

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris'te REKOMBİNANT KİMOZİN ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma ERSÖZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

EKİM 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



***Pichia pastoris*'te REKOMBİNANT KİMOZİN ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma ERSÖZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

EKİM 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pichia pastoris'te REKOMBİNANT KİMOZİN ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma ERSÖZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 31/10/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL

Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

ÖZET

Pichia pastoris'te REKOMBİNANT KİMOZİN ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma ERSÖZ

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Ekim 2022; 111 sayfa

Bu tez çalışması, peynir endüstrisinde sütün pıhtılaştırılması amacıyla kullanılan kimozin enzimini yüksek verimlilikte üreten bir maya klonunun geliştirilmesi ve bazı temel üretim parametrelerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma kapsamında sığır gen kaynaklı kimozin enziminin *Pichia pastoris*'te farklı promotorlar kontrolünde, farklı konak hücrelerde rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim miktarının arttırılabilmesi amacıyla diploid hücre formlarında, yüksek gen kopyası içeren haploid klonlarda ve şaperon protein overekspresyonu ile enzim üretimi gibi yöntemler denenmiştir. Bu amaçla çalışmanın **ilk bölümünde** yabancı tip *P. pastoris* X33 hücrelerinde yapısal GAP promotoru altında enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Kimozin genini 1 kopya içeren haploid formdaki klon ile erlenmayer ölçeğinde 5.3 IMCU/mL, fermentör ölçeğinde ise 18 IMCU/mL değerlerinde enzim aktivitesi elde edilmiştir. Ancak bu klon ile enzim üretim seviyesi yetersiz kaldığı için verimi arttırabilmek amacıyla diploid formdaki hücreler ile enzim üretimi denenmiştir. Bu amaçla kimozin genini 1 kopya içeren okzotrof GS115(*his4*) ve JC220(*ade1*) konakçılarının eşleşme ile diploid formu oluşturulmuş ve bu formunda erlenmayer ölçekli üretimde 3 IMCU/mL enzim aktivitesi tespit edilmiş, fermentör üretimi denenmemiştir. Diploid formdaki bu hücrede haploid X33 hücrelerine göre daha düşük seviyede enzim üretimi görülmüştür. Sanayi boyutlu üretimlerde besleme prosesi açısından (ucuz besin kaynağı olan glukoz ile besleme) kolaylık sağlaması amacıyla çalışmanın bu kısmında yapısal GAP promotoru tercih edilmiş ancak düşük verimlilikten dolayı çalışmanın devamında promotor değişikliği yapılmıştır.

Çalışmanın **ikinci bölümünde** yapısal GAP promotoruna göre daha güçlü olduğu bilinen, etanol ile indüklenen sentetik *ADH2SNT5* promotoru kullanılmış, *P. pastoris* KM71 hücrelerinde enzim üretimi yapılmıştır. Erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimler sonucu 18 IMCU/mL civarında enzim aktivitesi elde edilmiş, fermentör ölçeğinde ise bu değer 45 IMCU/mL seviyesine ulaşmıştır. Ancak elde edilen bu değer artırılabilmesi amacıyla çalışmanın bir sonraki bölümünde kimozin genini yüksek kopya sayıda içeren çoklu kopyalı kimozin klonları oluşturulmuştur.

Çoklu kopyalı kimozin klonlarının elde edilmesi amacıyla çalışmanın **üçüncü bölümünde** in vitro koşullarda sentetik *ADH2SNT5* promotoru kontrolünde 4 kopyaya kadar sığır kimozini içeren *P. pastoris* KM71 klonları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu klonlarda erlenmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimlerde en yüksek enzim aktivitesi 6.3 IMCU/mL değeri ile 2 kopya kimozin geni içeren klonda tespit edilmiştir. Beklenenin aksine kimozin genini 2 kopya içeren klonda 1 kopyaya göre artış gözlemlenmişken daha yüksek kopyalarda ise azalma görülmüştür. Oluşturulan klonlarda kimozin gen kopya

sayısının artması ile üretilen enzim miktarı artsa da enzimin hücre dışına sekresyonunun tam olarak sağlanamadığı düşünülmektedir. Bu amaçla çalışmanın **dördüncü bölümünde** enzim üretim miktarının artırılabilmesi amacıyla yüksek kopyalı kimozin klonlarında, PDI şaperon proteininin ekstra 2 gen kopya sayısına kadar overekspresyonu sağlanmış ve protein üretim miktarlarına etkisi incelenmiştir. PDI overekspresyonu ile oluşturulan klonlar arasında erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimlerde en yüksek enzim aktivitesinin 8.2 IMCU/mL değeri ile 2 kopya kimozin ve 2 kopya PDI içeren klonda tespit edildiği görülmüştür. Bu klonlar ile fermentör ölçekli gerçekleştirilen üretimlerde ise elde edilen enzim aktivite değerleri 2 kopya kimozin içeren klonda 20 IMCU/mL seviyesinde iken 2 kopya kimozin+2 kopya PDI geni içeren klonda 39 IMCU/mL seviyesine ulaşmıştır. PDI overekspresyonu ile aynı klonun enzim aktivite değeri yaklaşık 2 kat artırılmış olmasına rağmen hedeflenen üretim yakalanamamıştır.

Çalışma kapsamında oluşturulan tüm klonlar arasında fermentör ölçeğinde 28°C ve pH 3 şartlarında gerçekleştirilen üretimlerde en yüksek enzim aktivitesi, 45 IMCU/mL değeri ile ikinci bölümde oluşturulan **pADH2SNT5αHIS4-BtCHY-C#12 (KM71)** klonunda tespit edilmiştir. Bu klonda enzim aktivite değerinin artırılması amacıyla farklı sıcaklık ve pH değerlerinde üretimler yapılmıştır. Denenen farklı sıcaklık ve pH'lar arasında en yüksek enzim aktivitesinin 75 IMCU/mL ile 24°C ve pH 4'te elde edildiği görülmüştür. Bu sebeple en yüksek enzim aktivitesini gösteren bu aday klon ile sanayi boyutlu üretim için fermentör ölçeğinde sıcaklık ve pH gibi bazı parametreleri belirlenmiş olan bir üretim prosesi geliştirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Diploid, fermantasyon, haploid, in vitro klonlama, kimozin, *Pichia pastoris*, PDI şaperon protein, yapısal GAP ve sentetik ADH2SNT5 promotörü

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL

Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RECOMBINANT CHYMOSIN PRODUCTION IN *Pichia pastoris*

Fatma ERSÖZ

PhD Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İNAN

October 2022, 111 pages

This thesis study was carried out to develop a yeast clone that produced the chymosin enzyme, which is used for milk coagulation in the cheese industry, with high efficiency and to determine some basic production parameters. In this study, bovine chymosin was produced in *Pichia pastoris* by recombinantly by using different host cells and promoters. To increase the production amount, methods such as diploid cell forms, haploid clones with high gene copies and chaperon protein overexpression have been tried. **In the first part of the study**, enzyme production was carried out under the structural *GAP* promoter in wild type *P. pastoris* X33 cells. With the clone containing 1 copy of the chymosin gene, enzyme activity was obtained at 5.3 IMCU/mL in the shake flask scale and 18 IMCU/mL in the bioreactor scale. However, the enzyme production level was insufficient with this clone, so enzyme production was tried with cells in diploid form to increase the yield. For this purpose, diploid cells were formed by mating of auxotroph GS115(*his4*) and JC220(*ade1*) hosts containing 1 copy of the chymosin gene, and in this form, 3 IMCU/mL enzyme activity was detected in shake flask scale production, and bioreactor production was not tested. In this part, the structural *GAP* promoter was preferred, but due to low efficiency, the promoter was changed the next part of this study.

In the second part of the study, ethanol induced synthetic *ADH2SNT5* promoter, which is known to be stronger than the structural *GAP* promoter, was used, and enzyme production was performed in *P. pastoris* KM71 cells. As a result of the productions carried out on the shake flask, the enzyme activity was around 18 IMCU/mL, and this value reached the level of 45 IMCU/mL at the bioreactor scale. To increase this value, in the next part of the study, multicopy chymosin clones were created.

In order to obtain multicopy chymosin clones, up to 4 copies of bovine chymosin gene under the control of synthetic *ADH2SNT5* promoter in *P. pastoris* KM71 cells were created in vitro conditions in **the third part of this study**. The highest enzyme activity was detected in the clone containing 2 copies of chymosin gene with an IMCU/mL value of 6.3 in shake flask scale production. Contrary to expectations, an increase was observed in the clone containing 2 copies of the chymosin gene compared to 1 copy containing clone, while a decrease was observed in higher copies. Although the amount of enzyme produced increases with the high copy chymosin clones, it is thought that the extracellular secretion of the enzyme is not fully achieved. For this purpose, **in the fourth part of the study**, to increase the amount of enzyme production, PDI chaperone protein was overexpressed up to 2 extra gene copy numbers in high copy chymosin clones and its

effect on protein production amounts was investigated. It was observed that the highest enzyme activity was detected in the clone containing 2 copies of chymosin and 2 copies of PDI with an IMCU/mL value of 8.2 in shake flask scale production. In the bioreactor scale productions, the enzyme activity values obtained were 20 IMCU/mL (for 2 copy chymosin clone) and 39 IMCU/mL (for 2 copy chymosin+2 copy extra PDI gene containing clone), respectively. Although the enzyme activity value of the same clone was increased approximately 2-fold with PDI overexpression, the targeted production could not be achieved.

Among the all clones, the highest enzyme activity was detected in the **pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71)** clone, which was created in the second section with 45 IMCU/mL value in the fermentor scale productions at 28°C and pH 3 conditions. To increase the enzyme activity, different pH and temperatures were tested at bioreactor scale production. It was observed that the highest enzyme activity (75 IMCU/mL) was obtained at 24°C and pH 4 among the different temperatures and pHs tested. For this reason, with this candidate clone, a production process has been developed for industrial-scale production, in which some parameters such as temperature and pH are determined at the bioreactor scale.

KEYWORDS: Chymosin, diploid, fermentation, haploid, in vitro cloning, *Pichia pastoris*, PDI chaperone protein, structural *GAP* and synthetic *ADH2SNT5* promoter

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL

Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bana rehberlik ederek kazandırdığı akademik öğrenimlerden dolayı danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN hocama sabrı, anlayışı, hoşgörüsü, sağduyusu ve nezaketi için ve bilgilerini, tecrübesini paylaşarak donanımlı bir laboratuvar ortamında çalışma imkânı oluşturduğu için çok teşekkür ederim. Kendisinden akademik kazanımlar başta olmak üzere sabır, azim ve en önemlisi de hoşgörülü olmayı öğrendim. Öğrencisi olduğum için kendimi her zaman şanslı ve mutlu hissettiğimi belirterek kendisine saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecim boyunca çalışmalarında destek vererek yönlendiren tez izleme komite üyeleri Sayın Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN ve Prof. Dr. Aysun ÖZKAN hocalarıma ve diğer jüri üyelerim Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL ve Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK hocalarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Yürütücülüğünü yaptığı projelerinde çalışırken kendisini tanıdığım Sayın Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK hocama laboratuvar çalışmalarında ve tezim sürecinde verdiği desteklerden dolayı çok teşekkür ederim. İlgisi, sevgisi, arkadaşlığı, birlikte vakit geçirirken hissettirdiği huzuru ve daha da önemlisi dostluğu için ayrıca minnettarım

Çalışma arkadaşlarım Gürkan YILMAZ ve Dr. Semiramis YILMAZ'a yardımları, arkadaşlıkları, destekleri ve yanımda olmasalar da her zaman bir telefon ucundaki mesafede oldukları için teşekkür ederim.

Desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen canım aileme çok teşekkür ederim.

En içten, en önemli ve en büyük teşekkürüm ise sevgili eşim, yol arkadaşım Süleyman ERSÖZ'e aittir. Kendisine anlayışı, sabrı, sevgisi için ve bu süre boyunca gece gündüz evlatlarımız ile hiç yorulmadan ilgilendiği, eksikliğimi hissettirmemek için çok çabaladığı için sonsuz teşekkürler.

Kendilerinden fazlasıyla vakit çalmama rağmen bana anlayış gösteren canım oğlum Nuri Cihan'ım ve canım kızım Ayşe Naz'ıma da sevgilerimi sunarım. Onların annesi olmak çok güzel, iyi ki hayatımdalar.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Kimozin Enziminin Özellikleri	3
2.2. Rekombinant Kimozin Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri	6
2.3. Pichia Pastoris Mayasında Rekombinant Kimozin Üretimi.....	9
2.3.1. Sığır kimozin enziminin üretimi.....	9
2.3.2. Bufalo, deve, keçi, Tibet sığır, tavşan ve beyaz balina gen kaynaklı kimozin enziminin üretimi.....	11
2.4. Rekombinant Protein Üretiminde Diploid Maya Hücrelerinin Kullanımı.....	16
2.5. Rekombinant Protein Üretimine Gen Kopya Sayısının Etkisi.....	19
2.6. Rekombinant Protein Üretiminde Şaperon Protein Kullanımı.....	21
3. MATERYAL VE METOD	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Gen kaynağı, suşlar ve plazmidler.....	29
3.1.2. Besiyerleri, kimyasallar, enzimler ve antibiyotikler.....	31
3.2. Metod	31
3.2.1. Kompetent bakteri ve maya hücrelerinin oluşturulması.....	31
3.2.2. DNA izolasyonu ve çoğaltılması.....	32
3.2.3. Defosforilasyon ve ligasyon protokolleri	33
3.2.4. Kimozin üretiminde kullanılan ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ve <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu	33
3.2.4.1.pGAPZaBtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması	33
3.2.4.2.pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması.....	34
3.2.4.3.Yüksek gen kopyalı pADH2SNT5 α -BtCHY (1-4 kopya) ekspresyon vektörlerinin oluşturulması	35
3.2.5. Ekspresyon vektörlerinin <i>P. pastoris</i> hücrelerine transformasyonu.....	38

3.2.6. Southern blot analizi ile maya genomuna entegrasyonun kontrolü.....	39
3.2.7. Yüksek kimozin gen kopyalı maya klonlarında PDI (protein disülfid izomeras) şaperonunun overekspresyonu.....	42
3.2.8. Yapısal GAP promotörü altında kimozin üretici diploid maya klonlarının oluşturulması	44
3.2.9. Erlenmayerde enzim üretimi	45
3.2.10. Süt pıhtılaştırma testi	46
3.2.11. SDS-PAGE analizi ve toplam protein miktarının belirlenmesi.....	46
3.2.12. Fermentör ölçeğinde üretim.....	47
3.2.13. İstatistiksel analizler	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Yapısal GAP Promotörü Kullanılarak Haploid ve Diploid Maya Klonlarında Kimozin Enzimi Üretimi.....	53
4.1.1. pGAPZ α BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması	53
4.1.2. pGAPZ α -BtCHY ekspresyon vektörünün <i>P. pastoris</i> X33, GS115 ve JC220 hücrelerine transformasyonu	54
4.1.3. Diploid maya hücrelerinin oluşturulması	54
4.1.4. Erlenmayerde enzim üretimi ile klon taraması.....	54
4.1.5. Fermentör ölçeğinde üretim.....	55
4.2. Sentetik ADH2 Promotörü Kontrolünde Haploid Maya Hücrelerinde Kimozin Enzimi Üretimi.....	59
4.2.1. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması	59
4.2.2. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün <i>P. pastoris</i> KM71 hücrelerine transformasyonu	61
4.2.3. Southern blot analizi ile gen kopya sayısının belirlenmesi	62
4.2.3.1. HIS4 probunun etkinliğinin ölçülmesi.....	62
4.2.3.2. HIS4 probu ile pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY#2 ekspresyon kasetinin KM71 maya genoma entegrasyonunun kontrolü.....	63
4.2.4. Erlenmayerde enzim üretimi ile klon taraması.....	64
4.2.5. Fermentör ölçeğinde üretim.....	65
4.3. Sentetik ADH2 promotörü kontrolünde yüksek gen kopyalı maya klonlarında kimozin enzimi üretimi	68
4.3.1. Sentetik ADH2 promotörü kontrolünde yüksek kimozin gen kopyalı ekspresyon vektörlerinin (pADH2SNT5 α -BtCHY (1-4 kopya)) oluşturulması	68
4.3.1.1. Kimozin genini 1 kopya içeren vektörün oluşturulması	68
4.3.1.2. Kimozin genini 2 kopya içeren vektörün oluşturulması	70

4.3.1.3. Kimozin genini 3 ve 4 kopya içeren vektörlerin oluşturulması	71
4.3.2. pADH2SNT5 α -BtCHY (1-4 kopya kimozin) ekspresyon vektörlerinin <i>P. pastoris</i> KM71 hücrelerine transformasyonu	71
4.3.3. Southern blot analizi ile gen kopya sayısının doğrulanması	72
4.3.4. Erlenmayerde enzim üretimi ile klon taranması.....	73
4.3.5. Yüksek kimozin gen kopyalı maya klonlarında protein disülfid izomeras (PDI)'in overekspresyonu.....	75
4.3.5.1. Southern blot yöntemi ile PDI geninin genoma entegrasyonunun kontrolü	76
4.3.5.2. PDI overekspresyonu ile oluşturulan klonlarda erlenmayer ölçeğinde kimozin üretimi	78
4.3.6. PDI overeksprese edilmiş yüksek kopyalı (2 kopya) kimozin klonlarında fermentör üretimi	79
4.4. Fermentör ölçeğinde kimozin üretimi için bazı üretim koşullarının optimizasyonu	81
4.4.1. ADH2SNT5 promotoru ile glukoz beslemeli fermantasyon	85
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇLAR	96
7. KAYNAKLAR	98
8. EKLER.....	104
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora tezi olarak sunduğum “*Pichia pastoris*’te Rekombinant Kimozin Üretiminin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

31/10/2022

Fatma ERSÖZ



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	: Mikro (10^{-6})
μ	: Spesifik gelişme hızı [$\text{g g}^{-1} \text{sa}^{-1}$]
J	: Joule
m	: Mili (10^{-3})
L	: Litre
M	: Molar
n	: Nano (10^{-9})
OD	: Optik yoğunluk (Optical Density)
V	: Volt
∞	: Sonsuz
kDa	: Kilo Dalton
α kazein	: Alfa kazein
β kazein	: Beta kazein
g	: Santrifüj kuvveti
kDa	: Kilo dalton
.	: Ondalık yazım ayracı
w/v	: Ağırlık/hacim

Kısaltmalar

bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albümin
BSM	: Temel tuz besiyeri
BMGY	: Tamponlanmış kompleks gliserol besiyeri
BMEY	: Tamponlanmış kompleks etanol besiyeri
BMMY	: Tamponlanmış kompleks metanol besiyeri

ÇO	: Çözünmüş oksijen
DCW	: Kuru hücre ağırlığı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
gDNA	: Genomik DNA
dsDNA	: Çift zincirli DNA
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
DIG	: Digoksinin
EtOH	: Etanol
IMCU	: International Milk Clotting Unit
GAP	: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
LB	:Luria-Bertani
LiAc	: Lityum asetat
MD	: Temel glukoz besiyeri (minimal dekstroza)
NFW	: Nükleaz arındırılmış su
OD	: Optik yoğunluk
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PDI:	: Protein disülfid izomeraz
SSC	: Tuzlu sodyum sitrat (Saline sodium citrate)
SU	: Soxhlet unit
TAE	: Tris asetat EDTA
TGS	: Tris-Glisin-EDTA
WCW	: Yaş hücre ağırlığı
YNB	: Maya azot kaynağı
YPD	: Maya pepton dekstroza

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>P. pastoris</i> 'te rekombinant protein üretiminin şematik gösterimi	7
Şekil 2.2. Rekombinant protein üretimine yönelik kombinasyonların şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.3. Yüksek gen kopyalı maya klonlarının oluşturulması amacıyla kullanılan tüm metotların şematik özeti.....	26
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan pGAPZ α A, pADH2-900 α A, ve pADH2SNT5 α vektör haritaları	30
Şekil 3.2. pGAPZ α BtCHY ekspresyon vektörünün oluşum aşamaları.....	34
Şekil 3.3. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulmasında kullanılan klonlama stratejisi	35
Şekil 3.4. In vitro koşullarda seri olarak klonlanan ekspresyon kaseti.....	36
Şekil 3.5. In vitro koşullarda oluşturulan 1 ve 2 kopyalıvektörlerinin oluşum şeması....	37
Şekil 3.6. <i>P. pastoris</i> mayasında protein ekspresyonu aşamasında klon seçim şeması.....	39
Şekil 3.7. Restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA'ların agaroz jelden membrana transferinin şematik gösterimi.....	41
Şekil 3.8. Southern blot analiz basamakları.....	42
Şekil 3.9. pADH2-900-PDI-HIS-Zeo vektör haritası	43
Şekil 3.10. Kimozin üretici diploid maya klonlarının oluşum şeması.....	45
Şekil 3.11. Fermentör üretim aşamalarının şematize edilmesi	48
Şekil 3.12. Laboratuvar ölçekli fermentasyonların gerçekleştirildiği Biostat B Twin fermentörü ve kontrol ekranı.....	49
Şekil 4.1. pGAPZ α BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması amacıyla vektör ve insert parçalarının jelden kesimi.....	53
Şekil 4.2. Ligasyon sonrası elde edilen pGAPZ α BtCHY içeren kolonilerde klonlama enzimleri ile yapılan doğrulama sonucu	53
Şekil 4.3. pGAP α -BtCHYvektörünün AvrII enzimi ile lineer hale getirilmesi	54
Şekil 4.4. Kimozin genini 1 kopya içeren haploid X33, GS115, JC220 ve diploid GS115xJC220 klonları ile yapılan erlenmayer ölçekli üretime ait SDS-PAGE görüntüsü.....	55

Şekil 4.5. pGAPZ α BtCHY#15 (X33) klonuna ait fermentör üretimi kontrol parametreleri grafiği.....	57
Şekil 4.6. pGAPZ α BtCHY#15 (X33) klonu ile pH 3 ve 28°C gerçekleştirilen fermentör üretim sonuçları.....	58
Şekil 4.7. pGAPZ α BtCHY#15 (X33) klonu ile pH 3 ve 28°C sıcaklıkta gerçekleştirilen fermantasyona ait örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	59
Şekil 4.8. XhoI-NotI restriksiyon enzimleri ile kesim sonrasında agaroz jelde görüntüleme	60
Şekil 4.9. Ligasyon sonrası elde edilen kolonilerde klonlama enzimleri ile yapılan doğrulama sonucu	60
Şekil 4.10. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY plazmidlerinde farklı restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen doğrulama analizi	61
Şekil 4.11. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY#2 vektörünün Kpn2I enzimi ile lineer hale getirilmesi.....	62
Şekil 4.12. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY#2 ekspresyon vektörünün transformasyonu sonucu zeosin içeren MD plakada gelişen klonlar	62
Şekil 4.13. HIS4 prob etkinliğinin ölçülmesi	63
Şekil 4.14. pADH2SNT5 α HIS-BtCHY ekspresyon vektörünü içeren klonlarda Southern blot analizi	63
Şekil 4.15. Oluşturulan klonlarda erlenmayer ölçekli gerçekleşen üretimin 72. Saat örneklerine ait SDS-PAGE analizi.....	64
Şekil 4.16. Seçilen klonlarla iki farklı zamanda gerçekleştirilen üretimlerde enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.17. Fermentör üretimi kontrol parametreleri grafiği.....	66
Şekil 4.18. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12(KM71) klonu ile pH 3 ve 28°C gerçekleştirilen fermentör üretim sonuçları	67
Şekil 4.19. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12(KM71) klonu ile pH3 ve 28°C sıcaklıkta gerçekleştirilen fermantasyona ait örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	67
Şekil 4.20. pAO815 vektörüne klonlanacak olan “ADH2SNT5 promotörü- α mating sinyal sekansı- Bt CHY geni- terminatör” bölgesinin gradient PZR ile çoğaltılması.....	68
Şekil 4.21. pADH2SNT5 α -BtCHY (1 kopya) ekspresyon vektörünün oluşturulması için vektör ve insert parçalarının agaroz jelde gösterimi	69

Şekil 4.22. pADH2SNT5 α -BtCHY-1C (1 kopya) ekspresyon vektörünün BglII ve BamHI enzimleri ile kesim sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü	69
Şekil 4.23. pADH2SNT5 α -BtCHY-1C (1 kopya kimoziin) plazmidlerinde farklı restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen doğrulama analizi	70
Şekil 4.24. pADH2SNT5 α -BtCHY-2C (2 kopya kimoziin) için jel görüntüleri.....	70
Şekil 4.25. pADH2SNT5 α -BtCHY-2C (2 kopya kimoziin) plazmidinin BglII-BamHI enzimleri ile kesim sonucu agaroz jelde kontrol edilmesi	71
Şekil 4.26. In vitro yöntemlerle elde edilen çoklu kimoziin kopyalı plazmidlerin lineer hale getirilmesi	72
Şekil 4.27. İn vitro klonlama yöntemleri ile elde edilen, MD agarda gelişen klonlar	72
Şekil 4.28. Çoklu kimoziin kopyalı klonlarda gen kopya sayısının Southern blot ile doğrulanması	73
Şekil 4.29. Yüksek kopyalı kimoziin (1-4 kopya) klonlarda 96. saat süpernatantlarının SDS-PAGE analiz sonucu.....	74
Şekil 4.30. pADH2-900-PDI-HIS-Zeo vektör haritası	75
Şekil 4.31. pADH2-900-PDI-HIS-Zeo vektörünün, kimoziin içeren klonlara transformasyonu sonucu YPD+zeosin plakada gelişen koloniler.....	76
Şekil 4.32. Çoklu kimoziin kopyalı klonlarda PDI overeksprese edilen klonlarda Southern blot görüntüsü	77
Şekil 4.33. PDI overeksprese edilmiş farklı kopya sayıda kimoziin geni içeren klonlarda erlenmayer üretiminin SDS-PAGE analizi (tüm klonlar ekstra 1 kopya PDI geni içerirken * işaretli klon ekstra 2 kopya PDI geni içermektedir)	78
Şekil 4.34. PDI overeksprese edilmiş farklı kopya sayıda kimoziin geni içeren klonlarda erlenmayer üretimi sonucu enzim aktivitesi değerleri	79
Şekil 4.35. 2 kopya kimoziin klonu ve ekstra 2 kopya PDI içeren klonlarda gerçekleştirilen fermentasyon sonuçları. (a: 2 kopya kimoziin geni içeren klonla ait SDS-PAGE görüntüsü.....	80
Şekil 4.36. Çalışma kapsamında farklı teknikler ile oluşturulan klonlar ile erlenmayer üretimi sonucu enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılması	81
Şekil 4.37. Fermentör çalışmalarına devam edilen pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonundan türetilen alt klonlarla gerçekleştirilen üretime ait SDS-PAGE analizi.....	82
Şekil 4.38. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile farklı sıcaklık ve pH'larda fermentör ölçeğinde gerçekleşen üretim sonuçları)	83

Şekil 4.39. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile farklı sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleştirilen fermantasyon üretimlerinin SDS-PAGE görüntüsü ...84

Şekil 4.40. Çalışma kapsamında seçilen bazı örneklerle ait karşılaştırmalı SDS-PAGE görüntüsü. 85

Şekil 4.41. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile glukoz içeren besiyerinde tamamlanan fermantasyona ait profil 86

Şekil 4.42. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile glukoz (a) ve etanol (b) besleme ile gerçekleştirilen fermantasyon sonucu SDS-PAGE görüntüsü 87

Şekil 4.43. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonunun glukoz ve etanol besleme ile gerçekleştirilen fermantasyonlarına ait enzim aktivite sonuçları.....88



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı <i>P. pastoris</i> konakçılarında rekombinant kimoziin enzimi üretimi	15
Çizelge 2.2. <i>P. pastoris</i> 'te rekombinant protein üretiminde şaperon protein kullanımının protein üretimi üzerine etkisine bazı örnekler	24
Çizelge 3.1. Zamana bağlı azalan oranda gliserol besleme hızı tablosu.....	51
Çizelge 3.2. Zamana bağlı artan oranda etanol besleme hızı tablosu	51
Çizelge 4.1. Çoklu kimoziin kopyalı klonlarda tespit edilen en yüksek enzim aktivitesi değerleri.....	74
Çizelge 4.2. Çoklu kimoziin kopyalı klonlarda PDI overekspresyonu sonucu zeosin oranına bağlı olarak gelişen transformantlar.....	76
Çizelge 4.3. PDI overeksprese edilen klonların içerdikleri ekstra PDI gen kopya sayısı.....	77
Çizelge 4.4. Aynı sıcaklıkta (24°C) farklı pH değerlerinde yapılan fermentasyonlara ait enzim aktivitesi, toplam protein miktarı ve yaş hücre ağırlığına ait verilerin istatistik olarak değerlendirilmesi	82
Çizelge 4.5. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonunun glukoz ve etanol besleme ile gerçekleştirilen fermentasyon sonuçları.....	87

1. GİRİŞ

Peynir üretim prosesinde süttten peynir eldesi sırasında sütü pıhtılaştırmak amacıyla farklı pıhtılaştırıcılar kullanılabilir. Bu pıhtılaştırıcılar bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcılar olarak sınıflandırılabilir. Bilinen bu farklı kaynaklı süt pıhtılaştırıcılar, genelde kimozen ve pepsin veya diğer gastik proteazların karışımı şeklinde elde edilmektedir. Ancak kimozen dışındaki diğer gastrik proteazlarda süt pıhtılaştırma aktivitesinin düşük, proteolitik aktivitesinin yüksek olmasından dolayı peynirde acı tat oluşumu, istenmeyen aroma bileşimi ve düşük verimlilik gibi problemler oluşturmaktadır. Bu sebeple peynir üretim prosesinde diğer süt pıhtılaştırıcılarından arındırılarak saf kimozen enziminin kullanımı tercih edilmektedir. Mevcut izolasyon yöntemlerinde kimozen enzimi diğer proteazlar ile kombine halde bulunduğu için enzimin rekombinant olarak üretimi ön plana çıkmıştır. Kimozen enzimi Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (American Food and Drug Administration, FDA) tarafından 1990 yılında onaylanarak gıda üretiminde kullanılan ilk rekombinant enzim olmuştur.

Rekombinant protein üretimi, hedef proteini kodlayan DNA bölgesinin, uygun klonlama teknikleri yardımıyla bir konak organizmaya aktararak o organizmada üretilmesi olarak tanımlanabilir. Rekombinant protein üretiminde geçmişten günümüze bakteri, maya, fungus ve memeli ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Her sistemin avantaj ve dezavantajları bulunmakta olup üretilen proteine, üretim prosesine, biyoaktivitesine ve hedeflenen üretim miktarına bağlı olarak kullanılacak ekspresyon sistemi değişmektedir. Konakçı organizmada protein ekspresyonunun başarılı bir şekilde yapılabilmesi için dikkat edilmesi gereken bazı parametreler vardır. **Rekombinant protein üretimi amacıyla bir proses tasarlanırken, seçilen konakçı ekspresyon sisteminin proteinin üretim sonrası ifadesinin kontrolü için gerekli DNA manipülasyonlarına olanak verebilmesi, hücre içi/dışı üretim yönteminin dizaynı, biyoproses kontrolünün kolaylığı, üretim sonrası kolaylıkla saflaştırılabilmesi ve biyoaktivitesini muhafaza etmesi gibi parametrelere dikkat edilmesi gerekmektedir.** Ayrıca “genden proteine” şeklinde ifade edilen bu proses tasarımının laboratuvar ortamından ölçek büyütme çalışmaları ile sanayi ölçekli üretim ortamlarına aktarılabilir olması ve maliyet açısından sürdürülebilirliği sağlanarak ekonomik boyutlarda üretim yapılabilmesi gerekmektedir.

Biyoteknolojik yöntemler ile üretilen proteinler, enzimler ve çeşitli moleküller hayatımızın birçok aşamasında kullanılmaktadır. Enzimlerin rekombinant üretiminde kullanılan maya ekspresyon sistemlerinden biri olan *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) maya ekspresyon sistemi homolog ya da heterolog protein ekspresyonunda genellikle kullanılmaktadır. Bu sistemin tercih edilmesindeki ana etkenler ekonomik üretim yapılabilmesi, klonlama ve üretim stratejilerinde gereken manipülasyonlara olanak sağlaması, yüksek ekspresyon seviyelerine çıkabilmesi, güçlü ve sıkı kontrol edilebilir promotorlarının olması, birçok ökaryotik post-translasyonel modifikasyonlara uyum sağlayabilir olması, ticari kit şeklinde satılabilir olması gibi özelliklerinden dolayı sıklıkla tercih edilen bir platformdur. *P. pastoris* ekspresyon sistemi günümüzde birçok proteinin rekombinant üretimi amacıyla sıklıkla kullanılan bir sistemdir.

Bu tez çalışmasının ana hedefi yüksek verimlilikte kimozen enzimi üretimidir. Bu amaçla *Bos taurus* (sığır) kaynaklı kimozen geni kullanılarak farklı klonlama

yöntemleriyle yüksek gen kopya sayılı klonların oluşturulması stratejisi denenmiştir. Farklı sayıda kimozen gen kopyası taşıyan klonlarda enzim üretim miktarları karşılaştırılarak seçilen klonlarda biyoreaktör ölçeğinde kontrollü şartlarda enzim üretimi yapılmıştır. Rekombinant sığır kimozen enziminin peynir üretiminde kullanılabilmesi amacıyla enzimin biyoproses dizaynı çalışılmış, laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde enzimin üretim sıcaklığı, pH'sı gibi temel üretim parametreleri belirlenmiştir. Dolayısıyla bu tez çalışması sonucunda, rekombinant sığır kimozen enziminin üretimi için bir klon ve biyoproses geliştirilmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

Türk Gıda Kodeksi'ne göre peynir; “Hammaddenin uygun bir pıhtılaştırıcı kullanılarak pıhtılaştırılması ve pıhtıdan peyniraltı suyunun ayrılmasıyla ya da sütün permeatının ayrılmasından sonra pıhtılaştırılmasıyla elde edilen, farklı sertliklerde ve yağ içeriklerinde, salamura ile ya da kuru tuzlama ile tuzlanarak ya da tuzlanmadan, starter kültür kullanarak ya da kullanmadan, telemesi haşlanarak ya da haşlanmadan, çeşnili ya da çeşnisiz olarak, tekniğine uygun olarak üretilen, olgunlaştırılmadan ya da olgunlaştırıldıktan sonra tüketilen, çeşidine özgü karakteristik özellikleri gösteren süt ürünlerini ifade eder.” şeklinde tanımlanmaktadır (Anonim 1).

Peynir üretim prosesinde süttten peynir eldesi sırasında sütü pıhtılaştırmak amacıyla farklı pıhtılaştırıcılar kullanılabilir. Bu pıhtılaştırıcılar bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcılar olarak sınıflandırılabilir. İncir, teleme otu, civan perçemi ve altın çiçek bitkisi gibi bazı bitkilerin özütleri bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcılara, *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis*, *Myxococcus xanthus* gibi bazı mikroorganizmalardan izolasyon yöntemi ile elde edilen izolatlar da mikrobiyal kaynaklı pıhtılaştırıcılara örnek verilebilir (Çakmakçı vd. 2017). Hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcılar ise doğumunun ilk günlerindeki buzağı, keçi koyun gibi hayvanların dördüncü midesinden (şirden) izole edilip kullanılan rennet olarak bilinmektedir. Rennetin genel bileşimi renninden (kimozin) oluşmakta, kalan kısmı ise pepsin olarak bilinmektedir. Hayvanın türüne, yaşına ve beslenme şekline göre rennet içerisindeki kimozin oranı %75-95 arasında değişmekte ve hayvanın yaşı ilerledikçe rennet içerisindeki kimozin enzimi oranı yerini pepsin ve diğer asit protezlara bırakarak azalmaktadır. Kageyama vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada doğumdan sonraki ilk 12 günlük süreç boyunca sıçan mide mukoza örnekleri Northern blotlama yöntemi ile incelenmiş olup ilk günden itibaren zimojen formdaki prokimozin önemli düzeyde salgılanırken 8. günde miktarı azalarak 12. günde neredeyse hiç kalmamış olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada doğumdan sonraki ilk günlerde hiç gözlemlenmeyen progastrisin 6 günden itibaren artan şekilde sentezlenmiştir. Kimozin enziminin hayvanın doğumundan sonraki birkaç gün içerisinde yerini progastrin gibi diğer proteazlara bırakması hayvansal kaynaklı süt pıhtılaştırıcıların endüstriyel kullanımında ciddi bir sınırlama getirmektedir. Ayrıca kimozin dışındaki diğer proteazlarda süt pıhtılaştırma aktivitesinin düşük, proteolitik aktivitesinin ise yüksek olmasından dolayı peynirde acı tat oluşumu, istenmeyen aroma bileşimi ve düşük verimlilik gibi problemler oluşmaktadır. Bahsedilen bu problemler ise son ürün olan peynirde olgunlaştırma ve depolama süreleri de düşünüldüğünde kalite kayıplarına sebep olmaktadır. Bu sebeple peynir üretim prosesinde diğer pıhtılaştırıcılara göre kimozin enziminin kullanımı ön plana çıkmaktadır.

2.1. Kimozin Enziminin Özellikleri

Uluslararası Biyokimya Birliği'nin enzim komisyonunca (EC) 1961'de yayınlanan karara göre sınıflandırılmada kimozin enzimi, 3. grup olan Hidrolazlar ailesinin 4. alt grubu olan Peptidazlar sınıfında yer almaktadır. Peptidazların kendi iç gruplandırılmasında da 23. sırada yer alan aspartik endopeptidazlar (pepsinojenler) ailesinin 4. üyesi olup literatürde EC 3.4.23.4 kodu, kimozin enzimi olarak bilinmektedir. Mide sindirim enzimleri olan bu pepsinojenler sentezlendiklerinde inaktif formları olan zimojen şeklinde salgılanmakta olup mide asidinin etkisi ile aktif formları olan *pepsin A*

(EC 3.4.23.1), *pepsin B* (EC 3.4.23.2), *gastriksin* (EC 3.4.23.3) ve *kimozin* (EC 3.4.23.4)'e dönüşmektedir (Kageyema T. 2002). Bu sebeple bu enzim grupları asit proteazları olarak da bilinmektedir. Pepsin ve mikrobiyal peptidazlar gibi bilinen diğer asit proteazları da süt pıhtılaştırmada kullanılmaktadır. Ancak fazlaca proteolitik aktivite göstermeleri, peynir üretiminde kimozone göre daha az stabil olmaları, peynirde acılaşmaya sebep olmaları, kazeini spesifik olmayan bölgelerden (kazeinin diğer fraksiyonları olan α s1- ve β - kazein) hidrolize ederek aşırı asit üretimine neden olmaları, istenmeyen aroma oluşumu, düşük verim gibi nedenlerle kullanımları sınırlıdır (Jiang vd. 2012). Ayrıca bu doğal izolatlar hem kalite yönünden yetersiz kalmakta hem de miktersal olarak sınırlı şekilde izole edilebilmektedir.

Süt endüstrisinde kullanılan bu pıhtılaştırıcılar, sütü pıhtılaştırma ve proteolitik aktivitelerine göre karakterize edilmektedir. **Sütü pıhtılaştırma aktivitesi (C)**, enzimin sütteki kapa (κ) kazeinin Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ bağımlı spesifik olarak kırarak sütü pıhtılaştırması olarak tanımlanırken, **proteolitik aktivite (P)** ise enzimin kazeindeki herhangi bir bağı kırması olarak tanımlanmaktadır. Bu iki özelliğin oranının (C/P) yüksek olması, süt pıhtılaştırıcı enzimin kalite özelliğini yansıtmaktadır. İyi kalitede peynir üretebilmek için enzimin düşük proteolitik aktiviteye sahip olması, κ -kazeindeki Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ bağına spesifik olması ve peyniraltı suyunda kolay denatüre olması gerekmektedir. Aksi takdirde peynir üretimi esnasında aşırı proteolitik aktivite, verim kaybına ve üründe zayıf aromaya sebep olmaktadır (Fox ve McSweeney 1997). Sığır sütünü pıhtılaştırmada sığır kimozininin referans (%100) alındığı bir çalışmada farklı pıhtılaştırıcıların C/P oranları karşılaştırılmış ve bu oranlar, sığır kimozininde 1, domuz kimozininde 2.1, *M. pusillis* proteazında 0.22, *M. miehei* proteazında 0.13 ve sığır pepsininde 0.05 olarak bulunmuştur (Kappeler vd 2006). Yine aynı çalışmada deve gen kaynaklı kimozin enziminin rekombinant klonlama teknikleri kullanılarak %100 saf kimozin (%0 pepsin veya diğer koagülantlar) olarak üretimi sağlanmış, sığır sütündeki pıhtılaştırma etkinliği test edilmiş ve C/P oranı 7 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak süt pıhtılaştırıcı enzim/ler içerisinde kimozin enziminin içeriği % olarak yükseldikçe düşük proteolitik aktivitede ve istenilen kalitede peynir yapımı amacıyla kullanılabilir olduğu sonucuna varılmaktadır.

Kimozin enzimi süt proteinlerinin yaklaşık olarak %80'ini oluşturan kazeinin alt fraksiyonu olan κ -kazeinde, Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ arasında bulunan peptid bağımlı kırarak kazein taneciklerinin kararsız bir hal almasını sağlamaktadır. Böylelikle κ -kazein kalsiyumparakazeinat ve kazeinomakropeptite dönüşür ve sütün pıhtılaşarak çökelti oluşturması ile peynir üretimi gerçekleşir (Fox and McSweeney, 1997).

Buzağı rennetinin başlıca komponenti olan kimozin enzimi midede önce 381 aminoasitlik **preprokimozin** formunda (42.179 kDa) sentezlenmekte, daha sonra endoplazmik retikulumda 16 aa uzunluğundaki öncü sinyal sekansı uzaklaştırılarak inaktif formdaki 365 aminoasitlik **prokimozin** halini (40.477 kDa) almaktadır. Zimojen formdaki bu prokimozinin ise midenin asidik pH şartlarında amino ucundaki 42 aminoasitlik pro-peptid kısmı kesilerek **aktif kimozin** formuna (35.653 kDa) dönüşmekte ve biyolojik olarak etkinliğini bu aktif formunda göstermektedir (Vallejo vd. 2008, Nosedá vd. 2014).

Enzimin moleküler ağırlığı 23-49 kDa arasında değişmekte olup moleküler büyüklükler arasındaki bu farklılık genel olarak gen kaynağının farklı olması ve

translasyon aşamasında proteinin glikozilasyonundan kaynaklanmaktadır (Kumar vd. 2010). Ökaryotik sistemlerde protein sekanslarındaki aminoasit diziliminde N-X-S/T (asparajin-X aminoasit-serin/treonin) sıralamasının görüldüğü noktalardaki asparajin aminoasitlerine çeşitli glikan grupları bağlanmaktadır. Çeşitli polisakkarit zincirlerinin proteinlere bağlanması olarak bilinen ve translasyon sonrası modifikasyonlar arasında en yaygın olarak görülen bu durum N-glikozilasyon olarak da tanımlanmaktadır. Glikozillenme sayıları ve bölgeleri ökaryotik sistemler ve gen kaynaklarına bağlı olarak değişmekte olup N-X-S/T sıralamasındaki X aminoasidi, Parodi (2000)'ye göre prolin dışındaki herhangi bir aminoasit olarak tanımlanmaktadır. Protein sentezi sırasında ya da sonrasında meydana gelen bu glikozillenmelerin pozisyonu ve sayısı, proteinin katlanmasını, doğru disülfid bağlarının oluşumunu ve bazı kinetik parametreleri de (termal stabilite gibi) etkilemektedir (Shental-Bechor vd. 2008). Sığır kimozin geninde 230.(Asp²³⁰-Pro-Ser), 310.(Asp³¹⁰-Leu-Ser) ve 349.(Asp³⁴⁹-His-Ser) aminoasitlerinde olmak kaydıyla potansiyel 3 tane glikozillenme bölgesi bulunmakta ancak 230. aminoasitteki (Asp²³⁰) asparajinden sonra prolin aminoasidi geldiği için 3 glikozillenme bölgesinin 2'ye düştüğü bilinmektedir.

Kimozin enziminin diğer fizikokimyasal özelliklerine bakıldığında ise yine gen kaynağına bağlı olarak izoelektrik noktasının 4.6 ile 5.5 arasında değiştiği, bağıl süt pıhtılaştırma aktivitesinin genelde 5.5-6.8 pH ve 37-55°C sıcaklık aralıklarında en yüksek oranda gözlemlendiği bildirilmiştir (Kumar vd. 2010). Yine aynı çalışmada farklı gen kaynaklı kimozin enzimlerinin SDS-PAGE analizi sonucunda farklı sayıda band profili oluşturduğu (1-4 arası bant) ve buna bağlı olarak farklı moleküler büyüklükte protein varlığı gözlemlenmiştir.

Kimozin enzimi, doğasında iki farklı allelik formda bulunmakta olup aminoasit profili incelendiğinde 286. sırasındaki aminoasit aspartikasit ise kimozin A, glisin ise kimozin B olarak sınıflandırılmaktadır. Kimozinin A formunun κ -kazeine daha çok spesifik olduğu fakat stabilitesinin iki allelik form içinde daha yaygın bulunan B formuna göre daha az olduğu bildirilmiştir (Danley vd. 1988).

Kimozin enziminin buzağı gibi doğal kaynaklardan izolasyonunda enzimin saf olarak değil de pepsin ile karışım şeklinde izole edilebilir olmasından dolayı peynirde daha fazla proteoliz oluşmakta ve bazı peptidlerin peyniraltı suyuna geçmesiyle verim kaybı gerçekleşmektedir. Hem bu sınırlamalar hem de izole buzağı renneti üretimi için çok fazla sayıda buzağının kesilip katledilmesi gibi etnik problemlerden dolayı ve peynir endüstrisinde aynı standart kalitede süt pıhtılaştırıcı enzim talebine karşılık kimozin enziminin rekombinant DNA teknolojisi teknikleri ile saf (%100) kimozin şeklinde üretimi ön plana çıkmaktadır. Kimozin enziminin rekombinant olarak üretilmesiyle sütü pıhtılaştırmada saf kimozin kullanıldığında peynir üretiminde yüksek verimlilik elde edilmektedir. Ayrıca rekombinant kimozin kullanımı, enzimin her zaman standart kalitede olmasından ve düşük proteolitik aktiviteye sahip olmasından dolayı peynir prosesinde ön görülebilir pıhtı oluşumu ile standardize ürün üretilmektedir. Hayvan dokularından izolasyon yöntemi ile elde edilmediği için de vejeteryan beslenme tarzına uygunluğu enzimin kullanımında avantaj olarak sayılmaktadır (Kumar vd. 2010).

2.2. Rekombinant Kimozin Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri

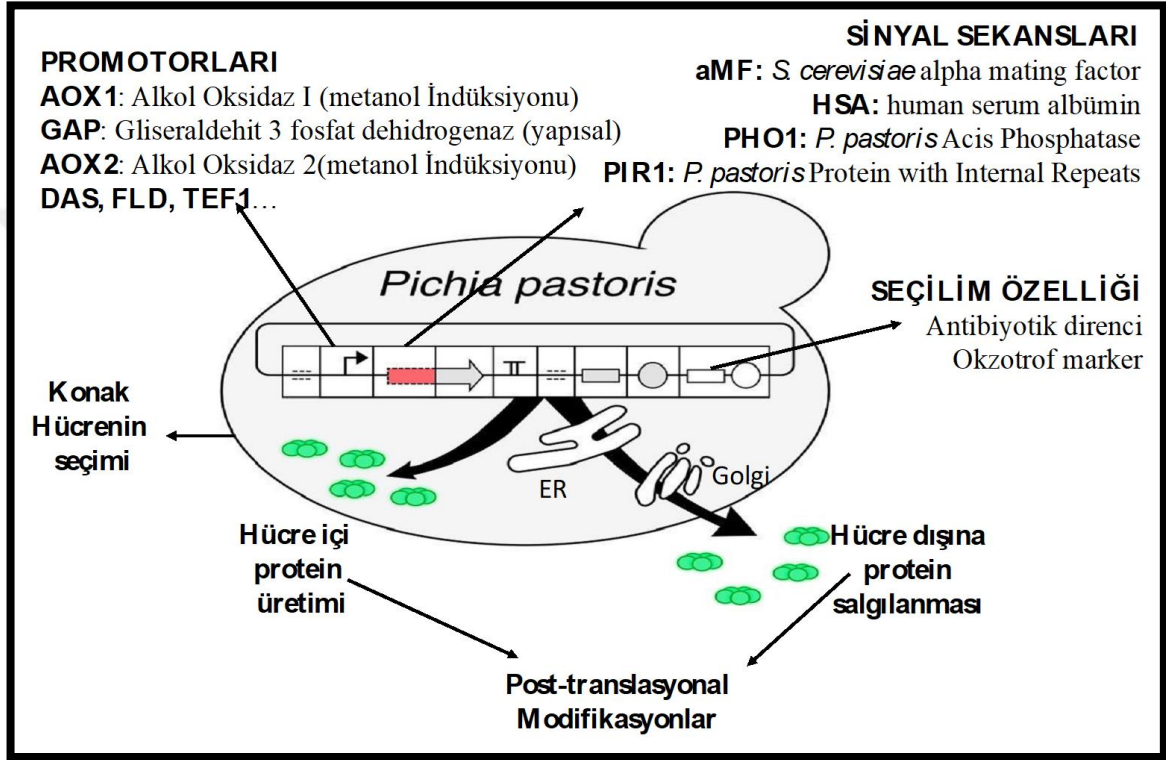
Rekombinant protein üretimi, hedef proteini kodlayan DNA bölgesinin uygun klonlama teknikleri yardımıyla bir konak organizmaya aktarılarak o organizmada ekspresyonunun yapılması olarak tanımlanabilir. Konakçı organizma (ekspresyon sistemi) seçilirken konakçının hücre büyüme karakteristiği, ekspresyon seviyesi, hücre içi/dışı ekspresyon özelliği ve hedef proteinin biyolojik olarak ifade edilmesinde önemli olan translasyon sonrası modifikasyona uyumu gibi özelliklere dikkat edilmesi gerekmektedir. Rekombinant protein üretiminde geçmişten günümüze bakteri, maya, fungus ve memeli ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. *E. coli* gibi bakteriyel ekspresyon sistemlerinin kullanımında bakteri hücrelerinin hızlı büyümesi, ucuz substrat kullanımı, ekspresyon vektörü ve mutant konakçı sayısının çok olması gibi avantajları olsa da hedeflenen proteinin üretiminin hücre içerisinde gerçekleşmesi ve inklüzyon cisimcikleri oluşturmasıyla saflaştırma maliyetinin yükselmesi dezavantajları olarak sayılabilir. Fungus hücrelerinde hedef proteinin üretimi yüksek miktarlarda üretilebilmekte ancak fungusların misel yapılı olmalarından dolayı hücre geliştikçe ortamda homojen karıştırma sağlanamamakta, fermantasyonun kontrolü zorlaşmakta ve standardize ürün üretimine bir kısıtlama oluşmaktadır. Bahsedilen bu dezavantajlardan dolayı hem hücre dışı ekspresyon yeteneğine sahip hem de fermantasyon ortamının daha kontrol edilebilir olmasından dolayı *K. lactis*, *S. cerevisiae* ve *P. pastoris* gibi çeşitli maya ekspresyon sistemleri ön plana çıkmıştır (Ersöz, F. 2016 ve Çelik vd. 2012).

