

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris'te REKOMBİNANT LAKTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Neslihan CEYLAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris'te REKOMBİNANT LAKTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Neslihan CEYLAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pichia pastoris'te REKOMBİNANT LAKTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Neslihan CEYLAN
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 23/06/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN
Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK
Dr. Öğr. Üyesi Fatma ERSÖZ

ÖZET

Pichia pastoris'te REKOMBİNANT LAKTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Neslihan CEYLAN

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Haziran 2025; 72 sayfa

Laktaz enzimi süt şekeri olarak bilinen laktozu katabolik reaksiyonlar ile parçalayarak glikoz ve galaktoz alt monomerlerine dönüştüren bir enzimdir. Diğer adıyla β -galaktosidaz olarak da bilinen laktaz enzimi özellikle gıda sanayisinde laktozsuz süt ve süt ürünleri üretmek amacıyla kullanılmaktadır. Toplumun geniş bir kesiminde bulunan laktoz intoleransı, laktozsuz ürünlere olan talebi artırmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık %70' ini etkileyen bu hassasiyet, bebeklik döneminden başlayarak yetişkin insanlarda şişkinlik, bağırsak ağrısı, kusma ve ishal gibi gastrointestinal sorunlara neden olmaktadır. Hassasiyeti bulunan kişilerde yaşam konforunu önemli ölçüde etkilediği için günlük diyetinde gıda takviyesi olarak kullanımı mevcuttur. Günümüzde laktaz enzimi (β -galaktosidaz), endüstriyel ölçekte ağırlıklı olarak mikrobiyal fermantasyon ve rekombinant DNA teknikleri kullanılarak üretilmektedir. Bu üretim yöntemleri, yüksek verim, düşük maliyet ve sürdürülebilirlik gibi avantajlar sunmakta olup, literatür bilgisi veremezsin burada bu çalışma kapsamında enzimin *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) mayasında etanol ile indüklenebilen mutant *ADH2* promotörü kontrolünde rekombinant üretimi yapılmıştır.

Çalışma kapsamında, sentetik kodon optimize olarak temin edilen *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) laktaz geni sentetik *SNT5* promotörü altına klonlanmış ve oluşturulan pSNT5 α -Lac ekspresyon vektörünün *P. pastoris* MK115(PDI)suşuna transforme edilmiştir. Transformasyon sonrasında elde edilen *P. pastoris* MK115(PDI)#1 ve #2 klonları ile engelli erlenmayerde üretim ile sıcaklık (20-24-28°C) ve pH (3.0-7.0) optimizasyonu yapılmıştır. Laktaz enzim üretimi için optimum pH ve sıcaklık değeri pH 6 ve 28 °C olarak belirlenmiştir. Erlenmayer ölçekli üretimler sonucunda seçilen *P. pastoris* MK115(PDI) #1 klonu kullanılarak pH 6.0 ve 28°C koşullarında hücre dışına sekresyon şeklinde yapılan üretimlerde en yüksek enzim aktivitesi 6,800,000 U/mL, en yüksek toplam protein miktarı 512 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Erlenmayer koşullarında belirlenen optimum sıcaklık ve pH değerlerinde, FM22 besiyeri kullanılarak biyoreaktör ölçeğinde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 95 saat süren fermantasyon sonucunda süpernatant örneklerinde enzim aktivite değerleri ve toplam protein miktarı sırasıyla 18,400,000 U/mL ve 3177 mg/L şeklinde tespit edilmiştir.

Çalışma sonucunda *A. oryzae* laktaz enziminin etanol ile indüklenebilen *SNT5* promotörü altında *P. pastoris* MK115(PDI) süşünde üretimi yapılmış ve endüstriyel boyutta laktaz üretimi için biyoproses verileri elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *A. oryzae* Laktaz, *Pichia pastoris*, Rekombinant protein, etanol indükleme, *SNT5* promotörü, biyoproses optimizasyonu.

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN
Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK
Dr. Öğr. Üyesi Fatma ERSÖZ



ABSTRACT

RECOMBINANT LACTASE ENZYME PRODUCTION IN *Pichia pastoris*

Neslihan CEYLAN

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İNAN

June 2025; 72 pages

Lactase enzyme is a biocatalyst that breaks down lactose, commonly known as milk sugar, through catabolic reactions into its submonomers glucose and galactose. Also known as β -galactosidase, the lactase enzyme is especially utilized in the food industry to produce lactose-free milk and dairy products. The widespread prevalence of lactose intolerance among the population has significantly increased the demand for lactose-free products. This sensitivity, which affects approximately 70% of the global population, can lead to gastrointestinal problems such as bloating, intestinal pain, vomiting, and diarrhea in adults, starting from infancy. Due to its considerable impact on quality of life, the enzyme is also used as a nutritional supplement in daily diets for sensitive individuals. Today, lactase (β -galactosidase) is predominantly produced on an industrial scale using microbial fermentation and recombinant DNA techniques. These production methods offer advantages such as high yield, low cost, and sustainability. In this study, the enzyme was recombinantly produced in *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) yeast under the control of an ethanol-inducible mutant *ADH2* promoter.

As part of the study, a synthetic codon-optimized lactase gene from *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) was cloned under a synthetic *SNT5* promoter, and the resulting pSNT5 α -Lac expression vector was transformed into a *P. pastoris* MK115 (PDI) strain. Following transformation, *P. pastoris* MK115 (PDI) #1 and #2 clones were used for production in baffled flasks, during which temperature (20–24–28°C) and pH (3.0–7.0) optimization studies were conducted. The optimum conditions for lactase enzyme production were determined to be pH 6 and 28°C. Using these parameters, shake-flask scale production with the selected *P. pastoris* MK115 (PDI) #1 clone led to extracellular secretion of the enzyme, achieving a maximum enzyme activity of 6,800,000 U/mL and a maximum total protein concentration of 512 mg/L.

Subsequently, enzyme production was scaled up to a bioreactor under the same optimized temperature and pH conditions using FM22 medium. After approximately 95 hours of fermentation, the enzyme activity and total protein concentration in the supernatant samples were determined as 18,400,000 U/mL and 3177 mg/L, respectively.

As a result of the study, *A. oryzae* lactase enzyme was successfully produced in the *P. pastoris* MK115 (PDI) strain under the control of the ethanol-inducible *SNT5* promoter, and bioprocess data were obtained for industrial-scale lactase production.

KEYWORDS: *A. oryzae* Lactase, *Pichia pastoris*, Recombinant protein, ethanol induction, *SNT5* promoter, bioprocess optimization.

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet İNAN
Assoc.Prof. Dr. Aysun ÖZÇELİK
Asist. Prof. Dr. Fatma ERSÖZ



ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji alanı Dünya’da son zamanlarda trend olan bilim alanlarından biridir.

Bana biyoteknoloji alanında çalışma imkânı sunan; tez konumu seçerken çok yardımcı olan, hiçbir zaman benden desteğini esirgemeyen, laboratuvar imkanları, ekipmanları ve cihaz konusunda hiç sıkıntı yaşamadan tüm imkana sahip olduğum bir ortam sağlayan hocam Prof. Dr. Mehmet İNAN’a çok teşekkür ederim. Tüm bilgilerini benimle paylaşmıştır. Bana çok yardımcı olmuştur.

Jüri üyelerim Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK ve Dr. Öğr. Üyesi Fatma ERSÖZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

HPLC analizlerinde bize yardımcı olan Şükriye Nilüfer, Selda Oflaz ve Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi’ne teşekkür ederim.

Projesinde bursiyer olarak yer aldığım ve bana verdiği destekten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu’na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Laktaz (β -galaktosidaz) Enzimi	3
2.2. <i>Aspergillus oryzae</i> Laktaz (β -galaktosidaz) geni	5
2.3. Laktoz İntoleransı.....	5
2.4. Laktaz Enziminin Gıda Sanayisinde Önemi	7
2.4.1. Gıda Sanayisinde Laktozsuz Süt Ürünleri Üretimi	8
2.5. <i>Pichia pastoris</i> Ekspresyon Sistemi.....	9
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Materyal	11
3.1.1. Gen Kaynağı	11
3.1.2. Plazmidler ve Konakçı Suşlar.....	11
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Antibiyotikler.....	12
3.2. Metot	15
3.2.1. Liyofilize Halde Gelen Plazmid DNA'nın Açılması.....	15
3.2.2. Konakçı Suşların Kompetent Hücre Haline Getirilmesi	15
3.2.3. pUC57_Lac Plazmid DNA'sının <i>E. coli</i> 'ye Aktarılması	16
3.2.4. pSNT5Z α Lac Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması	16
3.2.5. pSNT5Z α Lac Plazmidinin Lineer Hale Getirilmesi ve Konakçı <i>P. pastoris</i> MK115 (PDI) Suşuna Aktarılması	18
3.2.6. Mavi/Beyaz Tarama Testi (X-Gal Deneyi)	18
3.2.7. Erlenmayer Ortamında Laktaz Üretimi	18
3.2.8. SDS- PAGE Analizi	19
3.2.9. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	20
3.2.10. ONP Standart Grafiğinin Oluşturularak Grafik Eğiminin Hesaplanması....	21
3.2.11. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi.....	21

3.2.12. Laktaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu	21
3.2.13. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Tespit Edilmesi	22
3.2.14. Biyoreaktörde Üretim	23
3.2.15. Fermentör Süpernatantların Konsantre Hale Getirilmesi	26
3.2.16. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Analizi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	26
4. BULGULAR.....	29
4.1. Liyofilize pUC57_Lac Plazmidinin <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyonu ve Doğrulanması	29
4.2. Vektör (pSNT5 α) ve İnsert (Lac) Parçalarının Jelden Ekstraksiyonu	30
4.3. pSNT5 α -Lac Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması ve Restriksiyon Analizi ile Doğrulanması	31
4.4. pSNT5 α _Lac Ekspresyon Vektörünün Lineer Hale Getirilmesi ve <i>P. pastoris</i> MK115 (PDI) Suşuna Transformasyonu	32
4.5. Mavi/Beyaz Tarama Testi (X-Gal Deneyi).....	33
4.6. Engelli Erlenmeyer Ölçeğinde Laktaz Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu	33
4.7. Biyoreaktörde Laktaz Enzimi Üretimi	38
4.8. Rekombinant Laktaz Enziminin Karakterizasyonu	42
4.8.1. Sıcaklık ve pH	42
4.9. Metal İyonlarının Aktiviteye Etkisi	43
4.10. Biyoreaktör Süpernatantların Konsantre Hale Getirilmesi	44
4.11. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizi	45
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR	54
7. KAYNAKLAR	56
8. EKLER.....	62
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Pichia pastoris*’te REKOMBİNANT LAKTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

23/06/2025

Neslihan CEYLAN

İmza

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

kDa : Kilo Dalton

rpm : Devir/dakika

s : Saniye

g : Gram

L : Litre

U : Ünite

V : Volt

μ : Mikro

dk : Dakika

M : Molar

$\times g$: Santrifüj kuvveti

ms : Milisaniye

Kısaltmalar

bç : Baz çifti

BSA : Sığır serum albümin

BMGY : Tamponlanmış kompleks gliserol besiyeri

BMEY : Tamponlanmış kompleks etanol besiyeri

ÇO : Çözünmüş oksijen

DNA : Deoksiribonükleik asit

gDNA : Genomik DNA

DTT : Dithiothreitol

EtOH : Etanol

GAP : Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz

LB	: Luria-Bertani
LiAc	: Lityum asetat
NFW	: Nükleaz arındırılmış su
OD	: Optik yoğunluk
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PDI	: Protein disülfid izomeraz
TAE	: Tris asetat EDTA
TGS	: Tris-Glisin-EDTA
WCW	: Yaş hücre ağırlığı
YNB	: Maya azot kaynağı
YPD	: Maya pepton dekstroz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Disakkarit laktozun monosakkarit birimleri olan galaktoz ve glikoza katabolik dönüşümü	3
Şekil 2. 2. β -galaktosidaz yapısı	4
Şekil 2. 3. Laktoz intoleransı	6
Şekil 3. 1. pUC57_Lac vektör haritası.....	11
Şekil 3. 2. pSNT5 vektör haritası.....	12
Şekil 3. 3. pSNT5Z α Lac ekspresyon vektörünün elde edilmesi	17
Şekil 3. 4. Çalkalamalı inkübatörde engelli erlenmayerlerde laktaz enzimi üretimi	19
Şekil 3. 5. Laboratuvar ölçekli fermantasyonların gerçekleştirildiği Sartorius Stedim BIOSTAT B fermentörü	24
Şekil 3. 6. Biyoreaktörde enzim üretim adımları.....	25
Şekil 3. 7. Süpernatant örneğine ait ultrafiltrasyon işlemi görseli.....	26
Şekil 3. 8. Analizlerin yapıldığı HPLC Shimadzu LC20AT cihazı.....	27
Şekil 3. 9. Laktoz çözeltisinde enzim uygulama adımları	28
Şekil 3. 10. Sütte enzim uygulama adımları	28
Şekil 4. 1. pUC57_Lac plazmidinin <i>E. coli</i> NEB5 α hücrelerine transformasyonu sonucu plaka görüntüsü.....	29
Şekil 4. 2. pSNT5 α vektörünün ve pUC57_Lac plazmit <i>Xho</i> I ve <i>Not</i> I restriksiyon enzimleri ile doğrulama kesimi.....	30
Şekil 4. 3. pSNT5 α vektörünün ve Lac genine ait DNA parçasının jelden kesilmesi	30
Şekil 4. 4. pSNT5 α _Lac ekspresyon vektörünün yetenekli <i>E. coli</i> NEB5 α hücrelerine transformasyonu sonucu oluşan zeosinli plakalarda gelişen koloniler	31
Şekil 4. 5. pSNT5 α _Lac ekspresyon vektörünün, <i>Hind</i> III enzimiyle doğrulanması.....	31
Şekil 4. 6. <i>Bsi</i> WI restriksiyon enzimiyle lineer edilen pSNT5 α -Lac ekspresyon vektörünün agaroz jel görüntüsü.....	32
Şekil 4. 7. pSNT5 α -Lac ekspresyon vektörünün <i>P. pastoris</i> MK115 (PDI) transformasyonu sonucu zeosin içeren YPD plakada gelişen klonlar	32
Şekil 4. 8. pSNT5 α -Lac <i>P. pastoris</i> MK115 (PDI) hücrelerinin teke düşürme çizimi...	33