P. pastoris hem araştırma ölçeğinde hem de endüstriyel ölçekte, miligramdan grama ulaşan miktarlarda protein ekspresyonu sağlayan bir mayadır. *P. pastoris* konakçısının diğer ekspresyon sistemlerine göre sahip olduğu avantajları, rekombinant proteinin yüksek oranda üretilmesi (Richter vd. 2006), hızlı büyümesi, glikozilasyon ve katlanma gibi post traslasyonel modifikasyonlara uyumu (Cereghino vd. 2002), proteinin ekstraselüler olarak üretimi (Peng vd. 2004), basit moleküler manipülasyonlara olanak sağlaması, doğal ve sıkı kontrol edilebilir bir çok promotora sahip olması (Cregg vd. 2000), ve minimal besi ortamında yüksek biyokütle üretiminin sağlaması (Hong vd. 2002) olarak sıralanabilir. Kompleks büyüme ortamı ve kültür şartları gerektirmemesi, az miktarda besiyeri kullanarak yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşabilmesi, çok az endojen protein üretmesi de saflaştırma basamaklarında büyük kolaylık sağlamaktadır (Macauley-Patrick vd. 2005). Patojen ve toksik olmamasından dolayı rekombinant protein üretimi amacıyla laboratuvar çalışmalarında uzun bir süredir güvenle kullanılmaktadır (Ciofalo vd. 2006). Ayrıca son zamanlarda yapılan bir çalışmada *P. pastoris* X33 yabanil tip suşunun probiyotik özelliği araştırılmış, *P. pastoris* X33 ilave edilerek hazırlanmış 2 aylık bir diyet programında beslenen fareler üzerinde *Salmonella Typhimurium*'a karşı antibakteriyel aktivitesi bulunduğu tespit edilmiştir. *S. bouldardii* ile beslenen farelerin kontrol olarak kullanıldığı bir başka çalışma sonucuna göre *P. pastoris* X33 suşunun probiyotik özelliğe sahip olduğu da belirlenmiştir (Correa-França vd. 2015).

Philips petrol şirketi tarafından yaklaşık 50 yıl öncesinde metanolü kullanarak geliştirilen maya hücreleri, hayvan beslenmesinde katkı şeklinde tek hücre proteini olarak kullanılmış, ancak 1970'li yıllarda artan metanol fiyatından dolayı üretimi artık ekonomik olmamıştır (Wegner G. 1990). Bu yıllardan sonra bu platformun, insan lizozimi (Oka vd. 1999), insan büyüme hormonu (Khasa vd. 2007), insan insülin hormonu (Hang vd. 2008), insan serum albümini (Kobayasi vd. 2000), antikor IgG1 (Potgieter vd. 2010) gibi **terapötik proteinlerin üretimi** ve galaktozidaz (Zhang vd. 2005), lipaz (Zhao vd. 2008),

ksilanaz (Karaoğlu vd. 2014), transglutaminaz (Türkanoglu-Özçelik vd. 2019a) ve kimozi (Ersöz vd. 2019) gibi birçok **endüstriyel enzim üretimi** için kullanımı ön plana çıkmıştır.

Rekombinant protein üretiminde uzun yıllardan beri güvenle kullanılan bu sistemde protein ekspresyonu için önemli olan bazı parametreler şekil 2.1’de özetlenmiştir. Rekombinant protein üretiminde hedeflenen proteinin üretimi için optimal şartları tasarlanarak en uygun promotor, sinyal sekansı, konak hücre seçimi kombinasyonunu oluşturmak en önemli aşamadır.



Şekil 2.1. *P. pastoris*’te rekombinant protein üretiminin şematik gösterimi (Ahmad vd. 2014’ten uyarlanmıştır)

Protein üretimi için en uygun dizaynı oluştururken ilk olarak konak hücrenin seçilimi yapılmakta olup *P. pastoris* mayasının tüm ekspresyon suşları, yabancı tip olarak bilinen NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL) suşundan türetilmiştir. Yabancı tip olarak bilinen bu suşta herhangi bir okzotrofik özellik bulunmamakta olup *P. pastoris*’in diğer bazı **okzotrof suşları** (GS115(*his4*), GS190(*arg4*), JC220(*ade1*), JC254(*ura3*), GS200(*arg4 his4*), JC227(*ade1 arg4*), JC304(*ade1 his4*), JC305(*ade1 ura3*), JC306(*arg4 ura3*), JC307(*his4 ura3*) ve diğer 3-4’lü okzotroflar) protein üretiminde tercih edilmektedir. Ayrıca **proteaz silinmiş bazı suşları da** (KM71($\Delta aox1$: : *SARG4 his4 arg4*), MC100-3($\Delta aox1$: : *SARG4* ($\Delta aox2$: : *Phis4 his4 arg4*), SMD1165(*prb1 his4*), SMD1163(*pep4 prb1 his4*) ve SMD1168($\Delta pep4$: : *URA3 his4 ura3*) protein üretiminde kullanılmaktadır (Cereghino vd. 2000).

P. pastoris mayası ile gerçekleştirilen rekombinant protein üretiminde önemli olan bir diğer parametre ise kullanılan promotordur. *P. pastoris*'in **indüklenebilen promotorları** *AOX1* (metanol ile indüklenen), *DAS* (metanol ile indüklenen), *FLD1* (metanol veya metilamin ile indüklenen), *ICL1*(glukoz ile baskılanan, etanol ile indüklenen), *PHO89* (fosfat yokluğuyla indüklenen), *THI11*(tiamin ile baskılanan), *ADH1* (glukoz ve metanol varlığında baskılanan, gliserol ve etanol ile indüklenen), *ENO1* (glukoz, metanol ve etanol varlığında baskılanan, gliserol ile indüklenen) ve *GUT1* (metanol ile baskılanan, glukoz, gliserol ve etanol ile indüklenen) şeklinde sıralanmakta olup genellikle güçlü promotorlar olarak bilinmektedir. İndüklenebilen promotorlara göre daha zayıf olan **yapısal promotorları** ise *GAP* (glukoz ile ekspresyon), *TEF1* (glukoz ve gliserol ile ekspresyon), *PGK1* (glukoz ile ekspresyon) olarak sıralanmaktadır (Ahmad vd. 2014). Yapılan çalışmalarda hedef proteinin üretim dizaynında proteinin bazı karakteristik özelliklerine (toksik protein ise yapısal promotor yerine indüklebilen promotor tercihi gibi) ve karbon kaynağı tercihinine göre (ucuz karbon kaynağı olan glukoz veya atık gliserol gibi sanayi atıkları) uygun promotor seçilimi yapılmaktadır.

Protein ekspresyonunda bir diğer önemli parametre üretimin hücre içinde gerçekleştirilmesi veya hücre dışına sekresyonun yapılması olarak bilinmektedir. Hücre içinde gerçekleştirilen üretimlerde genellikle yüksek ekspresyon görülmektedir, fakat hedef proteinin *P. pastoris*'in kendi proteinlerinden arındırılarak saflaştırılması zor olmaktadır. Bu sebeple hedef protein üretiminde hücre dışına endojen protein salınımının az olmasından dolayı hücre dışına sekresyon sağlanması saflaştırmada büyük kolaylıklar sağlamaktadır (Macauley-Patrick vd. 2005. Hücre dışı ekspresyonda genellikle çeşitli sekresyon sinyallerinin kullanımı görülmekte olup *S. cerevisiae* α -mating factor (**α -MF**) pre-pro sinyal sekansı, *P. pastoris* ile protein ekspresyonunda en çok tercih edilen sinyal sekansıdır. Kullanılan diğer sekresyon sinyalleri ise **HSA** (Human serum albümin), **PHO1** (*P. pastoris* acid phosphatase) ve **PIR1** (*P. pastoris* protein with internal repeats) olarak bilinmektedir. Karaoğlu vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, α -MF, HSA PHO1 ve PIR1 sekresyon sinyallerinin *P. pastoris*'te kodon optimize edilen ksilenaz enziminin rekombinant olarak üretimine etkisi araştırılmış ve 250 U/mL enzim aktivitesi ile diğerleri içerisinde en yüksek hücre dışı aktivite PIR1 sekresyon sinyalinin kullanımı ile tespit edilmiş, PIR1 sekresyon sinyalinden sonraki en yüksek aktivite ise 170 U/mL aktivite değeri ile *S. cerevisiae* α -mating factor (α -MF) kullanımında gözlemlenmiştir. Tibet sığırtısı-YAK (*Bos grunniensis*) kimozen kaynaklı kimozen enziminin *P. pastoris*'te hücre dışı üretimi üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise yukarıda bahsedilen 4 farklı sinyal sekansı denenmiş ve diğer sekanslar içerisinde *S. cerevisiae* α -mating factor (α -MF) kullanımı ile maksimum seviyede hücre dışına ekspresyon yapıldığı gözlemlenmiştir (Adıgüzel Ö. 2016).

Rekombinant protein üretiminde hedeflenen proteinin üretimi gerçekleşikten sonra biyoaktivitesi için bazı post-translasyonel modifikasyonlar gerekli olmaktadır. Translasyon sonrası gerçekleşen, ökaryotik sistemlerde görülen bu modifikasyonlar genelde fosforilasyon, glikozilasyon, asetilasyon, metilasyon, proteolitik parçalanma ve diğer modifikasyonlar olarak sınıflandırılmaktadır. Fosforilasyon, hücrede genellikle sinyal iletiminde kullanılmakta, lokalizasyon ve diğer protein interaksiyonlarını etkileyerek protein fonksiyonunu düzenlemektedir (Yalçın A. 2012). Bir diğer önemli modifikasyon olan glikozilasyon ise proteine çeşitli glikan ünitelerinin bağlanması olarak tanımlanmakta ve protein katlanmasını, reseptör bağlanmasını, çözünürlüğünü ve in vivo

protein aktivitesini etkilediği bilinmektedir (Dixon B.1991). Her protein için gereken modifikasyon türü ve sayısı farklı olmakla beraber bahsedilen tüm bu modifikasyonların kombine etkisi ile üretilen proteinin biyoaktivitesi arasında bir interaksiyon olduğu da bilinmektedir. *P. pastoris*'te kimozen enzimi üretimine glikozilasyonun etkisinin araştırıldığı çalışmada, potansiyel 2 adet glikozillenme bölgesinin olduğu bilinen Tibet sığırları gen kaynaklı kimozen enzimi kullanılmış olup DNA sekansındaki bazı değişiklikler ile potansiyel glikozilasyon bölgeleri uzaklaştırılmış ve enzim üretimine etkisi incelenmiştir. Glikozile ve glikozile olmayan formdaki kimozen enzim üretimi arasında verim açısından önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir (Ersöz F. 2016).

Rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *P. pastoris* mayası ile gerçekleşen protein üretimlerinde şekil 2.1'de gösterilen parametrelere dikkat edilerek hedeflenen protein üretimi için en uygun kombinasyonun (kullanılan maya suşu, tercih edilen promotor ve sinyal sekansı gibi) seçilmesi protein üretiminde çok kritiktir. Ayrıca seçilen kombinasyon sonrasında elde edilen üretim suşlarında üretim gerçekleşmesi için tasarlanan üretim prosesinin de ölçek büyütme çalışmaları ile sanayiye aktarılabilir olması da bir diğer önemli faktördür. Bu sebeple endüstriyel boyutta enzim üretim sürecinde enzimin gen kaynağı, uygun suş seçilimi, promotor tercihi, hücre içi-dışı ekspresyon, üretim tasarımı, ekonomik olarak sürdürülebilir olması, saflaştırma süreci, karakterizasyon ve ürün üretimi gibi aşamaların dikkatle oluşturulması ve iyi tasarlanması gerekmektedir.

2.3. *Pichia pastoris* Mayasında Rekombinant Kimozen Üretimi

P. pastoris'te birçok enzimin rekombinant üretimi mevcut olup bu tez çalışmasında üretimi gerçekleştirilen kimozen üretimi ile alakalı çalışmalar incelendiğinde farklı gen kaynaklı (sığır, bufalo, deve, keçi ve Tibet sığırları) kimozen enzimlerinin, farklı *Pichia* konakçılarında (X33, GS115 ve SMD1168) ve farklı promotorlarda (indüklenebilir AOX1 veya yapısal GAP) rekombinant olarak üretildiği görülmektedir. Farklı gen kaynaklı kimozen enzimlerinin *P. pastoris*'te üretimleri aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

2.3.1. Sığır kimozen enziminin üretimi

Sığır kimozeninin *P. pastoris* konakçısında rekombinant üretimine yönelik Zhang vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada enzimin prokimozen formu indüklenebilir AOX1 promotoru kontrolünde hücre dışında eksprese edilmiş ve aktivitesi 12.2 SU/mL olarak bulunmuştur. Çalışma kapsamında sığır kimozenini doğal hali ile klonlanmış olup konakçı organizmaya uygun olacak şekilde herhangi bir kodon optimizasyonu yapılmamıştır. Bu çalışmanın referans olarak alındığı ve Espinoza-Molina vd. (2016) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise *Pichia*'ya göre kodon optimizasyonu yapılmış sığır prokimozenini yine AOX1 promotoru kontrolünde, pPICZαA plazmidinde, aynı erlenmayer üretim şartlarında ekstraselüler olarak üretilmiş ve enzim aktivitesi 146 SU/mL olarak bulunmuştur. Yukardaki iki çalışma sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde konakçı organizmaya uygun kodon optimizasyonu yapmanın kimozen enzimi üretim verimliliğini yaklaşık 12 kat arttırdığı gözlemlenmekte ve kodon optimizasyonunun rekombinant protein üretiminde raporter genin ifade düzeyinde artırıcı etkiye sahip olabileceği sonucuna varılmaktadır.

Sığır pro-kimozininin *P. pastoris*'te rekombinant olarak üretimi üzerine Jiang vd. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise yapısal GAP promotoru kontrolünde erlenmayer ölçeğinde 30°C üretim sıcaklığında gerçekleştirilen üretimde süpernatant örneklerinde 37.44 U/mg spesifik aktivite ölçülmüşken, saflaştırma sonucu enzimin spesifik aktivitesi yaklaşık 100 kat artarak 3705 U/mg olarak tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada sığır kimozininin sadece κ -kazeine etki ettiğini göstermek amacıyla saflaştırılan kimozin örneği kazein proteininin fraksiyonları olan α , β ve κ -kazein ile ayrı ayrı muamele edilmiş ve α ve β kazeine herhangi bir etki göstermezken sadece κ -kazeinin parçalanarak yeni bir hidrolitik parçalanma ürünü oluşturduğu SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir.

Noseda vd. (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *P. pastoris*'e göre kodon optimize sığır kimozini *AOX1* promotoru kontrolünde rekombinant olarak üretilmiştir. Yapılan bu çalışmada oluşturulan “pPIC9K::prochy” ekspresyon kasetini içeren klon ile erlenmayer ölçeğinde 4 farklı pH değerli besi ortamında (3,4,5,6) ve 3 farklı sıcaklıkta (20, 25, 30°C) 120 saatlik süre boyunca enzim üretimi test edilmiş olup en yüksek kimozin aktivitesinin (yaklaşık olarak 3 IMCU/mL) tespit edildiği pH 4 değeri ve 25°C sıcaklık değerleri enzimin büyük ölçekte üretimi için en uygun şartlar olarak seçilmiştir. Ayrıca besi ortamının bileşiminde ilave besin maddelerinin kullanılmasının enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla, *AOX1* promotorunun indükleyici karbon kaynağı olan metanole ilaveten besiyerine sorbitol (50 g/L), askorbik asit (10 mmol/L) ve hem sorbitol hem askorbik asit birlikte ilave edilmiş olup kontrol grubu olarak sadece metanol beslemesi ile üretim yapılmıştır. İlgili besin maddelerinin düzenli aralıklarla besi ortamına ilavesi ile 25°C sıcaklık ve 4 pH değerinde erlenmayerde gerçekleşen üretimde en yüksek enzim aktivitesi sorbitol ve askorbik asidin birlikte kullanıldığı besleme profilinde yaklaşık 12 IMCU/mL olarak gözlemlenmiştir. Elde edilen bu şartlarda (pH 4, 25°C ve sorbitol+askorbik asit kombineli besleme profili) biyoreaktör şartlarında gerçekleşen 96 saatlik üretim sonucunda enzim aktivitesi 96 IMCU/mL değerine yükseltilmiş, saflaştırma işlemleri sonucunda ise 192 IMCU/mL değerinde bir enzim aktivitesi elde edilmiştir. Bu çalışma ile sığır kimozininin *P. pastoris*'te rekombinant olarak üretimi için sıcaklık, pH ve besin maddelerinin etkisi gibi bazı üretim parametreleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen kimozin enzimi üretici *P. pastoris* klonu (klon 1) ile aynı ekip bir sonraki çalışmasında analitik gliserole muadil olabilecek atık gliserol içeren besi ortamındaki, farklı başlangıç biyokütle (1.5, 3.2 ve 5.8 g/L) ve farklı spesifik büyüme hızlarında (μ ; 0.005, 0.01 ve 0.02) geliştirdikleri hücrelerde kimozin enziminin ekspresyon seviyesine bakmışlardır (Noseda vd. 2014). Erlenmayerde BSM besi ortamında 40 g/l atık gliserol kullanılarak gerçekleştirilen 96 saatlik üretimde 3 IMCU/mL enzim aktivitesi elde ederek rekombinant kimozin üretiminde atık gliserolün analitik gliserol yerine kullanılabileceği ve maliyeti düşürebileceği tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında denenen 3 farklı başlangıç hücre yoğunluğunun enzim üretimine etkisine bakıldığında ise yüksek hücre yoğunluğu (5.8 g/L) ile üretime başlamak enzim aktivitesini yaklaşık 6 IMCU/mL seviyesine çıkartmış olup buna bağlı olarak biyoreaktör ölçeğinde denenen 3 farklı spesifik hücre gelişim hızında gerçekleştirilen üretimde en yüksek enzim aktivitesi μ ; 0.01 değerinde elde edilmiştir. Bu 3 farklı spesifik gelişme hızlarındaki (μ ; 0.005, 0.01 ve 0.02) hücre biyokütle miktarları sırasıyla 138, 154 ve 172 g DCW/L (kuru hücre ağırlığı) olarak ölçülmüş olup bu veriler fermantasyonda yüksek enzim aktivitesi için yüksek hücre yoğunluğu gerektirmediğini ve büyüme hızı ile enzim üretimi arasında lineer bir ilişki olmadığını göstermektedir. En yüksek enzim aktivitesinin

gözlemlendiği μ ; 0.01 değerindeki fermentör üretiminin süpernatant örneği saflaştırılarak %95 saflıkta 768 IMCU/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir (Nosedá vd. 2014). Çalışma ile rekombinant kimozen üretiminin, atık gliserol kullanılarak uygun bir biyoproses dizaynı ile düşük maliyette ve yüksek verimlilikte gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir.

Aynı ekibin bir sonraki çalışmasında ise kimozen enzimini en yüksek verimlilikte üretici klonu bulmak amacıyla 120 adet klon taranmıştır (Nosedá vd. 2016). Bu amaçla 96 kuyucuklu üretim plakalarında zengin besiyerinde (YPD) gerçekleşen 96 saatlik metanol indüklemesi ile gerçekleşen üretim sonucunda en yüksek üretimi gerçekleştiren 15 klon seçilmiş ve sanayi üretiminde düşük maliyetli üretim hedefini gerçekleştirmek için içeriği belirlenmiş, karbon kaynağı olarak biyodizel atık gliserolu içeren BSM besi ortamında geliştirilmiştir. Erlenmayer ölçeğinde 144 saat metanol indüklemesi ile gerçekleşen bu üretim sonucunda 75 numaralı klon yaklaşık 3 IMCU/mL enzim aktivitesi ile en iyi üretici klon olarak seçilmiştir. Seçilen bu klon ile hücre gelişimi aşamasında atık gliserol, indükleme aşamasında ise saf metanol kullanılarak 4 aşamalı fermantasyon gerçekleştirilmiş ve 120 saatlik metanol indüklemesi sonucunda enzim aktivitesi 192 IMCU/mL değerine, saflaştırma sonrası ise 384 IMCU/mL değerine ulaşmıştır. Saflaştırılan örnek 3 farklı sıcaklıkta (5, 20 ve 37°C) 120 gün boyunca depolanmış ve 5°C depolamada enzimin 120 gün boyunca stabilitesini koruduğu, 20°C depolamada 50. günde aktivitesi neredeyse yarı yarıya azaldığı ve 37°C depolamada ise aktivitenin 20. günde yarıya indiği, 70. günde ise tamamen kaybedildiği gözlemlenmiştir. Çalışma kapsamında biyoreaktörde gerçekleştirilen 120 saatlik metanol indüklemesinden sonra süpernatantlarından ayrılan hücreler, hücre geliştirilmesi aşamasında (yaklaşık 2 gün) oluşan zaman kaybını önlemek amacıyla, aynı besi ortamında 72 saat boyunca 2 kez daha metanol ile indüklenebilir. İlk 120 saatlik metanol indüklemesi sırasındaki ortalama üretim verimliliği 1.39 IMCU/mL saat iken, 2 kez 72 saatlik indükleme aşaması da dahil edildiğinde ortalama üretim verimliliği 2.04 IMCU/mL saat değerine yükselmiştir. Böylece fermantasyon sonucunda aynı hücreler ile tekrar tekrar metanol indüklemesi gerçekleştirilerek gliserol besleme fazındaki oluşan zaman kaybı önlenmiş ve sanayi üretimi düşünüldüğünde yüksek verimlilikte, kısmen ekonomik bir biyoproses tasarlanmıştır.

Sığır kimozeninin *Pichia* ekspresyon sisteminde rekombinant üretimine yönelik Filkin vd. (2020) tarafından son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada prokimozen formundaki sığır kimozenini *P. pastoris* X33 yabanıl tip hücrelerinde (20 IMCU/mL verimlilikte) üretilmiş, seçilen klon ile fermentör ölçekli üretim gerçekleştirilmiştir. Fermentör üretiminden sonra süpernatantlara DEAE-Sefaroz ve fenil sefaroze kolonları ile iki aşamalı saflaştırma yapılmış %85-90 saflıkta 1000 IMCU/mL aktivitede enzim elde edilmiştir.

2.3.2. Buffalo, deve, keçi, Tibet sığır, tavşan ve beyaz balina gen kaynaklı kimozen enziminin üretimi

Amerika yaban sığır olarak da bilinen buffalo kaynaklı prepro, pro ve aktif kimozen formlarının *P. pastoris* yapısal GAP promotörü kontrolünde GS115 konakçısında ücre dışında üretiminin yapıldığı bir çalışmada sadece prokimozen formunda yaklaşık olarak 16340 U/mg protein (k-kazein substratında) üretimi gözlemlenmiş olup, prepro ve aktif formlarında enzimin üretimi gözlemlenmemiştir (Vallejo vd. 2008). Bu çalışma ile kimozen enziminin ilk defa bir maya konakçısında,

hücre süpernatantında, asit muamelesi ve nötralizasyon işlemleri sonucunda rekombinant olarak üretilebileceği gösterilmiştir. Yine bufalo kimozinin *P. pastoris*'te rekombinant üretimi ile alakalı Tyagi vd. (2017) tarafından yapılan başka bir çalışmada bufalo kimozin geni mRNA'dan elde edilmiş ve pPICZαA plazmidine klonlanmıştır. Daha sonra hem yabanıl tip X33 suşuna hem de proteaz aktivitesi silinmiş SMD1168H suşuna transforme edilmiştir. Seçilen klonlar ile BMMY besiyeri kullanılarak erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimlerde X33 suşundaki klonda 24.4 U/mL aktivite tespit edilirken SMD1168H suşunda 16.6 U/mL aktivite elde edilmiştir. Yabanıl tip suşta gözlemlenen yüksek üretim sonucu bu klon ile biyoreaktör ölçeğinde kimozin üretimi yapılmış ve 0.162 U/mg spesifik aktiviteli bu örneğe saflaştırma işlemi gerçekleştirilerek 4.56 U/mg spesifik aktivitede verim elde edilmiştir. Saflaştırılan örnekte moleküler ağırlık tayini için SDS-PAGE analizi yapılmış ve beklenildiği gibi 36 kDa hizasında tek bant olarak bufalo kimozinini tespit edilmiştir. Saflaştırılan bu örnek ile daha sonra mozeralla peyniri üretimi gerçekleştirilmiş ve standart kimozin olarak kullanılan mikrobiyal kaynaklı enzim ile karşılaştırıldığında verim, yağ içeriği, protein, tuz, nem ve pH değerleri birbirine çok yakın çıkmıştır.

Sığır kimozinine göre proteolitik aktivitesinin 7 kat daha az olduğu bilinen deve kimozin enzimi, Wang vd. (2015) tarafından *P. pastoris* GS115 konakçısında AOX1 promotörü kontrolünde hücre dışında proenzim formunda 37 mg/L verimlilikle üretilmiş olup asit aktivasyonu ve baz nötralizasyonundan sonra enzim aktivitesi 400 U/mL olarak ölçülmüştür. Ancak proenzim formunda üretilen enzimde aktivasyon ve nötralizasyon işleminin hem maliyetli hem de iş yükü gerektirmesinden dolayı üretilen besiyeri pH değeri ile enzimin aktivasyonunun yapılması hedeflenmiştir. Bu amaçla pH değeri 3.64 ile 6.76 değerleri arasında değişen YPM besi ortamlarında enzimin ekspresyonu gerçekleştirilmiş, süpernatant örneklerine SDS-PAGE analizi yapılmıştır. 6.76 ile 4.07 arasındaki pH değerli besiyerlerinde gerçekleşen üretimde 42 ve 45 kDa moleküler ağırlığında bantlar gözlemlenmiş, 3.64 ve 3.84 pH değerlikli ortamdaki üretimde ise 40 ve 43kDa moleküler ağırlığında iki bant tespit edilmiş ve süt pıhtılaştırma testine tabi tutulduklarında ise yine sadece 3.64 ve 3.84 pH değerli ortamdaki üretim süpernatantlarının pıhtı verdiği, diğer üretimlerde herhangi bir pıhtılaşma gözlenmediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar düşük pH değerli fermantasyon besiyerinde gerçekleşen üretimde ortamın pH değerinin etkisiyle, proenzim formunda üretilen kimozin enzimin herhangi bir ekstra aktivasyon işlemi gerektirmeden aktif formuna dönüştüğünü göstermiştir. Bu uygulama, sanayi üretiminde enzimin aktif formuna dönüştürülmesi açısından büyük kolaylık getirmektedir. Üretilen rekombinant kimozin enzimine sıcaklık, pH ve ortam kalsiyum konsantrasyonu açısından kısmi karakterizasyon işlemi yapılmıştır. Üretilen enzimin 2.5-6.0 pH değerleri arasında stabilitesini 37°C sıcaklıkta 8 saate kadar stabilitesini koruduğu gözlemlenmiş ve optimum pH değerinin 5.04 olduğu bulunmuştur. Enzimin farklı sıcaklıklarda 8 saatlik depolanması sonucunda 0-20°C arası depolamada enzim aktivitesinde herhangi bir kayıp gözlemlenmezken 40°C depolamada rölatif enzim aktivitesinin %37.5 olduğu 50°C'de ise tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışma kapsamında kimozin enzimi kazeinin fraksiyonları olan α, β- ve κ- kazeinleri ile muamele edilmiş ve sadece κ-kazein'e etki ettiği SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir. Deve kimozininin rekombinant olarak üretimi üzerine yapılan bir diğer çalışmada *Camelus bactrianus* gen kaynağı kullanılarak yapısal GAP promotörü altında üretilmiştir (Ahishev vd. 2021). Çalışmada enzimin rekombinant üretimi sonucunda

anyon ve katyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmasıyla 1412 U/mL aktivitede, 80 mg/L verimlilikte üretim gerçekleştirilmiştir.

Rekombinant olarak üretilen 4 farklı kimozen enziminin (bufalo, sığır, deve ve keçi kaynaklı) sıcaklık ve pH stabilizasyonlarının birbirleri ile karşılaştırılması üzerine Vallejo vd. (2012) yapılan diğer bir çalışma sonucunda en yüksek sıcaklık stabilitesinin deve kimozeninde, en düşük sıcaklık stabilitesinin ise keçi kimozeninde olduğu, pH stabilitesi açısından ise bu durumun tam tersi şeklinde; en yüksek pH stabilitesinin keçi kimozeninde en düşük pH stabilitesinin ise deve kimozeninde olduğu bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda keçi kimozeninin katalitik etkinliği ve fizyokimyasal özelliklerinin sığır kimozenine göre daha iyi olduğu ve peynir üretimi açısından rekombinant sığır kimozenine iyi bir alternatif olabileceği savunulmuştur. Vallejo vd. (2012) tarafından yapılan bu çalışmada keçi kimozenini *Pichia* yapısal promotörü kontrolünde erlenmayer ölçeğinde üretilmiş olup sığır kimozeninin spesifik aktivite değeri %100 alındığında rekombinant keçi kimozeninin %148 spesifik aktivitede üretimi gerçekleştirilmiştir. Keçi kimozeninin *P. pastoris*'te rekombinant olarak üretimi amacıyla Tyagi vd. (2016) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise keçi prokimozenini indüklenabilir AOX1 promotöründe yabancıl tip X33 hücrelerinde üretilmiştir. Erlenmayer ölçekli üretimde proteazların etkinliğinin azaltılması amacıyla kazein hidrolizat aminoasitleri, peyniraltı suyu proteinleri, et ekstraktı ve arpa ekstraktı gibi besin maddelerinin % 0.5 ile %2 arasındaki konsantrasyonlarının besiyerine ilave edilerek kimozen üretimine etkileri ayrı ayrı incelenmiş, maksimum enzim aktivitesi, kazein hidrolizat aminoasitlerinin %1.5 oranında besi ortamına ilave edilmesiyle 6100 U/mL olarak tespit edilmiştir. Erlenmayer üretiminde ulaşılan 6657 U/mg aktivite değeri fermentör üretiminde 8255 U/mg olarak ölçülmüştür, enzim aktivitesindeki bu artış fermentör ortamında karıştırmanın ve havalandırmanın daha fazla yapılabilmesi ve erlenmayer ortamına göre daha kontrollü fermentasyonun gerçekleşmiş olmasından kaynaklanmaktadır.

Bir diğer kimozen enzimi kaynağı olan *B. grunniensis* (Tibet sığır-YAK) kaynaklı kimozen enzimi, ilk defa Luo vd. (2016) tarafından *P. pastoris*'te rekombinant olarak üretilmiştir. Luo vd. (2016) tarafından yapılan bu çalışmada enzimin prepro-, pro- ve aktif formlarını kodlayan DNA bölgeleri PZR ile çoğaltılarak *P. pastoris* X33 hücrelerine klonlanmış ve erlenmayer ölçeğinde enzim üretim miktarları karşılaştırılmıştır. Metanol ile indüklenabilir AOX1 promotörü kontrolünde hücre dışında gerçekleştirilen 184 saatlik üretim sonucunda en yüksek aktivite değeri 14.55 SU/mL (Soxhlet Unit/mL) değeri ile pro-kimozen formunda ölçülmüş olup SDS-PAGE ile analiz edildiğinde 37kDa moleküler ağırlığında oluşan protein bandı ile enzimin varlığı doğrulanmıştır. *B. grunniensis* kimozen enziminin *P. pastoris*'te üretilmesinde, enzimin doğal formu olan glikozilasyonlu hali ve glikozilasyon bölgelerinin uzaklaştırılarak deglikozile formunun rekombinant olarak üretilmesi üzerine tarafımızca yapılan bir başka çalışmada ise enzimi hem doğal formu olan glikozile formda hem de deglikozile formda içeren *Pichia* klonları ile erlenmayer ölçeğinde metanol ile indüklenebilir AOX1 kontrolünde üretim gerçekleştirilmiş ve verimlilik açısından glikozilasyonun enzim üretiminde herhangi bir fark oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Ersöz F. 2016). Daha sonra glikozile formunu içeren klon ile gerçekleştirilen biyoreaktör ölçekli üretimde enzim aktivitesi 214 IMCU/mL olarak bulunmuş ve üretilen rekombinant enzimde optimum çalışma sıcaklığı ve pH değerleri sırasıyla 40°C ve pH 6-7 arası tespit edilmiştir. Elde edilen fermentör süpernatanı ve ticari olarak satılan sığır kimozen (rekombinant kaynaklı) enziminin kontrol olarak

kullanılmasıyla laboratuvar ölçekli beyaz peynir üretimi gerçekleştirilmiş ve beyaz peynir üretim verimliliği karşılaştırıldığında benzer sonuçlar bulunmuştur.

Tavşan (*Oryctolagus cuniculus*) gen kaynaklı kimozen enziminin rekombinant üretimi üzerine Alihanoglu vd. (2021) tarafından erlenmayer ölçeğinde yapılan bir çalışmada *P. pastoris* GS115 suşu kullanılmış, 30°C sıcaklıkta pH 5.5 ortamında gerçekleşen 96 saatlik üretim sonucunda, 0.5mM CaCl₂ ile hazırlanan rekonstitüye süt ile gerçekleştirilen enzim aktivitesi 1.4 IMCU/mL olarak tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada sığır, keçi, koyun, eşek ve deve gibi farklı süt kaynaklarının substrat olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen süt pıhtılaştırma testi sonucunda eşek sütünün substrat olarak kullanılmasıyla 40 IMCU/mL enzim aktivitesi tespit edilmiştir.

Son zamanlarda yapılan bir diğer çalışmada ise daha öncesinde denenmemiş olan beyaz balina (*Delphinapterus leucas*) gen kaynaklı kimozen enzimi rekombinant olarak üretilmiştir (Filkin vd. 2021). *P. pastoris* GS115 suşunda, fermentör ölçeğinde, pH 5.5 değerlikli BSM besiyerinde gerçekleştirilen üretimde 5 IMCU/mL enzim aktivitesi tespit edilmiş, 2 aşamalı DEAE ve fenil sefaroze ile saflaştırma sonrasında ise %85-90 saflıkta 230 IMCU/mL verimlilikte enzim aktivitesi gözlemlenmiştir.

Kimozen enziminin, farklı gen kaynaklarından alınarak farklı konakçı organizmalarda rekombinant olarak üretildiği bilinmektedir. Bu tez çalışması kapsamında konak organizma olarak seçilen *P. pastoris*'te kimozen enzim üretimi yapılan çalışmalar çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı *P. pastoris* konakçılarında rekombinant kimozi enzimini üretimi

Gen Kaynağı	<i>P.pastoris</i> konakçısı	Promotor	Üretim Miktarı	Referans
Bufalo	GS115	GAP	16340 U/mg (sp.aktivite)	Vallejo vd. 2008
	X33	AOX1	24.4 U/mL	Tyagi vd. 2017
Deve	GS115	AOX1	400 U/mL	Wang vd. 2015
	GS115	GAP	1412 U/mL*	Akischev vd. 2021
Keçi	X33	GAP	% 148.26 rölatif artış	Vallejo vd. 2012
	X33	AOX1	6100 U/mL	Tyagi vd. 2016
Tibet sığırı	X33	AOX1	14.55 SU/mL	Luo vd. 2016
	GS115(PDI)	AOX1	214 IMCU/mL	Ersöz vd. 2019
Tavşan	GS115	AOX1	40 IMCU/mL	Alihanoğlu vd. 2021
Beyaz balina	GS115	AOX1	230 IMCU/mL*	Filkin vd. 2021
Sığır	GS115	GAP	3705 U/mg (sp. aktivite)*	Jiang vd. 2012
	GS115	AOXI	96 IMCU/mL	Nosedada vd. 2013
	GS115	AOXI	768 IMCU/ml*	Nosedada vd. 2014
	GS115	AOXI	384 IMCU/mL*	Nosedada vd. 2016
	KM71H	AOXI	146 SU/ml	Espinoza-Molina vd. 2016
	X33	AOX1	1000 IMCU/mL*	Filkin vd. 2020

*Saflaştırma yapılan örnekleri göstermektedir.

2.4. Rekombinant Protein Üretiminde Diploid Maya Hücrelerinin Kullanımı

Rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *P. pastoris* taksonomik sınıflandırmada bira mayası mantarları bölümünden olup doğasında genelde vejetatif haploid formda bulunur ancak bazen diploid formda da gözlemlenmektedir. Vejetatif olarak üremeleri tomurcuklanma şeklinde gerçekleşmektedir. Haploid olan hücrelerde yaşam döngüsü mitoz bölünme-büyüme-tekrar mitoz bölünme şeklinde olup yüksek stresli ortamlarda genelde ölürlür. Bazı fungal haploid maya hücreleri, yaşamı için uygun olmayan bir ortamda (stres faktörü içeren ortam) bulunduğu kendilerini korumak için ortama eşleşme sinyali gönderen feromonlar salgılar ve potansiyel bir eşleşme çifti ile birleşerek diploid hücrelerini oluştururlar (Merlini vd. 2013). Mayalarda eşleşme, haploid formdaki hücrelerin bir ortamda karşılaşması sonucu, hücrelerin karşıt hücreye doğru füzyon oluşturmasıyla birleşerek diploid form oluşumu olarak tanımlanabilir. Diploid hücre oluşumunda, hücreler ya aynı eşey tipindeki hücreler ile ya da karşıt eşey tipli hücreler ile birleşebilirler. Mayalarda eşleşmenin en çok görüldüğü canlı olan *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri incelendiğinde, eşleşme için a- ve α - gibi farklı eşey tiplerine ihtiyaç duyduğu bilinmektedir. Bu sebeple *S. cerevisiae* suşları genellikle **heterotallik** karakterli olarak tanımlanırlar. Fakat *S. cerevisiae*'nın aksine *P. pastoris* hücrelerinde aynı eşey tipleri birbirleri ile eşleşebildiği için bu maya **homotallik** karakterli olarak tanımlanır (Tolstorukov ve Cregg 2007). Heterotallik karakterli hücrelerde eşleşme sadece karşıt eşeylerle gerçekleşebildiğinden diploid hücre oluşumu için ortamda farklı eşey tipte hücrelerin bulunması gerekmektedir. Bu durum “secondary homotallik” olarak bilinen hücreler için de geçerlidir. Fakat bu ikincil homotallik karakterli hücreler kendi eşey tiplerini değiştirerek karşıt eşey tipte hücreye dönüşebilme yeteneğine sahip olduğu için böyle bir durumda aynı eşey tipte suşlar birbirleri ile de eşleşme geçirebilmektedir. Homotallik karakterli hücrelerde ise MAT (mating-type) genleri her iki allele de ifade edildiği için bir hücre aynı ortamda bulunan ve eşey tipi kendisi ile aynı olan diğer bir hücre ile de eşleşme geçirerek diploid formunu oluşturabilmektedir (Hanson vd. 2017).

Hücre eşey tiplerini belirleyen MAT genleri, *Pichia* genomunda 4. kromozom üzerinde iki lokusta (lokus 1 (*silent locus*) ve lokus 2 (*active locus*)) bulunmaktadır. Kromozom üzerinde bu iki lokusun aralarında 135 kb uzunlukta (sentromer bölgesini de içeren) bir mesafe bulunmaktadır. Telomere daha yakın olan lokus 1 bölgesi, telomerin pozisyonundan kaynaklı olarak daha az ekspres edilmekte olup hücrenin hangi eşey tipine sahip olduğu, aktif lokus olarak bilinen 2. lokustaki MAT genlerin ifadesine göre belirlenmektedir. Haploid hücrelerde salgılanan a ve α eşey feromon peptidleri, karşıt eşey hücre yüzeyinde bulunan feromon reseptörleri (a eşey hücrelerinde Ste2 reseptörü ve α eşey hücrelerinde Ste3 reseptörü) tarafından tanınarak bu bölgelere bağlanırlar ve hücre eşleşme prosesini başlatılmış olurlar. Diploid form oluşumu incelendiğinde *S. cerevisiae* hücreleri zengin besi ortamında bile kendiliğinden eşleşme geçirerek diploid hücreleri oluştururlarken, *P. pastoris* hücreleri genelde stres koşulları altında diploid form oluştururlar. Haploid hücreler azot eksikliği gibi bir stres ortamında bulundukları zaman eşleşme gerçekleştireceği partneri tanıyan reseptörleri ortama gönderir ve eşleşmeye özgü feromonların salgılanması ile eşleşme geçirerek diploid hücrelerini oluştururlar (Haber vd.2012, Hanson vd. 2014). Haploid hücrelerde a ve α eşey tiplerinde bulunan MATa1, a2 genleri ve MAT α 1 ve α 2 genlerinin fonksiyonlarının araştırılması üzerine Heisteringer vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada bu 4 genin her biri ayrı ayrı silinerek mutant haploid hücreler elde edilmiştir. Her bir mutant haploid hücre ile hem yabani tip hücre

hem de diğer mutant hücreler arasında eşleşme gerçekleştirilmiş olup $a2$ ve $\alpha1$ genlerinin tekli olarak silindiği hücrelerde herhangi bir eşleşme görülmemiş ve bu genlerin eşleşme için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Yine aynı çalışmada diploid hücrelerde mayoz bölünme ve spor oluşumu incelendiğinde $a1$ ve $\alpha2$ genlerinin gerekli olduğu tespit edilmiştir.

Maya hücrelerinde diploid hücre oluşumu, hücrelerin birbiri ile eşleşmesi ile gerçekleşmektedir. Söz konusu bu eşleşmede, haploid hücre ya karşıt eşey karakterle ya da aynı eşey karakterle eşleşebilmektedir. Maya hücresine göre eşleşme tercihi değişebilmekte olup diploid oluşturmak üzere bir araya getirilen hücrelerde eşleşmenin gerçekleşebilmesi için bazı hücrelerin eşeysel karakterini değiştirerek eşleşme geçireceği diğer hücreye uygun hal alması gerekmektedir. Eşeysel değişim (**MAT switching**) olarak bilinen bu durum genelde *O. polymorpha* ve *P. pastoris* gibi homotallik karakterli mayalarda görülmekte ve “**flip/flop mechanism**” olarak ifade edilen bir tersine çevirme mekanizmasının aktifleşmesi ile kromozom üzerindeki baskılanan diğer eşeysel genlerin ifadesi ile gerçekleşmektedir. Böylece aynı ortamda bulunan aynı eşey karakterli hücreler birbirleri ile birleşerek diploid hücre oluşturabilmekte, gerçekleşen bu eşleşmede hücreler daha önce kendilerinde olmayan yeni özellikler kazanabilmekte ve diploid formunun etkisi ile çeşitli ortam inhibitörlerine karşı dayanımı da artmaktadır (Stoyanov vd. 2014). Bazı diploid hücrelerin oluşumunda gerekli olan bu eşeysel değişim/dönüşüm *S. cerevisiae* hücrelerinde HO endonükleazın aktivitesi ile gerçekleşmekte iken *O. polymorpha* ve *P. pastoris* gibi mayalarda genelde ortamda nitrojen eksikliği varsa gerçekleşmektedir (Haber vd. 2012). Ortam nitrojen eksikliği belirli bir süre sonra hücrede eşeysel tersine çevirme mekanizmasını aktive ederek her iki eşey karakterinin de aynı anda ifadesini sağlamakta böylelikle hücrelerde diploid form oluşturmak üzere eşleşme gerçekleşmektedir. Bu sonuçlar hücrelerde amonyum eksikliğinde eşeysel değişimin aktifleştiğini göstermektedir.

Besin kaynaklarının diploid hücre oluşumuna etkisine bakılacak olunursa *S. cerevisiae* hücrelerinde diploid hücre oluşumu ve eşeysel değişim, hücrelerin bulunduğu besi ortamından bağımsız olup hücreler zengin besi ortamında bile kendiliğinden diploid hücre oluşturabilmektedir. Ancak *P. pastoris* mayasında MATa ve MAT α eşeysel genleri ve STE2, STE3 feromon reseptörleri hücrede zengin besi ortamında bile sürekli eksprese edilmekte olup sadece stres şartları altında eşleşme feromonlarının aktifleşmesi sonucu indüklenir ve eşleşme mekanizmasını başlatırlar.

P. pastoris hücrelerinde diploid hücre oluşumunda, haploid hücrenin bulunduğu ortamdaki büyüme hızının yavaş ve hızlı olmasının hücrede eşleşme için gereken genlerin ifadesini baskıladığı bilinmektedir. Hücre büyümesinin hızlı olması ile ortamda fazla miktarda bulunan besin kaynakları hücre için bir stres faktörü olmayarak hücrelerde eşleşmeye gerek olmazken, hücre büyüme hızının yavaş olması durumunda ise hücreler için ortamda yeteri kadar besinin olmaması eşeysel hücre oluşum mekanizmasının tamamlanamayacağı anlamına gelmekte olup her iki durumda da hücreler eşleşme mekanizmalarını hiç aktive etmemektedir. Rebnegger vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada hücreler 0.02 h^{-1} ve 0.150 h^{-1} spesifik gelişim hızı (μ) aralıklarında geliştirilmiş ve eşleşme genlerinin ortalama μ olarak belirlenen 0.05 ve 0.075 h^{-1} değerlerinde maksimum seviyede ekspres edildiği görülmüştür. Hücrelerde eşleşme ile diploid form

oluşumu amaçlanmakta ise bu eşleşme ortamındaki hücrelerin spesifik hücre gelişim hızının ortalama μ değerinde olması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Haploid ve diploid *S. cerevisiae* hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen biyoetanol üretiminde genellikle haploid *S. cerevisiae* hücreleri kullanılmakta olup bu hücrelerin fermantasyon ortam inhibitörlerine, asit ve oluşan etanole karşı toleransının az olması ve verimliliğinin düşük olması endüstriyel kullanımda büyük sınırlamalar getirmektedir (Garay-Arroya vd. 2004). Hücrelerin haploid formundan kaynaklandığı düşünülen bu sınırlamaları aşmak amacıyla Kato vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada haploid *S. cerevisiae* hücrelerinden diploid hücre edilmiş ve her iki formdaki hücrelerde etanol üretim miktarlarına bakılmıştır. Elde edilen diploid ve bu diploidi oluşturan haploid hücreler ile 30°C ve pH 5 değerli ortamdaki 48 saatlik fermantasyonda diploid hücrelerin etanol üretimi 0.89 g/L/h olup kendisini oluşturan haploid hücrelerinin etanol üretim miktarları ise 0.32 g/L/h ve 0.57 g/L/h şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ile diploid formdaki hücrelerin kendilerini oluşturan haploid formlarına göre ortam stres faktörlerine dayanımının daha yüksek olduğu ve hedef proteini ya da etanol gibi organik bileşenleri diploid formuna göre daha yüksek miktarlarda üretebildiği gösterilmiştir.

Diploid maya hücrelerinde etanol üretimi üzerine Yamada vd. (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada alfa-amilaz ve glukoamilaz genleri karşıt eşey karakterli haploid hücrelerde sırasıyla URA3 ve HIS3 lokuslarına klonlama teknikleri ile ikişer kopya olacak şekilde klonlanmıştır. Daha sonra bu haploid hücrelerde eşleşme gerçekleştirilerek diploid maya hücreleri elde edilmiştir. Diploid maya hücreleri ile üretim sonucunda haploid formlarına göre sırasıyla 1.2 kat daha fazla alfa amilaz aktivitesi ve 4 kat daha fazla glukoamilaz aktivitesi tespit edilmiş olup hücrelerde etanol üretiminin ise haploid formuna göre 1.5 kat daha fazla olduğu bulunmuştur.

Diploid maya hücrelerinde rekombinant enzim üretimi üzerine Stoyanov vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *E. coli* β -glukuronidaz enziminin *Hansenula polymorpha* metilotrofik mayasında hem haploid hem de diploid hücre formlarında üretimi gerçekleştirilmiştir. Haploid ve diploid klonlarda enzim aktiviteleri ölçülerek diploid klonda 97.92 EU (Enzyme Unit) spesifik enzim aktivitesi görülmüşken bu diploidi oluşturan haploid klonlarda ise 15.86 EU spesifik aktivite hesaplanmıştır. Bu çalışma sonucunda endüstriyel boyutta enzim üretiminde genellikle haploid formda kullanılan *O. Polymorpha* hücrelerinin diploid formunda da yüksek enzim aktivite verimliliği ile kullanılabileceği gösterilmiştir.

Diploid *P. pastoris* hücrelerinde monoklonal IgG1 antikorunun rekombinant olarak üretilmesi üzerine Chen vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada diploid hücreler ile üretim yapılmıştır. Çalışma kapsamında IgG1 antikorunun ağır ve hafif zincirleri, haploid yabanıl tip ve glikozilasyon yolağı insaninkine benzetilmiş, insan ile uyumlu olan GS2.0(Man5) *Pichia* hücrelerinde rekombinant olarak üretilmiş daha sonra bu klonların birbirleri ile eşleşme gerçekleştirilerek diploid klon elde edilmiştir. Elde edilen diploid klonda hem standart besi ortamında hemde nitrojen eksik besi ortamında erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen 72 saatlik üretimde hücrelerin diploid stabilitesi incelenmiş ve standart besi ortamında diploid klonun stabilitesini koruduğu görülmüştür. Yine aynı çalışma kapsamında diploid hücrelerde hedeflenen proteinin üretim miktarının

ve stres şartlarına dayanımının kendisini oluşturan haploid hücrelere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Yukarıdaki çalışmalar incelendiğinde *S. cerevisiae*, *O. polymorpha* ve *P. pastoris*'te diploid hücre ile hedeflenen proteinlerin üretiminin haploid formlarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Haploid mayaların endüstriyel boyutta kullanımında maya hücrelerinin termostabilitelerinin düşük olması ve fermantasyon ortam inhibitörleri, asit ve alkol gibi metabolitlere karşı dayanımlarının az olması gibi bazı dezavantajları vardır. Karşılaşılan bu sorunları aşabilmek ve hücreye yeni özellikler kazandırmak amacıyla haploid hücrelerin farklı veya aynı özellikteki bir diğer haploid hücre ile eşleşme geçirerek birleşmesiyle iki haploid hücrenin özelliklerinin kombine edilerek diploid formda hücre oluşumu ön plana çıkmaktadır. Maya hücrelerinde ploidilik durumunun hücreye sağladığı diğer avantajlar ise ekolojik ortam streslerine (sıcaklık, besiyerindeki inhibitör maddeler ve pH gibi) tolerans gösterebilmesi ve hücrenin kendinde olmayan bir özelliği eşleşme sonucu karşı taraftan kazanarak farklı karakteristik özellikler edinebilmesi şeklinde sıralanabilir (Stoyanov vd. 2014). Bahsedilen bu sebeplerden dolayı hedeflenen proteinin maya hücreleri kullanılarak endüstriyel ölçekte gerçekleştirilen üretimlerde hücrelerin diploid formları son zamanlarda daha çok tercih edilmeye başlanmıştır.

2.5. Rekombinant Protein Üretimine Gen Kopya Sayısının Etkisi

P. pastoris mayası ile gerçekleştirilen rekombinant protein üretiminde suş geliştirilmesi için dikkat edilmesi gereken bazı faktörler şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu faktörler göz önünde bulundurularak oluşturulan maya klonunda hedef proteinin yüksek miktarda üretimi için önem arz eden bir diğer parametre literatürde “*gene dosage*” olarak da bilinen gen kopya sayısıdır. Protein spesifik olmak kaydıyla genellikle 1 kopyadan daha yüksek sayıda gen içeren klonlarda 1 kopyalı klona göre daha yüksek verimlilikte protein üretildiği bilinmektedir. 1990'lı yıllarda yapılan bir çalışmaya göre farklı kopya sayıda tetanoz toksinini fragment C içeren *P. pastoris* klonlarında üretim miktarları ELISA ile belirlenmiştir. Erlenmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimde tetanoz toksinini fragment C'nin miktarı, hücre içi toplam protein içeriğinde % cinsinden verilmiş olup 1 kopya içeren klonda % 0.44 oranında, 2 kopya içeren klonda ise %1.16 oranında tetanoz toksinini C fragmenti içerdiği tespit edilmiştir (Clare vd. 1991). Bu çalışma ile yüksek gen kopya sayısındaki klonlar ile protein üretim miktarının artabileceği gösterilmiştir.

Yüksek gen kopya sayısı içeren klonların oluşturulmasında kullanılan yöntemlerden birisi **multimerizasyon yöntemi**dir. Bu yöntemde, istenen konfigürasyonda oluşturulan ekspresyon vektörünün konak hücreye transformasyonu sonrasında vektör üzerindeki direnç geni olan antibiyotiği yüksek oranda içeren besiyeri ortamında seçim sonucu, 1'den fazla ekspresyon kasetinin arka arkaya oturarak genoma entegrasyonu ile yüksek kopyada ekspresyon kaseti içeren klonlar elde edilmektedir. *P. pastoris*'te heterolog protein ekspresyonunda gen kopyasının etkisinin araştırılması amacıyla Scorer vd. (1994) tarafından yapılan bir çalışmada, HIV-1 ENV (Human Immunodeficiency Virus type 1) içeren vektörün ekspresyonu çalışılmış, vektör üzerindeki *Tn903kan* geni ile 0.25-4 mg/mL aralığında G418 antibiyotik içeren ortamlarda seçim sağlanmıştır. Dot blot analizi ile seçilen klonlarda 12 kopyaya kadar HIV-1 ENV içeren klon olduğu tespit edilmiş, farklı kopya sayısındaki klonlar ile gerçekleştirilen üretimde Western blot analizi

ile bant yoğunlukları karşılaştırılarak artan kopya sayısı ile üretilen protein miktarının da orantılı olarak arttığı sonucuna varılmıştır.