Şekil 4. 9. X-Gal Deneyi plaka görüntüleri (klon1, klon 2 ve kontrol)	33
Şekil 4. 10. <i>P. pastoris</i> MK115 (PDI) pSNT5 α -Lac #1 (a) ve #2 (b) klonunun iki paralelli farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) laktaz enzimi üretimi	34
Şekil 4. 11. <i>P. pastoris</i> MK115 (PDI) pSNT5 α -Lac #1 ve #2 klonunun iki paralelli pH 6.0'da farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) laktaz enzimi üretimi.....	35
Şekil 4. 12. pSNT5 α -Lac #1 MK115 (PDI) klonunda farklı pH'larda gerçekleştirilen üretimlere ait toplam protein miktarları	36
Şekil 4. 13. pSNT5 α -Lac #1 MK115 (PDI) klonunda farklı pH'larda gerçekleştirilen üretimlere ait enzim aktivitesi miktarları	36
Şekil 4. 14. pSNT5 α -Lac #1 MK115 (PDI) klonu kullanılarak farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretimlere ait toplam protein miktarları	37
Şekil 4. 15. pSNT5 α -Lac #1 MK115 (PDI) klonu kullanılarak farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretimlere ait enzim aktivitesi miktarları	37
Şekil 4. 16. pSNT5 α -Lac #1 <i>P. pastoris</i> MK115 (PDI) klonuna ait fermentör üretimi kontrol parametreleri grafiği	39
Şekil 4. 17. 5L'lik biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerde zamana bağlı alınan örneklere ait SDS-PAGE analizi.....	40
Şekil 4. 18. 5L'lik biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlere ait enzim aktivitesi değerleri.....	41
Şekil 4. 19. 5L'lik biyoreaktörde <i>SNT5</i> promotoru kontrolü altında yapılan rekombinant laktaz ekspresyonunun toplam protein miktarı ve yaş hücre ağırlığı	41
Şekil 4. 20. Laktaz enzimine ait optimum pH ve pH stabilitesi grafiği.....	42
Şekil 4. 21. Sıcaklığın laktaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkileri.....	43
Şekil 4. 22. Laktaz enzimi aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi	43
Şekil 4. 23. Konsantre edilmiş süpernatantlara ait SDS-PAGE analizi.....	45
Şekil 4. 24. α -Lactose monohydrate çözeltisi laktoz miktarı (%) sıcaklık ve seyreltme oranı denemesine ait grafik	46
Şekil 4. 25. α -Lactose monohydrate çözeltisi glikoz ve galaktoz miktarı (%) sıcaklık ve seyreltme oranı denemesine ait grafik.....	47
Şekil 4. 26. Sütte 37°C'de laktoz miktarı (%) ait grafik	48
Şekil 4. 27. Sütte 37°C'de glikoz ve galaktoz miktarı (%) ait grafik	48
Şekil 4. 28. Süt kontrol örneği HPLC kromatogram görseli	49

Şekil 4. 29. Süt 37°C’de 15 dk inkübasyon 5 kat seyreltme örneği HPLC kromatogram görseli	49
Şekil 4. 30. α -Lactose monohydrate çözeltisi kontrol örneği HPLC kromatogram görseli.....	49
Şekil 4. 31. α -Lactose monohydrate çözeltisi 60°C’de 10 kat seyreltme örneği HPLC kromatogram görseli	49



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. FM 22 besiyeri hazırlanması	13
Çizelge 3. 2. PTM4 hazırlanması.....	14
Çizelge 3. 3. Ayırma jeli içeriği.....	19
Çizelge 3. 4. Yükleme jeli içeriği	20
Çizelge 3. 5. 1mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam	22
Çizelge 3. 6. 10 mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam	22
Çizelge 3. 7. Kontrol ortamı	23
Çizelge 3. 8. Substrat besleme profili	23
Çizelge 4. 1. FB 95 ve konsantre edilmiş örneklerin enzim aktivitesi, toplam protein ve spesifik aktivite miktarları.....	44
Çizelge 4. 2.HPLC Analizi α -Lactose monohydrate çözeltisi numunesi hesaplama sonucu	46
Çizelge 4. 3. HPLC analizi süt numunesi hesaplama sonucu	48

1. GİRİŞ

DNA'nın 1953 yılında keşfi ve nasıl işlendiğinin çözülmesiyle moleküler biyoloji alanında yeni bir kapı açılmıştır. Bu keşif, rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesine öncülük etmiş olup birçok enzimin rekombinant olarak üretimi mümkün kılınmıştır (Khan vd., 2016). Rekombinant olarak üretilen enzimlerin daha ucuz ve saf şekilde elde edilmesi nedeniyle son yıllarda gıda sanayisinde rekombinant olarak enzimlerin kullanılması popüler hale gelmiştir.

Süt, insanların en önemli besin kaynaklarından biridir. İlk gıdamız olan anne sütünden itibaren hayatımızın her döneminde süt ve süt ürünlerinin ana besin kaynağı olarak tüketildiği bilinmektedir. İnsanoğlu yaklaşık 8000 yıldır sütü beslenmede kullanmış, özellikle sığır, manda, koyun ve keçi sütü olmak üzere birkaç türün sütünün insan gıdası olarak işlenmesi etrafında büyük bir endüstri gelişmiştir. Süt, yaklaşık 1400 çeşit peynir de dahil olmak üzere çok çeşitli farklı ürünlerin üretildiği bir hammaddedir (Fox, 2008). Süt ve süt ürünlerinde bulunan ana şeker laktozdur. Bazı kişilerde laktoz şekeri tüketime bağlı olarak rahatsızlıklar oluşabilmektedir. Laktaz enzimi, laktozu parçalayarak onu oluşturan glikoz ve galaktoz monomerlerine ayırtıran bir enzim olup gıda sanayisinde laktaz enzimi laktozun parçalanması amacıyla kullanılmaktadır. Gıda sanayisinde çokça kullanılması nedeniyle rekombinant olarak üretilmesi önem kazanmıştır.

Laktoz hassasiyeti, dünya nüfusunun yaklaşık %70'ini etkileyen bir problemdir. Laktoz enzimi aktivitesi bebeklik döneminde yüksekken, yaş ilerledikçe azalabilir; bu durum sonradan gelişen laktoz intoleransına yol açabileceği gibi bireylerde doğuştan laktoz hassasiyeti de bulunabilir. Laktoz intoleransı olan kişiler, laktoz içermeyen veya eser miktarda laktoz içeren süt ve süt ürünleri tüketmeyi tercih etmektedir. Bu sebeplerle gıda ve ilaç sanayisinde laktoz intoleransı olan bireylerin tedavisine öncülük eden ürünler geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Laktaz enzimi gıda sanayisinde laktoz intoleransı olan bireylerin tüketimine yönelik ürün üretmenin haricinde peynir altı sularının geri dönüşümde kullanılmasına öncülük ederek çevreye atılmasını önlemektedir. Dondurma gibi süt ürünlerinde laktozun parçalanması ile kıvam artırılması; galaktozun laktozdan daha tatlı olması nedeniyle laktozun parçalanması ile ürünlerin tatlandırılması için kullanılmaktadır. İlaç sektöründe laktaz enzimi gıda takviyesi olarak tüketicilere sunulmaktadır. Laktoz hassasiyeti yaşayan insanların hayat konforunu artırmak için çeşitli ürünler sunulmakta olup tablet şeklinde hazırlanan formları ile kolay kullanım olanağı sağlamaktadır.

Bu kadar geniş kullanım alanı bulan laktaz enziminin rekombinant üretiminde farklı organizmalar ekspresyon sistemi olarak kullanılmaktadır. Bu organizmalardan birisi de bu çalışmada kullanılan *P. pastoris* mayasıdır. *P. pastoris* biyoteknolojide çok sık kullanılan metilotrofik bir maya olup, memeli hücrelerine göre daha kolay genetik olarak manipüle edilmesi ve kültürünün yapılması, yüksek hücre yoğunluklarına çıkabilmesi ve post-translasyonel modifikasyonları yapabilmesi gibi avantajlarından dolayı genellikle tercih edilmektedir.

Bu tez kapsamında *A. oryzae* gen kaynaklı laktaz enzimi pUC57 vektörü üzerinde liyofilize olarak temin edilmiştir. Ekspresyonu için etanol ile indüklenebilen mutant *SNT5*

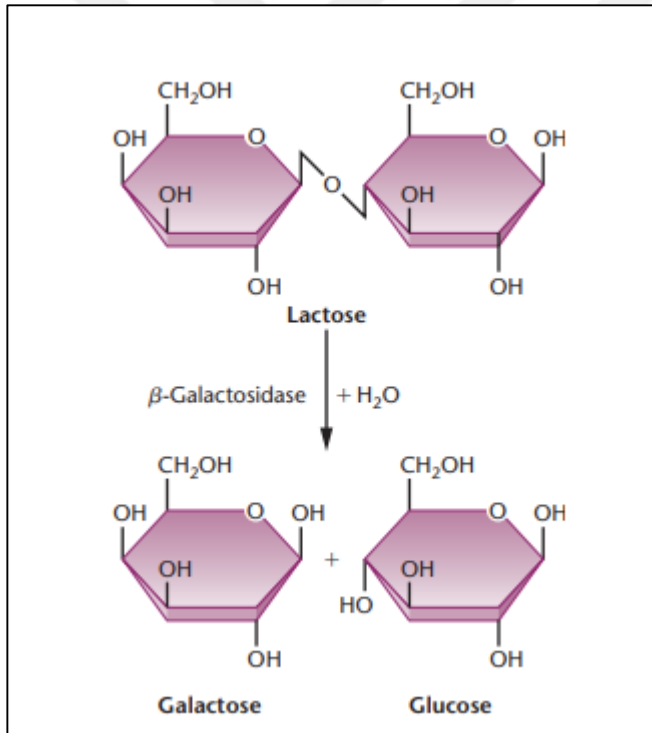
promotoru kullanılmıştır. Ligasyon sonucu oluşturulan pSNT5Z α Lac vektörü lineer hale getirilerek *P. pastoris* MK115 (PDI) suşuna transforme edilmiştir. Seçilen klonlarla erlenmayer düzeyinde üretim yapılarak laktaz enzimi üreten klonlar tespit edilmiştir SDS-PAGE analizi ile laktaz enzim üretimi doğrulanmıştır. Engelli erlenmayer ölçeğinde laktaz üretimi ve üretim koşullarının optimizasyonu yapılarak 5L'lik biyoreaktörde yüksek hacimde üretim gerçekleştirilmiştir. Laktaz enziminin karakterizasyonu yapılarak enzimin en iyi aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değeri belirlenmiş ayrıca pH ve sıcaklık stabiliteleri saptanmıştır. Laktaz enziminin laktozu parçaladığı ve glikoz ve galaktoz oluşturduğu HPLC analizi ile gösterilmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