Gen kopya sayısının etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise kancalı kurt enfeksiyonuna karşı bir aşı proteini olan Na-Asp1 proteini (insan ince bağırsağı parazidik nematod (*Necator Americanus*) proteini) üretilmiştir (Inan vd. 2005). Çalışmada Southern blot yöntemi ile 1,2,3 ve 4 kopya ekspresyon kaseti içeren klonlar tespit edilmiş ve bu klonlar ile hücre dışında gerçekleşen üretimlerde Western blot analizi sonucunda yapılan densitometrik analiz ile üretilen Na-ASP1 protein miktarı belirlenmiştir. Ekspresyon kasetini 1 kopya içerdiği belirlenen klonun referans alındığı çalışmada protein miktarları hesaplanmış ve farklı kopya ekspresyon kaseti içeren klonların rölatif olarak protein miktarları 1 kopya için 1, 2 kopya için 0.82, 3 kopya için 0.5 ve 4 kopya ekspresyon kaseti için 0.25 seviyesinde bulunmuştur.

P. pastoris'te α -amilaz enziminin hücre dışında rekombinant üretimi ile alakalı Karakaş vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada gen kopya sayısının üretim üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucuna göre ekspresyon kasetini 1,2,3, ve 4 kopya içeren klonlar seçilmiş ve erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimlerde 2 kopya ekspresyon kaseti içeren klonda 22 mg/L seviyesi ile en yüksek hücre dışı üretim gözlemlenmiştir. Çalışma sonucuna göre 2 kopya ekspresyon kaseti içeren klonda enzim üretimi 1 kopyaya göre daha yüksek, 3 ve 4 kopyalı klonlara göre daha düşük seviyede tespit edilmiştir. Bir diğer gıda enzimi olan transglutaminaz enziminin *P. pastoris*'te rekombinant üretimine yönelik yapılan başka bir çalışmada ise 1 ve 3 kopya ekspresyon kaseti içeren klonlar ile fermentör ölçeğinde gerçekleştirilen üretimde MTGase spesifik aktivite değerleri sırasıyla 13.35 U/mg ve 5.57 U/mg olarak tespit edilmiştir (Türkanoğlu-Özçelik A. 2019b). Yapılan bu çalışmalar ile in vivo multimerizasyon yöntemleri ile elde edilen yüksek gen kopyalı klonlarda, artan gen kopya sayısı ile hücre dışında üretimi hedeflenen protein üretiminin her zaman doğru orantılı olmadığı, özellikle hücre dışı ekspresyonlarda bazı proteinlerde gen kopya sayısı arttıkça hücre dışı protein üretiminin azaldığı sonucuna varılmıştır.

Yüksek gen kopyalı klon elde etmenin diğer bir yöntemi olan ***in vitro multimerizasyon yönteminde*** DNA bölgesinin uygun klonlama yöntemleri ile klonlaması yapılarak aynı vektör üzerinde hücre dışı ortamda yüksek sayıda kopyaları elde edilmektedir.

Hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) *P. pastoris*'te rekombinant üretimine yönelik yapılan bir çalışmada 1 kopya HBsAg geni içeren pAO815 vektörü ana iskelet olarak kullanılmış olup bu vektöre HBsAg genini içeren *ekspresyon kaseti* (5' AOX1 - HBsAg geni-3' AOX TT) sırasıyla 1, 2, 3, 4, 6 ve 8 kopya olacak şekilde klonlanmış ve *P. pastoris* GS115 hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu elde edilen 1-8 arası gen kopyasını içeren klonlar ile erlenmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimlerde gen kopya sayısı arttıkça üretilen Hepatit B yüzey antijen miktarının da orantılı olarak arttığı görülmüştür. ELISA yöntemi ile tespit edilen Hepatit B yüzey antijen miktarının 8 kopyalı klonda 1 kopyalı klona göre 11.56 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Vassileva vd. 2001).

Artan gen kopya sayısının etkisinin incelenmesine yönelik yapılan bir diğer çalışmada insan interlekin-3 (hIL-3) proteinini kodlayan DNA bölgesi ile 1, 2, 4, 6, 8,10

ve 12 kopya içeren klonlar oluşturulmuş ve *P. pastoris* X33 suşuna transforme edilmiştir. Erlenmayer ölçekli gerçekleştirilen üretimde hücre dışı hIL-3 üretim miktarının 1 kopyalı klonda 90 mg/L, 8 kopyalı klonda ise 310 mg/L olduğu ve 8 kopyaya kadar gen kopya sayısının artmasıyla üretim miktarının arttığı görülmüştür. Ancak gen kopya sayısının daha da yükseltildiği 10 ve 12 kopyalı klonlarda ise hIL-3 üretim miktarının tekrar azalarak 25mg/L seviyesine kadar düştüğü görülmüştür (Dagar vd. 2018). Çalışma ile artan gen kopya sayısının her zaman doğru orantılı bir şekilde protein üretim miktarını arttırmadığı, belirli bir seviyeye kadar arttığı sonrasında tekrardan azaldığı görülmüştür. Bu durumun sebebinin yukarıda bahsedilen çalışmaların çoğunun hücre dışı üretim olmasından kaynaklı olabileceği, aslında artan gen kopya sayısı ile üretilen proteinin de miktarının arttığı ancak belirli bir seviyeden sonra hücre dışına salgılanmanın yetersiz kaldığı bu sebeple protein üretilse de hücre içinde kalmış olabileceği düşünülmektedir.

2.6. Rekombinant Protein Üretiminde Şaperon Protein Kullanımı

Rekombinant protein üretiminde hedeflenen proteinin üretim miktarını artırmak amacıyla konakçıya uygun kodon optimizasyonun yapılması, gen kopya sayısının artırılması gibi yöntemler bazı durumlarda yetersiz kalabilmektedir. Her ne kadar bu yöntemlerin etkisi ile hedeflenen proteinin ifadesi arttırılsa da bazı durumlarda yanlış disülfid bağı oluşumu, katlanmanın düzgün gerçekleşmemesi veya hücre dışında gerçekleşen bir üretim ise yetersiz sekresyon gibi sorunlarla da karşılaşılabilir.

Protein sentezi ve sekresyonu hücrede çok aşamalı bir süreç olarak bilinmektedir. *P. pastoris* mayasında gerçekleşen bir protein sentez ve salgılanma sürecine bakıldığında, ilk olarak uygun promotor dizaynı, kodon optimizasyonu ve konak hücre seçimi gibi kombinasyonlardan sonra rekombinant genin **çekirdekte** (nükleus) meydana gelen transkripsiyonu ile süreç başlamaktadır. Daha sonrasında **ribozomda** gerçekleşen protein sentezi ve devamında **endoplazmik retikulumda (ER)** gerçekleşen protein katlanması ve glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar ile protein olgunlaşmaktadır. Burada bazı protein sekresyonlarında *helper gene* olarak da bilinen şaperonların da eklenmesi ile doğru katlanma ve hücre dışına sekresyon sağlanmaktadır. Daha sonrasında ise **golgi aygıtında** post-translasyonel modifikasyonlar tamamlanmakta ve proteinler paketlenerek **veziküller(kesecik)** aracılığıyla hedeflenen bölgeye taşınmaktadır. Bu aşamada proteazlar ile kesim meydana gelmekte, protein pre formunda ise pre kısmı kesilerek uzaklaştırılmaktadır. Hücre dışı üretimlerde taşınım sonrasında sekresyon sinyallerinin kullanımı ile **hücre duvarından** geçiş sağlanarak üretilen proteinin hücre dışına sekresyonu gerçekleştirilmektedir. (Raschmanova vd. 2021).

Sentezlenen proteinlerin katlanmaları ve disülfid bağlarının doğru şekilde oluşumu endoplazmik retikulum'da (ER) gerçekleşmekte olduğu için bu organel sistemin kalite kontrol merkezi olarak bilinmektedir. Endoplazmik retikulumun proteinleri olan ve izomeraz aktiviteleri sayesinde disülfid bağlarının doğru oluşumunu sağlayan bu proteinler, **şaperon protein** olarak tanımlanmaktadır. Moleküler şaperon olarak işlev yapan bazı proteinler; PDI (protein disulfide isomerase), BiP (immunoglobulin-binding protein), Kar2, ERO1 (ER oxidoreductase 1) olarak sıralanabilir. Ayrıca bu genler üretilmek istenen proteinlerle birlikte eksprese edildiği için "co-expressed helper gene" olarak tanımlanmakta ve hücre dışına sekresyonda salgılamayı artırıcı yönde pozitif etki etmektedir (Raschmanova vd. 2021).

Katlanma sonucu oluşan yanlış disülfid bağları, ER'nin proteini olan Protein Disülfid İzomeras (PDI) şaperon proteinin izomeras aktivitesiyle kırılarak yeniden düzenlenmekte ve doğru disülfid bağı oluşumu sağlanmaktadır. Daha önce İnan vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, kancalı kurt enfeksiyonuna karşı aşı üretimi amacıyla *N. americanus* Na-ASP1 proteini, *P. pastoris*'te metanol ile indüklenebilir AOX1 promotörü kontrolünde rekombinant olarak üretilmiştir. Na-ASP1 protein üretiminde en yüksek verimliliği elde edebilmek amacıyla ekspresyon kasetini 1, 2, 3 ve 4 kopya içeren klonlar elde edilmiş ve erlenmayer ölçeğinde üretimleri gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris* X33 hücrelerinde gerçekleştirilen üretimde gen kopya sayısı arttıkça yaklaşık 45 kDa büyüklüğündeki bu proteinin hücre içerisinde üretimin arttığı ancak hücre dışına salgılanmasının aynı oranda gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Bu durum, hücrenin doğal yapısında 1 kopya olarak bulunan endojen PDI proteinin, rekombinant olarak fazla miktarda üretilen Na-ASP1 proteinindeki disülfid bağlarının tamamının doğru şekilde oluşturulmasında yetemediği ve katlanma sırasında oluşan bağlarda hatalar meydana gelerek proteinlerin agregasyonuna neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Yanlış katlanma sonucu agregasyona uğrayarak kümeleşen bu proteinler ERAD (Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation) ya da UPR (Unfolded Protein Response) kontrol mekanizmaları ile degradasyona uğramaktadırlar. Gen kopya sayısının artması ile hücre içerisinde yüksek miktarda üretilen Na-ASP1 proteinin agregasyona uğramadan doğru ifade edilerek dışarıya salgılanması amacıyla bahsedilen bu çalışmada PDI proteinin homolog ekspresyonu sağlanmıştır. Bu amaçla 1, 2, 3 ve 4 kopya Na-ASP1 içeren *P. pastoris* hücrelerinin konak hücre olarak kullanılmasıyla farklı kopya sayılarında PDI genini içeren yeni klonlar oluşturulmuş ve hücre dışı Na-ASP1 üretim miktarları belirlenmiştir. Hücre dışı Na-ASP1 üretim miktarı, Western blot analizinde densitometrik hesaplama sonucu, 1 kopya Na-ASP1 içeren klonun referans alınarak hesaplanmasıyla 2 kopya Na-ASP1+8 kopya PDI eksprese eden klonda 3.64 kat daha yüksek oranda bulunmuştur (İnan vd. 2006). Çalışma ile, hedef proteinin hücre dışında üretim miktarının artırılması amacıyla izomeras aktivitesi sayesinde oluşan yanlış katlanmaların düzenlenerek doğru katlanmayı ve hücre dışına sekresyonu sağlayan PDI proteininin kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

P. pastoris GS115 suşunda *Y. lipolytica* lipaz 2 enziminin rekombinant olarak üretildiği bir çalışmada, lipaz enzimini 1-4 kopya içeren klonlar oluşturulmuş, maksimum enzim aktivitesi 2 kopya lipaz içeren klonda tespit edilmiş, bu klona 2 kopya Hac1 ve 1kopya vhb (*Vitreoscilla* hemoglobin gene) genleri klonlanmıştır. Fermentör ölçeğinde gerçekleştirilen üretimlerde 2 kopya lipaz içeren klonda enzim aktivitesi 6300 U/mL iken, 2 kopya Hac1p klonlanmasıyla enzim aktivitesi 8150 U/mL değerine ulaşmıştır. Bu klona ilaveten 1 kopya *Vhb* ilavesiyle enzim aktivitesi 9080 U/mL seviyesine ulaşmıştır. Çalışma sonucunda enzim aktivitesi 1.44 kat arttırılmıştır (Zhou vd. 2020).

Nitrillerin karboksilik asitlere ve amonyağa hidrolizini katalizleyen enzim grubu olan nitrilaz enziminin *P. pastoris*'te rekombinant üretimine yönelik yapılan bir başka çalışmada ise enzimin hem AOX1 ve GAP promotorlarında üretimi gerçekleştirilmiş hem de şaperonların ilavesinin protein üretim miktarlarına etkisine bakılmıştır. Her iki promotorda tek kopya ekspresyon kaseti içeren klonlarda enzim üretimi karşılaştırıldığında, AOX1 promotörü ile gerçekleşen üretimin GAP promotörüne göre yaklaşık 4 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca AOX1 promotöründe nitrilaz enzimini üreten multikopyalı klonlar oluşturulmuş, yaklaşık 4 gen kopyası içerdiği

bilinen nitrilaz üretim suşuna PDI, BiP ve ERO1 şaperonları ayrıca klonlanmış ve üretilen enzim miktarları karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda yaklaşık 4 kopya nitrilaz genini içeren ve ERO1 şaperon proteini kullanımıyla erlenmayer ölçeğinde AOX1 promotörü kontrolünde gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen nitrilaz enzim aktivite değerinin, GAP promotörü kontrolünde tek kopya nitrilaz genini içeren ve ekstra şaperon protein içermeyen klona göre 18 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Shen vd. 2020).

İnsan lizozim enzimi üretiminde gen kopya sayısının ve transkripsiyon faktörü olan Hac1p proteinin etkisinin incelendiği Liu vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada AOX1 promotörü kontrolünde, *P. pastoris* KM71H suşunda lizozim enzimi rekombinant olarak üretilmiştir. Gerçek zamanlı PZR ile 6 kopyaya kadar lizozim genini içeren klonlar tespit edilmiş ve bu klonlarda enzim üretim miktarlarına (*Micrococcus lysodeikticus*'a karşı antimikrobiyal aktivite ölçümü ile) bakılmıştır. Erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimlerde en yüksek üretim miktarı 61900 U/mL değeri ile 4 kopya lizozim geni içeren klonda bulunmuş, daha sonrasında aynı klona Hac1p klonlanmış ve enzim üretim miktarı 78600 U/mL seviyesine yükselmiştir. Aynı enzimin *P. pastoris* GS115 suşunda üretilmesine yönelik He vd. (2020) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise 12 kopyaya kadar genin kopyasını içeren klonlar oluşturulmuş, erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimlerde *M. lysodeikticus*'a karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 14680 U/mL değeri ile 6 kopya lizozim geni içeren klonda tespit etmişlerdir. Çalışma kapsamında 3 farklı şaperon proteinin GAP promotörü altında tek tek veya ikili şekilde ilavesi ile enzim aktivitesindeki değişiklik test edilmiş olup enzim aktivite değerlerinin PDI ilavesi ile 15600 U/mL seviyesine, ERO1 ilavesi ile 16500 U/mL seviyesine yükseldiği ancak BiP proteinin ise enzim aktivitesi değerini (10200 U/mL) düşürerek olumsuz etkilediği bulunmuştur. Ayrıca PDI ve ERO1 şaperonlarının ikili ilavesiyle de 21200 U/mL değeri ile erlenmayer ölçeğinde maksimum aktivite elde edilmiş olup bu klonun fermentör ölçekli üretiminde 96. saat süpernatant örneklerinde 176000 U/mL enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Her iki çalışmanın ortak noktasında lizozim gen kopya sayısının 4-6 kopyaya kadar artması ile üretimin en yüksek noktaya ulaştığı, daha da yüksek kopyalarda ise enzim üretiminin her ne kadar şaperon ilavesi gerçekleşse de tekrar düştüğü bulunmuştur.

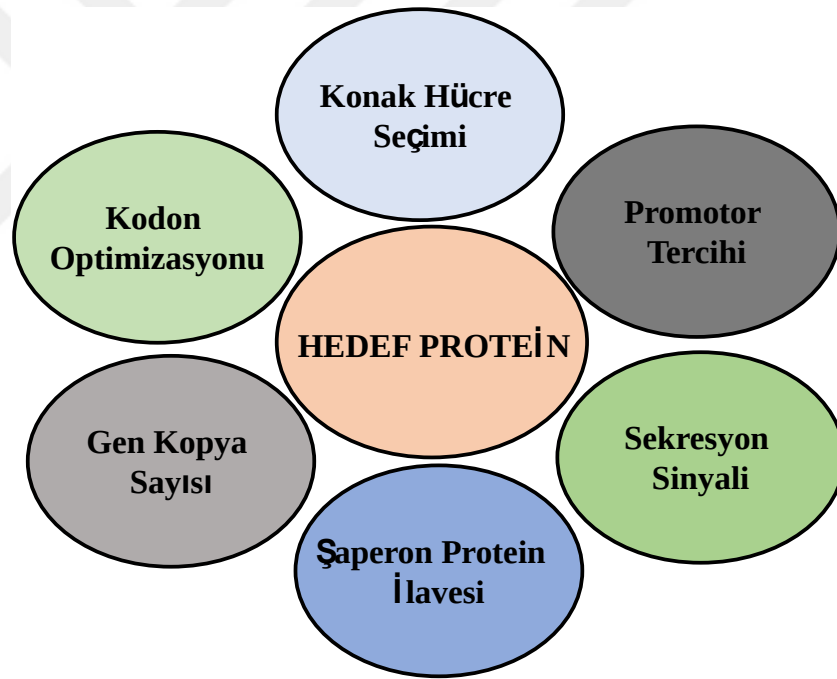
Farklı proteinlerde gen kopya sayısı ve *helper gene* olarak da bilinen şaperon ilavesinin etkisinin araştırıldığı birçok çalışma mevcut olup neredeyse tamamında hem kopya sayısının artmasının hem de şaperon protein kullanımının üretilen protein miktarına veya hücre dışına salgılanma oranına pozitif yönde etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. *P. pastoris* 'te rekombinant protein üretiminde şaperon protein kullanımının protein üretimi üzerine etkisine bazı örnekler

Rekombinant protein	Şaperon Protein	<i>P. pastoris</i> suşu	Kopya sayısı (<i>Rekombinant protein/Şaperon protein</i>)	Promotor (<i>Rekombinant protein/Şaperon protein</i>)	Üretime etkisi	Referans
<i>N. americanus</i> Na-ASP1	PDI	X33	2 kopya Na-ASP1 / 8 kopya PDI	AOX1 / AOX1	3.64 kat artış	İnan vd. 2006
<i>R. chinensis</i> Lipaz	PDI	GS115	5 kopya lipaz / 1 kopya PDI	AOX1 / AOX1	1.26 kat artış	Sha vd. 2013
<i>Streptomyces sp.</i> Lipaz MAS1	PDI	X33	- / -	AOX1 / AOX1	1.7 kat artış	Lan vd.2016
<i>Y. lipolytica</i> Lipaz 2	HAC1-VHb	GS115	2 kopya lipaz / 2 kopya Hac1p-1kopya vhb	AOX1 / AOX1	1.44 kat artış	Zhou vd. 2020
<i>T. Dupontii</i> Lipaz	PDI	X33	3 kopya lipaz / -	AOX1 / GAP	1.72 kat artış	Wang vd. 2019
<i>A. facilis</i> Nitrilaz	ERO1	GS115	4 kopya nitrilaz / -	AOX1 / AOX1	18 kat artış	Shen vd. 2020
İnsan Lizozimi	HAC1	KM71	4 kopya lizozim / -	AOX1 / AOX1	1.26 kat artış	Liu vd.2020
	PDI-ERO1	GS115	6 kopya lizozim / -	AOX1 / GAP	11.98 kat artış	He vd. 2020

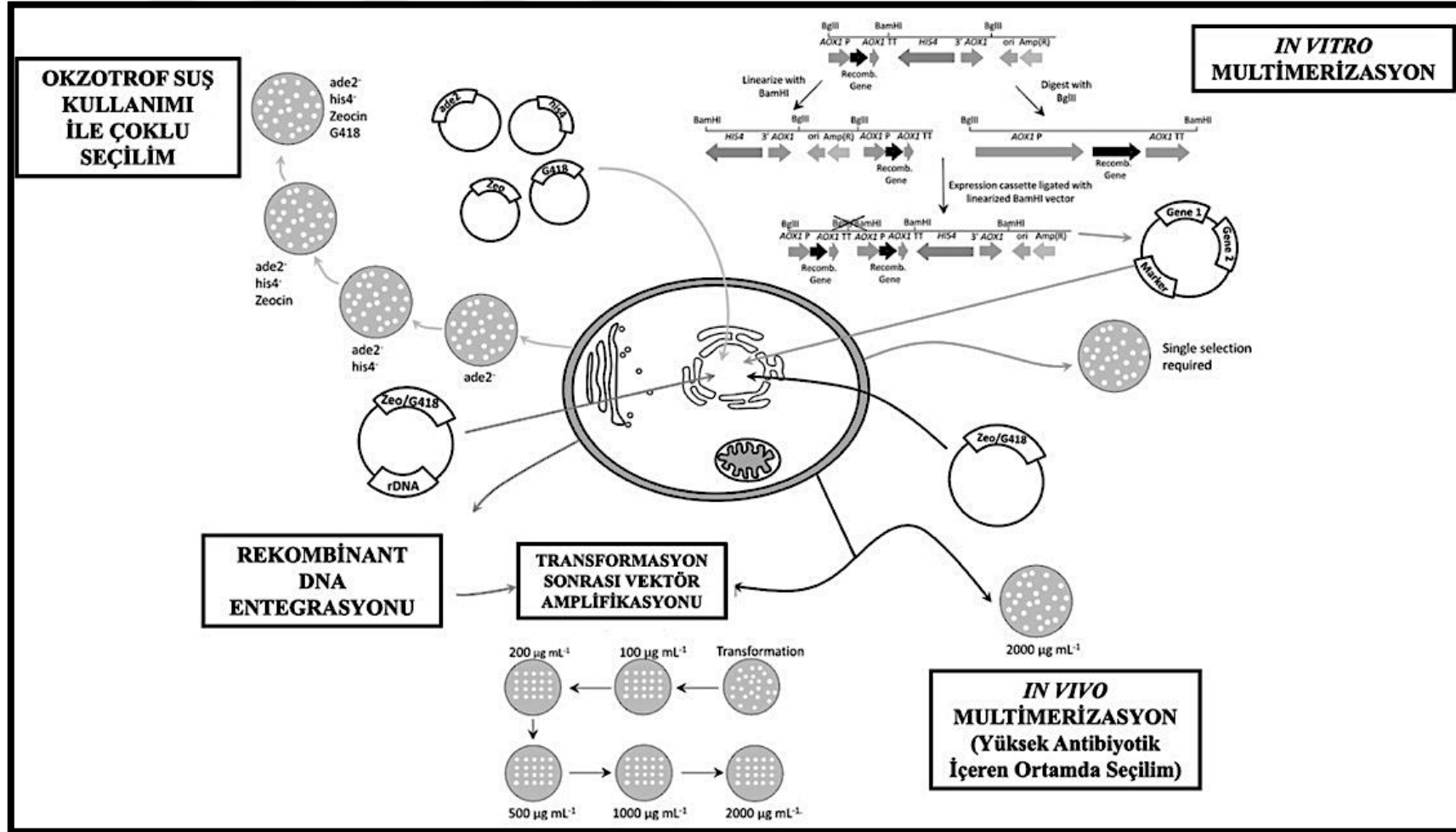
*Şaperon proteinlerin kopya sayıları *P. pastoris* 'in endojen şaperon genleri dahil edilmeden ayrıca klonlanan ekstra gen kopya sayısını ifade etmektedir.

Moleküler biyoloji tekniklerinin aktif kullanımıyla gerçekleşen ve rekombinant olarak üretilen proteinler, biyoteknolojik ilaçlar, endüstriyel enzimler ve gıda ürünleri gibi alanlarda günlük yaşantımızın birçok noktasında karşımıza çıkmaktadır. Bu şekilde gerçekleşen rekombinant protein üretimlerinde genelde bakteri, maya ve memeli hücreleri gibi çeşitli platformlar kullanılmaktadır. Her ekspresyon sisteminin üstünlükleri veya eksiklikleri bulunmakla beraber hedeflenen proteine göre seçilecek olan platform değişmektedir. Maya ekspresyon sistemi olan *P. pastoris*, 2000’li yıllardan beri birçok protein üretiminde kullanılmakta ancak proteinler arasında verimlilik açısından mg/L düzeyinden gr/L düzeyine değişen oranlarda farklılıklar gözlemlenmektedir. Ayrıca sanayi boyutunda bakıldığında minimal gereksinimler ile hedeflenen protein üretiminin gerçekleştirilebilir olması prosesin sürdürülebilirliği açısından önemlidir. Rekombinant protein üretiminde hedeflenen proteinin üretim miktarını artırmak amacıyla şekil 2.2’de şematize edildiği gibi, konakçıya uygun kodon optimizasyonun yapılması, gen kopya sayısının artırılması, şaperon protein ilavesi ve biyoproses dizaynının değiştirilmesi gibi kombinasyonlar ile farklı yöntemlerin denenebileceği bilinmektedir (Raschmanova vd. 2019).



Şekil 2.2. Rekombinant protein üretimine yönelik kombinasyonların şematik gösterimi

P. pastoris mayası heterolog protein üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Hedeflenen genin kopya sayısı arttıkça üretilen proteinin miktarı genellikle artmakta ve yüksek verimlilikte protein üretimi gözlemlenmektedir (Romanos M. 1995). Yüksek gen kopyalı maya klonlarının elde edilmesi için çeşitli moleküler yöntemler kullanılmakta olup, okzotrof suşların kullanımı ile çoklu seçim yapılması, in vitro multimerizasyon, yüksek antibiyotik konsantrasyonu içeren ortamda seçim ve transformasyon sonrası vektör amplifikasyonları gibi bazı metodlar aşağıdaki şekil 2.3’te gösterilmiştir (Aw vd. 2013)



Şekil 2.3. Yüksek gen kopyalı maya klonlarının oluşturulması amacıyla kullanılan tüm metotların şematik özeti (Aw vd. 2013'ten uyarlanmıştır).

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*'te gerçekleştirilen protein ekspresyon çalışmalarının çoğu metanol ile indüklenebilen AOX1 promotorunda gerçekleşmiş, etanolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı ADH2 promotorunda protein üretimine yönelik literatürde çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır.

P. pastoris ADH genleri laboratuvar ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada karakterize edilmiş (Karaoğlu vd. 2016a), etanol tüketiminden ADH3 geninin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Aynı ekip tarafından daha sonraki yapılan başka bir çalışmada ise ADH3 geninin promotorunun diğer promotorlar (GAP ve AOX1) ile karşılaştırılmış, ADH3 promotorunun diğer promotorlara göre daha güçlü olduğu tespit edilmiştir (Karaoğlu vd. 2016b). Ksilenaz enziminin ekspresyonu amacıyla GAP, AOX1 ve ADH3 promotorlarının kontrolünde tek kopya ksilenaz geni içeren klonlar ile fermentör ölçekli gerçekleştirilen üretimlerin karşılaştırıldığı bu çalışmada, üretilen enzim miktarları sırasıyla 580 U/mL, 2095 U/mL ve 3725 U/mL şeklinde bulunmuştur. Böylelikle ADH3* promotorunun, diğer promotorlara göre daha yüksek verimlilikte olması sebebiyle rekombinant protein üretiminde kullanılabileceği sonucuna varılmış, bu tez kapsamında üretimi hedeflenen kimozen enziminin bu promotorda yapılmasına karar verilmiştir. (*Yukarıdaki çalışmalarda ADH3 olarak isimlendirilen bu promotor, sistematik bir karışıklıktan dolayı isimlendirilmesi düzenlenerek ADH2 olarak yeniden adlandırılmıştır. Bundan sonraki anlatılan çalışmada ve bu tez kapsamında ADH2 olarak ifade edilmiştir.)

ADH2 promotorunun düzenlenmesinden sorumlu bölgelerin tespit edilmesi amacıyla aynı ekip tarafından yapılan bir sonraki çalışmada da promotor bölgesi üzerindeki UAS (Upstream activator) ve URS (repressor) bölgelerin tespit edilmesi amacıyla silme analizleri gerçekleştirilmiştir (Erden-Karaoğlu vd. 2022). Promotor gücünü arttırmak amacıyla aktiviteyi artırıcı bölgelerin ilavesi ve azaltıcı bölgelerin silinmesiyle elde edilen sentetik yeni promotorlar oluşturulmuştur. Oluşturulan bu sentetik promotorlar ile doğal promotor (pADH2-900bp) erlenmayer ölçeğinde karşılaştırılarak, en yüksek verimlilikteki promotorun pADH2SNT5 olduğu tespit edilmiştir. Fermentör ölçekli yapılan üretimlerde ise sentetik promotorda ksilenaz enzim aktivitesi 9942 U/mL seviyesinde iken doğal promotorda 4518 U/mL civarında olduğu bulunmuştur. Sentetik promotor ile başka bir enzimin rekombinant üretilmesi amacıyla yine laboratuvar ekibimiz tarafından yapılan bir diğer çalışmada fitaz enzimi rekombinant olarak üretilmiştir (Hadimioğlu M. 2019). Tek kopya fitaz geni içeren doğal ve sentetik promotorda, erlenmayer ölçekli gerçekleştirilen üretimlerde sentetik promotorun, 12203 U/mL değeri ile doğalına göre %60 daha fazla fitaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmaların ortak sonucu *P. pastoris*'te rekombinant protein üretiminde ADH2 promotorunun kullanılabileceği ve bu promotordan elde edilen SNT5 sentetik promotoru ile üretim verimliliklerinin ciddi oranda artabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasında üretimi hedeflenen kimozen enzimi daha önce rekombinant olarak üretilmiştir. Farklı gen kaynaklı rekombinant kimozen üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar (çizelge 2.1.) incelendiğinde üretimlerin büyük bir kısmının AOX1 promotoru altında gerçekleştiği görülmekte, gen kaynağı ve kullanılan üretim yöntemlerine bağlı değişimle beraber, sığır kimozenini üretim verimliliği fermentör ölçekli üretimlerde 40-90 IMCU/mL aralığında değişmektedir. Ancak sığır kimozen enzimi ilk defa bu tez çalışması kapsamında etanol ile indüklenebilen ADH2SNT5 promotorunda rekombinant olarak üretilmiştir. Bu tezin çıkış noktası Türkiye'de beyaz peynir üretiminde kullanılma

potansiyeli bulunan yerel bir kimozin üretici suş ve proses geliştirmek olduğu için, hedeflenen yüksek verimlilikleri elde etmek amacıyla üretimlerde önceki çalışmalarda daha güçlü olduğu tespit edilen *ADH2* promotörü denenmiştir. Bu amaçla *P. pastoris*'e göre kodon optimizasyonu yapılmış olan sığır kimozini, pADH2SNT5 plazmidi kullanılarak KM71 suşunda rekombinant olarak üretilmiştir.

Rekombinant protein üretimi üzerine daha önceki yapılan çalışmalar incelendiğinde genelde gen kopya sayısı arttıkça üretilen protein miktarının arttığı gözlemlenmiş olup bu çalışmada farklı gen kopya sayısında kimozin üretici klonlar in vitro koşullarda oluşturulmuş ve hücre dışı enzim üretim miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca hedeflenen hücre dışı üretimde yaşanabilecek olası sekresyon sorunlarına karşı PDI şaperon proteininin overekspresyonu sağlanmıştır. Farklı klonlama yöntemleri ile elde edilen klonlar içerisinde maksimum üretimin gözlemlendiği klonlar seçilerek fermentör ölçeğinde farklı sıcaklık ve pH değerlerinde üretim yapılmış ve kimozin üretici potansiyel bir suş ve proses geliştirilmiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

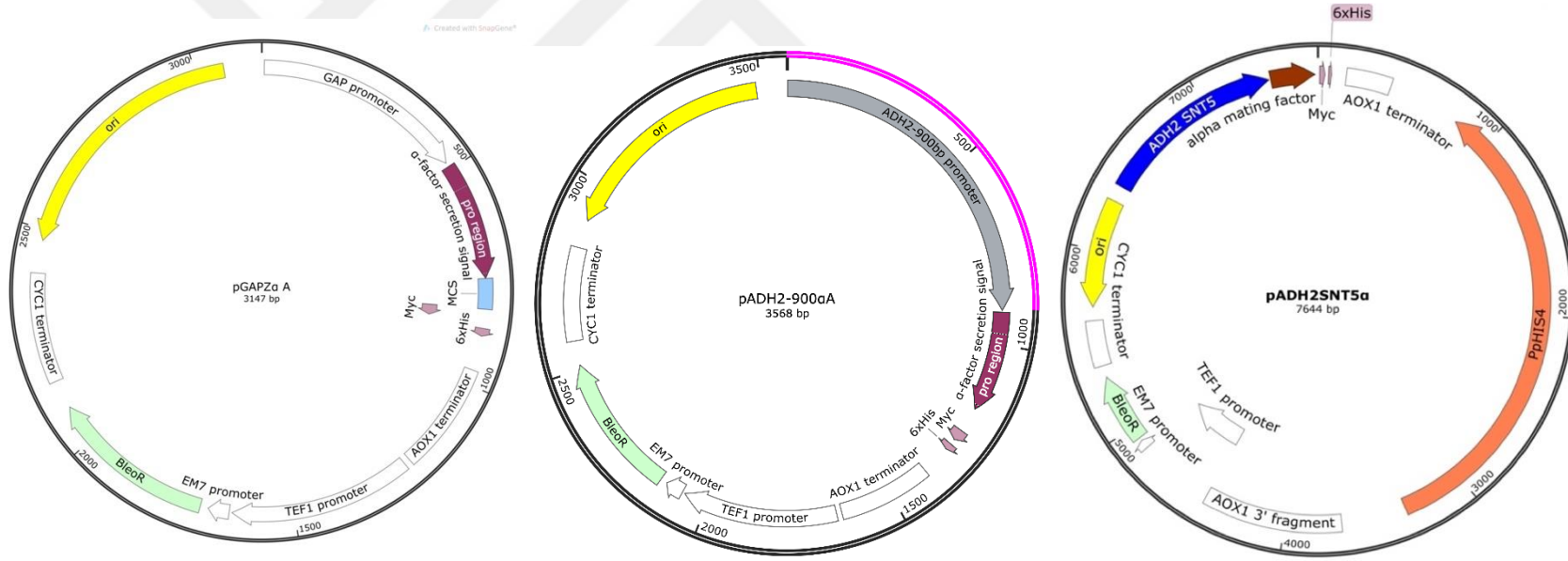
3.1.1. Gen kaynağı, suşlar ve plazmidler

Çalışmada kimozin gen kaynağı olarak *Bos taurus* (sığır) (Gen ID: 529879) kullanılmıştır. *P. pastoris*'e göre kodon optimizasyonu yapılan prokimozin enzimini kodlayan DNA dizisi pPICZ α A plazmidi içerisinde liyofilize formda GenScript (USA) firmasından temin edilmiştir

Ekspresyon vektörlerinin çoğaltılması amacıyla kompetent *E. coli* DH5 α suşu kullanılmıştır. Enzimin rekombinant olarak üretilmesi için *P. pastoris* X33(yabanıl tip) GS115 (*his4⁻*), JC220 (*ade1⁻*) ve KM71 (*his4⁻*) suşları kullanılmıştır.

Kimozin üretimi için laboratuvarımızda mevcut olan pGAPZ α A (şekil 3.1.) plazmidi ve Erden-Karaoğlu F. (2022) çalışması kapsamında oluşturulan pADH2SNT5 α -HIS4 vektörleri kullanılmıştır. Erden-Karaoğlu F. (2022) tarafından yapılan çalışmada pADH2SNT5 α -HIS4 vektörü 3 aşamalı klonlama ile oluşturulmuştur. İlk aşamada kit olarak satılan pPICZ α A (Invitrogen, CA, ABD) vektöründen AOX1 promotörü düşürülerek yerine etanol ile indüklenebilen ADH promotörü klonlanmış ve şekil 3.1'de vektör haritası verilen pADH2-900 α A vektörü oluşturulmuştur. İkinci aşamada verilen bu vektör üzerinde doğal haldeki ADH900 (900bp uzunluğundaki) promotor kısmı, yine aynı çalışma kapsamında doğal promotordan daha güçlü olan bir sentetik promotor tasarlanması amacıyla oluşturulan sentetik ADH2SNT5 promotörü ile değiştirilmiş ve pADH2SNT5 α A (şekil 3.1) vektörü elde edilmiştir. Her iki aşamada elde edilen bu vektörler (pADH2-900 α A ve pADH2SNT5 α A) kullanılarak rekombinant protein üretimi yapılabilmektedir. Bahsedilen çalışmanın son klonlama aşamasında ise pADH2SNT5 α A vektörünün içerisine pAO815 (Invitrogen, CA, ABD) plazmidinden alınan ve *P. pastoris* için okzotrof marker olan, histidin aminoasidinin sentezinden sorumlu olan Histidin geni (*HIS4*) ilave edilerek pADH2SNT5 α A-HIS4 plazmidi elde edilmiş ve bu tez çalışmasında bu vektör kullanılmıştır.

Yüksek gen kopya sayısında kimozin geni içeren multikopyalı kimozin klonları oluşturmak amacıyla da pAO815 vektöründen AOX1 promotorunun ADH2SNT5 α vektörü ile değiştirilmesi ile oluşturulan ve seri klonlamalar ile kimozin geninin klonlanması yöntemleri ile türetilen multikopyalı kimozin vektörleri elde edilmiş ve kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan pGAPZαA, pADH2-900αA, ve pADH2SNT5α vektör haritaları

3.1.2. Besiyerleri, kimyasallar, enzimler ve antibiyotikler

Plazmidlerin çoğaltılması amacıyla kullanılan *E. coli* hücrelerinin gelişiminde LB miller (%0.5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %1 NaCl) ve/veya LB Lennox besiyeri (%1 pepton, %0.5 maya ekstrakt ve %0.5 NaCl) kullanılmıştır. Plazmid üzerindeki direnç genine uygun antibiyotik ilaveleri yapılmıştır. *E. coli* suşları için 25 µg/mL zeosin veya 100 µg/mL amfisilin, *P. pastoris* suşları için ise 100-1000 µg/mL zeosin olacak şekilde ilave edilmiştir. Klonlama işlemlerinde DNA'ların kesilmesi amacıyla restriksiyon enzimleri kullanılmış ve üretici firmanın (FastDigest Restriction Enzymes—Thermo Scientific) talimatları doğrultusunda kesim protokolü uygulanmıştır.

P. pastoris suşlarının genel gelişiminde; YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz), MD (%1.34YNB ve %2 glukoz), BMGY (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-5} g/L biotin, %10 gliserol ve 0.1 M fosfat tamponu pH 6.0) ve BMEY (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-5} g/L biotin, %10 etanol ve 0.1 M sodyum sitrat tamponu pH 3.0) ve BYED (%3 maya ekstraktı %2 glukoz, %1.34 YNB, 4×10^{-5} g/L biotin ve 0.1 M sodyum sitrat tamponu pH 3.0) besiyerleri kullanılmıştır. Diploid maya hücrelerinin oluşumu için Mating Agar Plate (%0.5 sodyum asetat, %1 potasyum klorit, %1 glukoz, %2 agar) kullanılmıştır. Fermentör ölçeğinde üretimlerde ise BSM (26.7 mL/L fosforik asit, 0.93g/L kalsiyum sülfat, 18.2g/L potasyum sülfat, 14.9g/L magnezyum sülfat-7H₂O, 4.13g/L potasyum hidroksit, 40g/L gliserol) besiyeri kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Kompetent bakteri ve maya hücrelerinin oluşturulması

Plazmidlerin çoğaltılması amacıyla kullanılacak olan *E. coli* hücreleri kimyasal yöntem olarak bilinen CaCl₂ yöntemi ile kompetent -transformasyona elverişli- hale getirilmiştir. LB Miller plakada tek koloni düşecek şekilde geliştirilen *E. coli* DH5α suşundan, 3 mL LB Miller sıvı besiyerine ekimi yapılarak gece boyu 37°C çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Ertesi gün gelişen kültürün optik yoğunluğu ölçülerek 50 mL LB Miller sıvı besiyerine başlangıç OD_{600nm} değeri 0.01 olacak şekilde ekilmiş ve OD_{600nm} değeri 0.3 olana kadar (yaklaşık 3 saat) 37°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Kültür beklenen OD_{600nm} değerine ulaştığında 3000xg'de 4°C'de 5 dakika süre ile santrifüjlenerek hücreler hasat edilmiştir. Bu aşamadan sonra işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre peleti 5 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içinde süspanse edilmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücre peleti 1.5 mL %15 gliserol içeren 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içinde resüspanse edilmiş ve 100 µl'lik hacimler halinde daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

P. pastoris KM71 hücreleri Lityum Asetat (LiAc) yöntemine (Wu ve Letchworth 2004) göre kompetent hale getirilmişlerdir. Kompetent yapılmak istenen *P. pastoris* KM71 suşu, donmuş kültürden test tüpü içerisindeki 3 mL YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 250 rpm, 30°C çalkalamalı inkübatörde gece boyu geliştirilmiştir. Ertesi gün, gece boyu

gelişen kültürden başlangıç OD_{600nm} değeri 0.1 olacak şekilde 250 mL hacimli erlenmayerde 80 mL YPD sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. OD_{600nm} değeri 1.3-1.5 olana kadar 250 rpm, 30°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Hücreler yeterli gelişme gösterdikten sonra +4°C'de 3000 g hızında 5 dakika süre ile santrifüjlenerek hasat edildikten sonra süpernatant kısmı atılmıştır. Hücre peleti, 8 mL lityum asetat karışımı (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0.6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) içinde süspanse edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 4°C'de 3000xg hızında 5 dakika santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücreler 1.5 mL buz soğukluğundaki 1 M sorbitol içinde süspanse edilmiş ve 2 mL hacimli santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra hücreler 3 kez daha aynı şartlarda santrifüj edilerek 1.5 mL soğuk 1 M sorbitol ile yıkanmış ve çöktürülen hücreler buz soğukluğundaki maya resüspanسیون tamponu (1 M sorbitol, %20 gliserol) ile konsantrasyonları 10^{10} hücre/mL olacak şekilde karıştırıldıktan sonra 80 µl'lik hacimler halinde daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.2. DNA izolasyonu ve çoğaltılması

Pichia hücrelerine göre kodon optimize ve sentetik olarak tasarlanan sığır kimozin enzimini kodlayan DNA bölgesi pPICZαA vektörü içerisinde liyofilize şekilde temin edilmiştir. Liyofilize formda gelen plazmid DNA'sı (pPICZα-BtCHY) üretici firmanın talimatları doğrultusunda 40µl TE tamponu içinde çözündürülerek final konsantrasyonu 100 µg/µl olacak şekilde çözündürülmüştür. Daha sonra hazırlanan plazmid DNA'sının konsantrasyonu 1 µg/µl'ye nukleaz arı su (NFW; Nuclease Free Water) ile seyreltilmiş ve kompetent *E. coli* hücrelerine transformasyona uygun hale getirilmiştir.

Plazmid DNA'nın çoğaltılması amacıyla $CaCl_2$ yöntemi ile yetenekli hale getirilmiş *E. coli* DH5α hücreleri kullanılmıştır. Daha önceden hazırlanmış olan kompetent hücreler -80°C'den alınarak buz üzerinde çözündürülerek aseptik şartlarda üzerine 1 µl plazmid eklenmiştir. Kompetent hale getirilen *E. coli* hücrelerinin membran geçirgenliğini artırmak için hücre yüzeyinde porlar oluşur ve oluşan bu porlar sıcaklık farklılıklarından dolayı genişleyerek plazmid DNA'sının hücre içerisine alınmasında kolaylık sağlamaktadırlar. Isı şoku oluşturabilmek amacıyla hücreler önce buz üzerinde 30 dk, daha sonra 42°C sıcaklıktaki ısı bloğunun üzerinde 1-2 dk bekletilmiş hemen sonrasında tekrar buz üzerine alınarak 5dk daha buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerine soğutulmuş, antibiyotik ilavesiz 200 µl LB lenox sıvı besiyeri ilave edilmiş ve 37°C sıcaklıkta çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. 1 saatlik inkübasyon süresinden sonra gelişen hücreler, plazmid üzerindeki direnç geni olan zeosin antibiyotiğini içeren LB lenox agar besi ortamına ekilerek gece boyu aynı şartlarda gelişmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 18-20 saatlik inkübasyon süresinin sonunda oluşan kolonilerden alınarak antibiyotik içeren 3'er mL LB lenox besiyerine ekilmiş ve çalkalamalı inkübatörde plazmidleri taşıyan hücrelerin çoğaltılması sağlanmıştır.

Sıvı besi ortamında gelişmeleri sağlanan bakteri hücrelerinden GeneJET Plazmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific™) kullanılarak kit protokolleri doğrultusunda plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmidlerde DNA kalitesi agaroz jelde yürütülerek belirlenmiştir. DNA miktarı ise Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, ABD) cihazı kullanılarak florometrik olarak ölçülmüştür. Miktar ölçümlerinde Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™) kullanılmış ve kit içerisindeki standartlar ile cihazın

kalibrasyonu yapılarak 1000ng/ μ l'ye kadar olan plazmid DNA konsantrasyonları ölçülmüştür.

3.2.3. Defosforilasyon ve ligasyon protokolleri

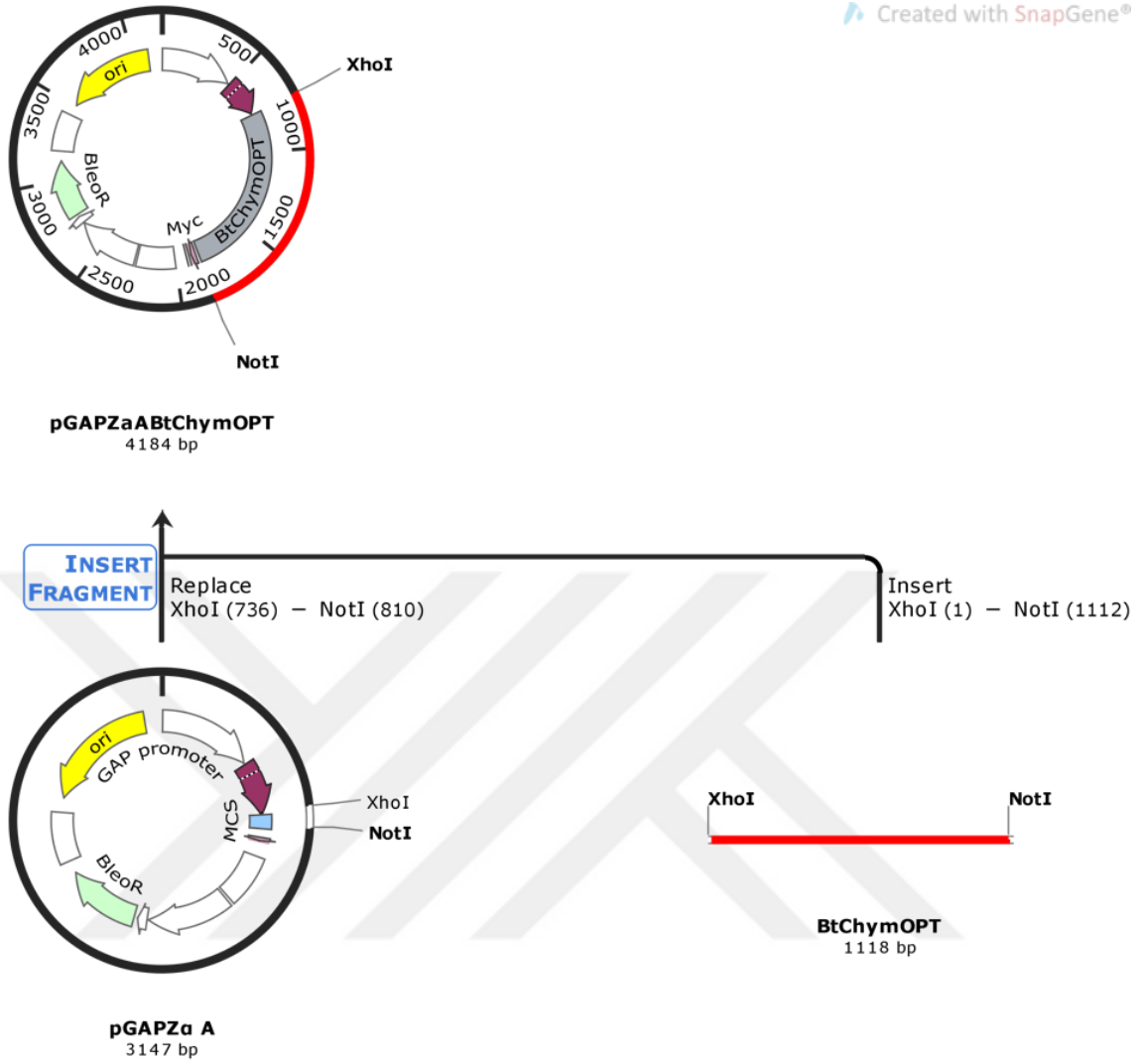
Sığır kimozinini kodlayan DNA parçasının (BtCHY) üretim vektörlerine ligasyonun yapılması amacıyla öncelikle hem insert DNA hem plazmid DNA uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek uçları açık hale getirilmiştir. Kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesim sonrasında klonlama vektörünün kendi üzerinde kapanmasını önlemek amacıyla FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific™) kiti kullanılarak defosforilasyon yapılmış ve böylece yapışkan formda bırakılan 5' ucundaki fosfat uçları uzaklaştırmıştır.

Defosforile vektör ile insert DNA'nın ligasyonu amacıyla T4 DNA ligaz (Thermo Scientific™) enzimi kullanılarak ve kit protokolü doğrultusunda ligasyon gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işleminde 1:3 molar oranında vektör ve insert DNA kullanılmış ve 50 ng vektör baz alınarak insert DNA ortama ilave edilerek ligasyon yapılmıştır. Vektörün insert DNA olmadan kendi kendine kapanıp kapanmayacağını test etmek amacıyla sadece defosforile edilmiş vektör DNA'sını içeren (vector only) başka bir tüpte T4 DNA ligaz enzimi yardımıyla ligasyon işlemindeki bütün aşamalar aynı şekilde uygulanmıştır.