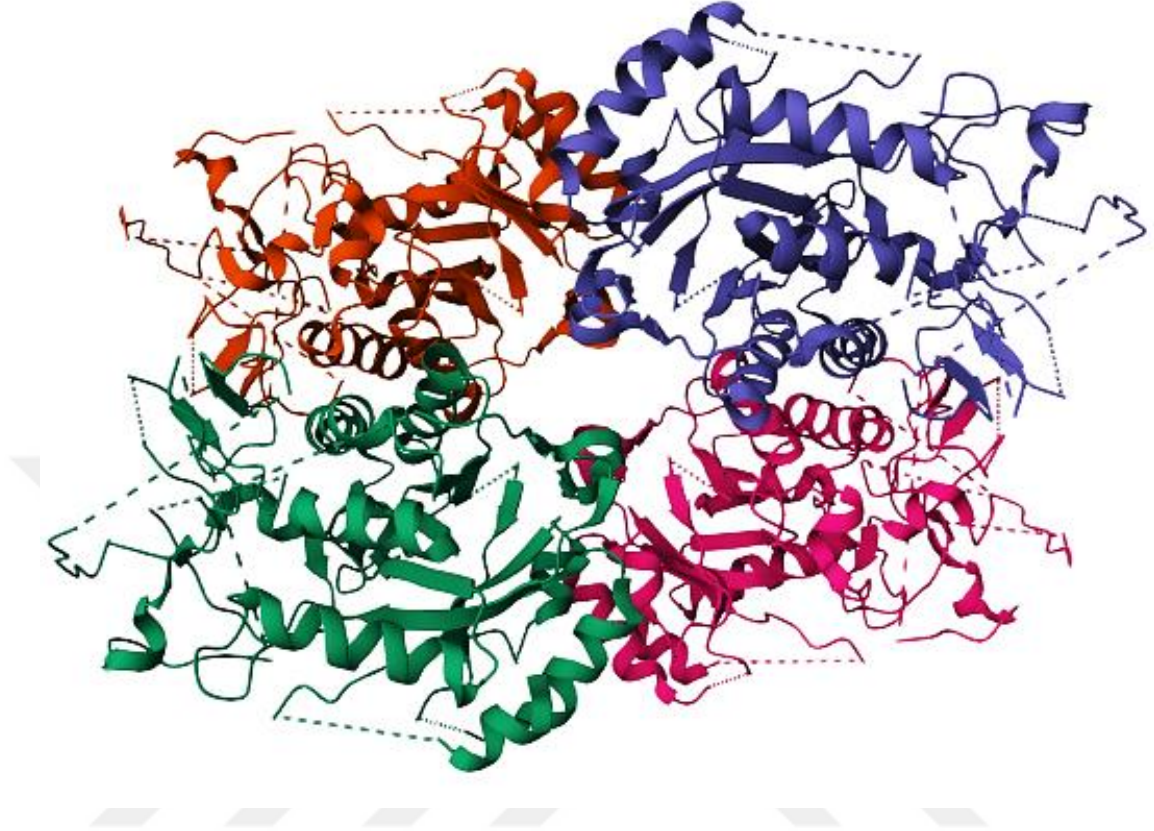
2.1. Laktaz (β -galaktosidaz) Enzimi

Laktoz sütteki ana şeker olup glikoz ve galaktozdan oluşur (Misselwitz vd., 2019). Laktoz, sulu çözeltide dengelenmiş olan alfa (α) ve beta (β) olmak üzere iki izomerik formda bulunur. Laktoz, β formuna özel bir tercihi olan laktaz enzimi tarafından hidrolize edilir (Schaafsma, 2008). Laktaz enzimi diğer adıyla β -galaktosidaz (EC.3.2.1.23) sütün içerisinde bulunan bir disakkarit ve ana karbonhidrat olan laktozu enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere kendini oluşturan monosakkaritlere (galaktoz ve glikoza) parçalamak için bağırsak sisteminde hidrolizini katalizleyen bir enzimdir (Şekil 2.1.) (Kuchay, 2020). Laktaz enzimi, laktozun aktif bölgesinde bulunan galaktozid bağlarını hedef alarak, su molekülü (H_2O) yardımıyla laktozun parçalanmasını sağlar. Kimyasal reaksiyon şu şekilde ifade edilir:



Şekil 2. 1. Disakkarit laktozun monosakkarit birimleri olan galaktoz ve glikoza katabolik dönüşümü (William S. Klug vd., 2018)

Yapısal olarak bir protein enzimi olan laktaz, amino asit zincirlerinden oluşur ve moleküler kütlesi organizmaya bağlı olarak değişiklik göstermekle beraber yaklaşık 160-220 kDa aralığında olduğu bilinmektedir. Sağlıklı insanlarda laktaz aktivitesi yaşamı boyunca devam eder, laktazı sindirmede sıkıntı yaşamazlar. Laktaz aktivitesi devam etmeyen insanlarda ise laktoz hassasiyeti oluşur (Swallow, 2003b).



Şekil 2. 2. β -galaktosidaz yapısı (Berman vd., 2000; RCSB Protein Data Bank, 2025).

Günümüzde laktaz enzimi (β -galaktosidaz), endüstriyel ölçekte ağırlıklı olarak mikrobiyal fermentasyon ve rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak üretilmektedir. Bu üretim yöntemleri, yüksek verim, düşük maliyet ve sürdürülebilirlik gibi avantajlar sunmaktadır (Zuhri & Wilda, 2024).

Rekombinant olarak üretilirken laktaz enzimi (β -galaktosidaz) mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvan dokuları dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalardan elde edilebilir. Hayvan ve bitki kaynaklarıyla karşılaştırıldığında, mikroorganizmalar bu enzimi daha yüksek verimlerde üretir.

Laktaz enzimi (β -galaktosidaz) mayalar, mantarlar, bakteriler ve aktinomisetler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalarda görülür (Rosenberg, 2006). Laktaz enzimi genellikle maya ve küfler kullanılarak üretilmektedir. Bu amaçla kullanılan en önemli mikroorganizmalar, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*'dir (Harsa vd., 2008). Şekil 2.2'de β -galaktosidazın yapısı RCSB Protein Data Bank'tan alınarak gösterilmiştir.

2.2. *Aspergillus oryzae* Laktaz (β -galaktosidaz) geni

Laktaz enzimi için *A. oryzae* (NCBI gen erişim no: CAW30743.1) gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Laktaz enziminin yaklaşık moleküler ağırlığı 110 kDa civarındadır. *Aspergillus oryzae* Laktaz geni toplam 1005 aminoasitten oluşmaktadır ve 2974 bp büyüklüğündedir.

Laktaz enziminin rekombinant üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sisteminde farklı gen kaynakları ve çeşitli promotorlar kullanılarak yapılan çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalar Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2. 1. Laktaz enziminin *P. pastoris*’te rekombinant olarak üretimine yönelik çalışmalar

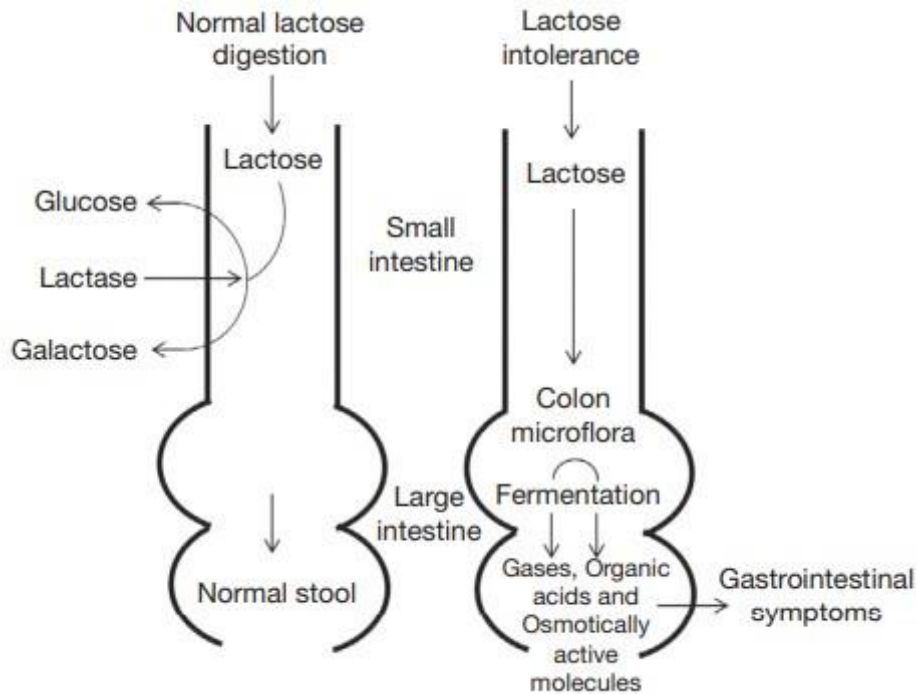
Gen Kaynağı	Kullanılan Promotor	<i>P. Pastoris</i> ’te Kullanılan Suş	Enzim Aktivitesi Miktarı	Referans
<i>Aspergillus oryzae</i>	GAP	SMD1168H	4239 U/mL	(Zhao vd., 2014)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	GAP	X33	271 U/mL	(Li vd., 2013)
<i>Lactobacillus crispatus</i> B470	AOX1	GS115	24.52 U/mL	(Nie vd., 2013)
<i>Bifidobacterium infantis</i> HL 96	AOX1	X33	170.74 U/mg	(Jung & Lee, 2008)
<i>Planococcus sp</i> -L4	AOX1	KM71H ve GS115	3.7 U/mL	(Mahdian vd., 2016)
<i>Aspergillus oryzae</i>	AOX1	GS115	4528 U/mL	(Miao vd., 2024)
<i>Aspergillus oryzae</i>	AOX1, SDH ve TEF1	GS115	1434 U/mL	(Sun vd., 2017a)
<i>Aspergillus oryzae</i>	AOX1	X33	185.52 U/mg	(Shi vd., 2022)

2.3. Laktoz İntoleransı

Dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğunda, çocukluk döneminden sonra ince bağırsakta laktaz enzimi aktivitesinin %75 ila %100 oranında azaldığı bildirilmektedir (Harju vd., 2012). Laktaz aktivitesini kaybettiği bilinen bireylerde laktoz intoleransı oluşabilmektedir. Laktoz intoleransı, gastrointestinal semptomlara ve etkilenen bireylerde süt ürünlerinden kaçınmaya neden olan yaygın bir sağlık sorunudur. Laktoz, insan vücudunda, ince bağırsağın epitel hücrelerinin fırçası kenarında bulunan laktaz

enzimi (β -galaktosidaz) tarafından metabolize edilir. Laktozun ince bağırsakta yetersiz emilimi ve fermentasyonu, laktaz enzimi (β -galaktosidaz) eksikliğinden kaynaklanır ve şişkinlik, bağırsak ağrısı, kusma ve ishal gibi gastrointestinal sorunlara neden olur (Deng vd., 2015). Laktaz enzimi takviyeleri, bu rahatsızlığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (McClafferty, 2017).