3.2.4. Kimozin üretiminde kullanılan ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ve *E. coli* hücrelerine transformasyonu

3.2.4.1. pGAPZaBtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması

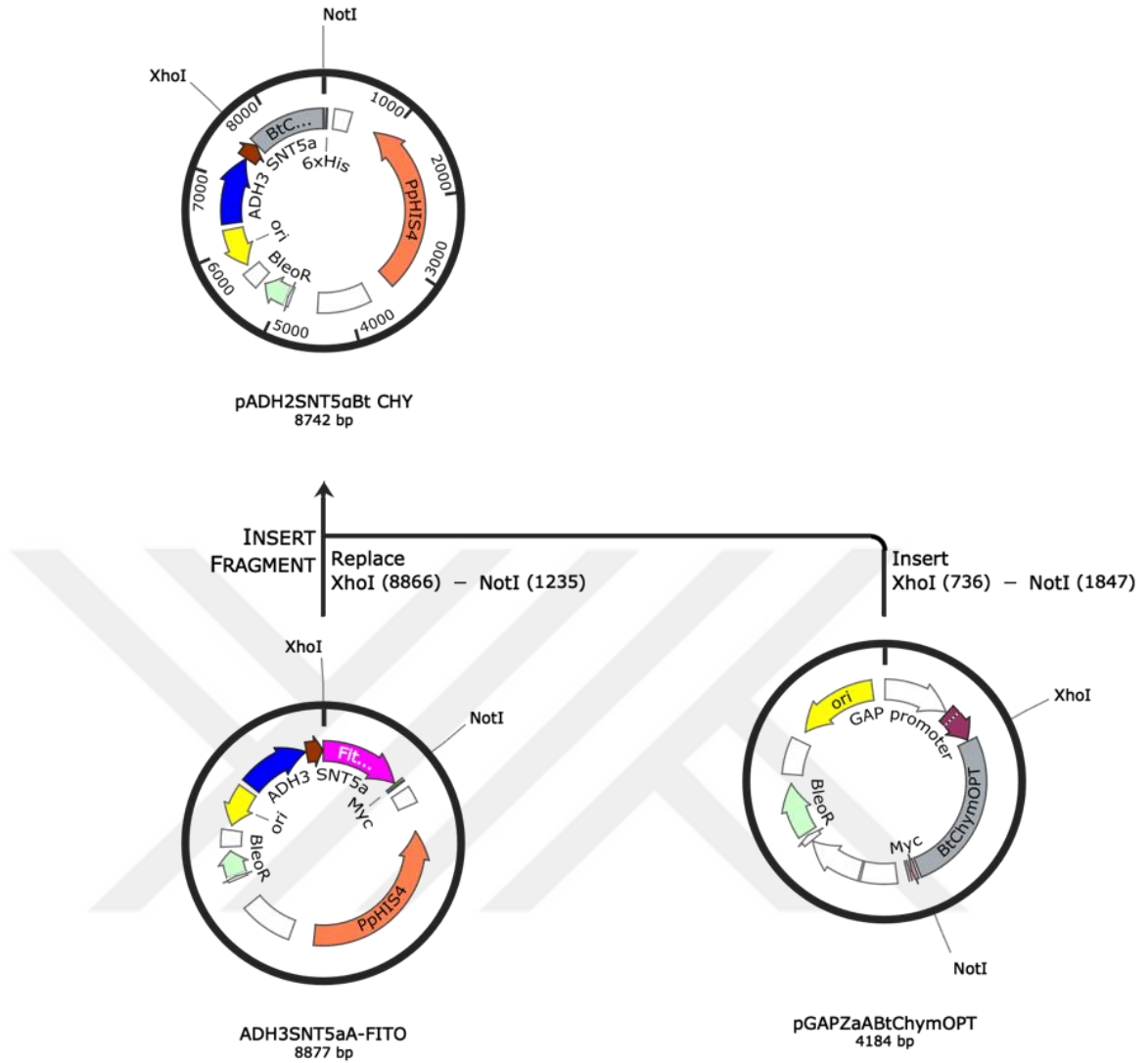
Yapısal GAP promotörü kontrolünde kimozin enzimi üretimi için kullanılan pGAPZaBtCHY ekspresyon vektörünün elde edilmesi amacıyla pPICZaA plazmidi içerisinde satın alınan BtCHY kimozin geni *Xho*I-NotI enzimleri ile kesilerek jelden saflaştırma yapılmıştır. Vektör olarak kullanılan pGAPZaA'de aynı enzimler ile kesilerek saflaştırılmış ve defosforilasyon yapılmıştır. Daha sonra vektör ve insert parçaları şekil 3.2'de gösterildiği gibi ligasyona alınarak pGAPZaBtCHY ekspresyon vektörü elde edilmiştir.



Şekil 3.2. pGAPZαBtCHY ekspresyon vektörünün oluşum aşamaları

3.2.4.2. pADH2SNT5αHIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması

Etanol ile indüklenebilen ADH2SNT5 promotoru kontrolünde kimozen enzimi üretimi için kullanılan pADH2SNT5αHIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması amacıyla, vektör olarak pADH2SNT5αHIS4, insert olarak BtCHY geni kullanılmış olup hem insert hem vektör *XhoI*-*NotI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş, vektöre defosforilasyon işlemi yapılarak ligasyona hazır hale getirilmiştir. Daha sonra T4 DNA ligaz enzimi ile ligasyon yapılarak klonlama stratejisi şekil 3.3'te şematize edilen pADH2SNT5α-BtCHY ekspresyon vektörü elde edilmiştir.

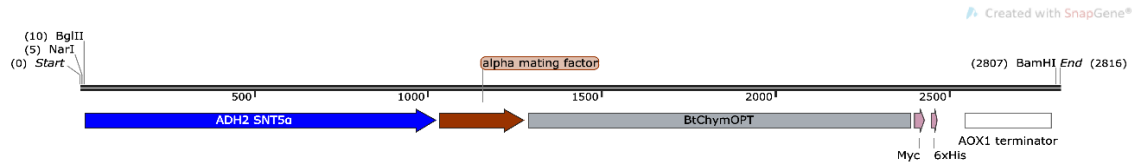


Şekil 3.3. pADH2SNT5αHIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulmasında kullanılan klonlama stratejisi

3.2.4.3. Yüksek gen kopyalı pADH2SNT5α-BtCHY (1-4 kopya) ekspresyon vektörlerinin oluşturulması

Tez çalışmasının standart klonlama yöntemleriyle oluşturulan ve şekil 3.3’de şematize edilerek gösterilen pADH2SNT5αHIS4-BtCHY üretim vektörünün *Pichia* hücrelerine transformasyonu sonrasında yüksek orandaki antibiyotikli seçilim ortamlarında in-vivo koşullarda ekspresyon kasetini 1 ve 1 kopyadan daha fazla içeren klonların elde edilmesi hedeflenmiştir. Ancak ekspresyon kasetinin büyüklüğünden (8742bp) dolayı, hücre genomunda 1’den fazla kopya sayısının oluşma ihtimalinin zayıf olması göz önünde bulundurularak kimozin genini yüksek kopya sayıda içeren vektörlerin in vitro koşullarda oluşturulması planlanmıştır. Bu amaçla gen kopya

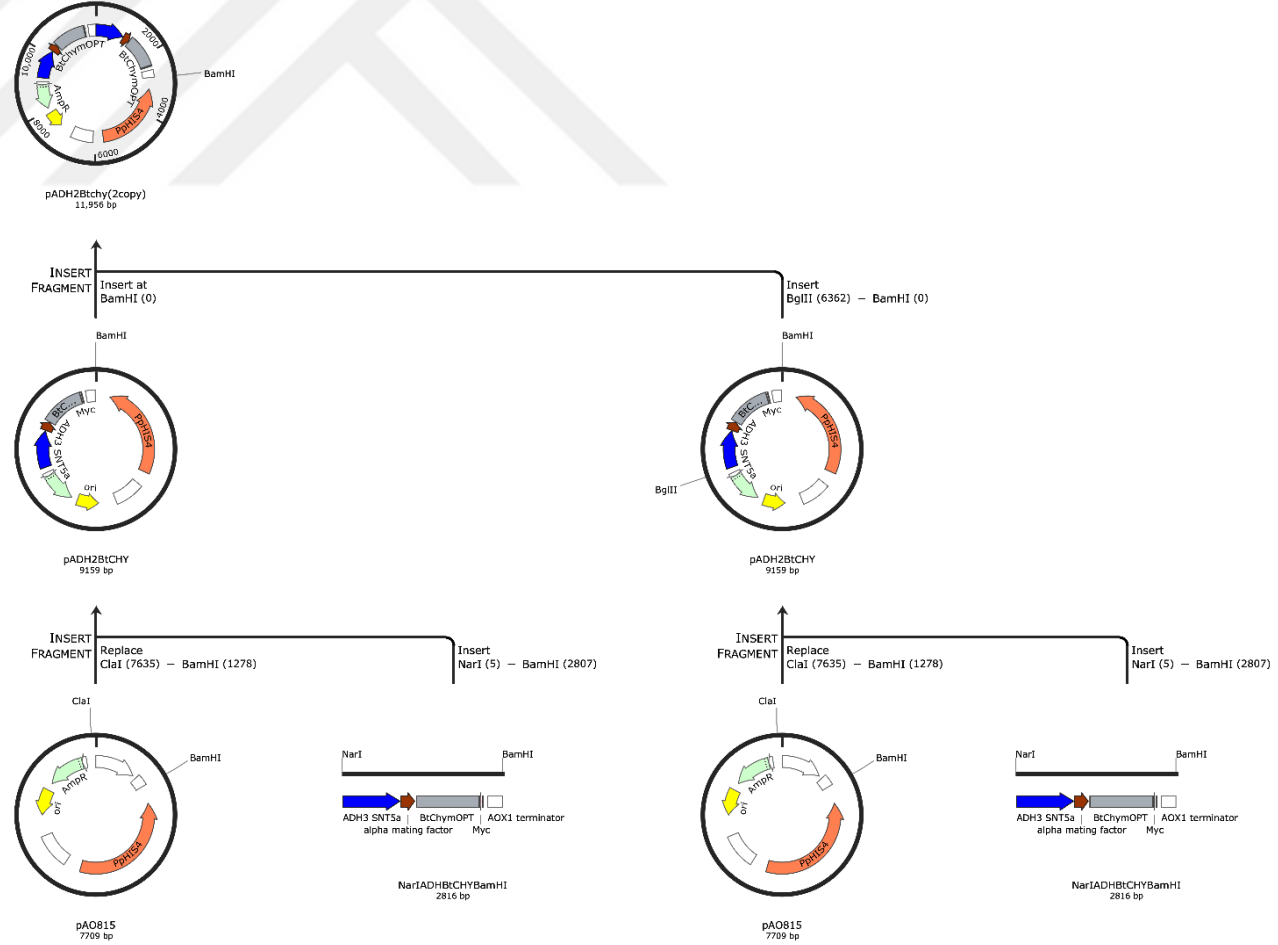
sayısının artırılması için daha önce Vassileva vd. (2001) tarafından Hepatit B yüzey antijeninin *P. pastoris*'te yüksek kopyalı klonlar oluşturulmasına yönelik yapılan bir çalışmada kullanılan metodlar uygulanmıştır. In vitro şartlarda yüksek gen kopyası içeren ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında pAO815 vektörü iskelet olarak alınmış ve ilk olarak bu vektör üzerindeki AOX1 promotoru *ADH2SNT5* promotoru ile değiştirilmiştir. Bu amaçla aynı vektör bünyesinde şekil 3.4'te verilen “*ADH2SNT5* promotoru- α mating sinyal sekansı- BtCHY geni- terminatör” bölgelerinden oluşan, yaklaşık 2816 bç büyüklüğündeki DNA parçasının bu vektöre klonlanması ile 1 kopya kimojin geni içeren pADH2SNT5 α -BtCHY (1 kopya kimojin) ekspresyon vektörü elde edilmiştir.



Şekil 3.4. In vitro koşullarda seri olarak klonlanan ekspresyon kaseti

Yukarıdaki şekilde (şekil 3.4) gösterilen “*ADH2SNT5* promotoru- α mating sinyal sekansı- Bt CHY geni- terminatör” DNA bölgesi ilk olarak *NarI*-*BamHI* enzimleri ile kesilmiş ve *ClaI*-*BamHI* enzimleri ile kesilen pAO815 vektör ile ligasyonu yapılarak 1 kopya kimojin geni içeren pADH2BtCHY ekspresyon vektörü elde edilmiştir (şekil 3.5). Daha sonrasında kimojin genini 1 kopya içeren pADH2SNT5 α -BtCHY-1C (1 kopya kimojin) vektörü *BamHI* enzimi ile kesilerek ana iskelet olarak kullanılmış, içerisine yine aynı vektörden *BglII*- *BamHI* ile kesilerek düşürülen “*ADH2SNT5* promotoru- α mating sinyal sekansı- Bt CHY geni- terminatör” bölgesi tekrar klonlanmıştır. Böylelikle kimojin genini 2 kopya içeren ve oluşum şeması şekil 3.5'te verilen ve büyüklüğü 11956 bç olan pADH2SNT5 α -BtCHY-2C (2 kopya kimojin) vektörü elde edilmiştir. Her ligasyon işleminden sonra oluşturulan ekspresyon vektörü gerekli doğrulama analizleriyle doğrulanarak bir sonraki aşamaya geçilmiştir.

In vitro koşullarda oluşturulan 2 kopya kimojin geni içeren vektör iskeleti ana iskelet olarak kullanılarak aynı klonlama stratejisi ile 3 ve 4 kopya kimojin geni içeren pADH2SNT5 α -BtCHY-3C (3 kopya kimojin) ve pADH2SNT5 α -BtCHY-4C (4 kopya kimojin) vektörleri oluşturulmuştur. Sırasıyla 14753 bç ve 17550 bç boyutlarındaki 3 ve 4 kopya kimojin geni içeren ekspresyon vektörlerinin oluşum şeması ekler bölümünde (EK-1 ve EK-2) verilmiştir.



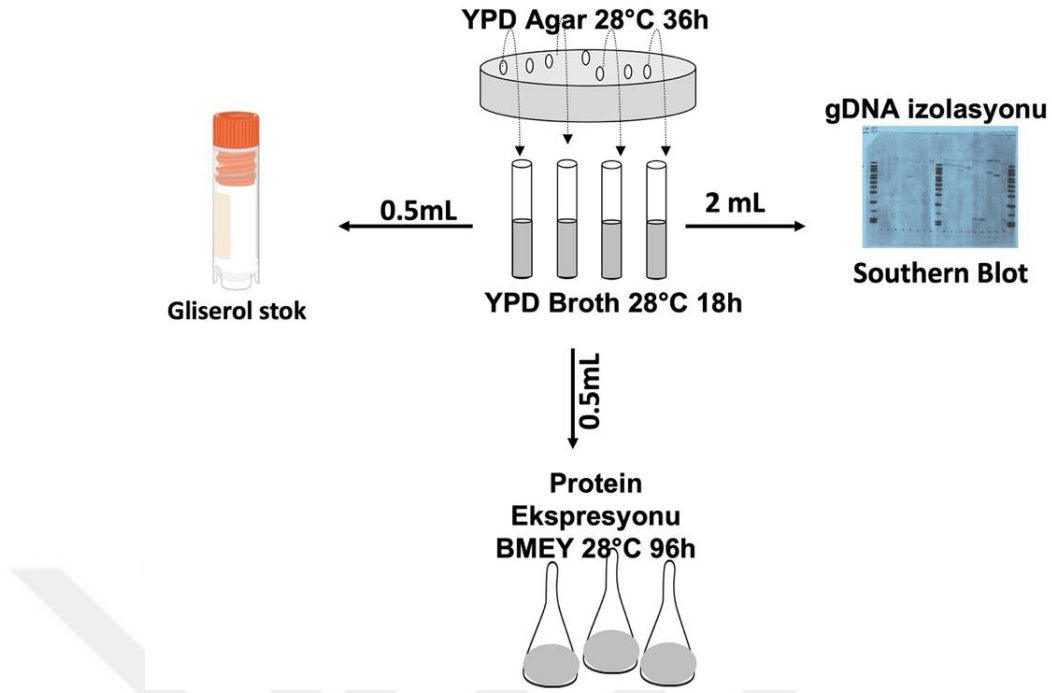
Şekil 3.5. In vitro koşullarda oluşturulan 1 kopyalı pADH2SNT5 α -BtCHY-1C (1 kopya kimozin) ve 2 kopyalı pADH2SNT5 α -BtCHY-2C (2 kopya kimozin) vektörlerinin oluşum şeması

3.2.5. Ekspresyon vektörlerinin *P. pastoris* hücrelerine transformasyonu

Doğrulama analizleri sonrasında seçilen ekspresyon vektörlerinin kompotent haldeki *P. pastoris* hücrelerine transformasyonu amacıyla *Pichia* genomunda entegrasyonun hedef alındığı bölgeye göre seçilen ve klonlama vektörünü tek bir yerden kesen restriksiyon enzimleri (*ADH2SNT5* promotoru içeren ekspresyon kasetlerini *Kpn2I* enzimi ile, *GAP* promotorunu içeren ekspresyon kaseti *XmaI* enzimi ile) ile vektörler kesilerek lineer hale getirilmiş ve jelde doğrulanmıştır. Lineer edilen DNA MinElute PCR Purification Kiti (Qiagen) kullanılarak saflaştırılmış ve sonrasında konsantrasyonu ölçülerek en az 1000 ng lineer DNA'nın kompotent maya hücrelerine transformasyonu yapılmıştır.

Lineer hale getirilen plazmidin kompotent *P. pastoris*, GS115, JC220, X33 ve KM71 hücrelerine transformasyonu elektroporasyon yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) cihazı kullanılarak plazmid DNA'nın genoma entegrasyonu için hücreler yüksek elektrik akımına maruz bırakılmıştır. Kompotent haldeki *P. pastoris* hücreleri buz üzerinde çözdürülmüş daha sonra tüpe lineer plazmid DNA'sı ilave edilerek pipet yardımı ile karıştırılmıştır. Bu karışım, buz üzerinde soğutulmuş olan 2mm genişliğindeki elektroporasyon tüplerine (Electroporation Cuvettes-Thermo Scientific™) aktarılmış ve elektroporator cihazına yerleştirilmiştir. Daha sonrasında 1600V gerilimde 5ms süre ile elektrik akımı verilerek elektrotransformasyon yapılmıştır. Yüksek elektrik akımına maruz bırakılan bu hücrelerde işlem sonrasında hücrelerin üzerine çok hızlı bir şekilde buz soğukluğundaki 1M sorbitol'den 1ml ilave edilerek süspanse edilmiş ve 28°C sıcaklıkta 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda ekspresyon vektörlerini içeren hücreler 100-1000 µg/mL aralığında değişen farklı zeosin konsantrasyonlarındaki MD veya YPD agar plakalara ekilmiştir, 28°C sıcaklıkta 3 gün inkübasyona bırakılmışlardır.

Kimozin enzimini kodlayan DNA bölgesini genomunda içeren klonlarda enzim üretim miktarını tespit etmek amacıyla gelişen klonlar YPD sıvı besiyerlerinde çalkalamalı inkübatörde 18-20 saat geliştirilmiştir. Sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra aşağıdaki şekilde (şekil 3.6) şematize edildiği gibi üretime alınmışlardır.



Şekil 3.6. *P. pastoris* mayasında protein ekspresyonu aşamasında klon seçim şeması

3.2.6. Southern blot analizi ile maya genomuna entegrasyonun kontrolü

Rekombinant protein üretimi için klonlama işlemleri yapıldıktan sonra klonlanan DNA'nın protein olarak ifade edilmesi için konak maya hücresinin genomuna doğru bölgeye uygun şekilde entegrasyon yapılması proteinin ifadesi, stabilitesi ve biyolojik aktivitesi için gerekli olan en önemli aşamadır. Standart moleküler biyoloji tekniklerinden birisi olan Southern blot analizi, tanımlı ve etiketli spesifik DNA bölgelerini tespit etmeye yarayan bir hibridleme yöntemidir. Bu yöntemde gDNA'lar belirli restriksiyon enzimleri ile kesilerek fragmentlerine ayrılmakta, ayrılan bu fragmentler agaroz jelde yürütülmekte ve sonrasında denatüre edilmektedir. Denatürasyon işleminden sonra ssDNA'lar nitroselüloz veya naylon membrana transfer edilmekte bu membran üzerinde radyoaktif olmayan bir ajan ile etiketlenmiş prob ile hibridlenerek görüntülenmektedir.

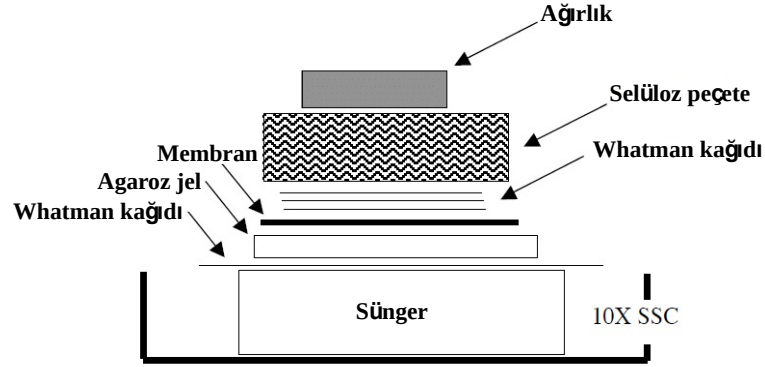
Transformasyon sonrası seçilen klonlarda DNA'nın genomda hedeflenen bölgeye entegrasyonunun kontrolü için Southern blot analizi yapılmıştır. Bu amaçla seçilen klonlar YPD sıvı besiyerine ekilmiş, genomik DNA izolasyonu için geliştirilmişlerdir. Genomik DNA izolasyonu amacıyla gece boyu geliştirilen 6-10 OD_{600nm} arasındaki hücrelerden 2ml çöktürülerek süpernatant kısımları atılmıştır. Tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine 200 µl maya hücre lizis tamponu (%2 Triton X-100, %1 SDS, 0.1M NaCl, 10mM Tris HCl (pH 8) 1mM EDTA (pH 8)) ilave edilmiş ve vortekslenerek çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonrasında -80°C sıcaklıkta en az 30 dk bekletilerek hücre ve lizis tamponu karışımı dondurulmuş sonrasında ise 95°C sıcaklıkta 2 dk bekletilmiş ve tekrar vortekslenmiştir. Bu aşama 3 kez tekrarlandıktan sonra karışımın üzerine 200 µl kloroform ilave edilerek 2 dk. vortekslenmiştir. Daha sonrasında 20000g hızında 5 dk

santrifüjleme işlemi yapılarak faz ayrımı sağlanmıştır. Santrifüjleme işleminden sonra üst faz alınarak içerisinde 400 µl soğuk etanol bulunan yeni tüpe aktarılmış ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek gDNA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır. Sonrasında tekrar santrifüjleme yapılmış ve 500 µl %70'lik etanol ile yıkanmıştır. Etanol yıkamasından sonra evaporator (Eppendorf Concentrator Plus-5301) cihazı ile kalan etanol uzaklaştırılmıştır. Elde edilen gDNA'lar 20 µl elüsyon sıvısı (TE buffer: 10mM Tris, pH 8.5) içerisinde çözündürülmüş ve RNA'ların uzaklaştırılması için üzerilerine 1 µl RNase enzimi (RNase A, DNase and protease-free, Thermo Scientific™) eklenerek 37°C sıcaklıkta 1 saat bekletilmiştir.

Southern blot analizinde etiketleme amacıyla *HIS4* geninden HIS4618F (CAATACTACACAGGGCTGATGT) ve *HIS41146R* (GATGGAGTCGCTTTGAA GAC) primerleri ile ve GAP geninden GAPBglII (GGAGATCTTTTTGTAGAAATGT CTTG) ve GAPEcoRI (GGCCACGTGAATTCCTCG)) primerleri ile çoğaltılan PZR ürünleri prob olarak kullanılmıştır. Analizin temel prensibi tek zincirli prob DNA ile o bölgenin karşı zinciri olan gDNA bölgesinin hibridlenmesi ve tespit edilmesi olduğu için prob olarak kullanılacak olan bu PZR ürününün digoksisijenin (DIG) ile etiketlenmesi yapılmıştır. Probun etiketlenmesinde DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, Almanya) kullanılmış ve kit protokolleri doğrultusunda etiketleme yapılmıştır. PZR ürünü olan bu probun etiketlenmesinde en önemli aşama probun etkinliğinin iyi olmasıdır. Bu yüzden kit içerisinde bulunan DIG etiketli kontrol DNA referans olarak kullanılarak yine kit protokolleri doğrultusunda prob etkinliği ölçülmüştür. Prob etkinliğinin en az kontrol DNA etkinliğinde olduğu kontrol edilerek analizlerde kullanılmıştır.

Entegrasyon kontrolü amacıyla yapılan Southern blot analizi “DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II” kiti kullanılarak aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'lar uygun restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Restriksiyon işleminden sonra %0.8 konsantrasyondaki agaroz jele yüklenmiş ve 1XTAE tamponu ile 200V elektrik akımında 2-4 saat yürütülmüştür. Süre sonunda agaroz jele 45 dk denatürasyon (5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ve 30 dk nötralizasyon (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) işlemi yapılarak membrana transfere hazır hale getirilmiştir.

Agaroz jelden naylon membrana transfer etmek amacıyla kullanılan Positively Charged Nylon Membran (Roche, ABD) ilk olarak 1X SSC tamponu ile aktiveleştirilerek transfere elverişli hale getirilmiştir. Sonrasında jelden membrana transfer işlemini sağlamak amacıyla aşağıdan yukarıya olacak şekilde sırasıyla kapiler geçiş platformu(sünger), whatman filtre kağıdı, agaroz jel, naylon membran, whatman kağıdı, selüloz peçete üst üste dizilmiş ve en üste uygun bir ağırlık yerleştirilmiş, 1XSSC tamponu ile transfer yapılmıştır. Transfer işlemi aşağıdaki şekil 3.7'de şematize edilerek gösterilmiştir. Kapiler taşınım prensibiyle DNA'ların jelden membrana transfer işlemi yaklaşık 3-5 saat boyunca devam etmiştir.

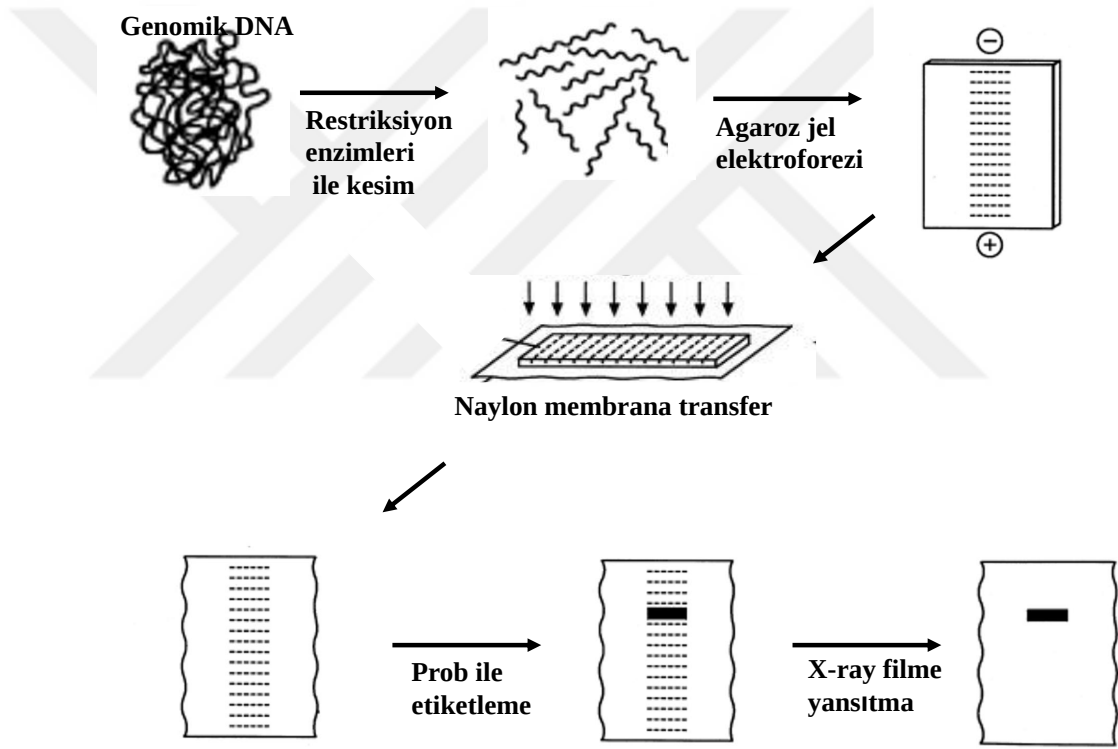


Şekil 3.7. Restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA'ların agaroz jelden membrana transferinin şematik gösterimi

Transfer sonrasında membran düzenek içerisinde agaroz jele bakan kısmı üste gelecek şekilde çıkarılmış, oda sıcaklığında çok kısa bir süre kurutulmuştur. Kurutulan membran ultraviyole çapraz bağlayıcıya yerleştirilerek (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) 4 kez 120mJ UV ışını uygulanmış ve DNA'ların membran üzerine bağlanması sağlanmıştır. Membran DNA'ların bağlandığı yüzeyi üste gelecek şekilde uygun hibridizasyon tüpüne aktarılmış ve ön hibridizasyon çözeltisi (DIG Easy Hyb, Roche, Almanya) ilave edilerek 30 dk-1 saat arası 41°C sıcaklıkta ön hibridizasyona bırakılmıştır. Ön hibridizasyon süresinin sonunda yine aynı hibridizasyon sıvısı ile daha önceden hazırlanmış ve etkinliği test edilmiş olan prob içeren solüsyon ilave edilerek aynı sıcaklık ve dönme hızında gece boyu prob ile hibridizasyona bırakılmıştır. Hedeflenen bölgeye spesifik olarak dizayn edilen ve DIG etiketli olan prob bu süre boyunca membran üzerindeki ssDNA tanıma bölgelerine hibridlenmektedir. Gece boyu gerçekleşen bu hibridleme işleminden sonra prob solüsyonu boşaltılarak sırasıyla yıkama solüsyonları ilave edilmiştir. Birincil ($2\times\text{SSC} + 0.1\% \text{ SDS}$) ve ikincil ($0,5\times\text{SSC} + 0.1\% \text{ SDS}$) yıkama solüsyonu olarak bilinen bu solüsyonların kullanım amacı spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla yıkama aşamalarında yüksek tuz içeren birinci solüsyon ile yıkama işlemi 15-25°C sıcaklıkta 2 kez 5'er dk olacak şekilde, düşük tuz içeren ikinci yıkama solüsyonu ile gerçekleşen yıkama ise 65-68°C sıcaklıkta 2 kez 15'er dk olacak şekilde yapılmıştır.

Yıkama işlemlerinden sonra hibridizasyon tüpünde bulunan membran uygun bir kaba alınarak immünolojik olarak belirleme aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada membran öncelikle yıkama solüsyonu (0.1 M Maleik asit pH 7.5, % 0.3 (v/v) Tween 20) içerisinde 5 dk orbital karıştırıcıda yıkanarak SSC tuzundan arındırılmıştır. Daha sonrasında membranın üzerine kit içerisinde bulunan 10X blocking solüsyonunun maleik asit tamponu ile seyreltilmesiyle elde edilen kapatma tamponu (1×DIG Blocking Solution, Roche) ilave edilerek 1 saat tekrar yıkamaya bırakılmıştır. Bir sonraki adım olan antikor ile bağlanma aşamasında ise Anti-Dioxigenin-AP, Fab fragments antikorunun kit protokolünde belirtilen oranda seyreltilmesiyle hazırlanan anti-DIG antikor çözeltisi içerisinde 1 saat süreyle tekrar muamele edilmiştir. Süre sonunda 2 kez 15'er dk olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmış ve membran deteksiyon tamponu (0.1 M Tris pH 9.5 ve 0.1 M NaCl) ile 5 dk muamele edilmiştir. Daha sonrasında deteksiyon

aşamasının tamamlanması amacıyla membran şeffaf propilen zarf içerisine alınmış ve yüzeyini kaplayacak kadar CSPDR (alkalin fosfataz substratı, Roche) damlatılarak homojen dağılımı sağlanması amacıyla 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Membran ile propilen zarf içerisindeki hava kabarcıkları uzaklaştırılarak 37°C de 10 dk daha inkübe edildikten sonra membran X-Ray kaseti içerisine alınmıştır. Daha sonraki işlemler karanlık odada gerçekleşmiş olup kaset içerisindeki membran üzerine X-ışını filmi yerleştirilerek kapatılmış ve 1 saat süresince film yansımaya bırakılmıştır. Yansıma süresi sonunda X-ışını filmi karanlık odada Kodak film geliştirme solüsyonları ile muamele edilmiş ve kemilüminesans yansıma vererek Southern blot film görüntüsü elde edilmiştir. Southern blot analizinde genel olarak izlenen prosedür şekil 3.8’de özetlenmiştir. Elde edilen bu film görüntüsü üzerinde DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled (Roche) markırı kullanılarak gDNA bantlarının markır bandına göre hizaları veya bant yoğunlukları açısından yorumlama yaparak hedeflenen DNA parçalarının genoma entegrasyonu ve gen kopya sayısı hakkında bilgi edinilmiştir.



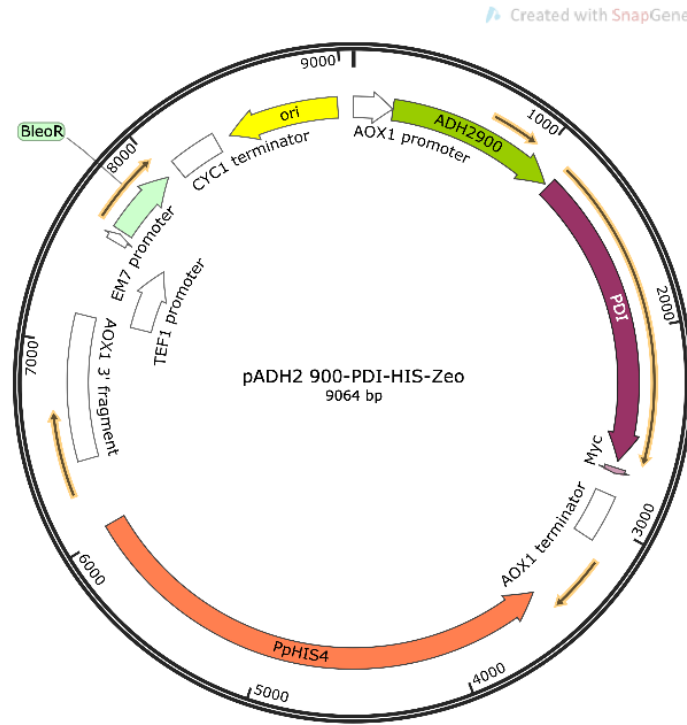
Şekil 3.8. Southern blot analiz basamakları

3.2.7. Yüksek kimoziin gen kopyalı maya klonlarında PDI (protein disülfid izomeraz) şaperonunun overekspresyonu

Hücre dışında gerçekleşen rekombinant protein üretimlerinde protein miktarının artırılması amacıyla seçilen konakçı organizmanın uygunluğu, kodon optimizasyonun yapılması, gen kopya sayısının artırılması gibi bazı temel faktörler önem kazanmaktadır. Bu çalışmada kimoziin enzimini kodlayan DNA bölgesinin, konak organizmaya göre kodon optimizasyonu yapılmış ve yüksek gen kopyalı klonlar oluşturulmuştur. Ancak gen

kopya sayısı arttırılınca üretilen protein miktarı artsa bile hücre dışına salgılanması aynı oranda gerçekleşmemekte ve bazı durumlarda üretilen proteinin hücre içinde kaldığı görülmektedir. Üretimi gerçekleşen proteinler, katlanması ve doğru ifadesinin yapılabilmesi için belirli kontrol mekanizmalarından geçerek hücre dışına salgılanmaktadır. Daha önceki çalışmalara bakıldığında (İnan vd. 2006), yetersiz sekresyon problemlerinin şaperon proteinlerin ekspresyonu ile çözüldüğü, hedef proteinin hücre dışına salgılanma oranının şaperon protein kullanımı ile arttırıldığı görülmüştür.

Bu tez çalışması kapsamında üretilen enzimin hücre dışına salgılanmasını artırabilmek amacıyla endoplazmik retikulum'un bir proteini olan Protein Disülfid İzomeraz (PDI) şaperon proteini kullanılmış ve oluşturulan multikopyalı kimozin klonlarında PDI proteini homolog olarak overekspres edilmiştir. Bu amaçla pADH2-900-PDI plazmidini elde etmek için pPIC3.5K-PDI plazmidi içerisinde laboratuvarımızda mevcut bulunan PDI geni, doğal ADH2-900 promotörü altına klonlanmış şekil 3.9'da vektör haritası verilen plamzid elde edilmiştir.



Şekil 3.9. pADH2-900-PDI-HIS-Zeo vektör haritası

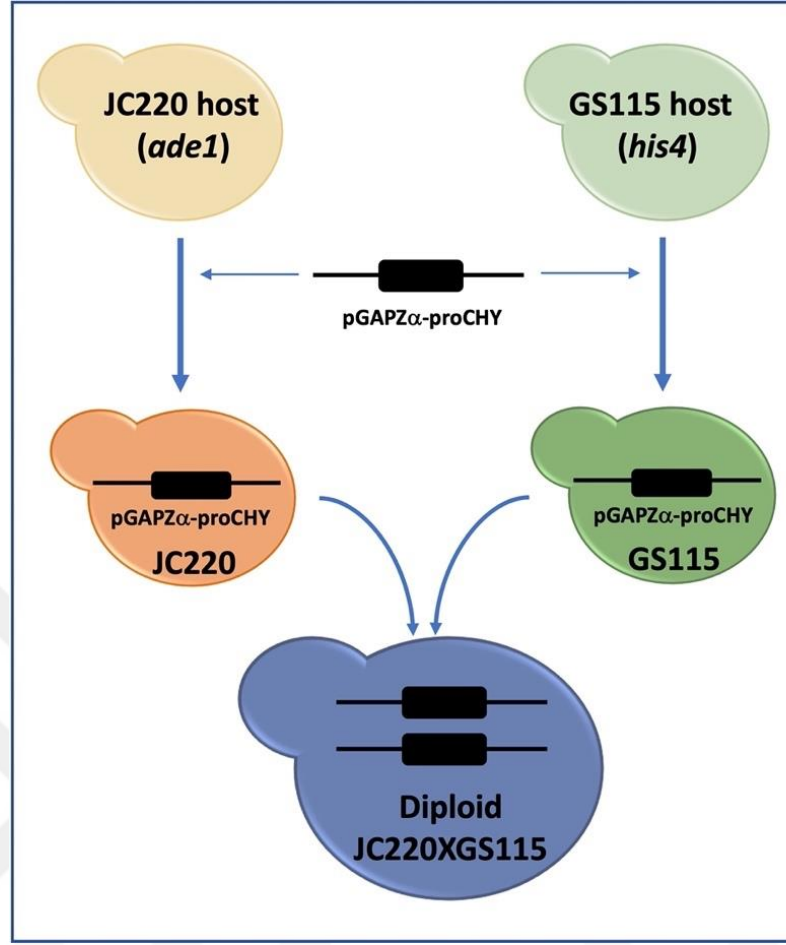
Yukarıda vektör haritası verilen pADH2-900-PDI-HIS-Zeo vektörü, bölüm 3.2.4.3'te oluşturulan ve doğrulama analizleri sonrası seçilen multikopyalı kimozin klonlarına transforme edilmiştir. Lineer etmek amacıyla *HIS4* içerisinde kesen *Kpn2I* enzimi kullanılmış ve YPD+zeosin plakalarına ekim yapılarak 3 gün 28°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloniler yukarıdaki bölümlerde anlatıldığı gibi geliştirilmiş, Southern blot analizi yapılarak PDI kopya sayısı belirlenmiş, seçilen klonlarla erlenmayer ölçeğinde tekrar üretim yapılmıştır. Böylece fermentör

üretimlerinde kullanım için, genomunda hem farklı kopyalarda kimoziin geni hem de PDI içeren maya klonları elde edilmiştir.

3.2.8. Yapısal GAP promotörü altında kimoziin üretici diploid maya klonlarının oluşturulması

Yapısal GAP promotörü kontrolünde kimoziin üretimi amacıyla pGAPZ α BtCHY vektörü GAP promotörünün içinden kesen AvrII enzimi ile kesilerek kompetent haldeki X33, GS115 ve JC220 hücrelerine transforme edilmiştir. Transformant hücrelerde farklı gen kopya sayılarına sahip klonların seçilebilmesi için artan zeosin konsantrasyonları (100, 500, 1000 μ g/ml) içeren YPD agar plakalarına ekilmiş, 28°C’de 3 gün inkübe edilmiştir. Gelişen transformant hücrelere Southern blot analizi yapılmış ve her 3 klonunda kimoziin gen kopya sayıları tespit edilmiştir.

Yabanıl tip X33 hücreleri direk üretime alınmış, GS115 ve JC220 konakçısındaki klonlar ise diploid oluşturmak üzere eşleşme plakasına ekilmiştir. Doğal formunda haploid olan *P. pastoris* hücrelerinden diploid hücre elde etmek amacıyla, pGAPZ α BtCHY ekspresyon kasetini 1 kopya içerdği Southern Blot ile belirlenen adenin okzotrof JC220(*ade1*) klonu ile histidin okzotrof GS115(*his4*) klonu YPD besiyerinde bir gece geliştirilmiştir. Daha sonra bu iki okzotrof suş eşleşme plakası (Mating Agar Plate) üzerinde birbirlerine dik olacak (+) şeklinde (Tolstorukov I. ve Cregg, J.M. 2007) ve Chen v. 2012) şekilde çizilmiştir. Azot eksik olan bu eşleşme besi ortamında iki suşun okzotrof özelliklerinden yararlanılarak eşleşme geçirmesi ve diploid hücrelerini oluşturması amacıyla 28°C’de 3-5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda diploid-haploid karışımı şeklinde gelişen bu hücrelerde sadece diploid olanlarını seçmek amacıyla MD (minimal dekstrozu) besi ortamına “replika-plating” yöntemi ile ekilerek 3 gün tekrar inkübasyona bırakılmışlardır. MD ortamında hem adenin hem de histidin aminoasitlerinin eksik olduğu bilinmekte olup bu ortamda gelişebilen hücreler eşleşme geçirerek diploid oluşturan hücreler olarak doğrulanmıştır. Böylelikle kimoziin enzimini bir kopya içerdği bilinen JC220 ve GS115 hücrelerinde eşleşme işlemi ile şekil 3.10’da şematize edildiği gibi 2 kopya kimoziin geni içeren diploid kimoziin üretici klonlar elde edilmiştir. Elde edilen diploid JC220XGS115 klonunda standart üretim yöntemleri ile enzim üretimi yapılmıştır.



Şekil 3.10. Kimozin üretici diploid maya klonlarının oluşum şeması

3.2.9. Erlenmayerde enzim üretimi

Elde edilen klonlarda tarama yapmak amacıyla öncelikle YPD agar plakada gelişen koloniler 3 mL YPD sıvı besiyerine ekilmiş ve 28°C de 250 rpm karıştırma hızındaki çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick, NJ ABD) gece boyu gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin OD_{600nm} değerleri ölçülmüş ve 0.1 OD_{600nm} başlangıç değeri ile 250 mL hacimli engelli erlenmayer içerisindeki 30 mL BMGY (pH 6) besiyerine ekim yapılmıştır. Yaklaşık 12-18 saatlik gelişme sonrasında hücre yoğunluğu tekrar ölçülmüş ve yeteri kadar geliştiği (10-15 OD_{600nm}) tespit edilen klonlar 3000xg'de 5 dakika santrifüj edilerek aynı hacimdeki BMEY (pH 3) ortamına aktarılmıştır. Protein ekspresyon besiyeri olan BMEY besiyerinde gelişen hücrelerde her 12 saatte bir son konsantrasyonu %1 olacak şekilde etanol ilavesi yapılmış ve belirli aralıklarla içerden 1ml örnek alınarak 96. saatte üretim sonlandırılmıştır. GAP promotörü kontrolünde üretim için ise YPD sıvı besiyerinde geliştirilen hücreler 0.1 OD_{600nm} başlangıç değeri ile 250 mL hacimli engelli erlenmayer içerisindeki 30 mL BYED (pH 3) besiyerine ekim yapılmış ve 96 saat boyunca burada geliştirilmiştir. Üretim sırasında düzenli olarak alınan örnekler santrifüj edilerek analiz edilene kadar süpernatantları uygun şartlarda muhafaza edilmiştir.

3.2.10. Süt pıhtılaştırma testi

Belirli aralıklarla alınan örneklerden elde edilen süpernantlarda enzim aktivitesinin belirlenmesinde International Dairy Federation (IDF) (ISO 11815 IDF 157) standart protokolü kullanılmıştır. İlgili metoda göre yağsız süt tozu ile hazırlanan %26 (w/v) konsantrasyonda rekonstitüye süt substrat solüsyonu olarak kullanılmıştır (Nosedá vd. 2013). Kalsiyum konsantrasyonunun kimozin enzimi aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ise farklı konsantrasyonlardaki CaCl_2 çözeltileri denenmiş ve en yüksek enzim aktivitesinin 40 mM CaCl_2 ile ölçüldüğü sonucuna varılmıştır (Wang vd.2015). Bu tez çalışmasında rekonstitüye süt substrat solüsyonunun hazırlanması amacıyla kullanılan süt tozu Ekiciler Süt Gıda Tar. Hay. San. ve Tic. A.Ş. (Antalya)'den temin edilmiştir. Süt tozundan 40 mM CaCl_2 (pH6.5-6.8) ile %26 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmış olan bu süt solüsyonu homojen karışması amacıyla oda sıcaklığında 20 dk karıştırılmış ve 37°C sıcaklıkta 20 dk inkübe edilerek substrat olarak kullanılmıştır. Süt pıhtılaştırma testi ham süpernantlar ile 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Mikrosantrifüj tüpü içindeki 1 mL süt solüsyonuna 20 µL süpernant eklenmiş ve elle sabit hızda döndürme işlemi yapılarak tüp duvarları gözlemlenerek süt solüsyonunda ne kadar sürede (s) pıhtı oluştuğu kaydedilmiştir. Farklı klonların tarama yöntemi ile enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu pıhtılaştırma testinde ticari sığır kimozininin (200 IMCU/mL) (Mayasan, Türkiye) seyreltilmesiyle elde edilen 12 IMCU/mL gücündeki RENMAX %100 enzimi referans olarak alınmış ve klonlar arası karşılaştırma yapılmıştır. Standart sığır kimozini seri dilüsyon şeklinde seyreltilmiş ve enzimin substratta gösterdiği kararlı pıhtılaşmanın başladığı dilüsyon oranı baz alınarak üretilen rekombinant kimozin enzimlerinin pıhtı süreleri belirlenmiştir.

3.2.11. SDS-PAGE analizi ve toplam protein miktarının belirlenmesi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) metodu proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırarak görüntülenmesini sağlayan bir elektrofrez tekniğidir. OWL P8D8 (Thermo Scientific) cihazında %5 poliakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli olacak şekilde jeller hazırlanarak protein üretim çalışmasının belirli aralıklarında alınan protein örnekleri analiz edilmiştir. Örneklerin hazırlanmasında 20 µl süpernant örneği, 7 µl 4X SDS-PAGE örnek tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0,4 bromphenol blue, %40 glycerol, 100 mM DTT) ve 3 µl 1M DTT karışımı hazırlanarak 70 °C sıcaklıkta 10 dk bekletilerek denatüre edilmiştir. Denatürasyon işleminden sonra jele yüklenerek 1 saat 120V elektrik akımında 1xTGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, %0.1 SDS, pH 8.3) tamponu içerisinde yürütülmüştür.

Elektrofrez işleminden sonra jeller Coomassie çözeltisi (% 0.1 Coomassie Blue R250, % 10 asetik asit, % 50 metanol ve % 40 saf su) ile 1 saat boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmıştır. Daha sonrasında yıkama çözeltisi (% 10 asetik asit, % 50 metanol ve % 40 saf su) ile tekrar 1 saat yıkılarak fazla boya uzaklaştırılmıştır. İşlem sonrasında 15 dk boyunca saf su içerisinde son yıkama yapılmış ve görüntülemeye hazır hale getirilmiştir. Jelin görüntülenmesi amacıyla LiCor (Odyssey) cihazı kullanılmış olup jel içerisinde referans olarak yüklenen protein marker bantları ile üretim süpernantlarının verdiği bantlar hizalanarak hedef proteinin yaklaşık moleküler ağırlığı kDa cinsinden

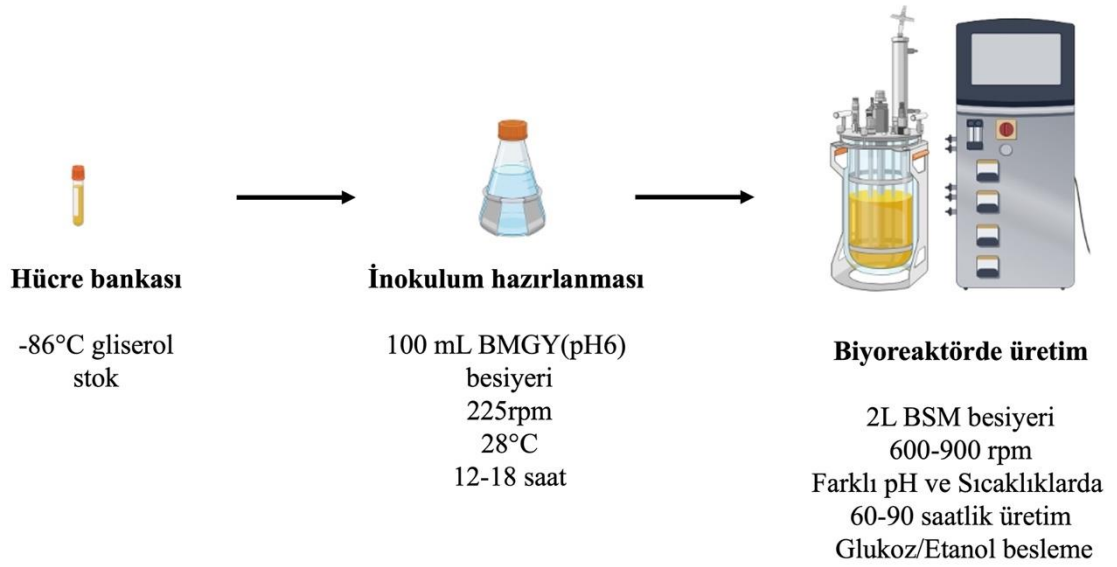
belirlenmiştir. Çalışmalarda referans marker olarak PageRuler™ Unstained Protein ladder (Thermo Scientific™) veya Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad) kullanılmıştır.

Toplam protein tayini Coomassie plus™ (Bradford) Assay kit (ABD) ile üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Miktar belirlenmesi amacıyla 0 µg/mL-1500 µg/mL aralığında farklı konsantrasyonlardaki “Bovine serum albümin” kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuş ve grafiğin eğiminden çıkartılan formül ile hesaplama yapılarak toplam protein miktarları verilmiştir. Paralel olarak ölçülen standart serisinden elde edilen absorbans değerleri ile çizilen standart kalibrasyon grafiği ekler (EK-6) kısmında verilmiş olup çizilen bu standart grafikten yararlanılarak örneğin protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.12. Fermentör ölçeğinde üretim

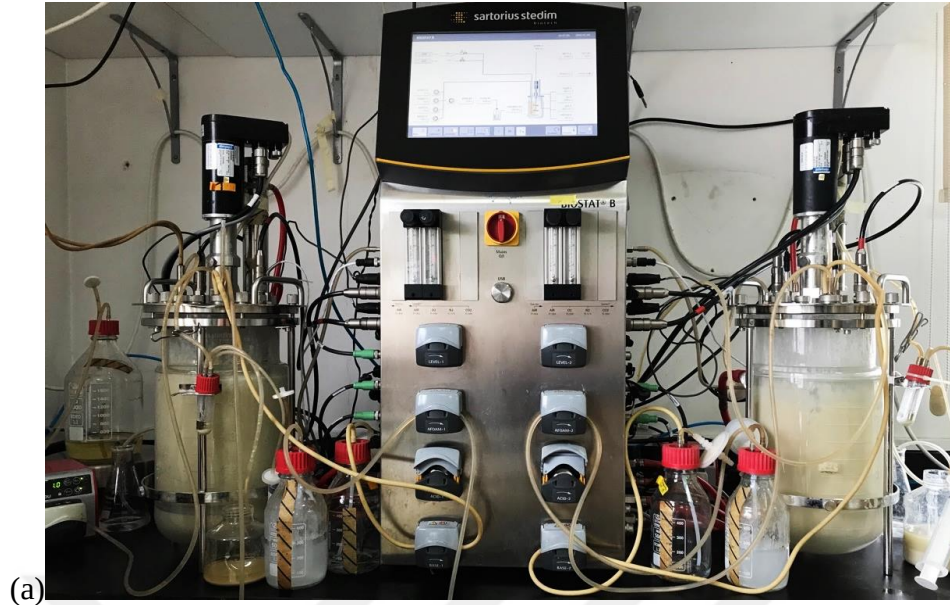
Klonlama çalışmalarından ve doğrulama analizlerinden sonra seçilen aday klonlar ile biyoreaktör ölçekli üretimlerde standardizasyon sağlamak amacıyla aday klonların hücre çalışma bankaları oluşturulmuştur. Bu amaçla YPD agar plakada teke düşürülerek geliştirilen koloniler 3 mL YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 28°C sıcaklıkta çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Gece boyu geliştirilen bu kültürden BYED (%3 maya ekstraktı, %2 glukoz, %1.34 YNB, 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 6.0, %4x10⁻⁵ biotin) besiyerine başlangıç OD_{600nm} değeri 0.1 olacak şekilde ekim yapılmış, OD_{600nm} değeri 10-12 olana kadar aynı şartlarda tekrar gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra bu kültür ile steril %80 gliserol 3:1 oranında karıştırılarak kriyojenik tüplere 1'er mL aktarılmış ve üretim zamanına kadar -80°C'de depolanmıştır. Böylelikle bir klonun birebir aynısı olan çok sayıda kopyası elde edilmiş ve her bir fermentasyon üretiminde bir vial kullanılmak üzere hücre çalışma bankası hazırlanmıştır.

Üretim için seçilen klonda hazırlanan ve -80°C'de depolanan hücre bankası stoklarından 1 vial çözündürülerek 500 mL çalışma hacimli engelli erlenmayer içerisindeki 100 mL BMGY (pH 6) besiyerine ekilerek çalkalamalı inkübatörde 28°C'de OD_{600nm} değeri 10 olana kadar geliştirilmiştir. Yeterli gelişim sağlandıktan sonra aseptik şartlarda 50 mL hacimli steril şırıngalara aktararak fermentöre inokulum olarak verilmeye hazır hale getirilmiştir. Klonların hücre bankasından alınarak fermentör ortamında üretime alınması aşağıdaki şekilde (Şekil 3.11) şematize edilmiştir.

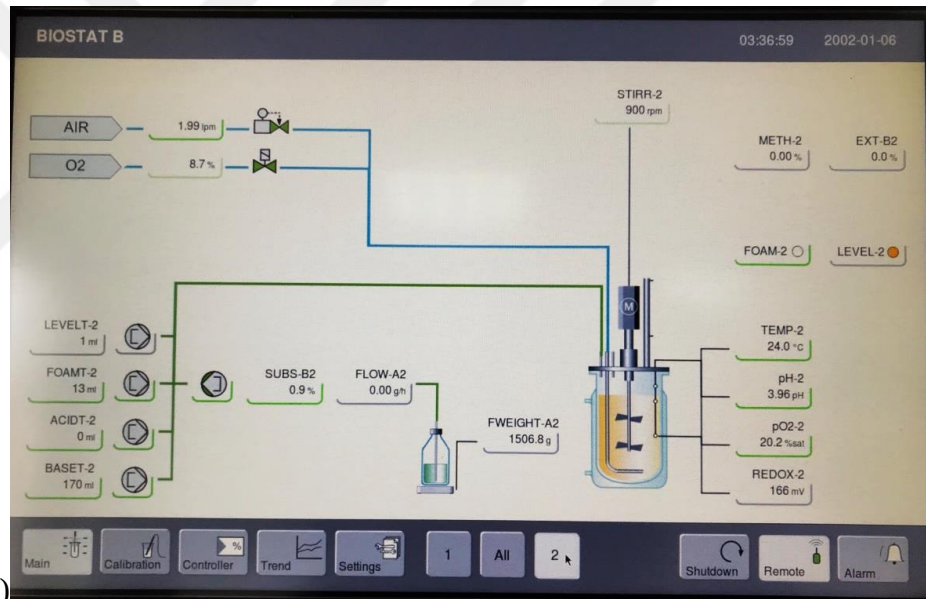


Şekil 3.11. Fermentör üretim aşamalarının şematize edilmesi

Fermantasyon çalışmaları iki hazneli 5 L Biostat B (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Fermentör ölçekli üretim için besiyerleri, sıcaklık, pH ve karıştırma hızı gibi üretim parametreleri “*Pichia* Fermentation Process Guidelines” protokolleri referans alınarak belirlenmiştir. İlgili protokol doğrultusunda BSM besiyeri ile hazırlanan fermentörler uygun şartlarda steril edilerek protokolde belirtilen standart üretim ön hazırlıkları (DO ve pH prob kalibrasyonları, PTM tuz ilaveleri, pH ayarlanması) yapılmış ve üretim için hazır hale getirilmiştir. Fermantasyonlar boyunca bazı parametreler spesifik problar kullanılarak sürekli olarak ölçülmüş böylece fermantasyon hakkında bilgiler edinilmiştir. Fermantasyonların gerçekleştirilmesi için kullanılan çift sistem biyoreaktör ve kontrol paneli şekil 3.12’de verilmiştir. Kullanılan problar şu şekildedir: **sıcaklık sensörü** (kontrol aralığı 0-80°C), **çözünmüş oksijen probu** (Oxyferm FDA VP 120-Hamilton İsviçre (kontrol aralığı %0-100)), **pH& Redoks probu** (Easyferm FDA VP 120-Hamilton İsviçre (kontrol aralığı 0-14)), **anti foam (köpük kontrol) probu** (seramik kaplı paslanmaz çelik-elektrik iletken sensör), **etanol probu** (Raven Biotech Inc Kanada (kontrol aralığı % 0.1-1.5 etanol) (Yılmaz S. 2018)).



(a)



(b)

Şekil 3.12. Laboratuvar ölçekli fermentasyonların gerçekleştirildiği Biostat B Twin fermentörü (a) ve kontrol ekranı (b)

Fermantasyon ortamında havalandırılması amacıyla kompresör yardımı ile sağlanan hava kullanılmış, yetersiz kaldığında saf oksijen kullanılarak çözünmüş oksijen seviyesinin kontrolü sağlanmıştır. Hava ve saf oksijen biyoreaktörden üretim ortamına verilirken 0.22µm por büyüklüğündeki filtreler ile filtre edilmiştir. Ortam pH değerinin kontrolü amacıyla %25'lik amonyak solüsyonu kullanılmış olup sisteme dahili bir pompa aracılığıyla verilmiştir. Fermantasyonun ilerleyen zamanlarında hücrelerin oluşturduğu köpüklenmeyi önlemek amacıyla antifoam sensöründen gelen sinyal doğrultusunda dahili bir pompa yardımıyla %5 konsantrasyonda hazırlanan köpük kırıcı (Köpük kesici, Tito, Türkiye) ile köpüklenme kontrol edilmiştir. Besleme solüsyonu ise harici bir peristaltik

pompa aracılığıyla (Watson Marlow 120U, İngiltere) uygun pompa dönüş hızlarında biyoreaktör ortamına verilmiştir.

Fermantasyonun ilk aşaması olan **Kesikli (batch phase)** fazda inokulum olarak geliştirilen 100 mL kültür şiringalar yardımıyla fermentör ortamına aseptik koşullarda aktarılmıştır. Hücreler 2L BSM temel tuz besiyeri içeren bu ortamda bulunan % 4 oranındaki gliserol tüketene kadar geliştirilmiştir. Yaklaşık 18-20 saat süren bu fazda çözünmüş oksijen (% DO) değeri gözlemlenerek ortam gliserol varlığı kontrol edilmiştir. Bu fazda temel amaç hücre yoğunluğunun artırılması olup üretim koşulları 28°C sıcaklık ve pH 6 şeklindedir. Kesikli fazın sonlarına doğru çözünmüş oksijen (DO) değerinde gerçekleşen ani artışın (*DO spike*) gözlemlenmesi ile ortamda bulunan gliserolün tükendiği anlaşılmış ve bir sonraki faza geçilmiştir.

Kesikli fazın tamamlanmasından sonra fermantasyonun ikinci aşaması olan **gliserol besleme fazı** başlatılmış olup bu fazda azalan oranda gliserol besleme profili uygulanmıştır. Bu aşamada %40(w/w) konsantrasyondaki steril gliserol kullanılmış olup besleme 16.5ml/L.sa akış hızı ile 2 saat boyunca sabit hızda yapılmış, sonrasında aşağıdaki çizelgede (çizelge 3.1) belirtilen profile göre azalan konsantrasyonda besleme tamamlanmıştır. Gliserol beslemesinin ilk, orta ve son saatlerinde hücrelerin indükleyici karbon kaynağı olan etanole alışabilmeleri için 2 mL/L saf etanol eklenmiştir. Karışık besleme olarak bilinen bu besleme stratejisinde ilk olarak 16.5ml/L.sa akış hızı ile 2 saat boyunca yapılan gliserol beslemeden sonra gliserol besleme pompası kapatılarak çözünmüş oksijen artış piki beklenmiş, bu pik görüldüğünde ortama şırınga yardımıyla 2ml/L etanol verilmiş, hücrelerin bu etanolü metabolize etmesi için bir süre (yaklaşık 45-60 dk sürmüştür) beklenmiştir. Bu bekleme aşamasında herhangi bir besleme yapılmamış, pH, ve çözünmüş oksijen değerleri düzenli olarak kontrol edilmiştir. Beklenen sürenin ilk aşamasında çözünmüş oksijen seviyesi bir süre sabit kalmış sonrasında ise hızlı bir ivme kazanarak tekrar düşüşe geçmiş sonrasında tekrar aniden bir artış (*DO spike*) görülmüştür. Görülen bu artıştan sonra çizelgedeki gibi azalan konsantrasyonda gliserol besleme yapılmış, azalan beslemenin orta noktasında (9 mL/L.sa pompa hızında besleme tamamlanınca) tekrar 2 mL/L saf etanol eklenmiş ancak bu aşamada gliserol besleme kapatılmamış, ortamda hem etanol hem gliserolün aynı anda bulunması sağlanmıştır. Daha sonra tablodaki şekilde azalan konsantrasyonda besleme profili uygulanmaya devam ettirilmiştir. Azalan gliserol besleme tamamlandığında (0 mL/L.sa pompa hızı) ortama tekrar 2 mL/L saf etanol eklenmiş ve hücrelerin etanole adaptasyonu (metabolize edebildiği) çözünmüş oksijen seviyelerine bakılarak kontrol edilmiştir. Bu aşamada karıştırma hızı 900 rpm, hava beslemesi 2vvm değerlerinde, çözünmüş oksijen seviyesi %20 seviyesinde tutulmuştur. Sıcaklık ve pH değerleri ise çalışma kapsamında gerçekleştirilecek olan farklı değerlerin denenmesi ile en yüksek protein üretiminin görüldüğü değerlerde sürdürülmüştür. Bu koşullarda etanole adaptasyon tamamlandıktan sonra üretim fazı olan etanol indüksiyon fazına geçilmiştir.

Çizelge 3.1. Zamana bağlı azalan oranda gliserol besleme hızı tablosu

Süre(dk)	Gliserol Besleme Hızı(rpm)	Akış (mL/L.sa)
0	1.1	16.5
30	0.9	13.5
60	0.7	110.5
90	0.6	9.0
120	0.4	6.0
150	0.2	3
165	0.1	1.5
180	0	0

Protein üretim fazı olarak da bilinen ve fermantasyonun üçüncü fazı olan **etanol indüksiyon (fed batch) fazında** üretim yaklaşık 90 saat sürdürülmüş, bu fazda besleme kaynağı olarak 12 mL/L PTM1 tuzu içeren %100 etanol kullanılmıştır. Bu aşamada etanol besleme ile artan hücre yoğunluğuna göre artan hızda etanol besleme profili (*step by step*) hızı uygulanmış olup kademeli olarak yükseltilen etanol besleme profili çizelgesi aşağıda verilmiştir (çizelge 3.2). Artan etanol besleme hızına ve ulaşılan hücre yoğunluğuna göre ortam DO seviyesinin %20 seviyesinde tutulabilmesi amacıyla ortama gerektiğinde saf oksijen takviyesi yapılarak cihazın yazılımında mevcut bulunan “cascad kontrol” modu ile fermantasyon tamamlanmıştır. Fermantasyon süresi boyunca tablodaki besleme profilinde uygulanan etanol besleme miktarlarının gözlemlenmesi amacıyla etanol sensörü kullanılmıştır. Böylece ortama verilen etanol miktarının hücreler tarafından kullanıldığı, ortamda birikmediği kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.2. Zamana bağlı artan oranda etanol besleme hızı tablosu

Etanol Besleme Saat	Etanol Besleme Hızı (rpm)	Akış (mL/L.sa)
0	0.1	1.5
4	0.2	3.0
12	0.3	4.5
24	0.4	6.0
36	0.5	7.5
48	0.6	9.0
48-90	~	~

Etanol besleme fazı yaklaşık 90 saat boyunca sürdürülmüştür. Ortama verilen saf oksijeninin kullanım veya limit oluşturma durumuna göre fermantasyonun sonlandırılma zamanı belirlenmiştir. Süre boyunca üretim ortamından düzenli aralıklarla örnekler

alınmış, bu örneklerde bazı analizler yapılmıştır. Alınan örneklerde ilk olarak yaş hücre ağırlığı (WCW; g/L) ölçülmüş olup, g/L cinsinden hücre ağırlığı belirlenmiştir. Bu amaçla darası alınmış olan 3 adet mikrosantrifüj tüplerine 1'er mL fermantasyon sıvısı eklenmiş 3000 g hızda 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası şırınga yardımıyla süpernatant kısımları toplanmış tüplerin diplerinde kalan pelet miktarları hassas terazi yardımı ile tartılarak boş tüp ile pelet içeren tüp arasındaki fark alınmış ve hesaplama yapılarak g/L cinsinden yaş hücre ağırlıkları belirlenmiştir. Şırıngaya alınan süpernatant kısımları ise 0.45 µm por büyüklüğüne sahip PES (polyethersulfone) filtreler ile filtre edilerek temiz tüplere aktarılmıştır. Elde edilen süpernatant örneklerinde toplam protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla Bradford metodu kullanılmıştır. Süt pıhtılaştırma testi yapılarak üretilen enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca SDS-PAGE analizi ile protein bantları gözlemlenmiş ve kDa cinsinden yaklaşık büyüklükleri tespit edilmiştir.

3.2.13. İstatistiksel analizler

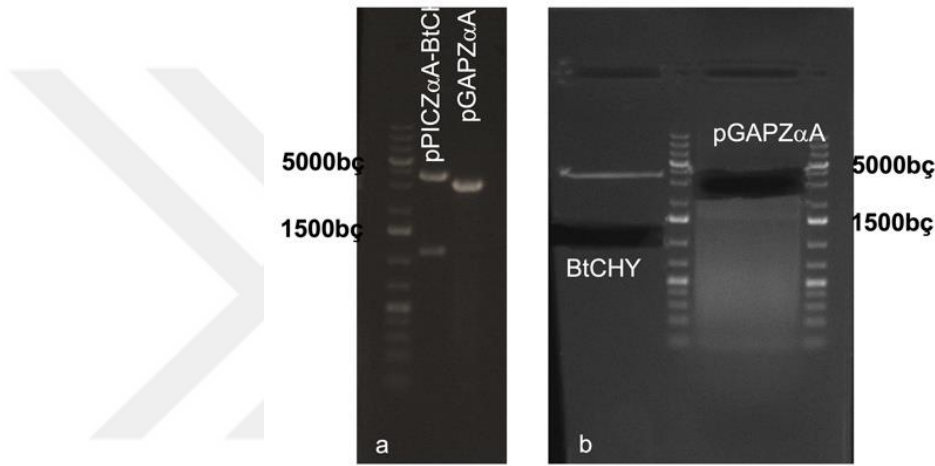
Analizler paralelli olarak yürütülmüş olup elde edilen veriler SPSS Statistics 23 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Veriler arasındaki farklılık %95 güven aralığında ($p < 0.05$) Duncan testi ile belirlenmiştir

4. BULGULAR

4.1. Yapısal GAP Promotoru Kullanılarak Haploid ve Diploid Maya Klonlarında Kimozin Enzimi Üretimi

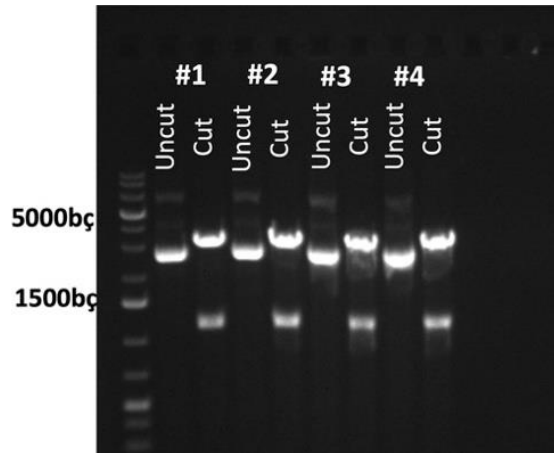
4.1.1. pGAPZ α BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması

P. pastoris'in yapısal GAP promotoru altında kimozin üretimi yapmak amacıyla oluşturulan pGAPZ α BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması amacıyla pGAPZ α A vektörü ve pPICZ α ABtCHY vektörleri *Xho*I-*Not*I enzimleri ile kesilerek jelden saflaştırma yapılmıştır (şekil 4.1.). Saflaştırılan parçalar ligasyona alınmış ve *E. coli* DH5a hücrelerine transforme edilmiştir.



Şekil 4.1. pGAPZ α BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması amacıyla vektör ve insert parçalarının jelden kesimi

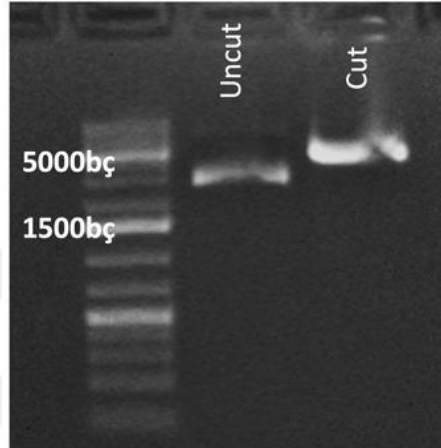
Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmış, klonlama enzimleri ile doğrulama analizleri yapılarak tüm plazmidler doğrulanmıştır (şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Ligasyon sonrası elde edilen pGAPZ α BtCHY içeren kolonilerde klonlama enzimleri ile yapılan doğrulama sonucu

4.1.2. pGAP α -BtCHY ekspresyon vektörünün *P. pastoris* X33, GS115 ve JC220 hücrelerine transformasyonu

Pichia hücrelerine transforme etmek amacıyla *AvrII* enzimi ile lineer hale getirilmiş pGAP α -BtCHY vektörü jelde kontrol edildikten sonra saflaştırılmıştır (şekil 4.3.). Çalışmanın bu bölümünde yapısal promotor kontrolünde kimozin enzimi üretimi amacıyla diploid maya hücrelerinin oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla lineer haldeki pGAP α -BtCHY ekspresyon vektörü eş zamanlı olarak *P. pastoris* X33, GS115 ve JC220 hücrelerine ayrı ayrı transforme edilmiş ve 28°C’de 3 gün inkübe edilmiştir.



Şekil 4.3. pGAP α -BtCHY vektörünün *AvrII* enzimi ile lineer hale getirilmesi

İnkübasyon sonrasında her 3 konakçıda gelişen klonlar alınarak gDNA izolasyonu ve Southern blot analizi yapılmıştır. Southern blot sonucuna (verilmemiştir) göre her konakçı için pGAP α -BtCHY ekspresyon vektörünü 1 kopya içeren klonlar tespit edilmiştir. Yabancıl tip X33 hücreleri için pGAPZaBtCHY#15 (X33) numaralı klonun, GS115 konakçısı için pGAPZaBtCHY#24 (GS115) numaralı klonun ve JC220 konakçısı için pGAPZaBtCHY#30 (JC220) numaralı klonun 1 kopya ekspresyon kaseti içerdiği tespit edilmiştir. X33 yabancıl tip konakçasındaki klon ile direk enzim üretimi gerçekleştirilmiş, GS115 ve JC220 konakçıları diploid hücre oluşumuna bırakılmıştır.

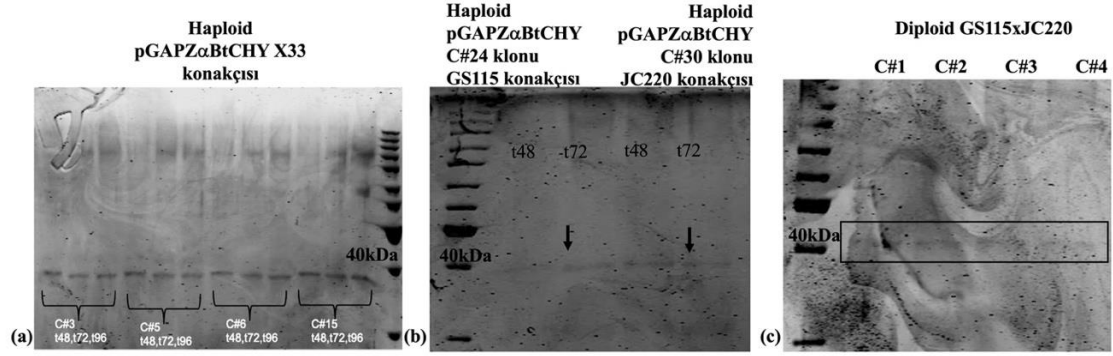
4.1.3. Diploid maya hücrelerinin oluşturulması

Diploid hücre oluşumu için, ekspresyon kasetini 1 kopya içerdiği tespit edilen pGAPZaBtCHY#24 (GS115) ve pGAPZaBtCHY#30 (JC220) klonlar, gece boyu YPD sıvı besiyerinde geliştirilmiş ve sonrasında eşleşme plakası üzerinde birleştirilerek 3-5 gün süre ile diploid hücre oluşumu için bırakılmıştır. Daha sonrasında diploid klonlar MD agar besiyerinde teke düşürme çizimleri yapılarak erlenmayer ölçeğinde enzim üretimine alınmışlardır.

4.1.4. Erlenmayerde enzim üretimi ile klon taranması

Kimozin enziminin ekspresyonu amacıyla oluşturulan diploid GS115XJC220 klonlarında ve X33 yabancıl tip konakçasında elde edilen klonlar ile erlenmayer ölçeğinde BYED besiyerinde pH 3 değerinde 28°C sıcaklıkta 72 saat süresince enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim süresi boyunca sadece 48. saatte glukoz eklemesi yapılarak

üretimin 72. saatinde alınan süpernatant örneklerine enzim aktivite testi ve SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Kimozin genini 1 kopya içeren haploid X33 klonlarından bazılarına (şekil 4.4.a), haploid GS115 (C#24 numaralı klon) ve JC220 (C#30 numaralı klon) klonlarına (şekil 4.4.b) ve GS115 ve JC220 klonlarının eşleşmesi ile oluşturulan diploid GS115xJC220 klonlarına (şekil 4.4.c) ait erlenmayer üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 4.4. Kimozin genini 1 kopya içeren haploid X33, GS115, JC220 ve diploid GS115xJC220 klonları ile yapılan erlenmayer ölçekli üretime ait SDS-PAGE görüntüsü

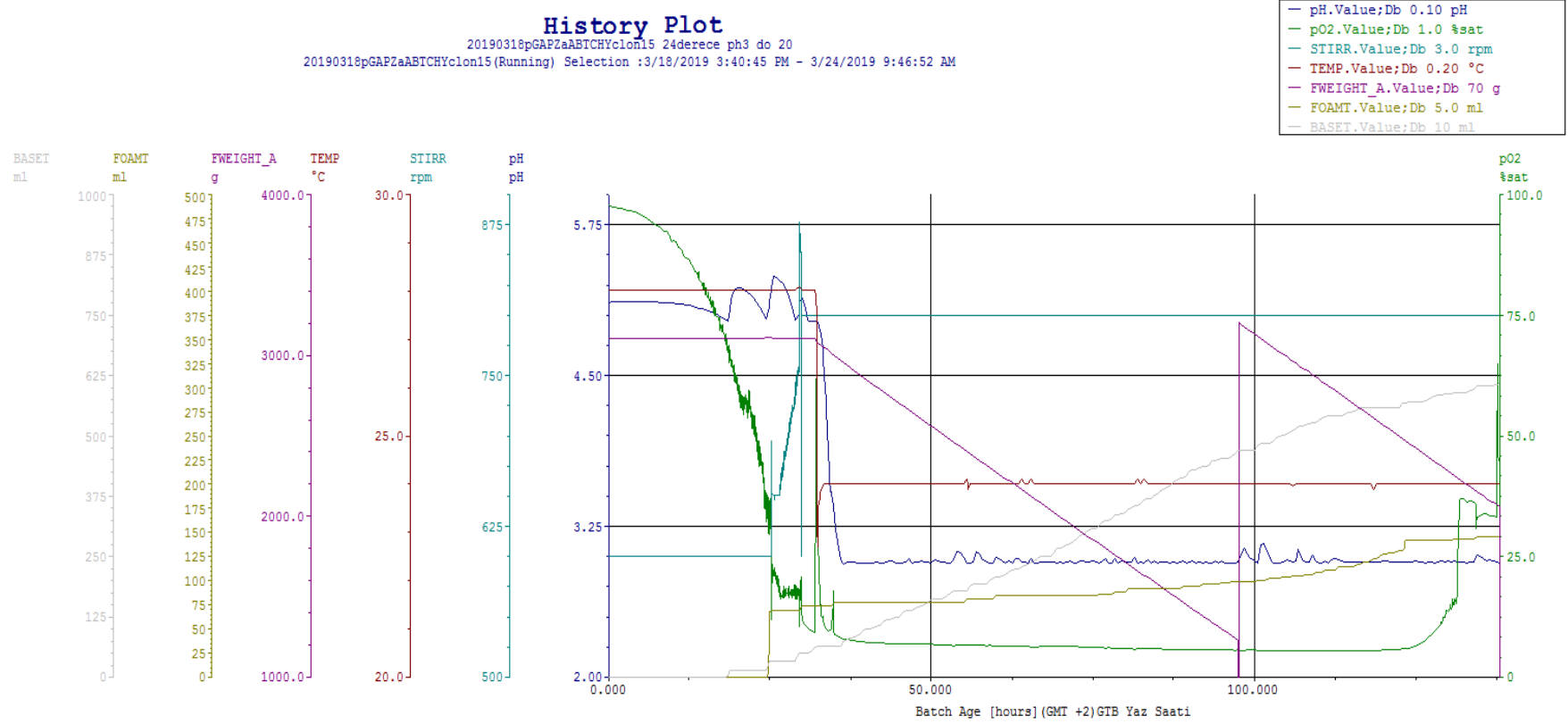
Erlenmayerde gerçekleştirilen üretimler sonucu X33 yabancı tip konakçasındaki klonlar arasında elde edilen en yüksek enzim aktivitesi 5.3 IMCU/mL değeri ile pGAPZαBtCHY#15 numaralı klonda tespit edilmiştir. Diploid hücre oluşumu için tasarlanan ve 1 kopya ekspresyon kaseti içeren haploid pGAPZαBtCHY#24 (GS115) ve pGAPZαBtCHY#30 (JC220) klonlarında ise tespit edilen enzim aktivite değerleri sırasıyla 1.3 IMCU/mL ve 1.1 IMCU/mL seviyesindedir. Bu klonların oluşturduğu, 2kopya kimozin geni içeren diploid GS115xJC220 klonunda ise elde edilen en yüksek aktivite 3 IMCU/mL seviyesindedir. Bu sonuçlara göre diploid hücre oluşumu ile elde edilen enzim aktivite değeri, kendisini oluşturan haploidlerine göre yaklaşık 2.5 kat daha yüksektir. Ancak bu çalışma kapsamında GAP promotörü altında oluşturulan tüm haploid ve diploid klonlar incelendiğinde, erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen en yüksek enzim aktivite değerinin X33 konakçasındaki pGAPZαBtCHY#15 numaralı klonda (5.3 IMCU/mL) tespit edildiği görülmüştür. Bu sebeple yapısal GAP promotörü altında gerçekleştirilecek fermantasyon üretimleri için pGAPZαBtCHY#15(X33) klonu seçilmiş ve bu klon ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.1.5. Fermentör ölçeğinde üretim

Yapısal GAP promotörü altında kimozin ekspresyonu amacıyla oluşturulan kimozin klonları içerisinde erlenmayer koşullarında en yüksek enzim aktivitesi değerine sahip olan **pGAPZαBtCHY#15 (X33)** klonu ile fermentör koşullarında üretim yapılmıştır. Üretimlerde standardizasyonun yakalanması amacıyla hücre çalışma bankası hazırlanarak aynı klonun seri kopyaları oluşturulmuş ve her bir fermantasyonda bu bankadan bir stok tüp çıkartılarak üretime alınmıştır. Fermantasyonlar gerçekleştirilirken aksi belirtilmediği sürece %4 gliserol içeren BSM besiyeri kullanılmış, 2 lpm sabit hava beslemesinde ve gerektiğinde saf oksijen takviyesi ile çözünmüş oksijen seviyesi %20 civarında olacak şekilde üretimler yapılmıştır. Bu klon ile gerçekleştirilen üretim laboratuvar ölçekli 5L hacimli fermentörde, pH 3 değerinde 28°C sıcaklıkta yapılmış olup

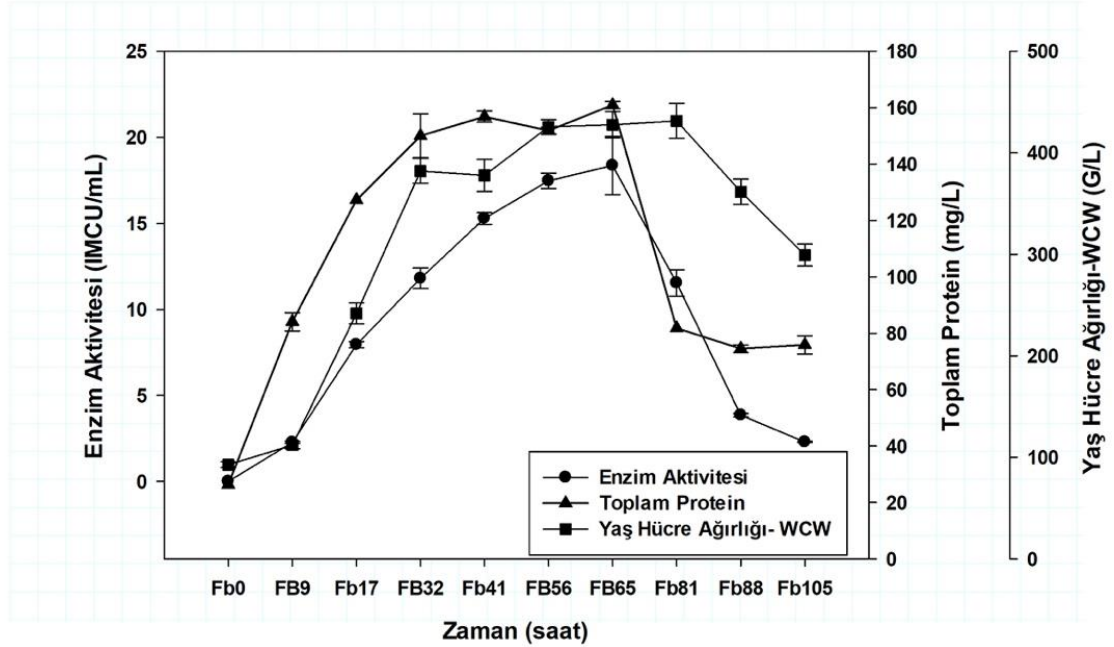
fermantasyon ortamına sabit 1rpm pompa hızında %50'lik glukoz solüsyonu ilave edilerek 105 saat boyunca besleme yapılmış ve düzenli olarak örnek alınmıştır. Fermentör cam haznesi doluluk oranı limite ulaştığı 65. saatlerde fermentasyon ortamından yaklaşık 2 L kültür alınmış ve fermentasyon aynı şartlarda 105. saatine kadar devam ettirilmiştir. Fermentasyon süresi boyunca ortam değerlerinin kaydedilmesi ile sistem tarafından otomatik olarak oluşturulan grafik (*history plot*) şekil 4.5'te verilmiştir. Bu grafiğin farklı zamanlarındaki verilerin incelenmesi ile fermentasyon sürecinin tamamı ya da anlık durumu hakkında geniş kapsamlı bilgiler edinilmiş, böylece 90-100 saat gibi sürelerde gerçekleşen fermentasyonlar düzenli olarak takip ve kontrol edilmiştir.





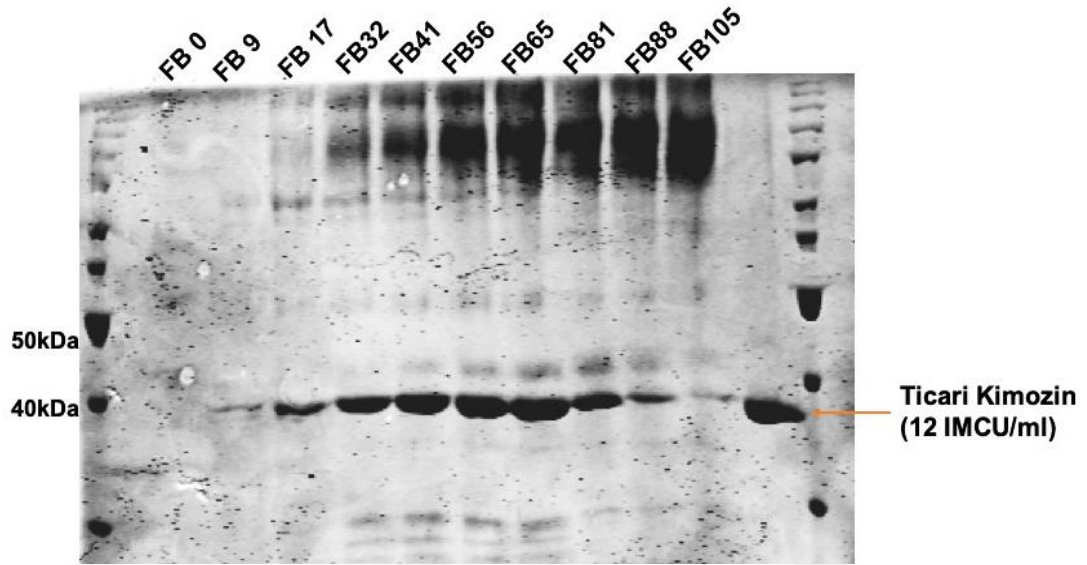
Şekil 4.5. pGAPZαBtCHY#15 (X33) klonuna ait fermentör üretimi kontrol parametreleri grafiği

Fermantasyon boyunca alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı ölçülmüş daha sonra hücre süpernatantları alınmış, bu süpernatantlarda toplam protein ölçümü ve enzim aktivite testleri yapılmıştır. Şekil 4.6'da verilen fermentör sonuçlarına göre elde edilen maksimum enzim aktivite değeri 18.35 ± 1.39 IMCU/mL, toplam protein miktarı 160.90 ± 1.28 mg/L ve yaş hücre ağırlığı 427.6 ± 12.9 g/L olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.6. pGAPZαBtCHY#15 (X33) klonu ile pH 3 ve 28°C gerçekleştirilen fermentör üretim sonuçları

Fermantasyonun ilk 65 saatinde enzim aktivitesi, toplam protein ve yaş hücre ağırlığı zamana bağlı olarak artış göstermekte iken 65. saatten sonra her üç değer de düşmeye başlamıştır (şekil 4.6). Fermantasyon boyunca alınan örneklerde moleküler ağırlık doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE analiz sonucu incelendiğinde ise (şekil 4.7) üretilen enzimin oluşturduğu protein bandının da 65. saate kadar artan konsantrasyonda olduğu, 65. saatten sonra ise bant yoğunluğunun azalması, son saatte tamamen kaybolması üretilen proteinin degradasyona uğramış olabileceğini düşündürmüştür. Bu sebeple pGAPZαBtCHY#15 (X33) klonu ile glukoz beslemeli gerçekleştirilen fermentasyon için 2 L hacimli %50 glukoz besleme solüsyonu tüketildiğinde (yaklaşık 60-65 saatte) fermentasyon sonlandırılması gerektiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7. pGAPZαBtCHY#15 (X33) klonu ile pH 3 ve 28°C sıcaklıkta gerçekleştirilen fermentasyona ait örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü

Kimozin enziminin yapısal GAP promotoru altında üretimi amacıyla oluşturulan klonlar arasında erlenmayer ölçeğinde 5.3 IMCU/mL değeri ile en yüksek enzim aktivitesini gösteren klonun pGAPZαBtCHY#15 (X33) klonunu olduğu sonucuna varılmıştır. Bu klonun fermentör ölçekli üretiminde ise elde edilen en yüksek enzim aktivitesi 18.35 ± 1.39 IMCU/mL olup fermentör üretimi ile enzim aktivitesi yaklaşık 3.5 kat arttırılmıştır. Ancak çalışmanın temel amacı sanayi boyutunda, ucuz besin kaynağı (glukoz) ile besleme yapılarak yüksek verimlilikte kimozin enzim üretimi yapabilen bir maya klonu geliştirmek olduğu için elde edilen 18.35 ± 1.39 IMCU/mL değeri yeterli olmamıştır. Bu sebeple çalışmanın bir sonraki bölümünde yapısal GAP promotoru yerine daha güçlü olduğu bilinen (Karaoğlu vd. 2016b) ADH2 promotorunda enzim üretime geçilmiştir.

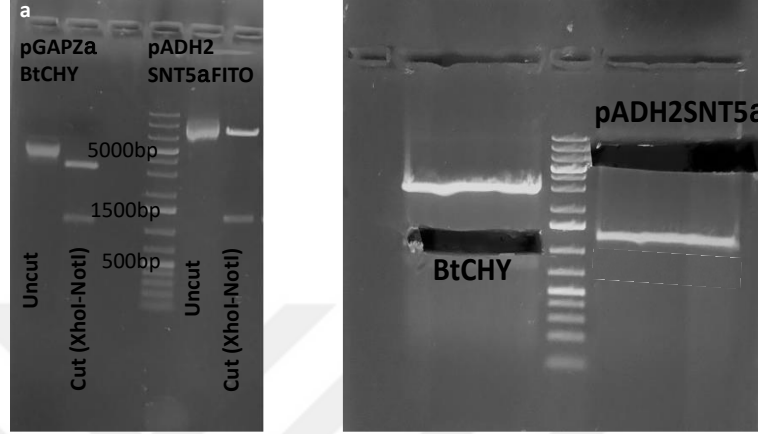
4.2. Sentetik ADH2 Promotoru Kontrolünde Haploid Maya Hücrelerinde Kimozin Enzimi Üretimi

4.2.1. pADH2SNT5αHIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması

Çalışmanın bu bölümünde kimozin enzimi üretimi için bir önceki bölümde kullanılan GAP promotoru yerine etanol ile indüklenen ADH2 promotoru ile üretim yapılmıştır. Bu amaçla Erden-Karaoğlu vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ADH2 promotorundan silme analizleri ile sentetik olarak yeniden oluşturulmuş ve AOX1 promotoruna göre yaklaşık 4 kat daha fazla oranda rekombinant protein ürettiği gösterilmiş ADH2SNT5 promotoru kullanılmıştır. ADH2SNT5 promotorun hem etanol hem de glukoz ile indüklenebilir olmasından dolayı temel amacı sanayi boyutunda kimozin üretiminde kullanılabilecek bir suş ve biyoproses geliştirmek olan çalışmanın bu bölümünde ADH2SNT5 promotoru kontrolünde kimozin üretimi yapılmıştır.

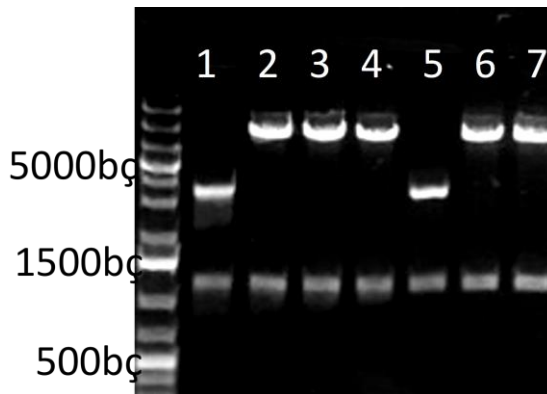
Sentetik ADH2SNT5 promotoru kontrolünde kimozin üretimi amacıyla vektör olarak daha önce tamamlanan bir çalışma (Hadimioğlu M. 2019) kapsamında fitaz enzimi

üretiminde kullanılan plazmid (pADH2SNT5 α HIS4-FITO) kullanılmış içerisinden fitaz geni düşürülerek kimoziin geni klonlanmıştır. Kimoziin üretimi için pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün oluşturulması için vektör ve insert DNA'lar klonlama enzimleri ile kesilerek parça salmaları kontrol edilmiş (şekil 4.8.a) ve yüksek hacimde kesim reaksiyonu tekrar kurularak ligasyon için vektör ve insert parçaları jelden alınmıştır (Şekil 4.8.b)



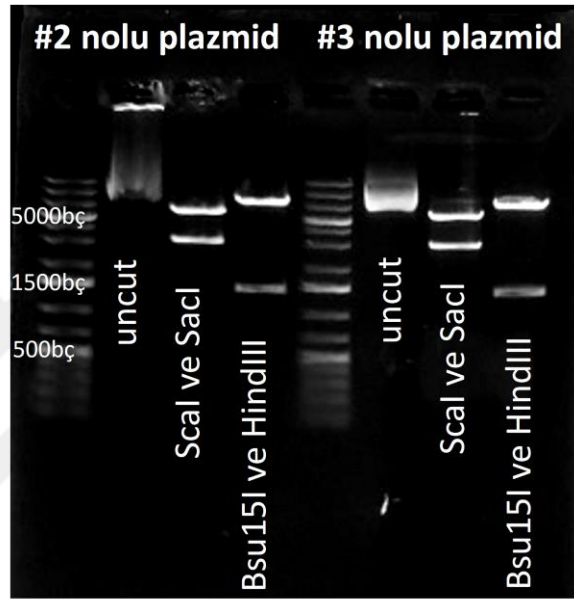
Şekil 4.8. XhoI-NotI restriksiyon enzimleri ile kesim sonrasında agaroz jelde görüntüleme (a: Vektör ve insert olarak kullanılacak parçaların kesim kontrolü, b: agaroz jelden uygun parçaların alınması)

Agaroz jelden kesilerek alınan pADH2SNT5 α HIS4 (vektör) ve BtCHY (insert) DNA parçaları saflaştırılmış ve ligasyon yapılmıştır. Elde edilen ligasyon karışımı, kompetent *E.coli* DH5 α hücrelerine transforme edilerek zeosin içeren LB Lenox agar plakaya yayılmış ve pozitif kolonilerin seçimleri sağlanmıştır. Ligasyondan sonra elde edilen 8742 bç büyüklüğündeki plazmid pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY olarak isimlendirilmiş ve plazmid izolasyonları yapılmıştır. Plazmid izolasyonundan sonra klonlama enzimleri (*XhoI*-*NotI*) ile kesim reaksiyonu sonucu beklenen parçaları (7631 ve 1111 bç) verdikleri agaroz jelde kontrol edilmiş ve doğrulama analizinin ilk kısmı tamamlanmıştır (şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Ligasyon sonrası elde edilen kolonilerde klonlama enzimleri ile yapılan doğrulama sonucu

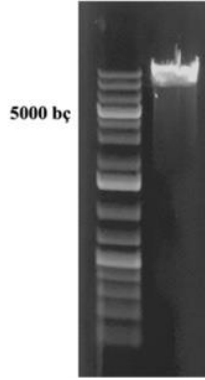
Agaroz jelde yürütme sonucu elde edilen jel görüntüsüne göre 1 ve 5 numara haricindeki diğer tüm plazmidler doğrulanmıştır. Klonlama enzimleri ile doğrulanan 2 ve 3 numaralı plazmidler ikinci bir doğrulama işlemi için, farklı restriksiyon enzimleri (*ScaI* ve *SacI* enzim setleri ile *Bsu15I* ve *HindIII* enzim setleri) ile tekrar kesilmiş ve agaroz jelde kontrol edilmiştir (şekil 4.10.). Jelde doğrulama analizi sonrasında *ScaI* ve *SacI* enzim setleri ile kesim sonucu beklenen parçalar 5756 ve 2986bç, *Bsu15I* ve *HindIII* enzim setleri ile kesim sonucu beklenen parçalar 7320 ve 1422 bç şeklinde olup her iki plazmidde doğrulanmıştır. Böylece *P. pastoris*'e transformasyon amacıyla elde edilen 2 numaralı plazmid ile (pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY#2) transformasyona devam edilmiştir.



Şekil 4.10. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY plazmidlerinde farklı restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen doğrulama analizi

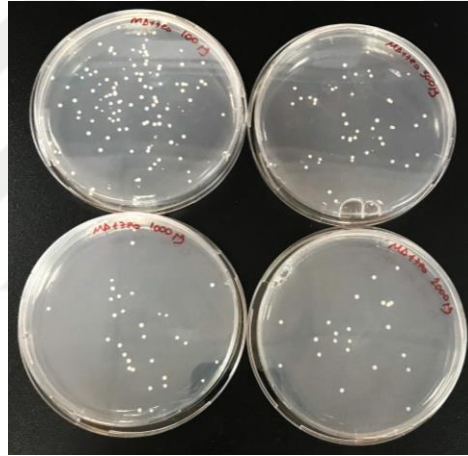
4.2.2. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY ekspresyon vektörünün *P. pastoris* KM71 hücrelerine transformasyonu

Pichia hücrelerine transforme etmek amacıyla *Kpn2I* enzimi ile lineer hale getirilmiş pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY#2 vektörü jelde kontrol edildikten (şekil 4.11.) sonra saflaştırılmış ve kompotent KM71 hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyondan sonra farklı oranlarda zeosin (2000, 1000, 500 ve 100 μ g/mL) içeren MD plakalara yayılmış ve 28°C'de 3 gün inkübe edilmiştir.



Şekil 4.11. pADH2SNT5αHIS4-BtCHY#2 vektörünün Kpn2I enzimi ile lineer hale getirilmesi

İnkübasyon süresinin sonucunda gelişen koloniler şekil 4.12’de gösterilmiştir. Artan zeosin konsantrasyonunda gelişen kolonilerin yüksek gen kopya sayısında kimozin içerdiği düşünülmektedir.



Şekil 4.12. pADH2SNT5αHIS4-BtCHY#2 ekspresyon vektörünün transformasyonu sonucu zeosin içeren MD plakada gelişen klonlar

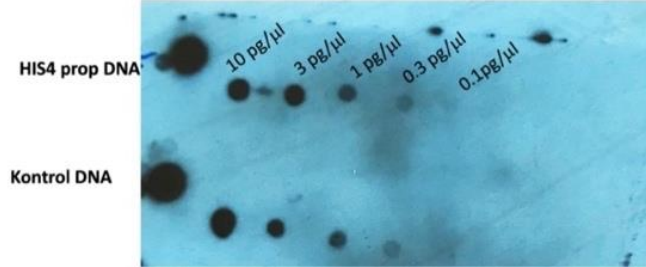
4.2.3. Southern blot analizi ile gen kopya sayısının belirlenmesi

Southern blot analizi ile klonlanmak istenilen DNA bölgesinin maya hücresinin genomunda hedeflenen bölgeye entegrasyonu ve gen kopya sayısı kontrol edilmektedir. Southern blot analizi iki aşamalı olup ilk aşaması prob hazırlığı, ikinci aşaması hibridleme yöntemi ile genoma entegrasyonun kontrol edilmesidir.

4.2.3.1. HIS4 probunun etkinliğinin ölçülmesi

Kimozin enziminin rekombinant olarak üretimi amacıyla yapılan bu çalışmada ADH2SNT5 promotorunda yapılan üretimlerde oluşturulan klonlarda kimozin genini içeren ekspresyon kasetinin *P. pastoris* KM71 genomunda entegrasyon ve gen kopya sayısının belirlenmesi amacıyla *HIS4* probu kullanılmıştır. Probun hazırlanması amacıyla *HIS4* geninden *HIS4618F* ve *HIS41146R* primerleri ile çoğaltılan yaklaşık 530 bp uzunluğundaki PZR ürünü kullanılmış ve DIG ile etiketlenmiştir. PZR yöntemi ile

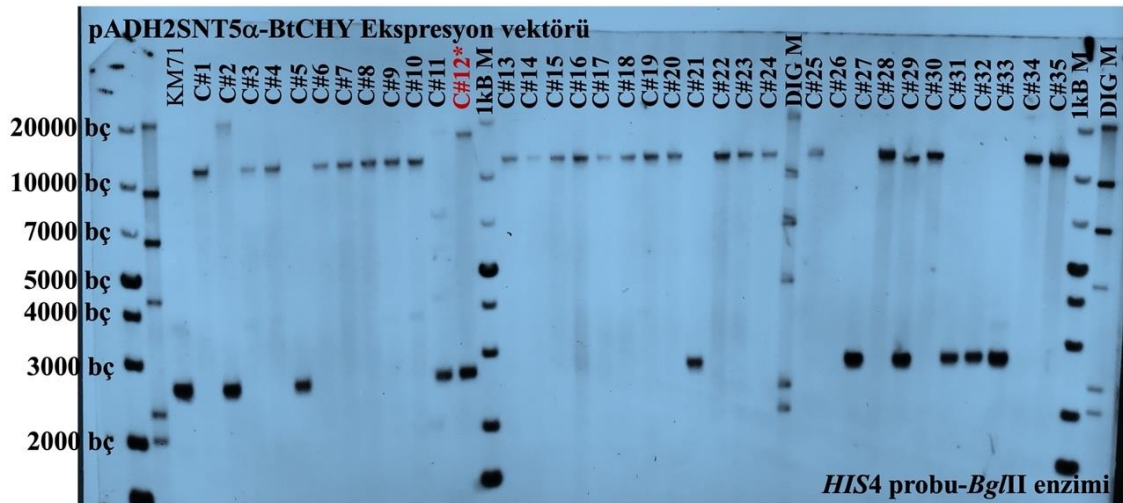
çoğaltılarak DIG ile etiketlenen probun etkinliği, kit içerisinde bulunan kontrol DNA'nın referans olarak alınması ile ölçülmekte ve en az 0.1pg/μl oranındaki dilüentin yansıma verdiği kontrol edilmektedir. Şekil 4.13 incelendiğinde 0.1pg/μl oranlı dilüentin HIS4 probunda görünür olduğu tespit edilmiş ve probun analizlerde kullanıma uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.13. HIS4 prob etkinliğinin ölçülmesi

4.2.3.2. HIS4 probu ile pADH2SNT5αHIS4-BtCHY#2 ekspresyon kasetinin KM71 maya genoma entegrasyonunun kontrolü

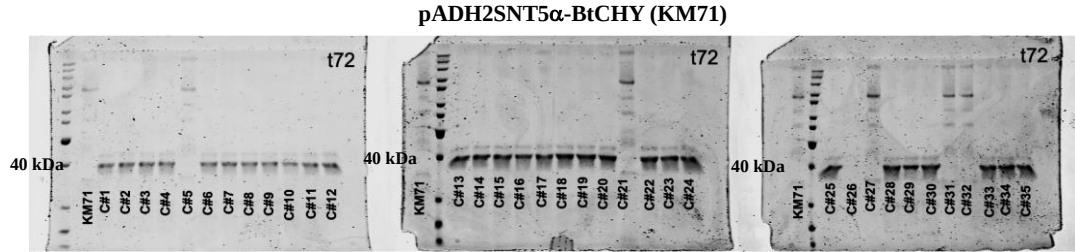
Southern blot analizi için ilk olarak maya gDNA'ları izole edilmiş, sonrasında *Bgl*II enzimi ile kesilmiştir. Ekspresyon kasetinin genoma entegrasyonunun kontrolünde *P. pastoris* KM71 gDNA'sı kullanılmıştır. HIS4 probunun kontrol DNA'sında etiketlediği bölge 2650 bç hizasında beklenmekte olup ekspresyon kaseti 1 kopya şeklinde genoma entegre olmuşsa beklenen bant boyutu 11392 bç hizasında, 2 kopya şeklinde genoma entegre olmuşsa beklenen bant boyutu 20134 bç hizasındadır. Şekil 4.14'e bakıldığında 5,11,21,27,31,32,33 numaralı klonlarda genoma entegre olmadığını, 2,12 ve 29 numaralı klonların hedeflenen *HIS4* dışında başka bir bölgeye entegre olduğu, kalan diğer tüm klonların ise 1 kopya ekspresyon kaseti içerdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. pADH2SNT5αHIS-BtCHY ekspresyon vektörünü içeren klonlarda Southern blot analizi (Beklenen bant hizaları; KM71 konakçısında 2650 bç hizasında bant beklenmektedir. Ekspresyon kaseti 1 kopya şeklinde genoma entegre olmuşsa beklenen bant boyutu 11392 bç)

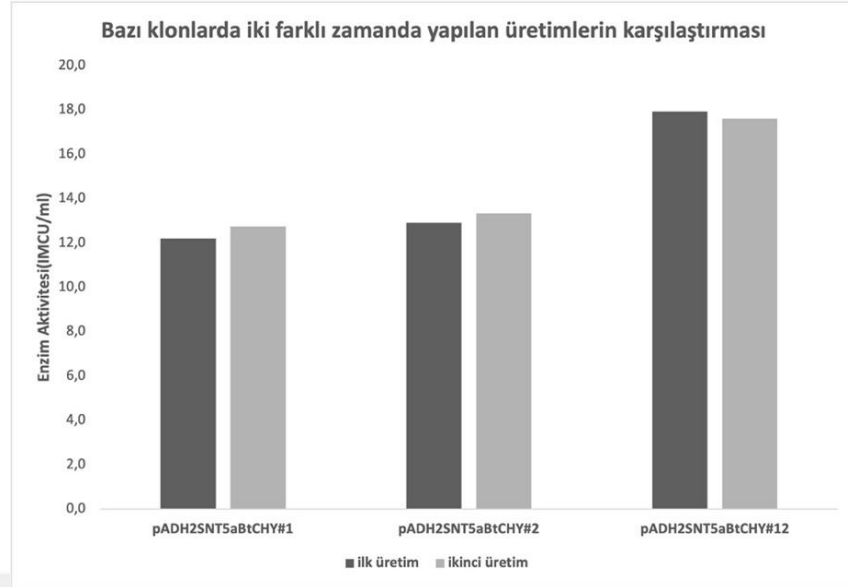
4.2.4. Erlenmayerde enzim üretimi ile klon taranması

Kimozin enziminin ekspresyonu amacıyla oluşturulan klonlarda erlenmayer ölçeğinde BMEY besiyerinde pH 3 değerinde 28°C sıcaklıkta 96 saat süresince enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim süresi boyunca her 12 saatte son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde etanol eklemesi yapılarak üretimin 72. saatinde alınan süpernatant örneklerine SDS-PAGE analizi yapılmıştır (şekil 4.15.). Sığır kimozininin beklenen moleküler ağırlığı yaklaşık 37 kDa büyüklüğünde olup şekil 4.15 incelendiğinde konak hücre olarak kullanılan KM71 hücre süpernatantlarında bu hızda herhangi bir band görülmezken transformantlarda belirtilen hızda kimozin proteininin üretildiği görülmüştür. SDS-PAGE analizi sonucunda klonların bazılarında (C#5, C#21, C#26, C#27, C#31 ve C#32) protein üretimi gözlemlenmemiştir. Bu klonlarda kimozin enziminin üretilmemiş olmasının sebebi, şekil 4.14'deki Southern blot sonucunda da görüldüğü gibi ekspresyon kasetinin genoma entegre olmaması olarak düşünülmektedir.