Laktoz intoleransı, dünya nüfusunun yaklaşık %70'ini etkilemiş olup, bu bireylerin yaklaşık %90'ını Asya kökenli kişiler oluşturmuştur (Oak & Jha, 2019). Laktoz intoleransı olan bireyler genellikle hiç laktoz içermeyen ya da çok düşük miktarda laktoz barındıran fermente süt ürünlerini tüketmişlerdir (Saqib vd., 2017). Temel olarak üç tip laktaz eksikliği bulunmuştur: birincil, konjenital ve sekonder. Birincil laktaz eksikliği, 2 ila 20 yaş arasında ortaya çıkmış ve ince bağırsağın fırça kenarlarında bulunan laktaz enziminin (β -galaktosidaz) sentezinin azalması nedeniyle gelişmiştir. Konjenital laktaz eksikliği ise genetik bir bozukluk sonucu, laktaz enziminin çok az veya hiç sentezlenmemesi ile karakterize olmuştur. Sekonder laktaz eksikliği olan konjenital laktaz eksikliği, hastalarda bu enzimin çok az miktarda olması veya etkilenen bireylerde bu enzimin hiç olmaması ile karakterize genetik anormallik nedeniyle oluşur. İkincil laktaz eksikliği olarak bilinen üçüncü tip, gastrointestinal sistem kaynaklı laktoz intoleransı (GI) yolunu ise gastrointestinal sistemi etkileyen altta yatan hastalıkların, laktaz enzimi seviyelerini düşürmesi sonucu meydana gelmiştir (El-Gindy, 2003; Saqib vd., 2017). Laktoz intoleransı olan bireylerde, laktoz ince bağırsakta sindirilemediği için kalın bağırsağa geçmiş ve burada metan, karbondioksit ve kısa zincirli yağ asitlerine fermente edilmiştir (Şekil 2.3). Bu fermentasyon süreci, sindirim süresinin artmasına ve bağırsak basıncının yükselmesine neden olmuş; sırt ağrısı, terleme, kusma hissi ve mide krampları gibi belirtiler ortaya çıkmıştır (Walsh, 2014).



Şekil 2. 3. Laktoz intoleransı (Lule vd., 2016)

2.4. Laktaz Enziminin Gıda Sanayisinde Önemi

Laktoz, insan ve evcil hayvanların sütünde yüksek konsantrasyonlarda bulunan önemli bir disakkarit karbonhidrattır. Fermente süt ürünleri üretiminde, özellikle yoğurt ve kefir gibi ürünlerde, laktoz temel substrat olarak metabolize edilir. Ancak, laktoz intoleransı ve galaktozemi gibi metabolik bozukluklarda laktoz, patojenik bir bileşen olarak rol oynamakta ve peynir endüstrisinde yan ürün olarak ortaya çıkması, proses yönetiminde zorluklara yol açmaktadır (Adam vd., 2004). Laktaz (β -galaktosidaz) enzimi, laktozu monosakkaritler olan glikoz ve galaktoza hidrolize ederek gıda endüstrisinde kritik bir işlev görmektedir. Global popülasyonun büyük bir kısmında laktoz intoleransı görülmesi, bu enzimin endüstriyel uygulamalarını ve kullanımını zorunlu kılmaktadır. Laktozun düşük tatlılık seviyesi ve yüksek kristalleşme eğilimi, ürünlerde çözünürlük sorunlarına ve tat profilinin olumsuz etkilenmesine sebep olmaktadır. Laktaz enzimi tarafından gerçekleştirilen hidroliz sonucu oluşan glikoz, sütün tatlılık seviyesini artırmaktadır; çünkü laktoz bir molekül laktoz, bir glikoz ve bir galaktoz biriminden oluşmaktadır ve tam hidroliz halinde eşit miktarda monosakkarit açığa çıkar. (Damin vd., 2021). Laktoz içeriği fazla olan gıdaların laktoz miktarları Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 2. Bazı gıdalarda bulunan laktoz miktarları

Gıda	Laktoz miktarı (g)
Süt, inek, UHT, tam yağlı (100 ml' de 3 g süt yağı)	6.24
Süt, inek, UHT, yarım yağlı (100 ml' de 1.5 g süt yağı)	5.7
Süt, inek, UHT, yağsız (100 ml' de 1.5 g' dan az süt yağı)	4.65
Süt, koyun	4.70
Süt, keçi	4.43
Çikolata, sütlü	10.42
Yoğurt, homojenize, tam yağlı (süt yağı $\geq$ %3.8)	4.28
Fındık kreması, kakaolu	4.81
Süt tozu, yağsız (100 g kuru maddede en çok 1.5 g süt yağı)	4.44
Dondurma, vanıksı, Antalya	6.85
Peynir, beyaz, tam yağlı (yağ, kuru maddede $>$ %45)	2.25
Peynir, beyaz, az yağlı-yağsız (yağ, kuru maddede $<$ %20)	3.32
Kefir, Kars	0.43
Ayran, yayık, Bursa	0.45

Bileşen değerleri gıdanın yenilebilir 100 g'ı içindir.

Türkomp Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı'na (2025) göre düzenlenmiştir.

2.4.1. Gıda Sanayisinde Laktozsuz Süt Ürünleri Üretimi

Laktaz enzimi gıda sanayisinde laktozsuz süt ürünleri üretmek için süte eklenir. Süt insanların beslenmesinde besleyici özelliği en yüksek gıdalar arasındadır. İnsanlar doğumundan sonra anne sütü ile başlayıp çocukluk yıllarından yaşlılık sürecine kadar besi hayvanlarının sütünü içerek sütü tüketirler.