Şekil 4.15. Oluşturulan klonlarda erlenmayer ölçekli gerçekleşen üretimin 72. Saat örneklerine ait SDS-PAGE analizi

Southern blot, SDS-PAGE analizi ve süt pıhtılaştırma testi sonuçlarına göre C#1, C#2, C#6 ve C#12 klonları seçilmiş ve klon stabiliteelerini de test etmek amacıyla erlenmayer ölçeğinde, 2 farklı zaman diliminde tekrar üretime alınmışlardır. 96 saatlik üretim sonucu elde edilen süpernatantlarda %100 kimozin standardı referans alınarak süt pıhtılaştırma testi yapılmış ve elde edilen sonuçlar şekil 4.16'da özetlenmiştir.

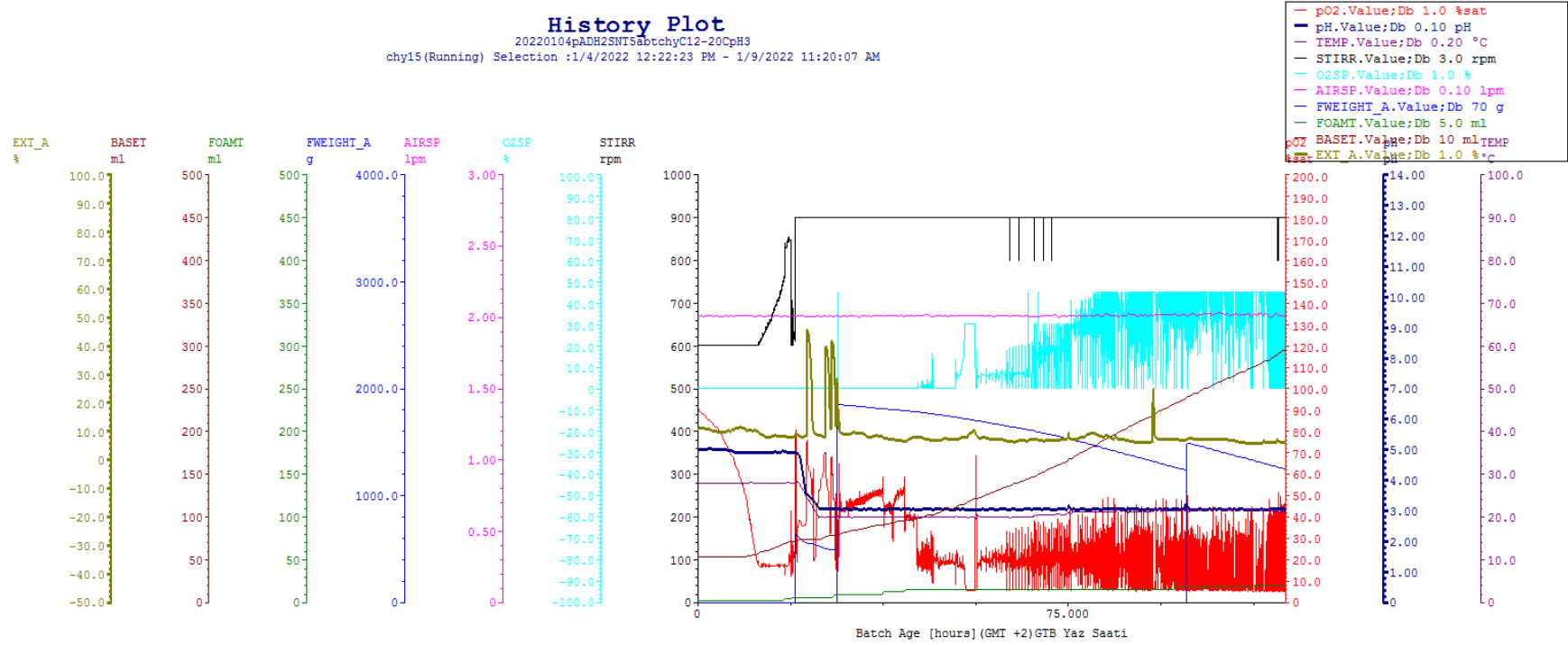


Şekil 4.16. Seçilen klonlarla iki farklı zamanda gerçekleştirilen üretimlerde enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılması

Erlenmayerde gerçekleştirilen üretimin 72. saat süpernatantlarında süt pıhtılaştırma testi yapılmış ve en yüksek enzim aktivite değeri, her iki üretimde de pADH2SNT5αHIS4-BtCHY C#12 (KM71 host) numaralı klonla yaklaşık 18 IMCU/mL olarak ölçülmüştür (şekil 4.16). Aynı süpernatant örneklerinde yapılan SDS-PAGE analizi ile proteinin yaklaşık moleküler ağırlığının 37 kDa olduğu kullanılan pozitif kontrol kimozin enzimi ile doğrulanmıştır.

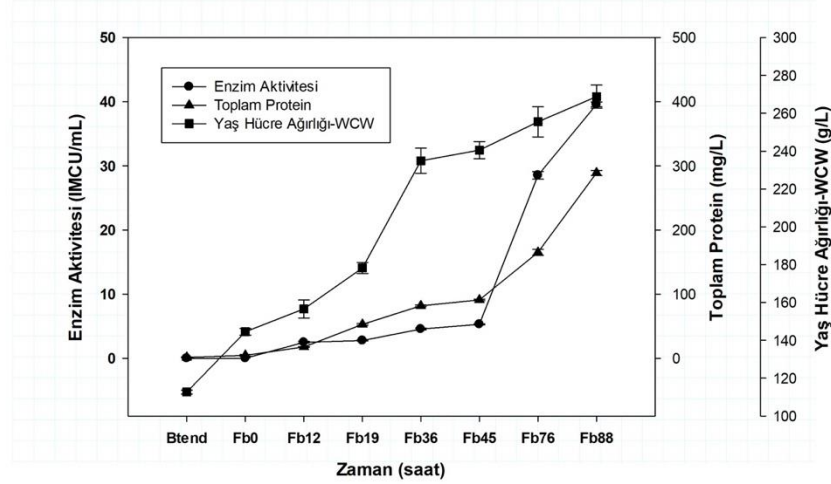
4.2.5. Fermentör ölçeğinde üretim

ADH2SNT5 promotoru kontrolünde kimozin ekspresyonu amacıyla oluşturulan kimozin klonları içerisinde erlenmayer koşullarında en yüksek enzim aktivitesi değerine (~18 IMCU/mL) sahip olan 12 numaralı klon (**pADH2SNT5αHIS4-BtCHY-C#12 (KM71)**) ile fermentör koşullarında üretim yapılmıştır. Üretimlerde standardizasyonun yakalanması amacıyla hücre çalışma bankası hazırlanarak aynı klonun seri kopyaları oluşturulmuş ve her bir fermentasyonda bu bankadan bir tüp çıkartılarak üretime alınmıştır. Fermentasyonlar gerçekleştirilirken aksi belirtilmediği sürece %4 gliserol içeren BSM besiyeri kullanılmış, 2 lpm sabit hava beslemesinde ve gerektiğinde saf oksijen takviyesi ile çözünmüş oksijen seviyesi %20 civarında olacak şekilde üretimler yapılmıştır. Bu klon ile gerçekleştirilen üretim laboratuvar ölçekli 5L hacimli fermentörde, pH 3 değerinde 28°C sıcaklıkta yapılmış olup fermentasyon ortamına belirli aralıklarda artan konsantrasyonda (*step by step*) 112 saat boyunca etanol beslemesi yapılmış ve düzenli olarak örnek alınmıştır. Fermentasyon süresi boyunca ortam değerlerinin kaydedilmesi ile sistem tarafından otomatik olarak oluşturulan grafik (*history plot*) şekil 4.17’de verilmiştir. Bu grafiğin farklı zamanlarındaki verilerin incelenmesi ile fermentasyon sürecinin tamamı ya da anlık durumu hakkında geniş kapsamlı bilgiler edinilmiş, böylece 90-100 saat gibi sürelerde gerçekleşen fermentasyonlar düzenli olarak takip ve kontrol edilmiştir.

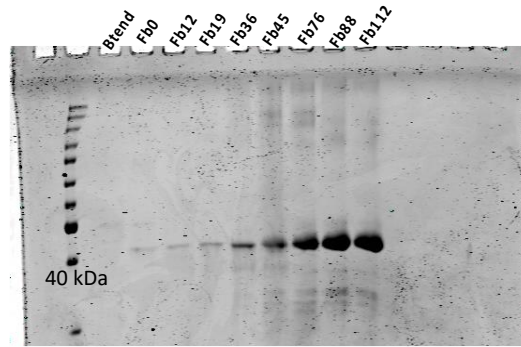


Şekil 4.17. Fermentör üretimi kontrol parametreleri grafiği

Fermantasyon boyunca alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı ölçülmüş daha sonra hücre süpernatantları alınmış, bu süpernatantlarda toplam protein ölçümü ve enzim aktivite testleri yapılmıştır. Şekil 4.18’de verilen fermentör sonuçlarına göre elde edilen maksimum enzim aktivite değeri 45.28 ± 1.18 IMCU/mL, toplam protein miktarı 289 ± 3.85 mg/L ve yaş hücre ağırlığı 323 ± 5.65 g/L olarak elde edilmiştir. Fermantasyon süresi boyunca üretilen protein miktarı artmaya devam etmekte buna paralel olarak enzim aktivitesi de artmaktadır. Ancak fermentasyon süresince ortama düzenli olarak ilave edilen besleme solüsyonu ve hücre miktarının artmasıyla 5L hacim ile sınırlı olan fermentörün cam haznesi bir süre sonra dolmakta, bu da fermentasyonun sonlandırılmasına sebep olmaktadır. Fermantasyon boyunca alınan örneklerde moleküler ağırlık doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE analiz sonucu şekil 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.18. pADH2SNT5αHIS4-BtCHY-C#12(KM71) klonu ile pH 3 ve 28°C gerçekleştirilen fermentör üretim sonuçları

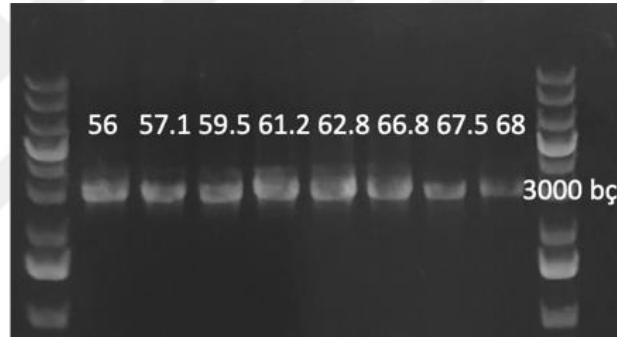


Şekil 4.19. pADH2SNT5αHIS4-BtCHY-C#12(KM71) klonu ile pH3 ve 28°C sıcaklıkta gerçekleştirilen fermentasyona ait örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü

4.3. Sentetik ADH2 promotoru kontrolünde yüksek gen kopyalı maya klonlarında kimozi enzim üretilimi

4.3.1. Sentetik ADH2 promotoru kontrolünde yüksek kimozi enzim gen kopyalı ekspresyon vektörlerinin (pADH2SNT5 α -BtCHY (1-4 kopya)) üretilmesi

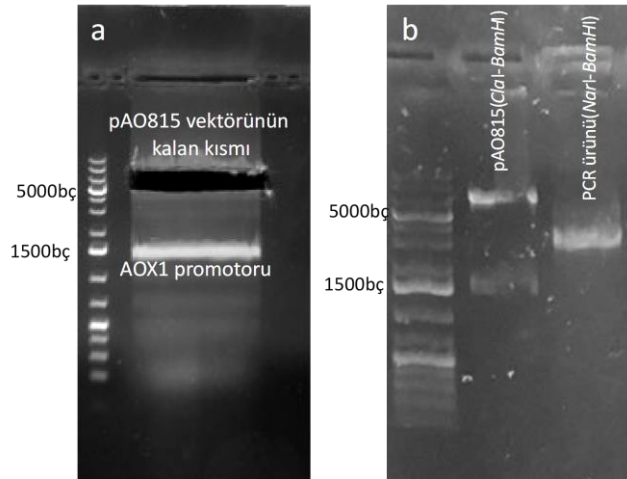
Yüksek kopyalı kimozi enzim klonlarının üretilmesi amacıyla vektör iskeleti olarak pAO815 kullanılmış, vektör üzerinde tek kesim bölgesi bulunan *Bgl*III enzimi ile geni yüksek kopyada içeren plazmidler üretilmiştir. Ayrıca vektör üzerindeki *HIS4* geni ile *Pichia* hücrelerinde transformasyon sonrası seçim sağlanmıştır. pAO815 vektöründeki *AOX1* promotoru etanol ile üretilenebilen *ADH2SNT5* promotoru ile üretilmiştir. Bu amaçla öncelikle pAO815 vektörü *AOX1* promotorunun hemen ön kısmından kesen *Cla*I enzimi ve *AOX1* terminatör bölgesinin sonundan kesen *Bgl*III enzimleri ile kesilerek *AOX1* promotor ve terminatör bölgesi üretilmiş, plazmidin geri kalan kısmı alınmıştır. Daha sonra *ADH2SNT5* promotor bölgesinin üst kısmına *Nar*I enziminin tanıma bölgesi PZR ile ilave edilerek üretilmiştir (şekil 4.20.). Gradient PZR sonrasında elde edilen PZR ürünü saflaştırılarak ligasyona uygun hale getirmek için *Nar*I-*Bam*HI enzimleri ile kesilmiştir.



Şekil 4.20. pAO815 vektörüne klonlanacak olan “*ADH2SNT5* promotoru- α mating sinyal sekansı- Bt CHY geni- terminatör” bölgesinin gradient PZR ile üretilmesi

4.3.1.1. Kimozi enzim genini 1 kopya içeren vektörün üretilmesi

*Cla*I ve *Nar*I restriksiyon enzimleri tanıma bölgeleri nedeni ile DNA’yı kestiklerinde oluşan yapışkan uçlar (nnCGnn) birbirleri ile uyumlu bölgeler bırakmaktadır. Bu iki enzimin “compatible end” özellikleri sayesinde bu çalışmada *AOX1* promotor ve terminatör bölgesi üretilmiş, yerine kimozi enzim genini içeren ve şekil 3.4’te verilen “*ADH2SNT5* promotoru- α mating sinyal sekansı- Bt CHY geni-terminatör” bölgelerinden oluşan, yaklaşık 2816 bp büyüklüğündeki DNA parçası klonlanmıştır. Ekspresyon vektörü üzerinde bulunması gereken *HIS4* geni, AmpR geni ve ori bölgesini içeren kısmın pAO815 vektöründen alınabilmesi için vektör, *Cla*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve 6357bp büyüklüğündeki parça jelden alınarak saflaştırılıp ligasyona hazır hale getirilmiştir (şekil 4.21.a). İnsert olarak şekil 4.5’te PZR ile üretilen, *ADH2SNT5* promotoru altında kimozi enzim genini içeren yaklaşık 2816 bp büyüklüğündeki parça kullanılmış, *Nar*I-*Bam*HI enzimleri ile kesilerek saflaştırılmış ve ligasyona hazır hale getirilmiştir (şekil 4.21.b).



Şekil 4.21. pADH2SNT5α-BtCHY (1 kopya) ekspresyon vektörünün oluşturulması için vektör ve insert parçalarının agaroz jelde gösterimi

Klonlama enzimleri ile kesilen vektör ve insert DNA parçaları jelde kontrol edilerek saflaştırıldıktan sonra ligasyona alınmış, ligasyon sonrası elde edilen pADH2SNT5α-BtCHY-1C (1 kopya) vektörü elde edilmiştir. Ligasyon karışımı kompetent *E.coli* DH5a hücrelerine transforme edilerek amfisilin içeren LB Miller agar plakaya yayılmış ve pozitif kolonilerin seçimleri sağlanmıştır.

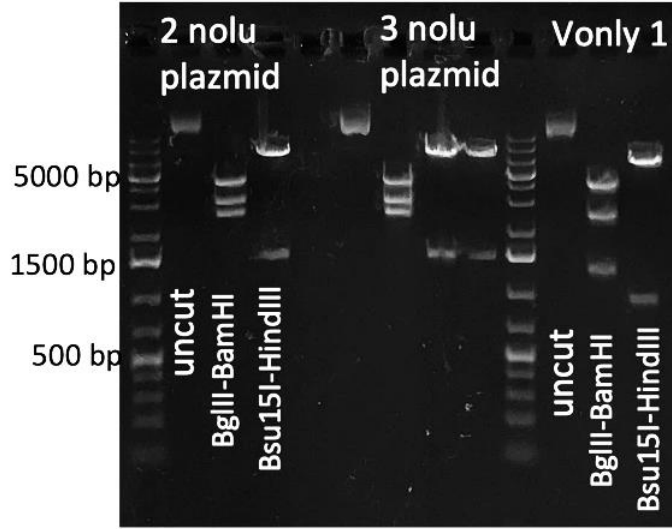
Ligasyon sonrasında elde edilen transformantlardan 8 tanesi seçilerek plazmid izolasyonları yapılmış, *Bgl*II ve *Bam*HI enzimleri ile restriksiyon kesimi kurularak agaroz jelde görüntülenmiştir (şekil 4.22.). Kesim sonucu beklenen parçalar 4028, 2797 ve 2334 bp şeklinde olup 2, 3, 4, 5 ve 7 numaralı plazmidler doğrulanmıştır. Ligasyon işleminde vektör olarak kullanılan pAO815 vektörü ise aynı enzimler ile kesildiğinde 4028, 2404 ve 1277 bp şeklinde parça salacak olup VO1 ve VO2 olarak gösterilenlerin ve 1, 6 ve 8 numaralı plazmidlerin boş vektör olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.22. pADH2SNT5α-BtCHY-1C (1 kopya) ekspresyon vektörünün *Bgl*III ve *Bam*HI enzimleri ile kesim sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü

Agaroz jel görüntüsüne göre doğrulanan plazmidler içerisinde 2 ve 3 numaralı olanlar ile farklı restriksiyon (*Bsu*15I ve *Hind*III) enzimleri ile ikinci bir doğrulama yapılmıştır. Şekil 4.23'e göre pADH2SNT5α-BtCHY-1C vektörünün *Bsu*15I ve *Hind*III

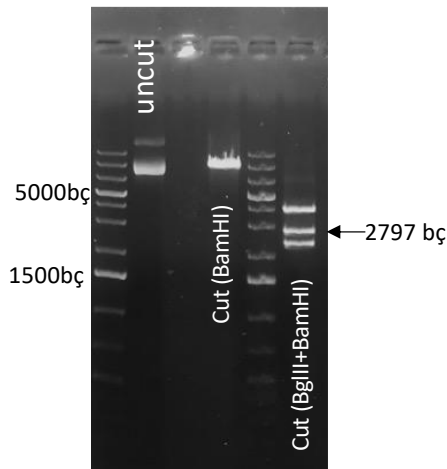
ile kesimi sonucu beklenen parçalar 7737 ve 1422 bç olup pAO815 vektöründe beklenenler ise 6763 ve 946 bç şeklindedir. Buna göre 2 ve 3 numaralı plazmidlerin her ikisi de doğrulanmış ve pADH2SNT5 α -BtCHY-1C#2 numaralı plazmidi 2 kopyalı kimoziin içeren plazmidi oluşturmak için ana iskelet olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.23. pADH2SNT5 α -BtCHY-1C (1 kopya kimoziin) plazmidlerinde farklı restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen doğrulama analizi

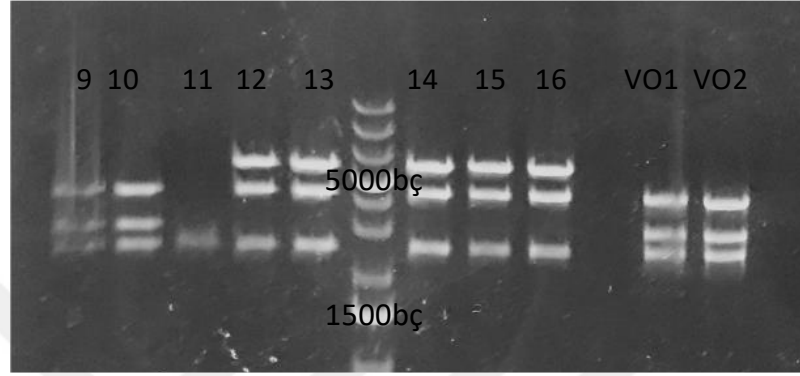
4.3.1.2. Kimoziin genini 2 kopya içeren vektörün oluşturulması

Kimoziin genini 1 kopya içeren pADH2SNT5 α -BtCHY-1C#2 plazmidine tekrar kimoziin genini klonlamak amacıyla bu vektör ana iskelet olarak kullanılmış, ligasyon amacıyla *Bam*HI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiştir. Lineer haldeki bu plazmide, yine aynı plazmid üzerinden *Bgl*II-*Bam*HI enzimleri ile kesilerek 2797 bç büyüklüğündeki “ADH2SNT5 promotörü- α mating sinyali sekansı- Bt CHY geni-terminatör” bölgesi jelden kesilip saflaştırılarak tekrar ligasyon yapılmış ve 2 kopyalı plazmid (pADH2SNT5 α -BtCHY-2C (2 kopya kimoziin)) elde edilmiştir (şekil 4.24).



Şekil 4.24. pADH2SNT5 α -BtCHY-2C (2 kopya kimoziin) eldesi için jel görüntüleri

Ligasyon işleminden sonra seçilen kolonilerden plazmid izole edilerek *Bgl*II-*Bam*HI enzimleri ile kesim kurulmuş ve agaroz jelde kontrol edilmiştir. 1 kopya kimoziin geni içeren plazmidlerin bırakması gereken parçalar 4028, 2797 ve 2334 bp iken 2 kopya kimoziin geni içeren plazmidlerin bırakması gereken parçalar ise 5594, 4028 ve 2334 bp şeklinde olup şekil 4.25'e bakıldığında 12,13,14,15 ve 16 numaralı plazmidlerin 2 kopya kimoziin geni içeren plazmidler olduğuna karar verilmiş ve çalışmalara 12 numaralı plazmid ile devam edilmiştir.



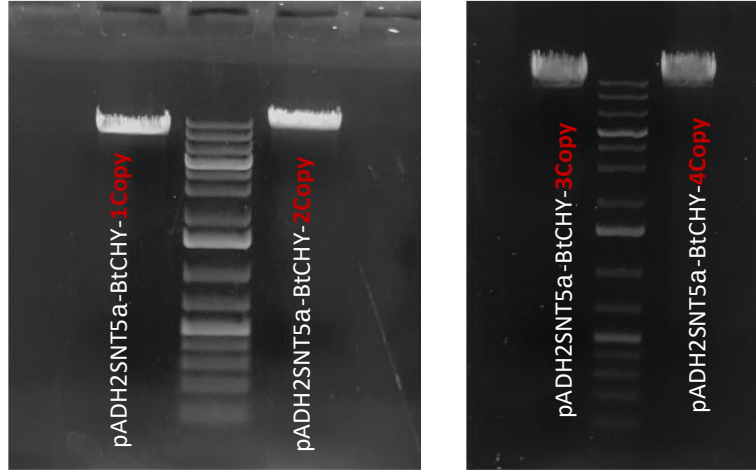
Şekil 4.25. pADH2SNT5 α -BtCHY-2C (2 kopya kimoziin) plazmidinin *Bgl*II-*Bam*HI enzimleri ile kesim sonucu agaroz jelde kontrol edilmesi

4.3.1.3. Kimoziin genini 3 ve 4 kopya içeren vektörlerin oluşturulması

In vitro koşullarda multikopya kimoziin geni içeren klonların oluşturulması için pADH2SNT5 α -BtCHY-2C plazmidine “ADH2SNT5 promotoru- α mating sinyal sekansı- Bt CHY geni- terminatör” bölgesinin tekrar ligasyon yapılmasıyla 3 ve 4 kopya kimoziin geni içeren vektörler oluşturulmuştur. 3 ve 4 kopya kimoziin geni içeren vektörler 2 kopya kimoziin geni içeren vektörün oluşturulmasında anlatılan şekilde aynı klonlama yöntemleri ile elde edilmiştir (sonuçlar verilmemiştir). Gerekli doğrulama analizlerinden sonra çalışma kapsamında kullanılmışlardır.

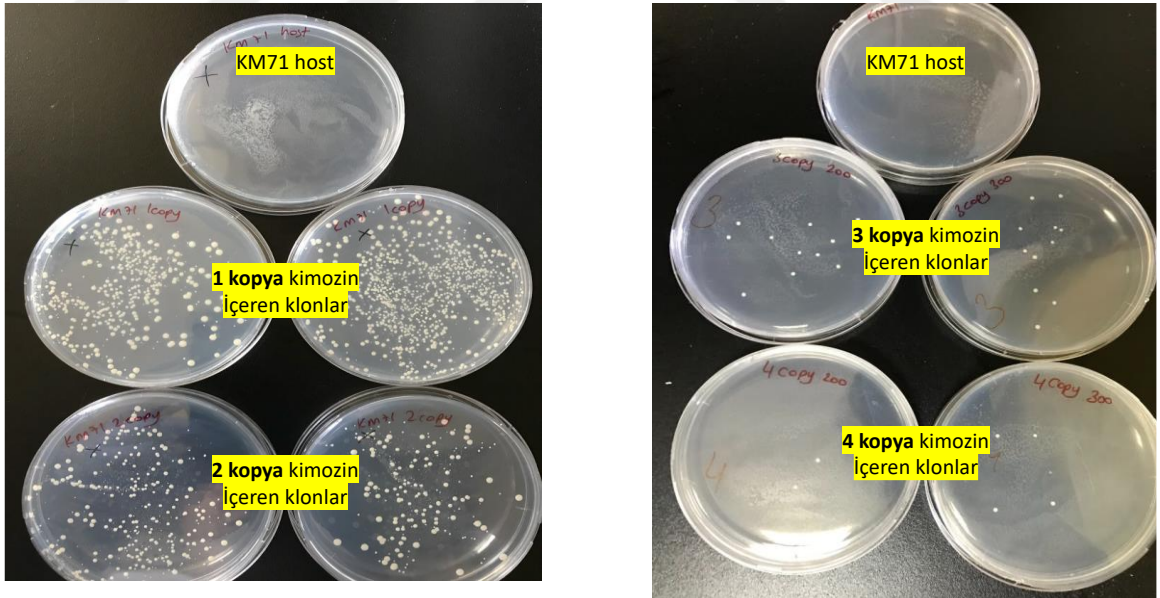
4.3.2. pADH2SNT5 α -BtCHY (1-4 kopya kimoziin) ekspresyon vektörlerinin *P. pastoris* KM71 hücrelerine transformasyonu

P. pastoris KM71 hücrelerine transforme etmek amacıyla *Kpn*2I enzimi ile lineer hale getirilmiş pADH2SNT5 α -BtCHY (1-4 kopya kimoziin) ekspresyon vektörleri jelde kontrol edildikten (şekil 4.26) sonra saflaştırılmış ve kompetent KM71 hücrelerine transforme edilmiştir.



Şekil 4.26. In vitro yöntemlerle elde edilen çoklu kimoziin kopyalı plazmidlerin lineer hale getirilmesi

In vitro klonlama yöntemleri ile elde edilen multikopyalı kimoziin içeren klonların transformasyonunda elektroporasyon yöntemi ile yapılmış olup seçiminde antibiyotik içermeyen MD plaka kullanılmıştır. KM71 hücreleri histidin okzotrof özellikte olup MD plakada gelişebilenler histidin içeren dolayısıyla kimoziin içeren klonlardır (şekil 4.27). Plakada gelişen klonların ekspresyon vektöründeki kimoziin gen kopya sayısı kadar (1, 2, 3 ve 4) kimoziin geni içerdiği bilinmektedir. Ayrıca şekil 4.27'ye bakıldığında kimoziin gen kopya sayısı arttıkça yani plazmid boyutu büyüdükçe daha az sayıda koloni elde edildiği gözlemlenmiştir.

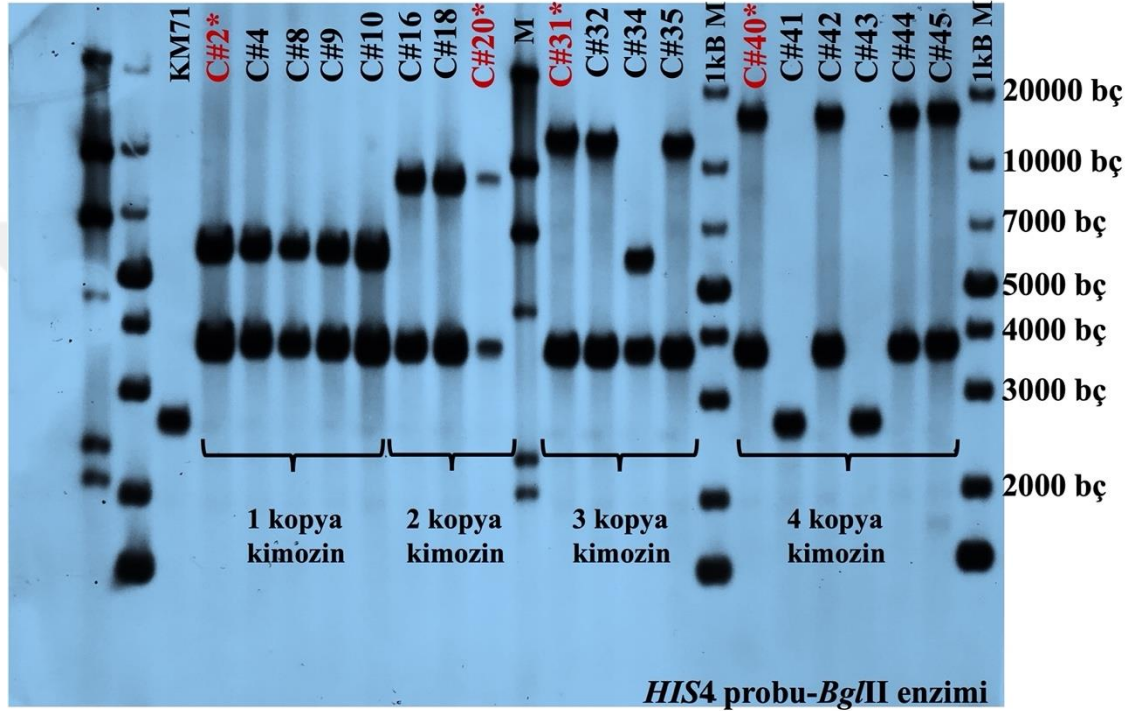


Şekil 4.27. İn vitro klonlama yöntemleri ile elde edilen, MD agarda gelişen klonlar

4.3.3. Southern blot analizi ile gen kopya sayısının doğrulanması

In vitro koşullarda oluşturulan yüksek kopyalı kimoziin klonlarında oluşturulan 1, 2, 3 ve 4 kopya kimoziin geni içeren ekspresyon kasetlerinin maya genomuna

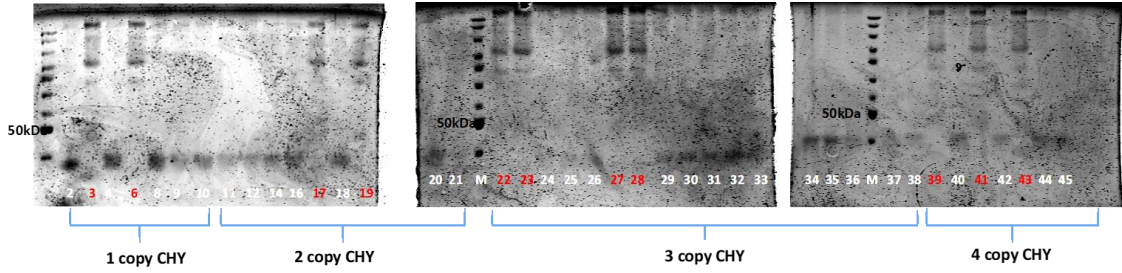
entegrasyonunun kontrolü amacıyla gDNA'lar *Bgl*III enzimi ile kesilmiş daha sonrasında *HIS4* probu kullanılarak elde edilen görüntüde bant hizalarına göre kopya numaraları doğrulanmıştır. Çoklu kopyalı kimozin klonlarında 1, 2, 3 ve 4 kopya kimozin içeren klonlarda sırasıyla 6825, 9622, 12419 ve 15216 bç hizalarında bant beklenmektedir. Şekil 4.28'e göre 2, 4, 8, 9 ve 10 numaralı klonlar 1 kopya kimozin, 16, 18, 20 numaralı klonlar 2 kopya kimozin, 31, 32 ve 35 numaralı klonlar 3 kopya kimozin ve 40, 42, 44 ve 45 numaralı klonlar ise 4 kopya kimozin geni taşıyan ekspresyon kasetlerini içerdiği doğrulanmıştır.



Şekil 4.28. Çoklu kimozin kopyalı klonlarda gen kopya sayısının Southern blot ile doğrulanması (Beklenen bant büyüklükleri; KM71 konakçısında 2650 bç hizasında bant beklenmektedir. Multikopyalı kimozin klonlarında 1, 2, 3 ve 4 kopya kimozin içeren klonlarda sırası ile 6825, 9622, 12419 ve 15216 bç hizalarında bant beklenmektedir)

4.3.4. Erlenmayerde enzim üretimi ile klon taranması

Enzim üretim miktarının artırılması amacıyla in vitro koşullarda, genin 1-4 kopyasını içeren transformantlar ile erlenmayer ölçeğinde BMEY besiyerinde pH 3 değerinde 28°C sıcaklıkta üretim gerçekleştirilmiştir. Erlenmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimin 96. saat süpernatantlarına SDS-PAGE analizi yapılmıştır (şekil 4.29).



Şekil 4.29. Yüksek kopyalı kimosin (1-4 kopya) klonlarda 96. saat süpernatantlarının SDS-PAGE analiz sonucu

Farklı kopya sayıda kimosin içeren klonların süpernatantlarında yapılan SDS-PAGE analizine (şekil 4.29) ve Southern blot analizine (şekil 4.28) göre *P. pastoris* KM71 genomuna hedeflendiği şekilde entegrasyonun gerçekleştiği doğrulanan ve üretim miktarları tespit edilen klonlar içerisinde seçim yapılmış ve her bir kopya sayısı için seçilen klonlar çizelge 4.1’de verilmiştir. Farklı gen kopya sayısına sahip klonlar ile erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimlerde gen kopya sayısına bağlı olarak enzim üretim miktarları arasında farklılıklar olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Çizelge 4.1. Çoklu kimosin kopyalı klonlarda tespit edilen en yüksek enzim aktivitesi değerleri

Kimosin gen kopya sayısı- Adlandırılması	Klon numarası	Tespit edilen en yüksek enzim aktivitesine bağlı seçilen klon
1 kopya kimosin pADH2SNT5 α -BtCHY- 1C	2-10 arası	4 IMCU/mL değeri ile #2 numaralı klon
2 kopya kimosin pADH2SNT5 α -BtCHY- 2C	11-21 arası	6.3 IMCU/mL değeri ile #20 numaralı klon
3 kopya kimosin pADH2SNT5 α -BtCHY- 3C	22-38 arası	4.5 IMCU/mL değeri ile #31 numaralı klon
4 kopya kimosin pADH2SNT5 α -BtCHY- 4C	39-45 arası	3 IMCU/mL değeri ile #40 numaralı klon

Teorik olarak üretimi hedeflenen enzimin gen kopya sayısının artması ile üretilen enzim miktarının da artması beklenmektedir. Ancak çizelge 4.1’de görüldüğü gibi gen kopya sayısının artması ile üretilen ve hücre dışına salgılanan enzim miktarı orantılı bir şekilde artmamıştır. Bu sebeple hem üretilen proteinin disülfid bağlarının doğru oluşumunu sağlayacak hem de hücre dışına salgılanmasına yardımcı olacağı düşünülen PDI şaperon proteininin overekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yapılan

çalışmalar bir sonraki bölümde verilmiştir.

4.3.5. Yüksek kimoziin gen kopyalı maya klonlarında protein disülfid izomeraz (PDI)'ın overekspresyonu

Rekombinant protein üretiminde yüksek miktarda enzim üretimi için gen kopya sayısının artırılması uygulanan bir stratejidir. Ancak gen kopya sayısı artırılınca üretilen protein miktarı artsa bile bazı durumlarda proteinin aynı oranda hücre dışına salgılanamadığı ve üretilen proteinin hücre içinde kaldığı düşünülmektedir. Üretimi gerçekleşen proteinler translasyon sonrası modifikasyonları yapıldıktan sonra hücre dışına salgılanmaktadır. Bu çalışma kapsamında kimoziin enziminin rekombinant üretimi amacıyla 4 kopyaya kadar gen kopya sayısı artırılmış, ancak hücre dışı sekresyon seviyelerine bakıldığında (çizelge 4.1) artan gen kopya sayısı ile sekresyon arasında orantılı bir artış olmadığı görülmüştür. Farklı gen kopya sayılı kimoziin klonları arasında gözlenen en yüksek enzim aktivitesinin 2 kopya kimoziin içeren klonda 6.3 IMCU/mL olduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla in vitro klonlama teknikleri ile oluşturulmuş bu klonlara, hücre dışı sekresyonu arttırabilmek amacıyla PDI şaperon proteinin overekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

PDI şaperon proteininin overekspresyonu amacıyla laboratuvarımızda mevcut bulunan, vektör haritası şekil 4.30'da verilen pADH2-900-PDI-HIS-Zeo plazmidi kullanılmıştır.



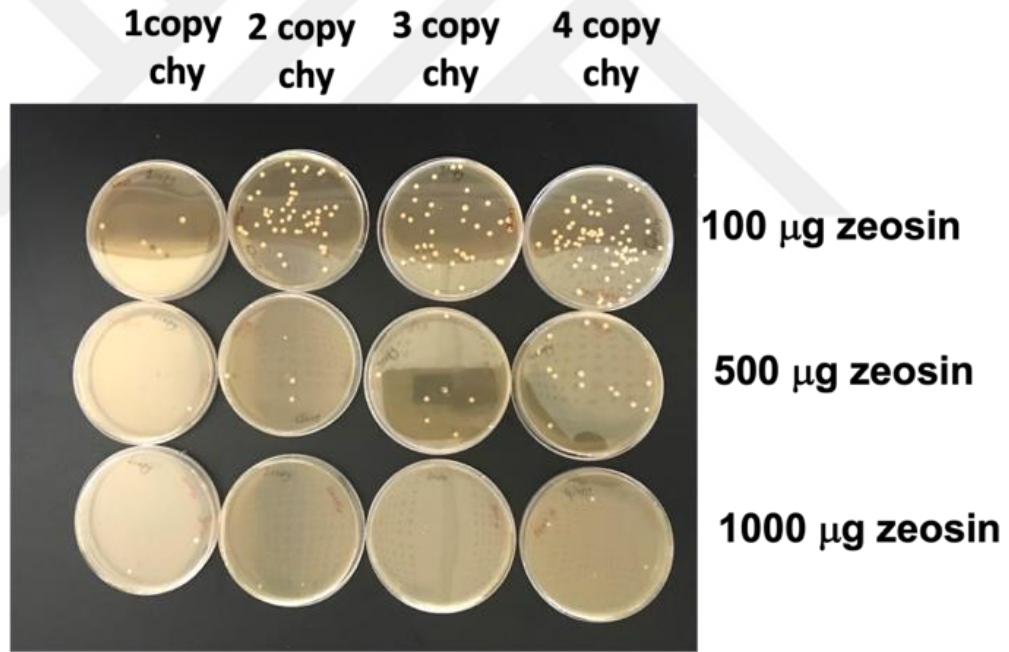
Şekil 4.30. pADH2-900-PDI-HIS-Zeo vektör haritası

Yüksek kopyalı kimoziin klonlarıyla gerçekleştirilen kimoziin üretimlerinde hücre dışına sekresyon miktarlarının artırılması amacıyla çizelge 4.1'de verilen 2, 20, 31 ve 40

numaralı olan ve sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 kopya kimoziin içeren klonlar PDI overekspresyonu için konakçı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle ilgili klonlar LiAc yöntemi ile transformasyona elverişli hale getirilmiştir. Daha sonrasında ise *Kpn2I* enzimi ile lineer hale getirilen pADH2-900-PDI-HIS-Zeo vektörü bu klonlara transforme edilmiş ve zeosin içeren YPD agar plakalarda seçim sağlanmıştır (şekil 4.31 ve çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Çoklu kimoziin kopyalı klonlarda PDI overekspresyonu sonucu zeosin oranına bağlı olarak gelişen transformantlar

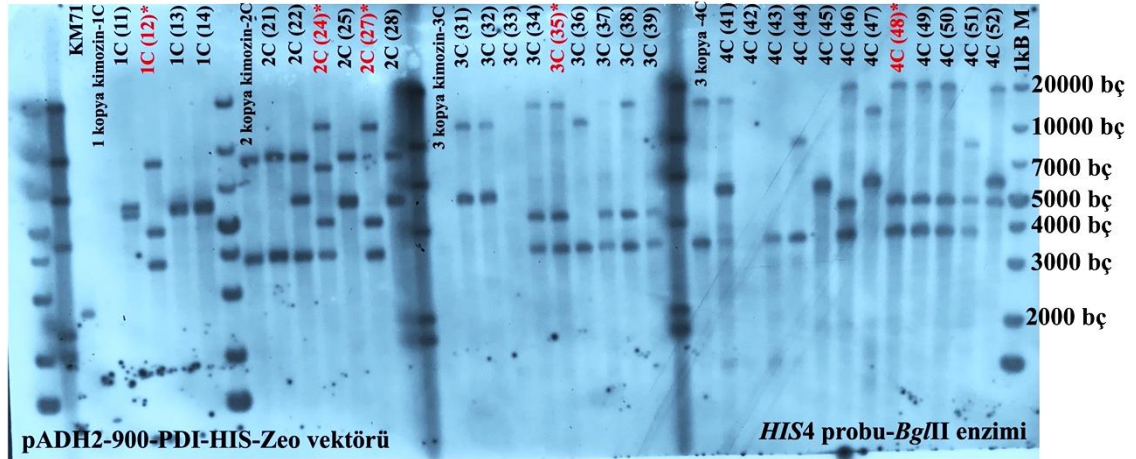
<i>Klon no- Adlandırma</i>	1 kopya kimoziin (C#2)	2 kopya kimoziin (C#20)	3 kopya kimoziin (C#31)	4 kopya kimoziin (C#40)
1000 µg zeosin	11,12	21,22	Koloni yok	41-44
500 µg zeosin	13	23-26	31-37	45-57
100 µg zeosin	14-17	27-29	38-40	58,59



Şekil 4.31. pADH2-900-PDI-HIS-Zeo vektörünün, kimoziin içeren klonlara transformasyonu sonucu YPD+zeosin plakada gelişen koloniler

4.3.5.1. Southern blot yöntemi ile PDI geninin genoma entegrasyonunun kontrolü

Kimoziin enzimini ürettiği doğrulanan klonlara aktarılan PDI geninin gen kopya sayısı Southern blot analiziyle belirlenmiştir. Bu amaçla klonların gDNA'ları izole edilmiş, *BglII* enzimi ile kesilmiş ve *HIS4* probu ile Southern blot analizi gerçekleştirilmiş, sonucu şekil 4.32'de verilmiştir.



Şekil 4.32. Çoklu kimoziin kopyalı klonlarda PDI overeksprese edilen klonlarda Southern blot görüntüsü

Southern blot sonucuna bakıldığında (şekil 4.32) KM71 konakçısında beklenen bant büyüklüğü 2650 bp hizasında olup doğrulanmıştır. Çoklu kimoziin kopyası içeren klonlarda PDI overekspresyonu amacıyla genoma entegre olan PDI ekspresyon kaseti kimoziin gen kopya sayısından bağımsız olarak 3682 bp ve 4759 bp hizasında sabit bantlar vermesi gerekmektedir. PDI ekspresyon kaseti 1 kopya şeklinde entegre olduysa 3682 bp ve 4759 bp bantlarına ilaveten 8742bp hizasında, 2 kopya şeklinde genoma entegre olduysa 11539 bp hizasında, 3 kopya şeklinde genoma entegre olduysa 14336 bp hizasında, 4 kopya şeklinde entegre olduysa da 17133 bp hizasında bant vermesi beklenmektedir. Çizelge 4.3 incelendiğinde 1, 2, 3 ve 4 kopya kimoziin geni içeren klonlarda PDI geninin ekstra kopyasını içeren klonlar özetlenmiştir (şekil 4. 32 üzerinde kırmızı ile etiketli olan klonların kimoziin ve PDI genlerini birlikte içerdiği ve doğrulandıkları tespit edilmiştir). Çizelge 4.3'teki çizelgede verilen klonlar ile erlenmayer ölçeğinde kimoziin üretimi gerçekleştirilerek PDI şaperon proteinin üretime etkisine bakılmıştır.

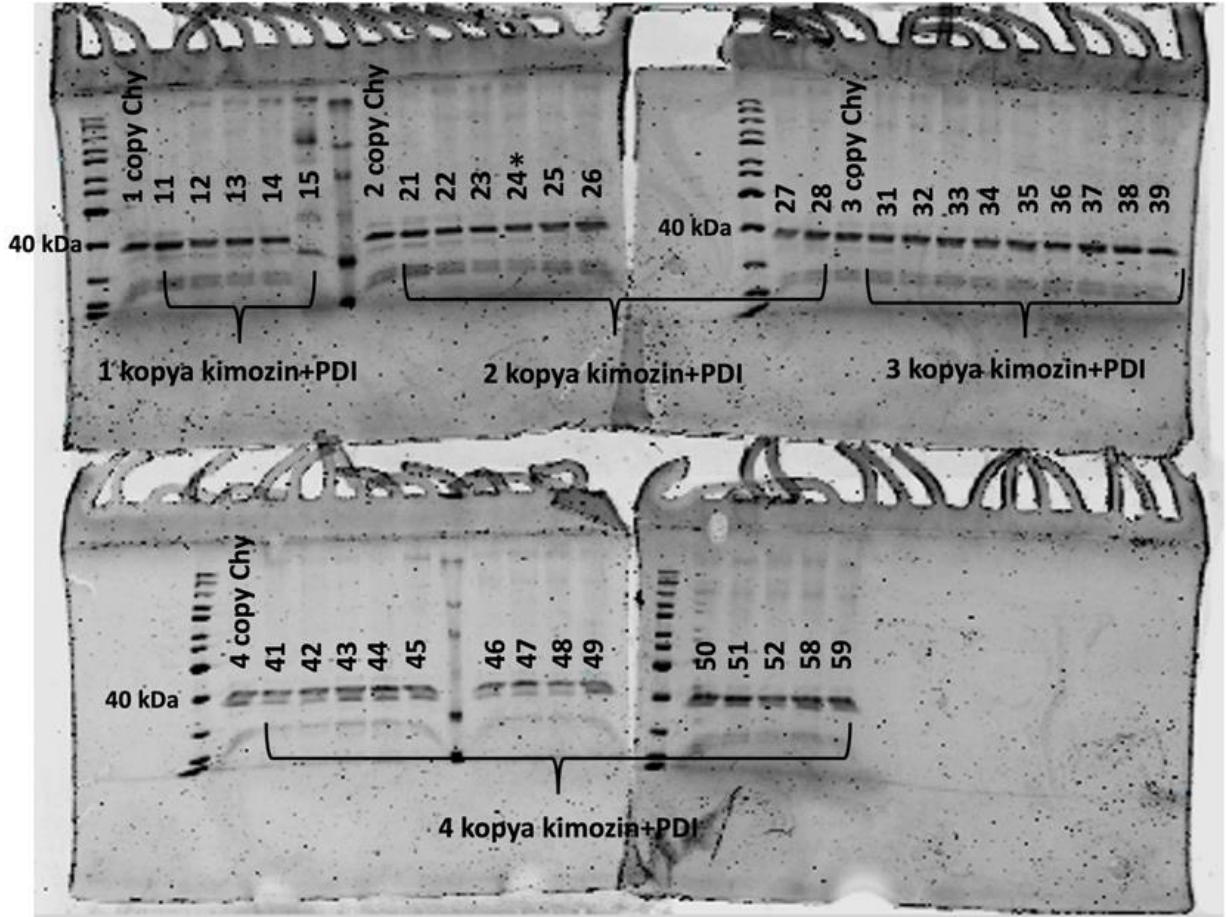
Çizelge 4.3. PDI overeksprese edilen klonların içerdikleri ekstra PDI gen kopya sayısı

	1 kopya PDI*	2 kopya PDI*
1 kopya kimoziin (C#2)	C#12	-
2 kopya kimoziin (C#20)	C#27	C#24
3 kopya kimoziin (C#31)	C#35	-
4 kopya kimoziin (C#40)	C#48	-

*1 ve 2 şeklinde ifade edilen kopya sayıları konak hücrenin içerdiği PDI geni dışında eklenen ekstra PDI gen kopya sayılarını göstermektedir.

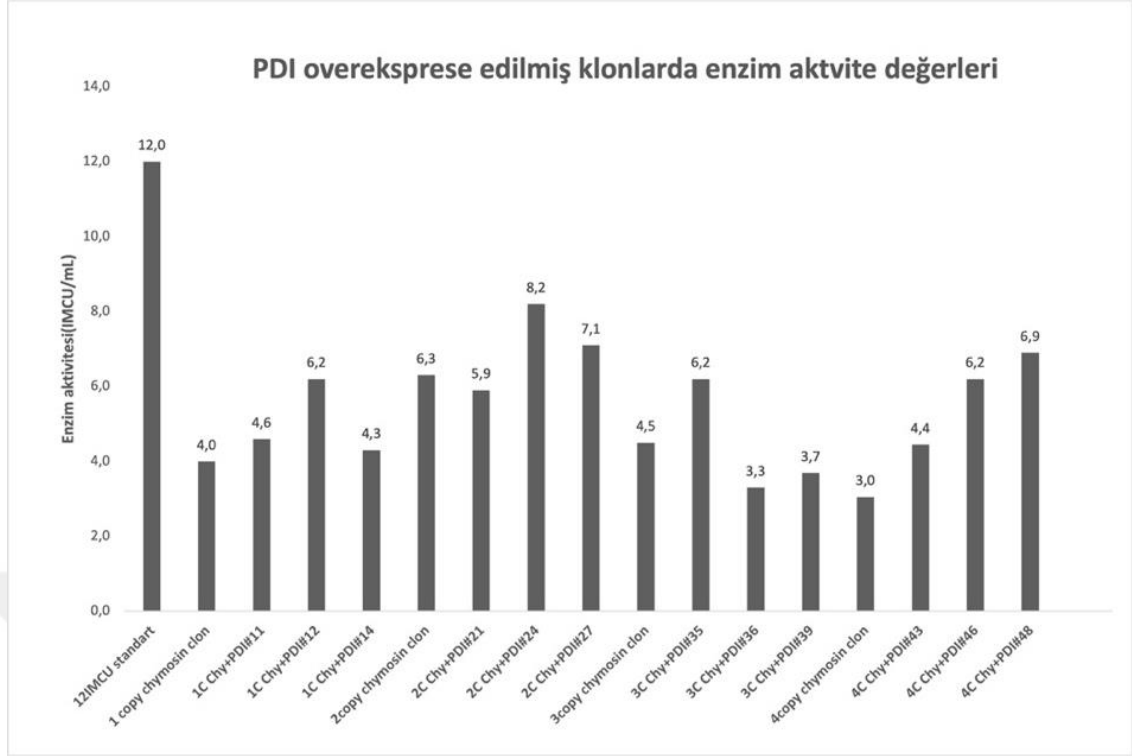
4.3.5.2. PDI overekspresyonu ile oluşturulan klonlarda erlenmayer ölçeğinde kimozin üretimi

PDI şaperon proteininin overekspresyonu ile elde edilen klonlarda kimozin üretimi için erlenmayer ölçeğinde BMEY besiyerinde pH 3 değerinde 28°C sıcaklıkta 96 saat süresince enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim süresi boyunca her 12 saatte son konsantrasyonu %1 olacak şekilde etanol eklemesi yapılarak üretimin 96. saatinde alınan süpernatant örnekleri SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (şekil 4.33).



Şekil 4.33. PDI overeksprese edilmiş farklı kopya sayıda kimozin geni içeren klonlarda erlenmayer üretiminin SDS-PAGE analizi (tüm klonlar ekstra 1 kopya PDI geni içerirken * işaretli klon ekstra 2 kopya PDI geni içermektedir)

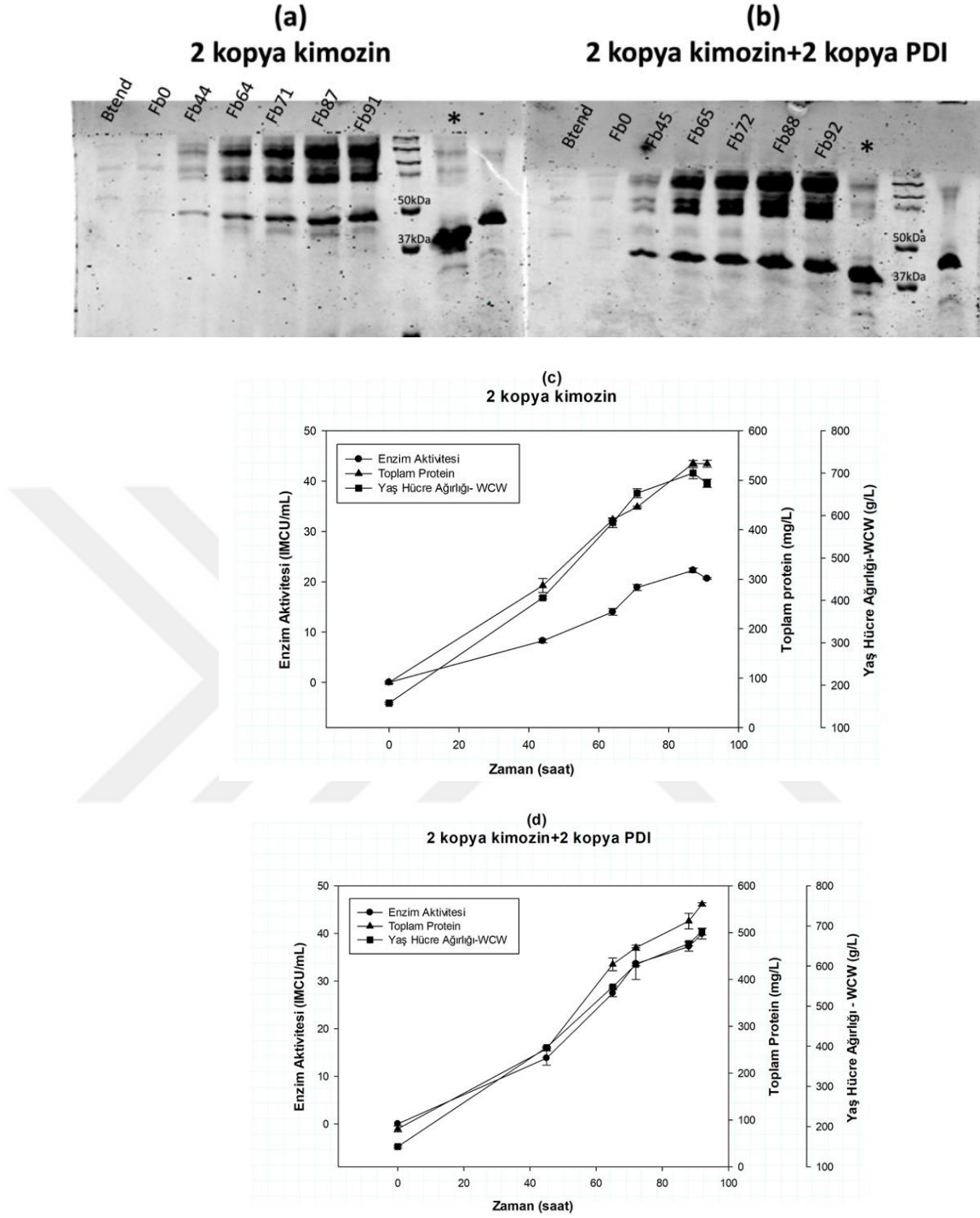
Erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimin 96. saat süpernatant örneklerine ait süt pıhtılaştırma testi yapılmış ve sonuçları şekil 4.34'te gösterilmiştir. Süt pıhtılaştırma testi sonuçlarına göre farklı gen kopya sayısına sahip klonlara ekstra PDI overekspresyonu ile elde edilen klonlarda erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimlerde gen kopya sayısı ve PDI overekspresyonunun enzim üretim miktarlarına etkisi olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).



Şekil 4.34. PDI overeksprese edilmiş farklı kopya sayıda kimoziin geni içeren klonlarda erlenmayer üretimi sonucu enzim aktivitesi değerleri

4.3.6. PDI overeksprese edilmiş yüksek kopyalı (2 kopya) kimoziin klonlarında fermentör üretimi

Şekil 4.34'e göre erlenmayer ölçeğinde üretim ile en yüksek enzim aktivite değerine sahip olan 2 kopya kimoziin geni ve 2 kopya ekstra PDI geni içeren klonda fermentör ölçeğinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Fermentör üretimleri sonucu alınan örneklere ait veriler ve SDS-PAGE sonuçları şekil 4.35'te gösterilmiştir.

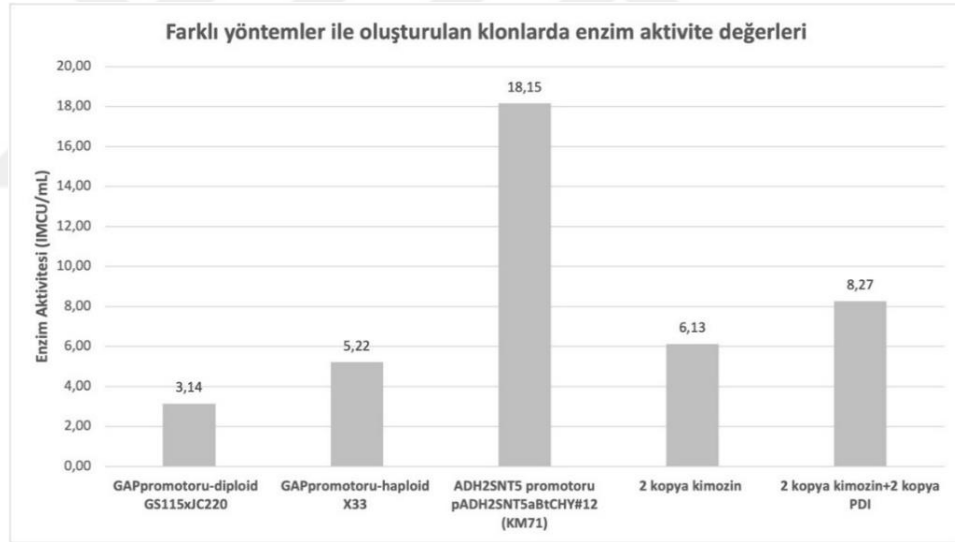


Şekil 4.35. 2 kopya kimosin klonu ve ekstra 2 kopya PDI içeren klonlarda gerçekleştirilen fermentasyon sonuçları. **(a):** 2 kopya kimosin geni içeren klona ait SDS-PAGE görüntüsü, (*standart yöntemlerle oluşturulan pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 klonuna ait 24C-pH4 üretim süpernatantına aittir) **b):** 2 kopya kimosin geni ve ekstra 2 kopya PDI geni içeren klona ait SDS-PAGE görüntüsü, **c):** 2 kopya kimosin geni içeren klona ait enzim aktivitesi, toplam protein ve yaş hücre ağırlığı grafiği **d):** 2 kopya kimosin geni ve ekstra 2 kopya PDI geni içeren klona ait enzim aktivitesi, toplam protein ve yaş hücre ağırlığı grafiği)

Şekil 4.35'te görüldüğü gibi iki klon arasında yaş hücre ağırlıkları ve toplam protein miktarları açısından ciddi bir fark olmamakla beraber, enzim aktiviteleri arasında neredeyse 2 kat farklılık gözlemlenmiştir. Sadece 2 kopya kimoziin geni içeren klon ile yapılan fermentasyonda 20.74 ± 0.74 IMCU/mL değerinde enzim aktivitesi elde edilmişken, ekstra 2 kopya PDI geni içeren klonda enzim aktivitesi değeri 39.94 ± 1.09 IMCU/mL olarak elde edilmiştir. Ayrıca şekil 4.35'te verilen SDS-PAGE görüntüsü incelendiğinde PDI şaperon proteininin overekspresyonu ile üretilen ve hücre dışına salgılanan protein miktarlarında artış gözlemlendiği tespit edilmiştir.

4.4. Fermentör ölçeğinde kimoziin üretimi için bazı üretim koşullarının optimizasyonu

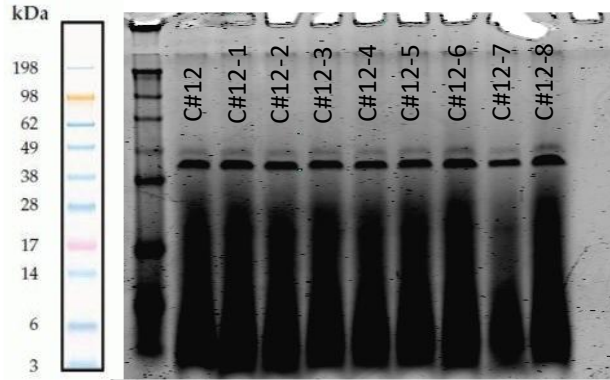
Çalışma kapsamında oluşturulan tüm klonlarda aynı koşullarda (28C -pH3) erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimler sonucu enzim aktivite değerleri karşılaştırıldığında (şekil 4.36) en yüksek enzim aktivitesinin yaklaşık 18 IMCU/mL değeri ile **pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71)** klonunda elde edildiği görülmüştür. Bu sebeple fermentör ölçekli üretim çalışmaları için **pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71)** klonu ile fermentör çalışmalarına geçilmeye karar verilmiştir.



Şekil 4.36. Çalışma kapsamında farklı teknikler ile oluşturulan klonlar ile erlenmayer üretimi sonucu enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılması

Fermentör üretimi için seçilen **pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71)** klonda Southern blot analizi sonucuna göre kimoziin geninin entegrasyonunun hedeflenen *HIS4* bölgesi dışında farklı bir lokasyona gerçekleştiği görülmüştür. Bu sebeple bu klon ile üretim yapılmadan önce gen kopya sayısının stabilitesinin test edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ilgili klonun -80°C gliserol stoğundan YPD agar plakalara ekim yapılmış ve burada oluşan farklı alt kolonilerle (12 numaralı klondan türetilen 8 alt klon, C#12-1-C#12-8 şeklinde isimlendirilmiştir) tekrar üretim yapılmıştır. Erlenmayerde gerçekleştirilen üretimler sonucu elde edilen süpernatant örneklerine SDS-PAGE analizi yapılmıştır (şekil 4.37). Enzim aktivite değerleri ve SDS-PAGE analizi incelendiğinde 12

numaralı klonun stabil davranış gösterdiği, gen kopya sayısını koruduğu ve fermentör çalışmalarında kullanıma uygun olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.37. Fermentör çalışmalarına devam edilen pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonundan türetilen alt klonlarla gerçekleştirilen üretime ait SDS-PAGE analizi

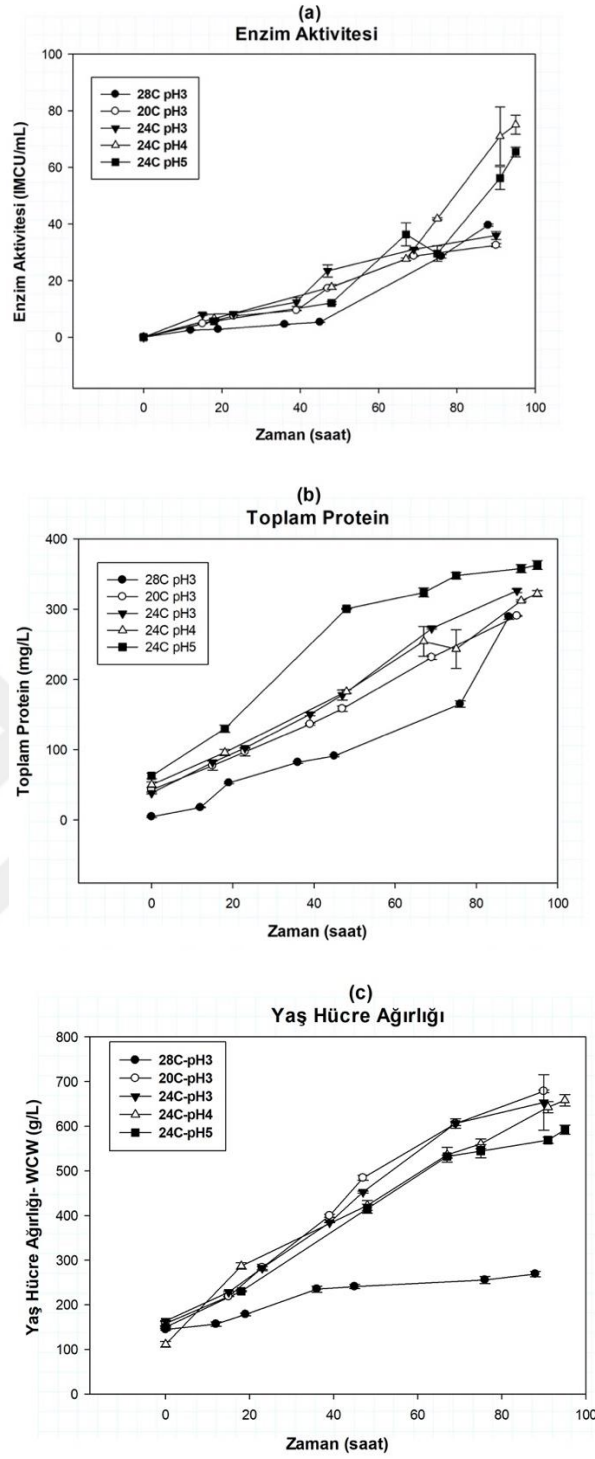
Kimozin üretiminde daha önce erlenmayer ölçekli gerçekleştirilen üretimlerde farklı pH ve sıcaklık parametreleri denenmiş olup aynı klonun farklı pH ve sıcaklıkta davranışının farklı olduğu, protein üretim miktarını etkilediği tespit edilmiştir (sonuçları verilmemiştir). Bu sebeple bu tez çalışması kapsamında hedef proteinin üretim miktarının artırılması amacıyla seçilen klonda 3, 4, 5 pH değerleri ve 20, 24, 28°C sıcaklık değerlerinde fermentör ölçekli üretimler gerçekleştirilmiş olup bu üretilere ait elde edilen veriler şekil 4.38’de gösterilmiştir.

Farklı koşullarda gerçekleştirilen fermentör üretimlerine ait verilerin tamamını içeren çizelgeler ekler kısmında (EK-3, EK-4, EK-5) verilmiştir. Enzim aktivitesi değerlerine bakıldığında en yüksek enzim aktivitesinin 75.07 ± 3.31 IMCU/mL değeri ile 24°C sıcaklık ve pH 4’te gerçekleştirilen fermantasyondan elde edildiği görülmüştür. Aynı fermantasyona ait toplam protein miktarı 322.78 ± 4.49 mg/L ve yaş hücre ağırlığı ise 658.13 ± 12.98 g/L olarak elde edilmiştir. Gerçekleştirilen bu fermantasyonlarda 24°C sıcaklıkta farklı pH değerlerinde tamamlanan fermantasyonlardan elde edilen enzim aktivitesi, toplam protein miktarı ve yaş hücre ağırlığına ait veriler istatistiki olarak değerlendirilmiş (çizelge 4.4.) olup fermantasyonların SDS-PAGE sonuçları ise şekil 4.39’da verilmiştir.

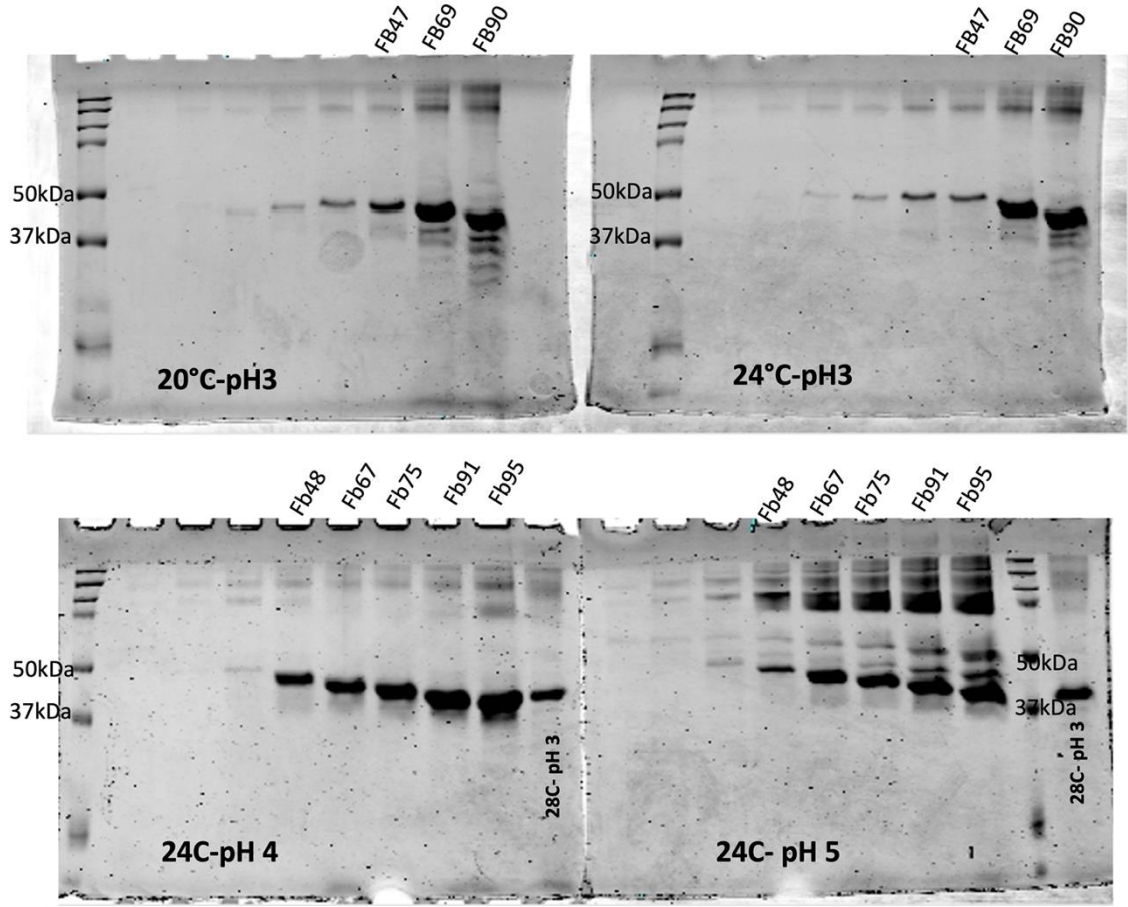
Çizelge 4.4. Aynı sıcaklıkta (24°C) farklı pH değerlerinde yapılan fermantasyonlara ait enzim aktivitesi, toplam protein miktarı ve yaş hücre ağırlığına ait verilerin istatistik olarak değerlendirilmesi

	Enzim Aktivitesi (IMCU/mL)	Toplam Protein (mg/L)	Yaş Hücre Ağırlığı (g/L)
pH 3	35.94 ± 1.39^c	326.36 ± 2.57^b	653.4 ± 62.18^a
pH 4	75.07 ± 3.31^a	322.27 ± 4.5^b	658.13 ± 12.99^a
pH 5	65.48 ± 1.68^b	362.73 ± 6.43^a	592.23 ± 9.90^a

Farklı harflerle işaretlenen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p < 0.05$).

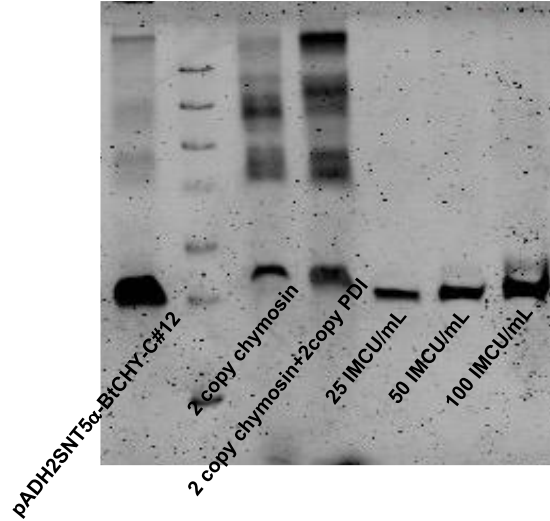


Şekil 4.38. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile farklı sıcaklık ve pH'larda fermentör ölçeğinde gerçekleşen üretim sonuçları (a: Enzim aktivitesi grafiği, b: Toplam protein grafiği, c: Yaş hücre ağırlığı grafiği)



Şekil 4.39. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile farklı sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleştirilen fermantasyon üretimlerinin SDS-PAGE görüntüsü

Bu tez çalışmasının temel amacı yüksek verimlilikte kimozin enzimi üretebilen bir maya klonu geliştirmek olduğu için in vitro klonlama yöntemleri ile de yüksek gen kopya sayıda kimozin içeren klonlar elde edilmiştir. 2 kopya kimozin geni içeren ve bu klona ekstra 2 kopya PDI overekspresyonu ile elde edilen klonlar ile gerçekleştirilen üretimler sonucu süpernatant örnekleri SDS-PAGE jeline yüklenmiştir (şekil 4.40).

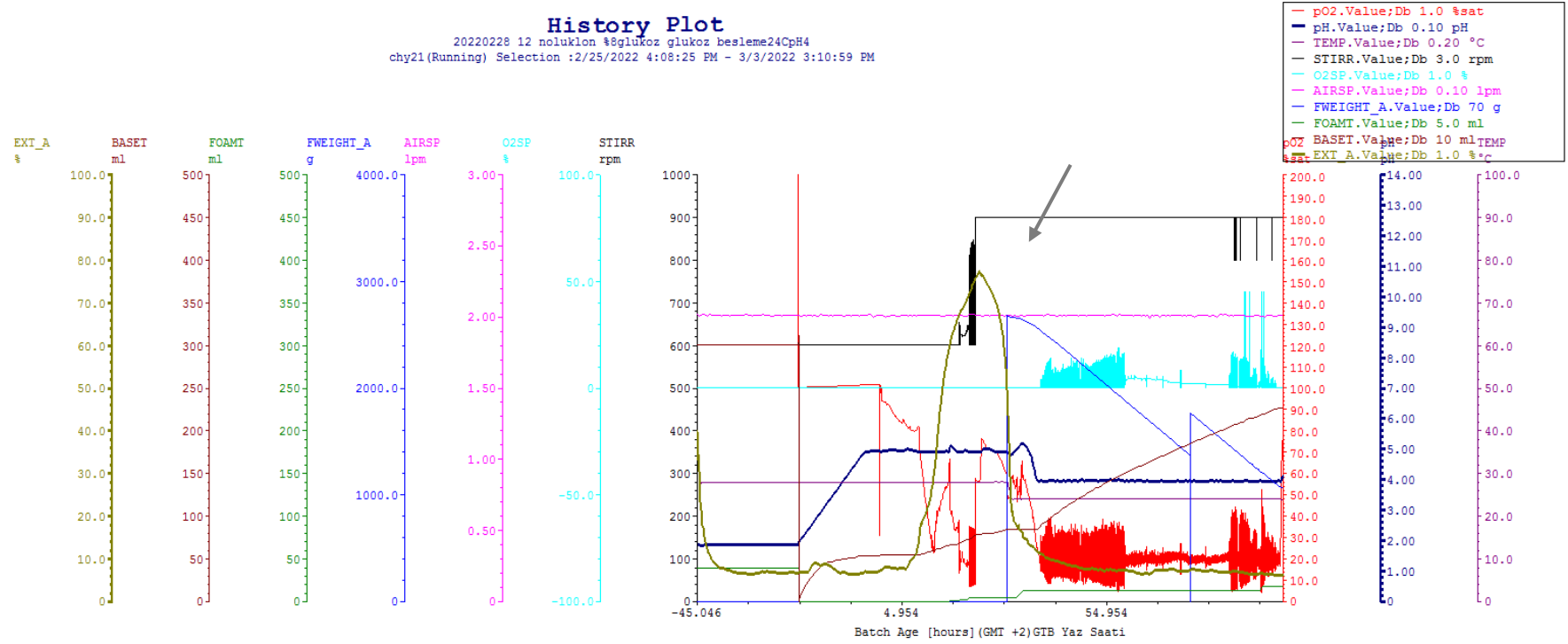


Şekil 4.40. Çalışma kapsamında seçilen bazı örneklere ait karşılaştırmalı SDS-PAGE görüntüsü.

Jel görüntülerinden anlaşılabileceği üzere 2 kopya kimozen (**20.63 IMCU/mL**) ve ekstra 2 kopya PDI geni içeren (**39.9 IMCU/mL**) klonlar ile elde edilen enzim üretim miktarı pADH2SNT5α.HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonundan (**75.07±3.31 IMCU/mL**) elde edilen enzim üretim miktarından düşüktür. Bu sonuçlar erlenmayer üretiminde olduğu gibi, fermentör ölçekli üretimde de pADH2SNT5α.HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile gerçekleştirilen üretimin in vitro yöntemler ile oluşturulan çoklu kopyalı klonlardan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla bu tez kapsamında denenen tüm yöntemlerde oluşturulan klonlar arasında en yüksek verimlilik bu klonda tespit edilmiş olup sanayi üretimi açısından aday klon olma potansiyeli bulunmaktadır. Ancak sanayide kullanım açısından etanolün dezavantajından uzaklaşabilmek amacıyla oluşturulan klonun glukoz besleme ile fermentörde üretimi yapılmıştır.

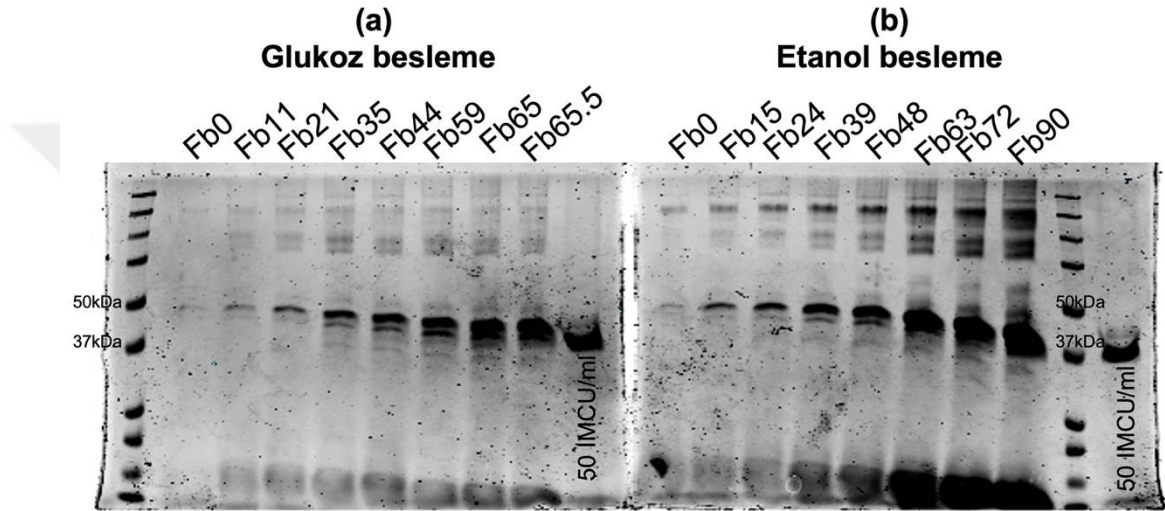
4.4.1. ADH2SNT5 promotörü ile glukoz beslemeli fermantasyon

Farklı sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleştirilen fermantasyonların sonucuna göre pADH2SNT5α.HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile en yüksek üretim 24°C sıcaklık ve pH 4 değerinde etanol beslemesi ile elde edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan ADH2SNT5 promotörünün etanol ile indüklenebilen bir promotor olduğu bilinmektedir. Erden Karaoğlu F. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada bu promotor üzerine glukozun etkisi erlenmayer ölçeğinde test edilmiş ve glukoz içeren besiyerinde etanole göre az da olsa (yaklaşık %50 daha az) protein ekspresyonu sağlandığı sonucuna varılmıştır. Bahsedilen bu ekspresyonun besiyeri içerisindeki glukozdan ADH2 geni vasıtasıyla oluşan etanol ile sağlandığı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasının ana hedefi sanayi ölçeğinde kullanılabilecek, yüksek verimlilikte ve ekonomik olarak kimozen enzimi üreten bir klon geliştirmek olduğu için kullanılan promotor glukoz ile de indüklenerek protein üretimi denenmiştir. Geliştirilen klon ile %8 glukoz içeren besiyerinde fermantasyon başlatılmış ve 65 saat boyunca %50 glukoz solüsyonu ile beslenerek fermantasyon tamamlanmıştır (şekil 4.41).



Şekil 4.41. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile glukoz içeren besiyerinde tamamlanan fermantasyona ait profil

Glukoz içeren BSM besiyerinde başlatılarak glukoz besleme ile devam ettirilen fermentasyonun en çok dikkat çeken noktası şekil üzerinde yeşil ok ile gösterilen ortam etanol miktarını belirten skaladır. Açık yeşil renkte gösterilen etanol değeri (grafikte EXT_A olarak ifade edilen), fermentasyon ortamında bulunan etanol sensörü (MeOH sensörü, raven BioTech, Kanada) ile ölçülmüştür. Şekil üzerinde görüldüğü gibi fermentasyonun kesikli fazında önce etanol birikmiş daha sonrasında ise biriken etanol hızla tüketilmiş ve bu noktadan itibaren glukoz ile besleme başlatılmış ve 65. saatin sonunda fermentasyon tamamlanmıştır. Glukoz beslemeli fermentasyonla eş zamanlı olarak aynı klonun etanol beslemeli fermentasyonunun da tekrarı yapılmış ve örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (şekil 4.42).



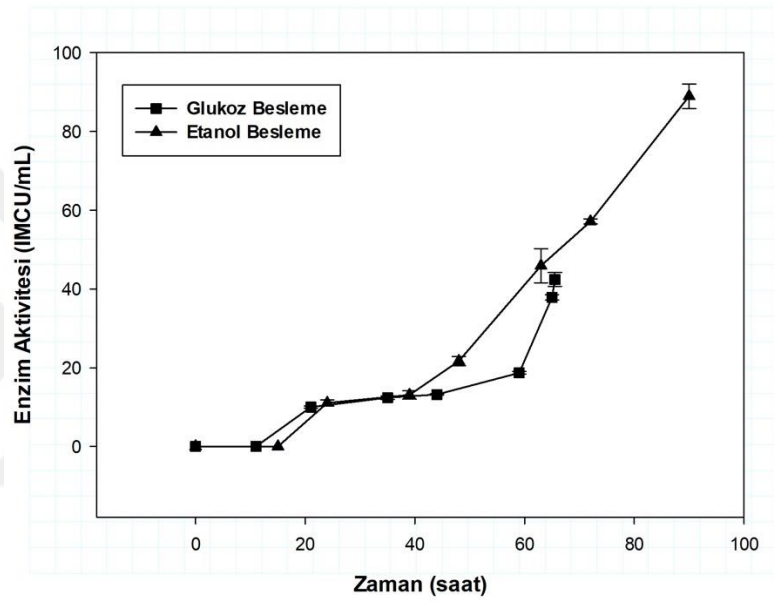
Şekil 4.42. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu ile glukoz (a) ve etanol (b) besleme ile gerçekleştirilen fermentasyon sonucu SDS-PAGE görüntüsü

Aynı klonun iki farklı fermentörde 24°C ve pH 4 şartlarında glukoz ve etanol beslemesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarına ait elde edilen enzim aktivitesi, toplam protein ve yaş hücre ağırlığı verileri çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonunun glukoz ve etanol besleme ile gerçekleştirilen fermentasyon sonuçları

	Enzim Aktivitesi (IMCU/mL)	Toplam Protein (mg/L)	Yaş Hücre Ağırlığı- WCW (g/L)
Glukoz Besleme (t65)	42.4±1.76	175±10.91	463.5±5.65
Etanol Besleme (t90)	81.9±3.10	356.4±6.42	739.5±1.78

Bu sonuçlara göre ADH2SNT5 promotörü ile hem glukoz besleme hem de etanol besleme ile fermantasyon gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir. Hasat saatlerine ait enzim aktivite değerleri incelendiğinde (çizelge 4.4), etanol besleme ile elde edilen enzim aktivitesi glukoz beslemenin 2 katından daha fazla olsa da şekil 4.43 incelendiğinde her iki fermantasyonun da 63-65. saatlerinde alınan örneklerde enzim aktivitesi değerleri arasında ciddi bir farklılık olmadığı (glukoz fermantasyonu(t65) ile 42.4 ± 1.76 IMCU/mL verimlilik, etanol fermantasyonu (t63) ile 45.91 ± 4.33 IMCU/mL) sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonu kullanılarak endüstriyel ölçekte kimozin üretimi yapılırken hem maliyeti düşürmek hem de etanolün depolama problemini ortadan kaldırmak için fermantasyonların etanol yerine glukoz besleme ile yapılabilceğini göstermiştir.



Şekil 4.43. pADH2SNT5 α HIS4-BtCHY-C#12 (KM71) klonunun glukoz ve etanol besleme ile gerçekleştirilen fermantasyonlarına ait enzim aktivite sonuçları

5. TARTIŞMA

P. pastoris mayasında kimozen enziminin, farklı gen kaynakları (bufalo, deve, keçi Tibet sığırı, tavşan, beyaz balina ve sığır) kullanılarak, farklı konak hücrelerde (GS115, X33, SMD1168H ve KM71H) ve farklı promotorlar (AOX1 ve GAP) kontrolünde rekombinant olarak üretimi mevcuttur. Bu tez çalışmasının temel amacı, farklı stratejiler kullanılarak sığır kimozen enzimini yüksek verimlilikte üreten bir maya klonu oluşturmak, bu klon ile endüstriyel boyutta ve ekonomik bir üretim prosesi geliştirmektir.

Bu amaçla çalışma kapsamında aşağıda verilen 4 farklı strateji ile enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

- *Yapısal GAP promotoru kontrolünde haploid ve diploid formdaki maya hücreleri ile kimozen enzimi üretimi*
- *Etanol ile indüklenen, sentetik ADH2SNT5 promotoru kontrolünde kimozen enzimi üretimi*
- *ADH2SNT5 promotoru kontrolünde in vitro koşullarda oluşturulan yüksek gen kopyalı klonlar ile kimozen enzimi üretimi*
- *PDI overeksprese edilmiş çoklu kimozen kopyalı klonlar ile kimozen enzimi üretimi*

Bahsedilen bu stratejiler kapsamında kimozen enzimi üretici klonlar oluşturulmuş ve elde edilen klonlar arasından erlenmayer ölçekli üretimde en yüksek enzim üretimini sağlayan klon ile fermentör ölçeğinde üretimlere geçilmiştir. Fermentör koşullarında gerçekleşen üretimlerde farklı pH ve sıcaklıklar denenerek en yüksek enzim üretiminin gerçekleştiği şartlar belirlenmiştir.

Yapısal GAP promotoru kontrolünde haploid ve diploid formdaki maya hücreleri ile kimozen enzimi üretimi

Temel amacı sanayi boyutunda ekonomik bir proses ile enzim üretimi olan bu çalışma kapsamında, ilk olarak kimozen enziminin, ucuz besin kaynağı olan glukoz ile üretim yapabilen yapısal bir promotor kullanılarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sığır kimozen geni yapısal GAP promotoru altına klonlanmış ve haploid formdaki *P. pastoris* X33 hücrelerinde erlenmayer ölçeğinde 5.3 IMCU/mL verimde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Kimozen enziminin *P. pastoris*'te rekombinant üretimine yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde, bufalo gen kaynaklı kimozen enziminin prepro, pro ve aktif formları ile yapısal GAP promotorunda enzim üretimi denenmiş ancak hücre dışına sekresyon şeklinde gerçekleşen üretimlerde sadece prokimozen formunu içeren klonların süpernatantlarında 16339.39 U/mg spesifik aktivitede, aktif enzim üretimi gözlemlenmiştir (Vallejo vd. 2008). Sığır gen kaynaklı kimozen enziminin üretiminin gerçekleştirildiği bu tez çalışması kapsamında da enziminin pro formunda üretimi sağlanmış olup bu kapsamda literatür ile uyum göstermektedir.

Sığır kimozen enziminin yapısal GAP promotorunda üretimine yönelik Jiang vd. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise enzim ekspresyonunun yapıldığı YPD sıvı besiyerinin pH değeri 6.5 civarında olup enzim üretiminden sonra süpernatantlara asit muamelesi yapılarak düşük pH'nın etkisi ile enzimin pro formunun uzaklaştırılmasıyla

enzimin aktif formu elde edilmiştir. Üretimden sonra yapılan bu asit muamelesi ve sonrasındaki nötralizasyon işlemlerinin yapılmadan hücre dışına direk aktif formda salgılanmasını sağlamak amacıyla bu tez çalışmasında erlenmayerde yapılan üretimler, pH 3 değerli BYED besiyerinde yapılmıştır. Böylece pro formunda hücre dışına sekresyon şeklinde gerçekleştirilen üretimlerde, asidifikasyon ve nötralizasyon gibi ön işlemler yapılmadan besiyeri pH değerinin etkisi ile bu ön işleme gerek kalmadan enzimin kültür ortamında aktif formda üretiminin yapılabileceği gösterilmiştir. Düşük pH değerli besiyerinin kullanımı ile enzimin hücre süpernatantında aktif formda üretiminin yapıldığı başka bir çalışmada ise deve kaynaklı kimozen enzimi yapısal GAP promotorunda *P. pastoris* GS115 hücrelerinde üretilmiştir (Akishev vd. 2021). Çalışmada enzim üretimi için kullanılan YPD besiyerine farklı oranlarda mısır pekmezi, pancar pekmezi ve tamponlayıcı maddelerin ilavesi gerçekleştirilmiş ve üretime etkisine bakılmıştır. Erlenmayer ölçekli gerçekleşen üretimlerde en yüksek aktivitenin görüldüğü YPD+CAS (sitrat fosfat tamponu) +BMz (pancar pekmezi-10g/L) besiyeri ile fermentör ölçekli üretim yapıldığında 1412 U/mL enzim aktivitede 80 mg/L verimlilikle enzim üretimi görülmüştür. Tüm bu çalışmaların ortak sonucunda ise enzim üretiminin prokimozen formuyla asidik ortam şartlarında yapılabileceği, böylelikle pro formunda klonlanan enzimin ön işlem gerektirmeksizin aktif formu ile hücre dışına salgılanarak üretiminin gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir.

Bu çalışma kapsamında sığır kimozen enziminin yapısal GAP promotoru altında üretimi amacıyla oluşturulan haploid *P. pastoris* X33 klonlarında, erlenmayer üretimi ile elde edilen 5.3 IMCU/mL enzim aktivite değeri, fermentasyon ile 18 IMCU/mL seviyesine (şekil 4.6) ulaşsa da sanayi boyutlu üretim düşünüldüğünde saflaştırma öncesi verim düşük olduğu için bu klon ile enzim üretimi ekonomik olmamaktadır. Bu sebeple çalışmanın devamında enzim üretimini arttırabilmek amacıyla doğallı haploid formda bulunan *P. pastoris* hücrelerinin diploid formları ile üretim denenmiştir. Bu amaçla kimozen geni okzotrof GS115 (*his4*) ve JC220 (*ade1*) konakçılara klonlanmış ve haploid formlarında enzim üretim miktarlarına bakılmıştır. Haploid formdaki bu konakçılarda enzim üretim miktarları sırasıyla 1.3 ve 1.1 IMCU/mL seviyesinde tespit edilmiş, bu klonların oluşturduğu diploid klonda ise enzim aktivitesi 3 IMCU/mL'ye ulaşmıştır. Diploid hücre oluşumu ile enzim aktivitesi kendisini oluşturan haploid formlarına göre rölatif olarak %130 seviyesinde arttırılmış olmasında rağmen diploid hücrelerde elde edilen son aktivite değeri üretim prosesi açısından ekonomik olmamaktadır. Bu sebeple diploid klonda fermentör üretimleri de yapılmamıştır. Enzim aktivitesinin arttırılması hedefi ile oluşturulan diploid klonlarda da elde edilen enzim aktivite değerlerinin düşük seviyelerde olmasından dolayı çalışmanın bir sonraki bölümünde GAP promotoruna göre daha güçlü bir promotor kontrolünde üretim denenmiştir.

Etanol ile indüklenen, sentetik ADH2SNT5 promotoru kontrolünde kimozen enzimi üretimi

Çalışmanın bu bölümünde kimozen enziminin üretimi için sığır kimozen geni pADH2SNT5 vektörüne klonlanarak elde edilen ekspresyon vektörü KM71 kompotent hücrelerine transforme edilmiştir. Elde edilen hücreler ile erlenmayerde gerçekleştirilen 96 saatlik üretim sonucunda, pADH2SNT5 α -BtCHY-C#12 klonunda yaklaşık 18 IMCU/mL değerinde enzim aktivitesi tespit edilmiştir (şekil 4.16). Çalışmada kullanılan ADH2SNT5 promotoru ile daha önce kimozen enzim üretimi gerçekleştirilmediği için

AOX1 promotörü kontrolünde gerçekleştirilen sığır kimozi enzim üretileri değeriendirilmiştir.

Sığır kimozi üretili için AOX1 promotörünün kullanıldığı ve erlenmayer ölçeğinde BSM besiyeri ile üretil gerçeleştirilen bir çalışmada 3 IMCU/mL enzim aktivitesi (Nosedá vd. 2016) elde edilmiştir. Filkin vd. (2020) tarafından erlenmayer ölçeğinde yapılan başka bir çalışmada ise elde edilen 12.5 IMCU/mL değeriindeki enzim aktivitesinin, besiyerine sorbitol ilavesi ile 20 IMCU/mL değeriine kadar yükseldiği tespit edilmiştir. Yapılan bir diğeri çalışmada ise analitik gliserole muadil olarak atık gliserolün de besiyeri bileşiminde kullanılabileceği gözlemlenmiş ve atık gliserol kullanımı ile erlenmayer ölçeğinde yapılan üretillerde 146 SU/mL (~4.5 IMCU/mL) değeriinde enzim aktivitesi elde edilmiştir (Espinoza-Molina vd. 2016). Çalışmanın bu bölümünde elde edilen enzim aktivite değeriinin bir önceki bölümde kullanılan yapısal GAP promotörü kullanımıyla elde edilen enzim aktivitesinden yüksek olması sebebiyle kimozi üretili için ADH2SNT5 promotörünün tercih edilmesine karar verilmiştir. Ayrıca AOX1 ve GAP promotörü kullanılarak kimozi üretilinin gerçeleştirildiği önceki çalışmalar ile kıyaslandığında, rekombinant kimozi üretilinde ADH2SNT5 promotörünün bu iki promotöre alternatif olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir.

Etanol ile indüklenabilen ADH2SNT5 promotörü kontrolünde oluşturulan pADH2SNT5 α -BtCHY-C#12 klonunda fermentör ölçekli üretil gerçeleştirilmiş ve 45 IMCU/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir (şekil 4.18). Fermentör üretileri karşılaştırıldığında, ADH2SNT5 promotörünün kullanımı ile, bir önceki bölümde oluşturulan yapısal GAP promotörüne göre (18 IMCU/mL) daha yüksek enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Ancak enzim üretilinin daha da yükseltilebilmesi yüksek gen kopya sayısına sahip maya klonlarının elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışmanın bir sonraki bölümünde in vitro koşullarda yüksek kimozi gen kopya sayısına sahip klonlar oluşturulmuştur.

ADH2SNT5 promotörü kontrolünde in vitro koşullarda oluşturulan yüksek gen kopyalı klonlar ile kimozi enzim üretili

Kimozi enzim üretili amacıyla oluşturulan ekspresyon kasetinin boyutunun büyüklüğünden dolayı genoma yüksek kopya sayısında entegrasyonunda bazı güçlükler yaşanmaktadır. Bu zorlukların aşılabilmesi amacıyla yüksek gen kimozi kopya sayılı plazmidlerin elde edilebilmesi için in vitro yöntemler kullanılmıştır. Bu amaçla yüksek kopyalı (1-4 gen kopyası) klonlar oluşturulmuş ve enzim üretil miktarlarına bakılmıştır. Literatür incelendiğinde rekombinant kimozi üretilinde in vitro yöntemler ile elde edilmiş yüksek kopya gen içeren bir çalışmaya rastlanılmamış dolayısıyla çalışmadan elde edilen sonuçlar in vitro yöntemler ile klonlama yapılarak üretilen diğeri proteinlerin sonuçları ile kıyaslanmıştır.

Vassileva vd. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada Hepatit B yüzey antijenini (HBsAg) 8 kopyaya kadar içeren klonlar ile *P. pastoris*'te üretil gerçeleştirilmiş, en yüksek üretil 8 kopyalı klonda tespit (1 kopyaya göre 11.56 kat daha yüksek) edilmiştir. Yine aynı yöntemle yapılan başka bir çalışmada insan interlökin-3 (hIL-3) proteinini 12 kopyaya kadar içeren klonlar oluşturulmuş 8 kopyaya kadar üretilin orantılı olarak arttığı (1 kopyada 25 mg/L iken 8 kopyada 310 mg/L), 8 kopyadan sonra 25 mg/L seviyesine kadar düştüğü gözlemlenmiştir (Dagar vd. 2018). Her iki çalışmada artan gen

kopya sayısı ile hedeflenen proteinin üretim miktarının arttığı tespit edilmiş olmasına rağmen bu tez çalışmasında benzer sonuçlar elde edilememiştir.

Etanol ile indüklenen *ADH2SNT5* promotörü kontrolünde aynı şekilde oluşturulan ve 4 kopyaya kadar kimozin geni içeren klonlarla üretim yapılmıştır. Gerçekleştirilen üretimlerde en yüksek enzim aktivitesi 6.3 IMCU/mL ile 2 kopyalı klonda tespit edilmiştir. Beklentinin aksine gen kopya sayısı arttıkça enzim aktivitesinde orantılı bir artış görülmemiştir. 2 kopya kimozin klonunda 1 kopyaya göre artış gözlemlenmişken daha yüksek kopyalarda ise artış değil azalma görülmüştür. Oluşturulan klonlarda kimozin gen kopya sayısının artması ile üretilen enzim miktarı artsa da enzimin hücre dışına sekresyonunun tam olarak sağlanamadığı düşünülmektedir. Olması muhtemel diğer sorunlar ise proteinin katlanması sırasında doğru disülfid bağı oluşamamasından dolayı hedef proteinin ERAD yolağına giderek yıkıma uğratılması olabilir. Ayrıca üretilen enzimin proteaz grubuna ait olmasından dolayı yüksek miktarlarda üretildiğinde hücreye toksik etki yapabileceği de düşünülmektedir. Bu sebeplerle çalışmanın bir sonraki aşamasında, yüksek gen kopya sayılarında elde edilen düşük verimliliğin aşılabilmesi ve hedeflenen yüksek miktarda enzim üretimine ulaşılması amacıyla, proteinlerin katlanmalarında yardımcı, doğru disülfid bağı oluşumunu destekleyici ve hücre dışı sekresyonu artırıcı PDI şaperon proteininin overekspresyonu yapılmıştır.

PDI overeksprese edilmiş farklı kopya sayıda kimozin geni içeren klonlar ile kimozin enzimi üretimi

Rekombinant protein üretmek amacıyla üretim klonu tasarlanırken konakçıya uygun kodon optimizasyonu, gen kopya sayısının artırılması, basit veya kompleks konakçı sistemlerinin seçilmesi gibi yöntemlere dikkat edilerek hedeflenen proteinin yüksek verimlilikte üretimi sağlanabilmektedir (şekil 2.2). Ancak bu yöntemlerin etkisi ile hedeflenen proteinin ifadesi kademeli olarak arttırılsa da bazı durumlarda yanlış disülfid bağı oluşumu, katlanmanın düzgün gerçekleşmemesi veya hücre dışına yetersiz sekresyon gibi sorunlarla karşılaşılabilir. Hücrelerde bu problemlerin tespiti amacıyla sistemin kalite kontrol merkezi olarak bilinen endoplazmik retikulum (ER) kullanılmakta ve gerektiğinde sistem içi düzeltmeler burada, ER proteinleri olarak bilinen şaperonlar tarafından yapılmaktadır. Bu sebeple bu şaperonlar *helper gene* olarak da bilinmektedir. Çalışma kapsamında oluşturulan çoklu kopyalı kimozin klonlarında hedeflenen protein üretimine ulaşamamasından dolayı oluşturulan bu klonlarda ER şaperonu olan PDI geninin overekspresyonu yapılmıştır.

Çoklu kopyalı kimozin klonlarına şaperon ilavesi ile oluşturulan PDI overeksprese edilen klonlarda erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretim sonuçlarına bakıldığında (şekil 4.34) en yüksek üretimin 8.2 IMCU/mL değeri ile 2 kopya kimozin geni ve ekstra 2 kopya PDI şaperonu içeren klonda elde edildiği görülmüştür. PDI overekspresyonundan önce bu klonun enzim aktivite değeri 6.3 IMCU/mL iken PDI overekspresyonundan sonra yaklaşık %30 (rölatif olarak 1.30 kat) artarak 8.2 IMCU/mL değerine ulaşmıştır. Enzim üretimi için oluşturulan çoklu kopyalı kimozin klonları arasında en yüksek aktivite veren 2 kopyalı kimozin ve ekstra 2 kopya PDI şaperonu içeren klonlar ile yapılan fermentör ölçekli üretimlerde sırasıyla 20.63 IMCU/mL ve 39.9 IMCU/mL elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre in vitro yöntemlerle oluşturulan 2 kopyalı kimozin klonuna PDI şaperon ilavesi ile fermentör ölçeğinde üretilen enzim miktarı yaklaşık 2 kat artmıştır.