Laktoz hidrolizinin gıda sanayisindeki önemli uygulamaları şunlardır: (1) laktozsuz ürünler üretmek; (2) dondurmaların ve yoğunlaştırılmış sütün kristalleşmesini azaltmak; (3) laktoz, yapısal olarak bir disakkarit olmasına rağmen, glikoz, galaktoz, fruktoz ve sakkaroz gibi diğer mono ve disakkarit şekerlerle karşılaştırıldığında hem suda çözünürlüğü hem de tatlılık derecesi bakımından daha düşüktür. Bu nedenle, laktozun hidrolizi çözünürlük sorununu çözebilir ve tatlandırma gücünü artırır (Gänzle vd., 2008). Laktaz enziminin eklenmesi ile yoğurt ve süzme peynir gibi süt ürünlerinde tercih edilen pH'a ulaşmak için gereken genel süre azaltılır. Ek tatlandırıcılar ekleme ihtiyacını da azaltır, böylece son ürünlerdeki kalori miktarı düşer (Domingues vd., 2005). Laktozun endüstriyel ölçekte hidrolizi için iki tip işlem mevcuttur. En basit işlemde, β -D-galaktosidaz doğrudan tam yağlı süte eklenir. Laktoz hidrolizi istenen seviyede tamamlandıktan sonra, daha fazla reaksiyonu önlemek için enzim ısıl işlemle inaktif edilebilir. İnaktive olmuş enzim tekrar kullanılamadığı için işletme maliyeti yüksektir. Bu sorunu aşmak için bir diğer işlem, immobilize β -D-galaktosidaz ile yağsız sütün hidrolizidir. İstenilen laktoz hidrolizi elde edildikten sonra, yağ içeriğini ayarlamak için hidrolize süte krema eklenir (Panesar vd., 2006).

Sütün yanı sıra, peynir altı suyu, peynir üretiminin bir yan ürünüdür ve laktozun ana kaynağıdır. Peynir altı suyu su akışlarına girdiğinde, laktoz peynir altı suyunun organik yüküne bağlı olduğundan su kirliliğine yol açar. Bir kg peynir üretimi sırasında yaklaşık 9 L peynir altı suyu üretilir ve bu da her yıl dünya çapında üretilen 160 milyon tondan fazla peynir altı suyuna denk gelir (Guimarães vd., 2010). Peynir altı suyunun diğer bileşenleri mineraller ve proteinlerdir. Peynir altı suyu atığı, su akışlarına atıldığı ve bu nedenle ciddi su kirliliğine neden olduğu için ciddi bir çevre sorunu haline gelmiştir (Brandão vd., 1987).

Laktaz enzimi eksik ya da yetersiz olduğu için laktoz intoleransı olan bireyler laktaz enzimi takviyelerini sindirim sürecini desteklemek amacıyla kullanabilirler. Laktaz enzimi takviyeleri genellikle tablet, kapsül veya damla formunda bulunur (He vd., 2014). Süt veya süt ürünleri tüketmeden hemen önce alınmalıdır. Dozaj kişisel toleransa göre değişebileceği için kademeli olarak artırılabilir. Bebekler için sıvı formu tercih edilmelidir. Laktaz enzimi takviyeleri, laktoz intoleransı olan kişiler için çeşitli avantajlar sunar. Süt ve süt ürünlerini rahat tüketmeyi sağlar. Sindirim problemlerini azaltarak bağırsak konforunu artırır. Kalsiyum gibi süt ürünlerinden elde edilen besin öğelerinin alımını destekler. Doğal laktaz eksikliğini telafi ederek sindirim fonksiyonlarını iyileştirir (Fraissl vd., 2011).

2.5. *Pichia pastoris* Ekspresyon Sistemi

P. pastoris rekombinant enzim ve protein üretiminde kullanılan metilotrofik bir maya türüdür. Metilotrofik mayalar, metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler (Cregg vd., 1993). Bu maya türü özellikle protein ekspresyonu ve rekombinant protein üretimi için yaygın olarak tercih edilir (Daly & Hearn, 2005). *P. pastoris*, son yıllarda yeniden adlandırılmıştır ve günümüzde *Komagataella phaffii* olarak isimlendirilmektedir (Kurtzman, 2009; Yamada vd., 1995). *P. pastoris* ekspresyon sisteminin lisans hakları Research Corporation Technologies (Tucson, AZ, ABD) tarafından tutulmaktadır ve *P. pastoris* ekspresyon sistemi, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) tarafından kit formunda temin edilebilir (Macauley-Patrick vd., 2005). *P. pastoris* ifade sistemi, moleküler biyolojide rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan platformlardan birisidir (Karbalaei vd., 2020).

P. pastoris, metanolü enerji kaynağı olarak kullanabilir. Metanolün metabolizması sırasında, güçlü ve sıkı kontrol edilen alkol oksidaz (AOX1) promotörü kullanılır (G. P. L. Cereghino & Cregg, 1999). *P. pastoris*'in önemli avantajlarından biri, genetik olarak kolay manipüle edilebilmesi ve yüksek hücre yoğunluklarında kültürlenebilmesidir (Rabert vd., 2013). Aynı zamanda bir ökaryot olması, proteinlerin doğru şekilde katlanması ve post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştirilmesine olanak tanır (Macauley-Patrick vd., 2005; Cregg vd., 2009).

P. pastoris ile üretilen proteinlerde endotoksin kontaminasyonu riski bulunmaz (Cereghino & Cregg, 2000a). Bu özellik, onu terapötik proteinlerin güvenli üretimi için uygun hale getirir. Nitekim, bu maya; aşılarda, antikorlar, enzimler, hormonlar, proteaz inhibitörleri, sitokinler ve alerjenler gibi çok sayıda biyoteknolojik ürünün üretiminde başarıyla kullanılmıştır (Walsh, 2014). Kültür koşulları açısından *P. pastoris*, pH 3,0 ile 7,0 arasında geniş bir aralıkta büyüebilir (P. Li vd., 2007). Bu durum, üretim sürecinde ortam pH'nın proteinin stabilitesine göre ayarlanmasına olanak sağlar. Ayrıca, amino asit veya pepton gibi zenginleştirici besin takviyeleri ile salgılanan proteinlerin kararlılığı artırılabilir. *P. pastoris*'in büyüme koşulları bakterilere benzediğinden, kolay ve ekonomik kültürlenme mümkündür (Smith, 1994). Ancak, kullanılan metanolün toksik etkileri nedeniyle üretim sürecinde dikkatli bir kontrol gereklidir (Higgins & Cregg, 1998b). Öte yandan, bazı durumlarda bu mayada üretilen proteinler, insan proteinlerinden farklı glikolizasyon paternleri gösterebilir (Hamilton vd., 2006). *P. pastoris*; rekombinant protein ve biyokatalizör üretiminde önemli bir rol üstlenmektedir ve biyoreaktör ortamında etkili bir hücre fabrikası olarak tanımlanmaktadır (Duman-Özdamar & Binay, 2021).