Literatüre bakıldığında kimozen enzim üretimi üzerine şaperon protein ilavesinin etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma yoktur. Ancak İnan vd. (2006) tarafından kancalı kurt enfeksiyonuna karşı *N. americanus* Na-ASP1 proteininin *P. pastoris*'te üretiminin gerçekleştirildiği çalışmada 2 kopya Na-ASP1+8 kopya PDI eksprese eden klonda, 1 kopya Na-ASP1 içeren klonun referans alınarak hesaplanmasıyla 3.64 kat daha yüksek oranda Na-ASP1 proteininin üretimi tespit edilmiştir.

Y. lipolytica lipaz 2 enziminin rekombinant olarak üretildiği başka bir çalışmada ise lipaz enzimini 1-4 kopya sayısında içeren klonlar arasında en yüksek enzim aktivitesi 2 kopya lipaz içeren klonda tespit edilmiştir. Daha sonra bu klona 2 kopya Hac1 ve 1 kopya Vhb (*Vitreoscilla* hemoglobin gene) genleri klonlanmıştır. Fermentör ölçekli gerçekleştirilen üretimler sonucunda enzim aktivitesi 1.44 kat arttırılmıştır (Zhou vd. 2020).

Nitrilaz enziminin *P. pastoris*'te rekombinant üretimine yönelik yapılan başka bir çalışmada ise enzim hem AOX1 ve GAP promotorları ile üretilmiş hem de şaperon ilavesinin protein üretim miktarlarına etkisine bakılmıştır (Shen vd. 2020)). Çalışma sonucunda 4 kopya nitrilaz genini içeren ve ERO1 şaperon proteini kullanımıyla erlenmayer ölçeğinde AOX1 promotoru kontrolünde gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen nitrilaz enzim aktivite değerinin, GAP promotoru kontrolünde tek kopya nitrilaz genini içeren ve ekstra şaperon protein içermeyen klona göre 18* kat daha yüksek olduğu, bu artışta promotor farklılığının önemli oranda etki ettiği (*Tek kopya ekspresyon kaseti içeren klonlar arasında AOX1 promotoru ile gerçekleştirilen üretimin GAP promotoru ile gerçekleştirilen üretimden 4 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir) tespit edilmiştir.

Rekombinant protein üretiminde gen kopya sayısı ve *helper gene* olarak da bilinen şaperon ilavesinin etkisinin araştırıldığı birçok çalışma mevcut olup neredeyse tamamında hem kopya sayısının artmasının hem de şaperon protein kullanımının üretilen protein miktarına veya hücre dışına salgılanma oranına pozitif yönde etkisi olduğu bilinmektedir (çizelge 2.2). Bu çalışma sonucunda erlenmayerde gerçekleştirilen üretimlerde 1 kopya kimozen geni içeren klonda elde edilen enzim aktivite değeri 4 IMCU/mL iken 2 kopya kimozen geni içeren klonda ulaşılan enzim aktivite değeri yaklaşık olarak %57 civarında artarak 6.3 IMCU/mL seviyesine ulaşmıştır. Bu 2 kopya kimozen geni içeren klona ekstra 2 kopya PDI şaperonu ilavesi ile elde edilen üretim verimliliği ise 8.23 IMCU/mL değeri ile %30.7 (rölatif olarak 1.30 kat) civarında arttırılmıştır. Bu kapsamda çalışmadan elde edilen veriler ile literatür sonuçları birbiri ile uyumludur. Ancak PDI overekspresyonu her ne kadar enzim aktivitesini arttırmış olsa da (şekil 4.36.) çalışmanın önceki bölümünden elde edilen klonların enzim aktivitelerinden (18 IMCU/mL) daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmanın tamamında oluşturulan tüm klonlar arasında erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretimler sonucunda en yüksek enzim aktivitesi 18 IMCU/mL değeri ile pADH2SNT5α-BtCHY-C#12 klonunda tespit edilmiştir. Bu sebeple bu klon ile fermentör üretimleri yapılmıştır. Çalışmanın genelindeki erlenmayer ve fermentör üretimlerinde 28°C ve pH 3'te üretimler yapılmış olup seçilen bu klonda enzim aktivite değerini arttırılması amacıyla farklı sıcaklık ve pH değerleri denenmiştir. Denenen farklı sıcaklık ve pH'lar arasında en yüksek enzim aktivite değerinin 75 IMCU/mL ile 24°C ve pH 4'te elde edildiği görülmüştür (şekil 4.38).

Noseda vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada sığır kimozi üretiminde farklı sıcaklık ve pH değerleri denenmiş olup en yüksek enzim aktivitesinin 96 IMCU/mL ile pH4 ve 25°C sıcaklıkta gerçekleştiği bulunmuştur. Aynı ekibin bir sonraki çalışmasında 0.005, 0.01, 0.015 ve 0.02 µ (spesifik hücre gelişim hızı) değerlerinde fermentör ölçekli üretimler gerçekleştirilmiş, en yüksek enzim aktivitesi 0.01 µ değerinde yapılan fermentasyonda 96 IMCU/mL olarak bulunmuştur (Noseda vd. 2014). Bu açıdan tez çalışması sonucunda elde edilen değerler literatür ile uyumludur. Ayrıca yukarıda bahsedilen çalışmada elde edilen süpernatant örnekleri saflaştırılarak 768 IMCU/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir. Ancak bu çalışma kapsamında süpernatant örneklerine herhangi bir saflaştırma yapılmamış, bu yüzden saflaştırma verileri değerlendirilememiştir.

P. pastoris’te sığır kimozi üretimine yönelik aynı ekip tarafından (Noseda vd. (2016)) yapılan son çalışmada ise enzim üretim miktarlarını artırabilmek amacıyla -daha öncekilerden farklı- yeni klonlar oluşturulmuş, taranan 150 adet yeni klon içerisinde erlenmayer ölçeğinde en yüksek enzim aktivitesini (3 IMCU/mL) gösteren klon ile fermentör ölçekli üretimde 192 IMCU/mL, saflaştırma sonucunda ise 384 IMCU/mL enzim aktivitesi elde edilmiştir. Ayrıca üretimin 120. saatinde süpernatantlarından arındırılan hücreler tekrar tekrar (2 kez) taze besiyeri ile üretime alınarak, aynı hücre ile taze besiyerinde tekrar üretim yapılabileceği gösterilmiştir. Ancak aynı hücrelerin kullanımı ile ikinci ve üçüncü kez yapılan üretimlerde elde edilen enzim aktivite değerleri ilk aktivite olan 192 IMCU/mL’ye ulaşamamış olup yaklaşık yarı yarıya azalmıştır. Bu şekilde aynı hücreler ile yapılan üretim, sanayi boyutlu prosesler açısından bakıldığında fermentasyonun ilk aşamalarının yapılmamasından dolayı zaman kazandırmış olsa da hücreler ile süpernatantları ayırarak sisteme taze besiyeri ilavesi potansiyel kontaminasyon sebebi olduğu için riskli bir uygulamadır.

Çalışma kapsamında oluşturulan klonlar arasından en yüksek enzim aktivitesini veren pADH2SNT5α-BtCHY-C#12 klonu ile *ADH2SNT5* promotörü kontrolünde gerçekleşen üretimlerde kullanılan bu promotörün etanole ilaveten glukoz ile de indüklenebilir olması bir diğer avantajı olup temel amacımız olan glukoz ile beslenen bir strateji oluşturma hedefine de uymaktadır. Bu amaçla bu klonun iki farklı fermentörde glukoz ve etanol ile beslemesi ile fermentasyonlar yapılmış, sırasıyla 42.4 IMCU/mL (Fb65) ve 81.9 IMCU/mL (Fb90) değerinde enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Etanol ile gerçekleştirilen enzim üretim miktarı glukoz ile gerçekleştirilen üretim miktarının 2 katı gibi gözükse de etanol üretiminin 63. saat verilerine bakıldığında (şekil 4.43) etanol besleme ile gerçekleştirilen üretimde enzim aktivitesinin 45.91 IMCU/mL değeri ile glukozla yakın verimlilikte olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuca göre sanayi boyutunda üretim düşünüldüğünde ucuz karbon kaynağı olan glukoz ile üretim yapılabilir olması *ADH2SNT5* promotörünün sağladığı avantajlar arasında sayılabilmektedir.

Çalışma kapsamında sığır kimozi rekombinant olarak üretildiği için bu bölümde genelde sığır kimozinin *P. pastoris*’te üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak sığır dışında farklı gen kaynaklı (keçi, deve, tavşan ve beyaz balina) kimozi enzimlerinin *P. pastoris*’te üretimleri son zamanlarda oldukça popülerdir (Tyagi vd. 2016, Akishev vd. 2021, Alihanoğlu vd. 2021 ve Filkin vd. 2021). Bu sebeple, sürekli artan dünya nüfusu ve oluşan gıda talebinin karşılanmasına yönelik arayışlar mevcut olduğu için farklı gen kaynaklı gıda enzimlerine olan talep sürekli artmaktadır. Oluşan bu ihtiyacın

kapatılabilmesi amacıyla bu tez çalışması sonucunda, peynir üretiminde sanayide kullanılma potansiyeli bulunan, laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde sıcaklık ve pH gibi temel üretim parametreleri belirlenmiş olan sığır kimozini üretici bir maya klonu ve prosesi geliştirilmiştir.



6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında sığır gen kaynaklı kimozen enziminin *P. pastoris* mayasında rekombinant olarak üretimi yapılmıştır. Farklı yöntemler ile oluşturulan klonlarda enzim üretimi için yapısal *GAP* ve etanol ile indüklebilen *ADH2SNT5* promotorları kullanılmış olup hücre dışına sekresyon şeklinde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan klonlar arasında, erlenmayer ölçekli gerçekleştirilen üretimlerde hücre süpernatantlarında tespit edilen en yüksek aktiviteyi veren klon, üretim klonu olarak seçilmiştir. Seçilen bu klon ile gerçekleştirilen fermentör ölçekli üretimlerde optimum sıcaklık ve pH değerleri tespit edilerek belirli parametreleri tanımlanan bir proses geliştirilmiştir.

- Yapısal *GAP* promotoru altında rekombinant kimozen enzimi üretimi amacıyla oluşturulan haploid *P. pastoris* X33 suşunda erlenmayer ölçeğinde 5.3 IMCU/mL, fermentör ölçeğinde 18 IMCU/mL verimlilikte enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.
- Haploid maya hücrelerinde elde edilen enzim aktivitesinin artırılması amacıyla diploid maya hücreleri oluşturulmuştur. Ancak beklenenin aksine diploid *P. pastoris* hücrelerinde elde edilen enzim aktivitesi 3 IMCU/mL seviyesinde gerçekleştirilmiştir. Erlenmayer ölçeğinde tespit edilen bu başlangıç enzim aktivite değerinin düşük olmasından dolayı bu diploid klon ile fermentör üretimi yapılmamıştır.
- Yapısal *GAP* promotoru ile enzim üretiminde elde edilen değerlerin düşük olmasından dolayı çalışmanın devamında sentetik *ADH2SNT5* promotoru kontrolünde üretim yapılmıştır. Bu amaçla oluşturulan klonlar içerisinde en yüksek enzim aktivitesi p*ADH2SNT5* α -BtCHY-C#12 klonunda erlenmayer ölçeğinde 18 IMCU/mL, fermentör ölçeğinde 45 IMCU/mL olarak tespit edilmiştir.
- Sentetik *ADH2SNT5* promotoru kontrolündeki, üretim miktarının artırılması amacıyla yüksek gen kopya sayılı kimozen klonları oluşturulmuştur. In vitro klonlama yöntemleri ile oluşturulan 1-4 gen kopya sayılı kimozen klonları ile erlenmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimlerde 1, 2, 3 ve 4 kopya kimozen geni içeren klonlarda tespit edilen enzim aktivite değerleri sırasıyla 4 IMCU/mL, 6.3 IMCU/mL, 4.5 IMCU/mL ve 3 IMCU/mL şeklindedir. 1 kopya kimozen geni içeren klon ile 2 kopya kimozen geni içeren klonlarda enzim aktivite değerleri karşılaştırıldığında, gen kopya sayısının 1 kopya artırılması ile enzim aktivite değerinin yaklaşık %57 oranında arttığı tespit edilmiştir. Ancak 3 ve 4 kopyalı kimozen klonlarında aynı oranda artışın gözlemlenmediği, aksine kopya sayısı arttıkça hücre dışında ölçülen enzim aktivitesinin azaldığı sonucuna varılmıştır.
- Çoklu kopyalı kimozen klonlarında hücre dışına sekresyon ile elde edilen enzim aktivite değerlerinin artırılabilmesi amacıyla farklı kopya sayıda kimozen içeren klonlara PDI geninin overekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstra PDI geni içeren bu klonlar arasında en yüksek enzim aktivitesinin 2 kopya kimozen+2 kopya ekstra PDI geni içeren klonda yaklaşık 8.2 IMCU/mL

olarak ölçülmüş olup PDI geninin overekspresyonu ile enzim aktivitesinin yaklaşık %30 oranında arttırıldığı tespit edilmiştir.

- In vitro klonlama yöntemleri ile oluşturularak erlenmayer ölçekli üretimde en yüksek enzim aktivitesini veren klon (2 kopya kimozen geni içeren klon ve bu klona ekstra 2 kopya PDI geninin overeksprese edildiği klon) ile fermentör üretimi yapılmıştır. Üretim sonucunda 2 kopya kimozen geni içeren klonda tespit edilen enzim aktivitesi 20.63 IMCU/mL iken ekstra PDI içeren diğer klonda aktivite değeri 39.9 IMCU/mL olarak ölçülmüştür. Fermentör ölçekli üretimler sonucunda PDI geninin overekspresyonu ile enzim aktivite değerinin yaklaşık 2 kat arttırıldığı sonucuna varılmıştır.
- Farklı yöntemler ile oluşturulan tüm klonlar arasında erlenmayer ölçeğinde en yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiği pADH2SNT5 α -BtCHY-C#12 klonu ile fermentör ölçeğinde farklı sıcaklık (20, 24 ve 28°C) ve pH (3, 4, 5) değerlerinde üretim gerçekleştirilmiştir. Üretimler sonucu en yüksek enzim aktivitesi 24°C sıcaklık ve pH 4 üretiminde 75.07 IMCU/mL olarak tespit edilmiştir. Her ne kadar 2 gen kopyalı kimozen klonunda PDI şaperon proteininin overekspresyonu ile kimozen enzim aktivitesi yaklaşık 2 kat arttırılarak 39.9 IMCU/mL'ye ulaşmış olsa da pADH2SNT5 α -BtCHY-C#12 klonu ile elde edilen enzim aktivitesinden (75 IMCU/mL) daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.
- Fermentör ölçekli üretimlerde toplam protein miktarları karşılaştırıldığında ise pADH2SNT5 α -BtCHY-C#12 klonunda 322.27 mg/L (0.232 U/mg spesifik aktivitede) oranında, in vitro klonlama yöntemleriyle elde edilen 2 kopya kimozen+ 2 kopya PDI içeren klonda 560.45 mg/L (0.123 U/mg spesifik aktivitede) toplam protein elde edildiği görülmüştür. Ayrıca in vivo multimerizasyon ile elde edilen klonda gerçekleşen üretimde spesifik aktivitenin in vitro yöntemlerle oluşturulan klondan daha yüksek olması sebebiyle üretilmek istenen enzimin daha saf elde edildiği, fermentasyon sonrası saflaştırma prosesinin daha kolay olacağı anlamına gelmektedir.

Bu çalışmanın temel hedefi Türkiye'de beyaz peynir üretimi için kullanılma potansiyeli bulunan sığır gen kaynaklı kimozen enzimini yüksek verimlilikte üretici bir maya klonunun geliştirilmesidir. Bu amaçla farklı klonlama yöntemleri ile yüksek gen kopya sayıda kimozen üretici klonlar oluşturulmuş ve bu klonlar ile enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris* mayasında kimozen enzim üretimi amacıyla geliştirilen bu klon ile ilk defa etanol ile indüklenebilen bir promotor kontrolünde kimozen enzimi üretimi yapılmıştır. Ayrıca in vitro klonlama yöntemleri ile yüksek gen kopya sayısında kimozen enzim üretici klonların oluşturulması ve bu klonlarda PDI şaperon proteininin denenmesi ilk defa bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

- Adıgüzel, Ö. 2016. *Pichia pastoris* mayasında rekombinant tıbet öküzü kimoziini ekspresyonu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Antalya, 68 s.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Microbiol Biotechnology*, 98 (2014): 5301–5317.
- Akishev, Z., Kiribayeva, A., Mussakhmetov, A., Baltin, K., Ramankulov, Y., Khassenov, B. 2021. Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*. *Heliyon*, 7 (2021) e07137.
- Alihanoglu, S., Ektiren, D., Karaaslan, M. 2021. Recombinant expression and characterization of *Oryctolagus cuniculus* chymosin in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Protein Expression and Purification*, 183 (2021) 105874.
- Anonim 1: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2015/02/20150208-16.htm> [Son erişim tarihi: 18.05.2022]
- Aw, R., ve Karen, M. P. 2013. Can too many copies spoil the broth? *Microbial Cell Factories*, 12(1):128.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Re*, DOI: 10.1016/S0168-6445(99)00029-7.
- Cereghino G.P.L., Cereghino J.L., Ilgen C., Cregg J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 329–332.
- Chen, M.T., Lin, S., Shandil, I., Andrews, D., Stadheim, T. A., 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.
- Ciofalo V., Barton N., Kreps J., Coats I., Shanahan D. 2006. Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. *Regul Toxicol Pharm*, 45(2006):1–8.
- Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P. Sreekrishna, K., Romanos, M. A. 1991. High-Level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *Pichia Pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of the Gene. *Biotechnology*, 9(1991):455-460.
- Correa-França, R. Rochedo-Conceição, F. Mendonça, M., Haubert L., Sabadin, G., Oliveira, P.D., Amaral, M.G., Silva, W.P. Moreira, A.N. 2015. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. 2015. *Appl Microbiol Biotechnol* (2015) 99:7953–7961
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. 2000. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 16, 23–52.
- Çakmakçı, S., Cantürk, A., Çakır, Y. 2017. Peynir Üretimi için Sütü Pıhtılaştırıcı Enzimlere Genel bir Bakış ve Güncel Gelişmeler. *Akademik Gıda*, 15(4) 396-408.

- Çelik, E., Çalık, P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30 (2012):1108–1118.
- Dagar, V. K., Khasa, Y. P. 2018. Combined effect of gene dosage and process optimization strategies on high-level production of recombinant human interleukin-3 (hIL-3) in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108 (2018) 999–1009.
- Danley D. E., Geoghegan K. F. 1988. Structure and Mechanism of Formation of Recombinant derived Chymosin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(20):9785-9789.
- Dixon, B. 1991. Enzyme Expression - Glycosylation Enhances Stability. *Bio-Technology*, 9(5):418-418.
- Erden-Karaoğlu F., Karaoğlu M., Yılmaz, G., Yılmaz, S., İnan, M. 2022. Deletion analysis of *Pichia pastoris* alcohol dehydrogenase 2 (ADH2) promoter and development of synthetic promoters. *Biotechnol. J.*, 17(2022):2100332.
- Ersöz, F. 2016. Rekombinant kimozin üretiminde glikozilasyonun etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 80 s.
- Ersöz, F., İnan, M. 2019. Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 154 (2019) 126–133.
- Espinoza-Molina, J. A., Acosta-Muniz C. H., Sepulveda D. R., Zamudio-Flores, P. B., Rios-Velasco C. 2016. Codon Optimization of the “*Bos Taurus* Chymosin” Gene for the Production of Recombinant Chymosin in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol*, 58 (2016):657–664.
- Filkin, S. Y., Chertovaa, N. V., Vavilovaa, E. A., Zatsepina, S. S., Eldarovb, M. A., Sadykhova, E. G., Fedorova, A. N., Lipkina, A. V. 2020. Optimization of the Production Method for Recombinant Chymosin in the Methylophilic Yeast *Komagataella phaffii*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(6): 657–66.
- Filkin, S. Y. Chertova, N. V., Zatsepina, S. S., Sadykhova, E. G., Fedorova, A. N. Lipkin, A. V. 2021. Production of Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*) Chymosin in the Methylophilic Yeast *Komagataella phaffii* and Characteristics of the Recombinant Enzyme. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 57(3):297–302.
- Fox P.F., McSweeney P.L.H., 1997. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. Law, B.A. (Ed.), *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2. ed. Blackie Academic and Professional, London, UK, 1– 49.
- Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A. A., Clark, I., Níao, I., Gosset, G., Martinez, A. 2004. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 63(2004):734–741.
- Haber, J. E. 2012. Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(2012): 33–64.
- Hadimioğlu, M. 2019. *Pichia pastoris* mayasında alkol dehidrogenaz (ADH3) promotörü ile rekombinant fitaz enzimi üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 82 s.
- Hang, H.F., Chen, W., Guo, M.J. Chu, J., Zhuang, Y.P. Zhang, S.L. 2009. A simple

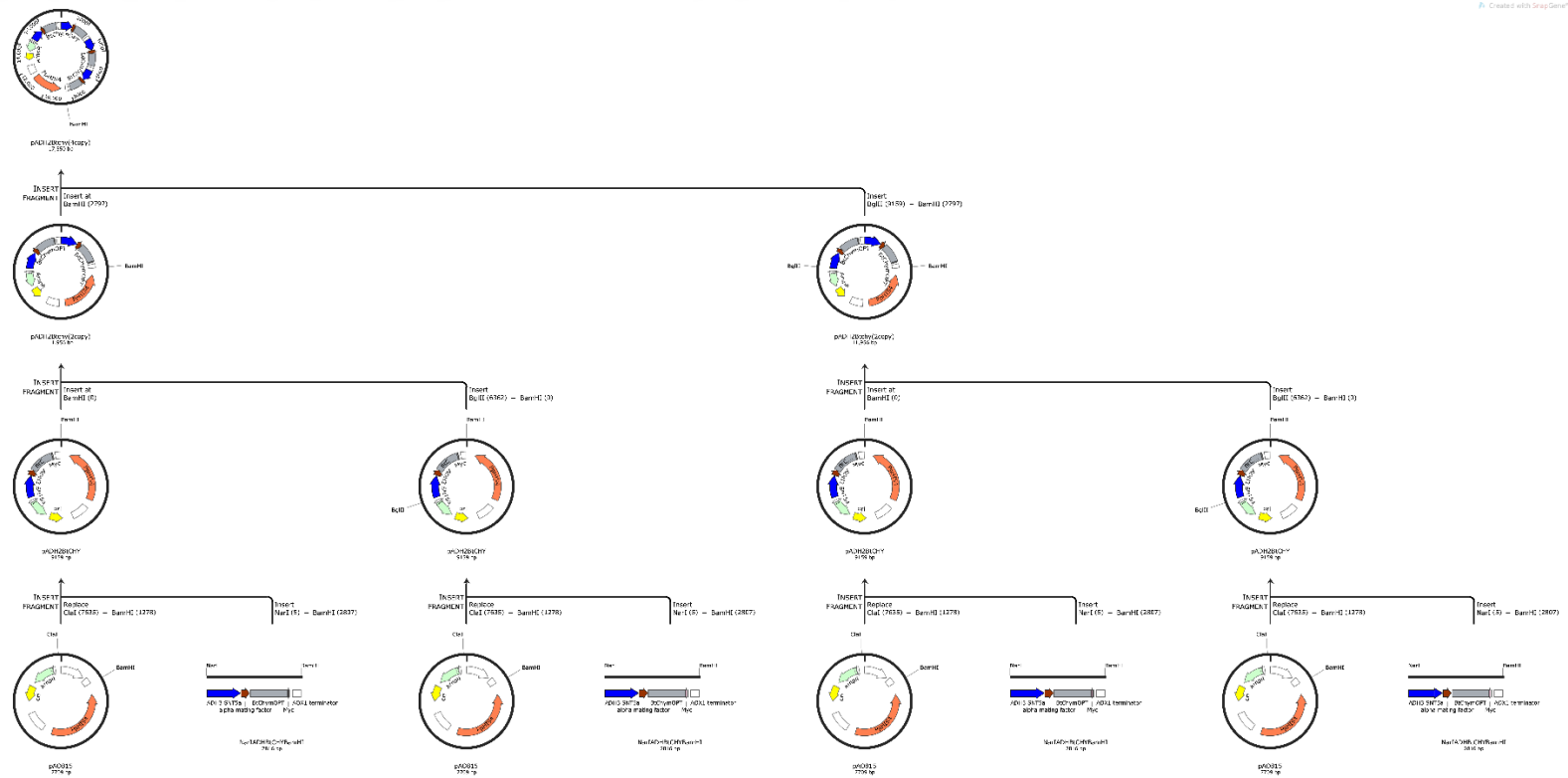
- unstructured model-based control for efficient expression of recombinant porcine insulin precursor by *Pichia pastoris*. *Korean J. Chem. Eng.*, 25(5):1065-1069.
- Hanson, S. J., Wolfe K.H. 2017. An Evolutionary Perspective on Yeast Mating-Type Switching. *Genetics*, 206 (9): 32.
- He, H., Wu, S., Mei, M., Ning, J., Li, C., Ma, L., Zhang, G., Yi, L. 2020. A Combinational Strategy for Effective Heterologous Production of Functional Human Lysozyme in *Pichia pastoris*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(2020):118.
- Heisteringer, L., Gasser, B., Mattanovich, D. 2018. Creation of Stable Heterothallic Strains of *Komagataella phaffii* Enables Dissection of Mating Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 38(2):e00398-17.
- Hong F., Meinander N.Q., Jonsson L.J. 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, 79(2002):438–449.
- İnan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J., Meagher, M.M. 2006. Enhancement of Protein Secretion in *Pichia pastoris* by Overexpression of Protein Disulfide Isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(4):771-778.
- Jiang X.-P., Yin M.-L., Chen P., Yang Q., 2012. Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 2087–2093.
- Kageyama, T. 2002. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59 (2002) 288–306.
- Kappeler, S.R., Brink V.H., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puan, Z., Hansen, E.B., Johansen, E. 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342 (2006) 647–654.
- Karakas, B., Inan M., Certel, M. 2010. Expression and characterization of *Bacillus subtilis* PY22 alpha-amylase in *Pichia pastoris*. *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 64(3-4): 129-134.
- Karaoglan, M., Yildiz, H., İnan, M. 2014. Screening of signal sequences for extracellular production of *Aspergillus niger* xylanase in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 92 (2014):16-21.
- Karaoglan, M., Karaoglan, F.E., İnan, M. 2016a. Functional analysis of alcohol dehydrogenase (ADH) genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 38(3):463-469.
- Karaoglan, M., Karaoglan, F.E., İnan, M. 2016b. Comparison of ADH3 promoter with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expression And Purification*, 121(2016):112-117.
- Kato, H., Suyama, H., Yamada, R., Hasunuma, T., Kondo, A. 2012. Improvements in ethanol production from xylose by mating recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-012-3914-6.

- Khasa, Y.P., Khushoo, A., Srivastava, L., Mukherjee, K.J. 2007. Kinetic studies of constitutive human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 29(12):1903-1908.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., Ohmura, T. 2000. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 89(1):55-61.
- Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., Batish, V. K. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4): 243–258.
- Liu, J., Han, Q., Cheng, Q., Chen, Y., Wang, R., Li, X., Liu, Y., Yan, D. 2020. Efficient Expression of Human Lysozyme Through the Increased Gene Dosage and Co-expression of Transcription Factor Hac1p in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology* 77(2020):846–854.
- Luo, F., Jiang, W.H., Yang, Y.X., Li, J., Jiang, M.F. 2016. Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 29(9): 1363-1370.
- Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., Mcneil B., Harvey L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(2005):249–270.
- Merlini, L., Dudin, O., Martin, S. G. 2013. Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol*, 3:13000.
- Nosedá D.G., Recupero M., Blasco M., Ortiz G.E. 2013. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under AOX1 promoter. *Protein Expression and Purification*, 92(2013):235–244.
- Nosedá, D.G., Blasco, M., Recúpero, M., Galvagno, M.A. 2014. Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under methanol-inducible AOXI promoter. *Protein Expression and Purification*, 104(2014):85-91.
- Nosedá, D.G., Recúpero, M., Blasco, M., Bozzo, J., Galvagno, M.A. 2016. Production in stirred-tank bioreactor of recombinant bovine chymosin B by a high-level expression transformant clone of *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 123(2016):112-121.
- Parodi, A.J. 2000. Protein Glucosylation and Its Role In Protein Folding. *Annu. Rev. Biochem.*, 69(2000):69–93.
- Potgieter, T. I., Kersey, S.D., Mallem, M. R., Nylen, A. C., d'Anjou, M. 2010. Antibody Expression Kinetics in Glycoengineered *Pichia Pastoris* *Biotechnology And Bioengineering*, 106(6)918-927.
- Raschmanova, H., Zamora, I., Borcinova, M., Meier, P., Weninger, A Machler, D., Glieder, A., Melzoch, K., Knejslik, Z., Kovar, K. 2019. Single-Cell Approach to Monitor the Unfolded Protein Response During Biotechnological Processes With *Pichia pastoris*. *Frontiers In Microbiology*, 10(2019):335.

- Raschmanová, H., Weninger, A., Knejzlík, Z., Melzoch, K., Kovar, K. 2021. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(2021):4397–4414.
- Rebnegger, C., Graf, B.A. Valli, M., Steiger, M.G., Gasser, B., Maurer, M., Mattanovich D. 2014. In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response. *Biotechnol. J.*, 9 (2014):511–525.
- Richter S., Nieveler J., Schulze H., Bachmann T.T., Schmid R.D. 2006. High yield production of a mutant *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* and its purification. *Biotechnol. Bioeng.*, 93(2006):1017–1022.
- Romanos M. 1995. Advanced in the use of *Pichia Pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(1995):527-533.
- Scorer, A. C. Clare, J. L., McCombine, W. R., Romanos, M.A., Sreekrishna, K. 1994. Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformations of *Pichia Pastoris* for High-Level Foreign Gene Expression. *Bio/Technology*, 12(1994):181-184.
- Shen, Q., Yu, Z., Pei-jin L. Li, Q., Zou, S., Xiong, N., Liu, Z.Q., Xue, Y.P., Zheng, Y.G. 2020. Engineering a *Pichia pastoris* nitrilase whole cell catalyst through the increased nitrilase gene copy number and co-expressing of ER oxidoreductin 1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2020):2489–2500.
- Shental-Bechor, D., Levy, Y. 2008. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *PNAS*, 105(24):8256–8261.
- Stoyanov, A., Petrova, P., Lahtchev, K., 2014. Enhanced heterologous gene expression in diploid cells of methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha*. *J. BioSci. Biotech.*, 3(3): 247-252.
- Tolstorukov, I. ve Cregg, J. M. 2007. Classical Genetics, Methods in Molecular Biology, *Pichia* Protocols, Second Edition, 389, syf 189-201.
- Türkanoglu-Özçelik, A.T., Ersöz, F., İnan, M. 2019a. Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 159(2019):83-90.
- Türkanoglu-Özçelik, A. 2019b. Comparison Of Multicopy Pro-Microbial Transglutaminase Encoded Gene Expression In *Pichia Pastoris*. *Acta Alimentaria*, 48 (3):384–392.
- Tyagi, A., Kumar, A., Yadav, A. K., Saklani, A.C., Grover, S., Batish, V. K. 2016. Functional expression of recombinant goat chymosin in *Pichia pastoris* bioreactor cultures: A commercially viable alternate. *LWT-Food Science and Technology*, 69 (2016):217-224.
- Tyagi, A., Kumar, A., Mohanty, K., Kaushik, J.K., Grover, S., Batish, V. K. 2017. Expression of buffalo chymosin in *Pichia pastoris* for application in mozzarella cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 84 (2017):733-739.
- Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. 2008. Cloning and expression of buffalo

- active chymosin in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem.*, 56,10606– 10610.
- Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. 2012. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. *J. Dairy Sci.* 95:609–613.
- Vassileva, A., Chugh, D. A., Swaminathan, S., Khanna, N. 2001. Effect of Copy Number on the Expression Levels of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21(2001):71–80.
- Wang N., Wang K.Y., Li G.Q., Guo W.F., Liu D.H. 2015. Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia Pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 111(2015):75–81.
- Wegner, G. 1990. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol*, 7(1990): 279-283.
- Wu S., Letchworth G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*. 36(1):152-4.
- Yalçın, A., 2012. Posttranslasyonel Modifikasyon ve Protein Fonksiyonu. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 31 (1): 29-37.
- Yamadaa, R., Bitoa, Y., Adachia, T., Tanakab, T., Oginoa, C., Fukudab, H., Kondo, A. 2009. Efficient production of ethanol from raw starch by a mated diploid *Saccharomyces cerevisiae* with integrated α -amylase and glucoamylase genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 44 (2009):344–349.
- Yılmaz, S. 2018. *Pichia pastoris* GAP promotörü altında hücre dışı üretilen rekombinant proteinler için yarı-kesikli proses geliştirilmesi, Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, 137s.
- Zhang, W., Sinha, J., Smith, L. A., Inan, M., Meagher, M. M. 2005. Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. *Biotechnology Progress*, 21(2):386-393.
- Zhang L, Jiang Y, Zhang J, Yang Z. 2009. Recombinant expression of bovine chymosin in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 25:1160–1165.
- Zhou, Q., Su, Z., Jiao, L., Wang, Y., Yang, K., Li, W., Yan, Y. 2020. High-Level Production of a Thermostable Mutant of *Yarrowia lipolytica* Lipase 2 in *Pichia pastoris*. *Int. J. Mol. Sci.* 21(2020):279; doi:10.3390/ijms21010279.

EK-2: In-vitro koşullarda oluşturulan 4 kopyalı kimozin pADH2-BtCHY (4 copy) vektörünün oluşum şeması



EK-3: pADH2SNT5 α -BtCHY-C#12 klonu ile farklı sıcaklık ve pH değerlerindeki fermentasyonlarda zamana bağlı alınan örneklerde **enzim aktivitesi** değerlerinin ham verileri

			Pıhtı süresi(sn)		Dilüsyon oranı	Enzim aktivitesi(IMCU/ml)			
			1.P	2.P		1.P	2.P	ort	stn spm
			Btend						
CHY04	CHY04-pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)-28C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0	0	1	0	0	0	0
		Fb0	0	0	1	0	0	0	0
		Fb12	560	602	1	2,57	2,39	2,48	0,13
		Fb19	510	529	1	2,82	2,72	2,77	0,07
		Fb36	310	324	1	4,65	4,44	4,54	0,14
		Fb45	275	269	1	5,24	5,35	5,29	0,08
		Fb76	205	199	4	28,10	28,94	28,52	0,60
		Fb88	293	289	8	39,32	39,86	39,59	0,38
		Fb112	260	249	8	44,31	46,27	45,29	1,38

			Pıhtı süresi(sn)		Dilüsyon oranı	Enzim aktivitesi(IMCU/ml)			
			1.P	2.P		1.P	2.P	ort	stn spm
			Btend						
CHY15	CHY15-pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)-20C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0	0	1	0	0	0	0
		Fb0	0	0	1	0,00	0,00	0,00	0,00
		Fb15	303	298	1	4,75	4,83	4,79	0,06
		Fb23	201	186	1	7,16	7,74	7,45	0,41
		Fb39	155	151	1	9,29	9,54	9,41	0,17
		Fb47	416	421	5	17,31	17,10	17,20	0,15
		Fb69	252	251	5	28,57	28,69	28,63	0,08
		Fb90	225	219	5	32,00	32,88	32,44	0,62

			Pıhtı süresi(sn)		Dilüsyon oranı	Enzim aktivitesi(IMCU/ml)			
			1.P	2.P		1.P	2.P	ort	stn spm
			Btend						
CHY16	CHY16-pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)-24C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0	0	1	0	0	0	0
		Fb0	0	0	1	0,00	0,00	0,00	0,00
		Fb15	173	186	1	8,32	7,74	8,03	0,41
		Fb23	168	181	1	8,57	7,96	8,26	0,44
		Fb39	128	107	1	11,25	13,46	12,35	1,56
		Fb47	329	289	5	21,88	24,91	23,40	2,14
		Fb69	233	232	5	30,90	31,03	30,97	0,09
		Fb90	195	206	5	36,92	34,95	35,94	1,39

			Pıhtı süresi(sn)		Dilüsyon oranı	Enzim aktivitesi(IMCU/ml)			
			1.P	2.P		1.P	2.P	ort	stn spm
			Btend						
CHY17	CHY17-pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)-24C-pH 4 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0	0	1	0	0	0	0
		Fb0	0	0	1	0,00	0,00	0,00	0,00
		Fb18	223	215	1	6,46	6,70	6,58	0,17
		Fb48	157	169	2	18,34	17,04	17,69	0,92
		Fb67	211	207	4	27,30	27,83	27,56	0,37
		Fb75	171	173	5	42,11	41,62	41,86	0,34
		Fb91	113	92	5	63,72	78,26	70,99	10,28
		Fb95	99	93	5	72,73	77,42	75,07	3,32

			Pıhtı süresi(sn)		Dilüsyon oranı	Enzim aktivitesi(IMCU/ml)			
			1.P	2.P		1.P	2.P	ort	stn spm
			Btend						
CHY18	CHY18-pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)-24C-pH 5 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0	0	1	0	0	0	0
		Fb0	0	0	1	0,00	0,00	0,00	0,00
		Fb18	262	254	1	5,50	5,67	5,58	0,12
		Fb48	245	233	2	11,76	12,36	12,06	0,43
		Fb67	147	172	4	39,18	33,49	36,34	4,03
		Fb75	229	261	5	31,44	27,59	29,51	2,73
		Fb91	122	135	5	59,02	53,33	56,17	4,02
		Fb95	112	108	5	64,29	66,67	65,48	1,68

EK-4: pADH2SNT5 α -BtCHY-C#12 klonu ile farklı sıcaklık ve pH değerlerindeki fermentasyonlarda zamana bağlı alınan örneklerde **toplam protein** değerlerinin ham verileri

			595nm abs		Toplam Protein (mg/L)			
			1.P	2.P	1.P	2.P	ort	stn spm
CHY04	CHY04- pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)- 28C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0,002	0,001	1,82	0,91	1,36	0,64
		Fb0	0,004	0,006	3,64	5,45	4,55	1,29
		Fb12	0,02	0,019	18,18	17,27	17,73	0,64
		Fb19	0,057	0,059	51,82	53,64	52,73	1,29
		Fb36	0,089	0,091	80,91	82,73	81,82	1,29
		Fb45	0,101	0,099	91,82	90,00	90,91	1,29
		Fb76	0,185	0,178	168,18	161,82	165,00	4,50
		Fb88	0,321	0,315	291,82	286,36	289,09	3,86
		Fb112	0,28	0,283	254,55	257,27	255,91	1,93

			595nm abs		Toplam Protein (mg/L)			
			1.P	2.P	1.P	2.P	ort	stn spm
CHY15	CHY15- pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)- 20C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0,022	0,021	20,00	19,09	19,55	0,64
		Fb0	0,047	0,047	42,73	42,73	42,73	0,00
		Fb15	0,09	0,08	81,82	72,73	77,27	6,43
		Fb23	0,111	0,102	100,91	92,73	96,82	5,79
		Fb39	0,149	0,151	135,45	137,27	136,36	1,29
		Fb47	0,171	0,177	155,45	160,91	158,18	3,86
		Fb69	0,257	0,252	233,64	229,09	231,36	3,21
		Fb90	0,319	0,32	290,00	290,91	290,45	0,64

			595nm abs		Toplam Protein (mg/L)			
			1.P	2.P	1.P	2.P	ort	stn spm
CHY16	CHY16- pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)- 24C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0,02	0,016	18,18	14,55	16,36	2,57
		Fb0	0,041	0,043	37,27	39,09	38,18	1,29
		Fb15	0,09	0,09	81,82	81,82	81,82	0,00
		Fb23	0,113	0,112	102,73	101,82	102,27	0,64
		Fb39	0,167	0,164	151,82	149,09	150,45	1,93
		Fb47	0,19	0,201	172,73	182,73	177,73	7,07
		Fb69	0,301	0,299	273,64	271,82	272,73	1,29
		Fb90	0,357	0,361	324,55	328,18	326,36	2,57

			595nm abs		Toplam Protein (mg/L)			
			1.P	2.P	1.P	2.P	ort	stn spm
CHY17	CHY17- pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)- 24C-pH 4 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0,019	0,025	17,27	22,73	20,00	3,86
		Fb0	0,058	0,052	52,73	47,27	50,00	3,86
		Fb18	0,109	0,102	99,09	92,73	95,91	4,50
		Fb48	0,199	0,203	180,91	184,55	182,73	2,57
		Fb67	0,263	0,296	239,09	269,09	254,09	21,21
		Fb75	0,246	0,289	223,64	262,73	243,18	27,64
		Fb91	0,342	0,344	310,91	312,73	311,82	1,29
		Fb95	0,351	0,358	319,09	325,45	322,27	4,50

			595nm abs		Toplam Protein (mg/L)			
			1.P	2.P	1.P	2.P	ort	stn spm
CHY18	CHY18- pADH2SNT5 α BtC HY#12(KM71)- 24C-pH 5 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	0,037	0,033	33,64	30,00	31,82	2,57
		Fb0	0,072	0,066	65,45	60,00	62,73	3,86
		Fb18	0,147	0,139	133,64	126,36	130,00	5,14
		Fb48	0,33	0,331	300,00	300,91	300,45	0,64
		Fb67	0,361	0,351	328,18	319,09	323,64	6,43
		Fb75	0,386	0,379	350,91	344,55	347,73	4,50
		Fb91	0,389	0,398	353,64	361,82	357,73	5,79
		Fb95	0,404	0,394	367,27	358,18	362,73	6,43

EK-5: pADH2SNT5 α -BtCHY-C#12 klonu ile farklı sıcaklık ve pH değerlerindeki fermentasyonlarda zamana bağlı alınan örneklerde **yaş hücre ağırlıkları** değerlerinin ham verileri

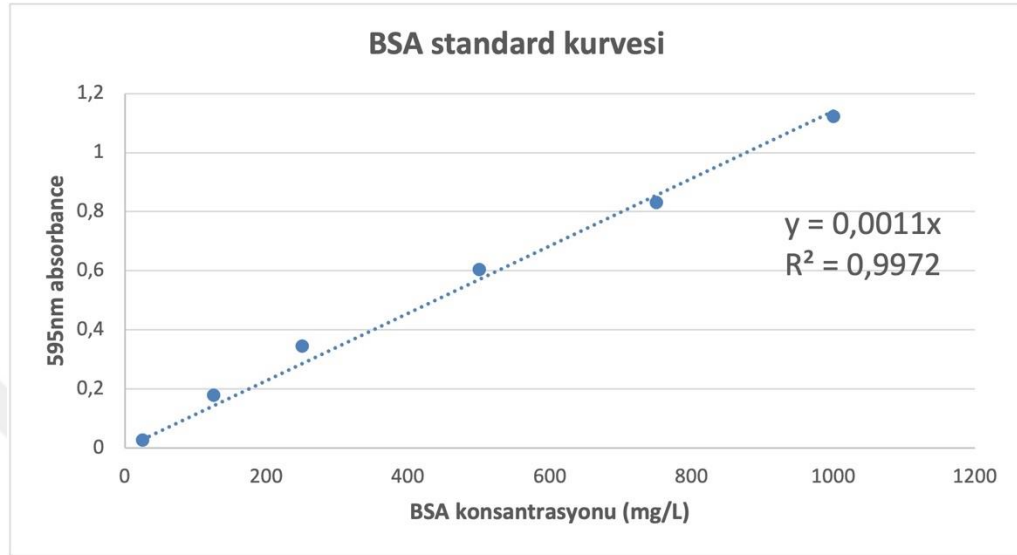
			Yaş Hücre ağırlığı- WCW(g/L)				
			1.p	2.p	3.p	ort	stn spm
CHY04	CHY04- pADH2SNT5aBtC HY#12(KM71)- 28C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	113,7	112,7	111,6	112,67	1,05
		Fb0	143,1	146,5	144	144,53	1,76
		Fb12	151,4	160,9	157,4	156,57	4,80
		Fb19	176,7	181,6	176,4	178,23	2,92
		Fb36	239,4	238	227,3	234,90	6,62
		Fb45	235,9	244,9	240,8	240,53	4,51
		Fb76	264,5	249,6	252,3	255,47	7,94
		Fb88	274,5	269,6	262,3	268,80	6,14
		Fb112	325,4	327,3	316,7	323,13	5,65

			Yaş Hücre ağırlığı- WCW(g/L)				
			1.p	2.p	3.p	ort	stn spm
CHY15	CHY15- pADH2SNT5aBtC HY#12(KM71)- 20C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	89,6	94,1	92,9	92,20	2,33
		Fb0	161,8	152,2	160,1	158,03	5,12
		Fb15	218	219,2	218,5	218,57	0,60
		Fb23	275,1	288	286	283,03	6,94
		Fb39	399,2	403,4	396,2	399,60	3,62
		Fb47	485	478,2	489,8	484,33	5,83
		Fb69	601,6	606,6	609,6	605,93	4,04
		Fb90	676,5	677	681,6	678,37	2,81

			Yaş Hücre ağırlığı- WCW(g/L)				
			1.p	2.p	3.p	ort	stn spm
CHY16	CHY16- pADH2SNT5aBtC HY#12(KM71)- 24C-pH 3 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	96,3	95,1	97	96,13	0,96
		Fb0	162,7	163,8	164,5	163,67	0,91
		Fb15	226,3	227,4	230,6	228,10	2,23
		Fb23	286,2	279,9	280,8	282,30	3,41
		Fb39	384,8	384,1	383,9	384,27	0,47
		Fb47	455,2	452,1	450,9	452,73	2,22
		Fb69	597,6	603,8	618	606,47	10,46
		Fb90	581,7	686	692,5	653,40	62,18

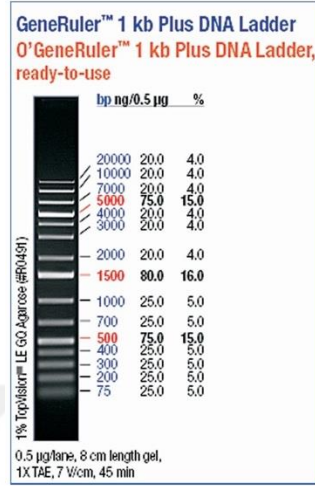
			Yaş Hücre ağırlığı- WCW(g/L)				
			1.p	2.p	3.p	ort	stn spm
CHY17	CHY17- pADH2SNT5aBtC HY#12(KM71)- 24C-pH 4 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	107,7	91,3	97,5	98,83	8,28
		Fb0	112,7	104,7	117,1	111,50	6,29
		Fb18	280,6	285	294,5	286,70	7,10
		Fb48	422,9	411,4	433,4	422,57	11,00
		Fb67	541,6	517,3	548,8	535,90	16,51
		Fb75	555,4	553,6	572,7	560,57	10,55
		Fb91	630,4	655	642,7	642,70	12,30
		Fb95	647	655	672,4	658,13	12,99

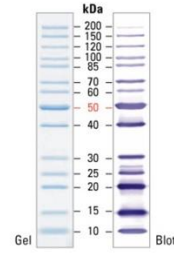
			Yaş Hücre ağırlığı- WCW(g/L)				
			1.p	2.p	3.p	ort	stn spm
CHY18	CHY18- pADH2SNT5aBtC HY#12(KM71)- 24C-pH 5 (Standart BSM media-step by step etanol besleme)	Btend	109	114,9	113,5	112,47	3,08
		Fb0	148,6	151,59	148,6	149,60	1,73
		Fb18	229,1	229,6	231,6	230,10	1,32
		Fb48	427	410,5	408,8	415,43	10,05
		Fb67	535,5	528,7	532,7	532,30	3,42
		Fb75	536,4	535,3	561,2	544,30	14,65
		Fb91	576	569,7	561	568,90	7,53
		Fb95	596	599,7	581	592,23	9,90

EK-6: Toplam protein miktarının hesaplanmasında kullanılan BSA standart kurvesi

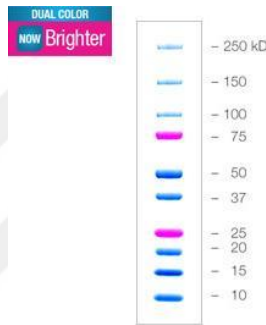
BSA standartları (mg/L)	1.p	2.p	ort
2000	1,403	1,419	1,411
1500	1,282	1,29	1,286
1000	1,12	1,124	1,122
750	0,814	0,85	0,832
500	0,617	0,591	0,604
250	0,35	0,34	0,345
125	0,177	0,18	0,1785
25	0,027	0,026	0,0265

EK-7: Çalışmada kullanılan DNA standardı (O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD))



EK-8: Çalışmada kullanılan protein standartları

PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad)

ÖZGEÇMİŞ

Fatma ERSÖZ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2016-2022	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D., Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-2016	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A. B.D., Antalya
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi
2008-2012	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi
2014-Devam ediyor	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Araştırma Görevlisi (ÖYP)	Ardahan Üniversitesi
2014-2014	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ardahan

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- **Ersöz F.**, Aykın-Dinçer E., Özçelik A., İnan M. (2021) Effect of Recombinant Transglutaminase on the Quality Characteristics of Cooked Beef Meatballs, 27(2), 209-215. **Doi:** [10.9775/kvfd.2020.25080](https://doi.org/10.9775/kvfd.2020.25080)
- 2- Al. M., **Ersöz F.**, Özaktaş T., Turkanoglu-Ozcelik A., Küçükçetin A. (2020) Comparison of the effects of adding microbial transglutaminase to milk and ice cream mixture on the properties of ice cream, International Journal Of Dairy Technology, 73(3),578-584 **Doi:** [10.1111/1471-0307.12707](https://doi.org/10.1111/1471-0307.12707)
- 3- Özçelik A., **Ersöz F.**, İnan M. (2019) Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*, Protein Expression and Purification, 159, 83-90. **Doi:** [10.1016/j.pep.2019.03.003](https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.03.003)
- 4- **Ersöz F.**, İnan M. (2019) Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*, Protein Expression and Purification, 154, 126-133. **Doi:** [10.1016/j.pep.2018.10.007](https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.10.007)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- **Ersöz F.**, İnan M. (2019) Tibet sığırı kimozen enziminin *Pichia pastoris* mayasında hücre dışında rekombinant üretimi. 20. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 10-12 Ekim 2019, cilt.1, sa.1, ss.50.
- 2- **Ersöz F.**, Ergin F., ErKaymaz T., İnan M., Küçükçetin A. (2019) Rekombinant Kimozen Enzimi Kullanılarak Üretilen Beyaz Peynirlerin Fizikokimyasal Özellikleri. 20. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 10-12 Ekim 2019, ss.61.
- 3- Özçelik A., **Ersöz F.**, İnan M. (2018) Effect of pH and temperature on extracellular production of recombinant microbial transglutaminase in *Pichia pastoris*. International Agricultural, Biological and Life Science Conference, Edirne, Türkiye, 02-05 Eylül 2018, ss.528.
- 4- **Ersöz F.**, Türkanoglu Özçelik A., İnan M. (2018) Large scale production of recombinant microbial transglutaminase in *Pichia pastoris*. International Agricultural, Biological and Life Sciences Conference, Edirne, Türkiye, 2-05 Eylül 2018, ss.570
- 5- Türkanoglu Özçelik A., **Ersöz F.**, İnan M. (2018) Effect of pH and temperature on extracellular production of recombinant microbial transglutaminase in *Pichia pastoris*. International Agricultural, Biological and Life Science Conference, Edirne, Türkiye, 2-05 Eylül 2018, ss.528

6- Özçelik A., **Ersöz F.**, İnan M. (2017) Molecular cloning of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase gene in yeast. 6. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Afyon, Türkiye, 22-25 Aralık 2017, ss.14

7- **Canlı-Ersöz F.**, İnan M. (2016) Rekombinant Tibet Öküzü *Bos grunniens* Kimozin Üretimine Glikozilasyonun Etkisi. 5. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Türkiye, 18-21 Temmuz 2016, ss.24

8- Adıgüzel Ö., **Canlı-Ersöz F.**, İnan M (2016). Recombinant Production and Characterization of yak Chymosin in *Pichia Pastoris*. Pichia 2016 Conference, 03-06 Nisan 2016, ss.77