AOX1 promotörü, farklı türlerde birçok rekombinant proteinin ekspresyonunda yüksek verim sağlaması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak metanolün indükleyici olarak kullanılması, özellikle gıda veya farmasötik ürünlerin üretimi gibi bazı uygulamalarda sınırlamalar oluşturabilir. Ayrıca, metanol özellikle büyük ölçekli fermentasyonlar için gereken miktarlarda potansiyel bir yangın tehlikesidir. Bu tür durumlarda alternatif promotor sistemlerinin tercih edilmesi gerekebilir. Bu nedenle, metanol tarafından indüklenmeyen promotorlar belirli genlerin ifadesi için alternatiftir. AOX1 promotoruna bilinen alternatif promotorlar *P. pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP), formate dehydrogenase 1 (FLD1), peroxin 8 (PEX8) ve yeast protein transport 1 (YPT1)'dir (J. L. Cereghino & Cregg, 2000b). Günümüzde

alternatif promotorların keşfi ve bu promotorların regülasyon mekanizmaları üzerine laboratuvar çalışmaları devam etmektedir. *SNT5* promotoru bu promotorlardan biridir, etanol ile indüklenebilir. Metanolün insan için toksik etki yaptığı bilindiğinden etanol ile indüklenebilen bir promotorun rekombinant protein üretiminde kullanımı bir avantaj olarak görülmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* alkol dehidrogenaz (*ADH2*) genine %74 homoloji gösteren *P. pastoris* alkol dehidrogenaz (*ADH2*) geni (Karaoglan vd., 2016a) tarafından yapılan çalışma ile karakterize edilmiş ve *ADH2* geninin promotorunun *AOX1* ve *GAP* promotoruna alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. *P. pastoris*'in oksijenli fermantasyon ortamında az da olsa etanol ürettiği ve bu yan ürün olarak üretilen etanolün *AOX1* promotorunu baskılayarak rekombinant protein üretimini olumsuz yönde etkilediği ortaya konulmuştur (Inan & Meagher, 2001).

Bu çalışmalar değerlendirildiğinde, tez çalışması kapsamında gıda endüstrisinde kullanılan laktaz enziminin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak *P. pastoris* ekspresyon sisteminde rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla pSNT5 α -Lac ekspresyon vektörü *P. pastoris* MK115 (PDI) suşuna transforme edilmiş ve etanol ile indüklenebilen SNT5 promotoru kontrolünde ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde etanol ile indüklenebilen sentetik olarak düzenlenmiş SNT5 promotoru altında laktaz enzimi ilk kez bu çalışma kapsamında üretilmiştir. *P. pastoris* MK115 (PDI) suşu proteinini kodlayan geni bu özelliği sayesinde *P. pastoris* MK115 (PDI) suşu, hücre dışına protein ekspresyonunu kolaylaştırır, üretilen proteinin doğru katlanmasını sağlar ve disülfid bağı oluşumu gibi post-translasyonel modifikasyonların yapılmasını destekleyici etki oluşturur. Çalışma bu özellikleri bakımından özgün nitelik taşımaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Gen Kaynağı

Laktaz enzimi için *A. oryzae* (NCBI gen erişim no: CAW30743.1) gen kaynağı olarak kullanılmış olup, Şekil 3.1’de vektör haritası verilmiştir Gen pUC57 vektörü içinde liyofilize olarak temin edilmiştir (GenScript, ABD).

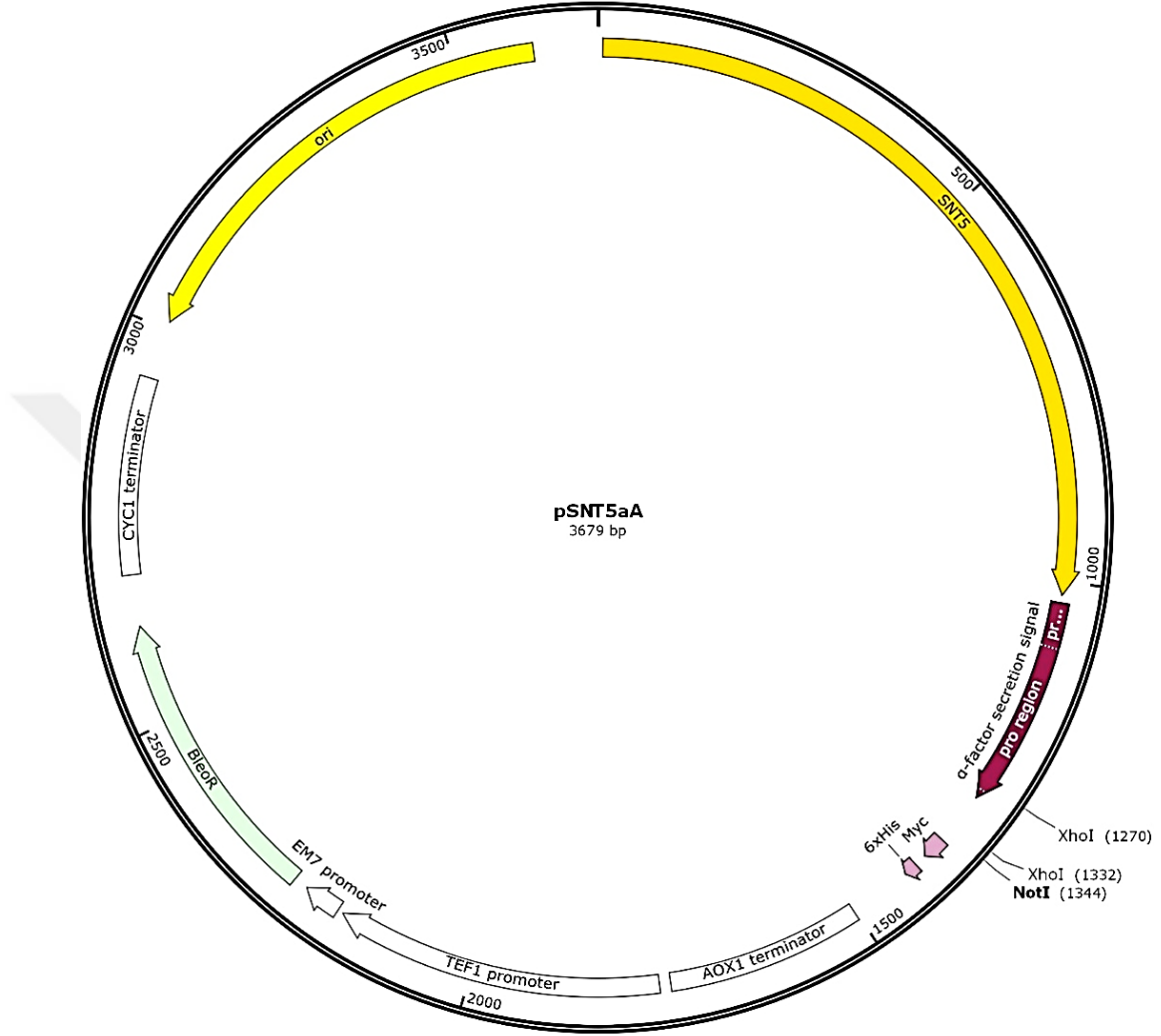


Şekil 3. 1. pUC57_Lac vektör haritası

3.1.2. Plazmidler ve Konakçı Suşlar

Protein ekspresyonu klonlama çalışmalarında laboratuvar ekibimiz tarafından oluşturulan ve ekstra 4 kopya PDI şaperon proteini içeren MK115 (PDI) suşu kullanılmıştır (Karaoğlu vd., 2016b). Ayrıca *E. coli* NEB5α suşu kullanılmıştır.

Laktaz enzim ekspresyonu için daha önce laboratuvar ekibimiz tarafından (Erden-Karaoğlu vd., 2022) oluşturulmuş olan pSNT5 vektörü kullanılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3. 2. pSNT5 vektör haritası

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Antibiyotikler

E. coli hücrelerinin gelişiminde taşıyıcı plazmidlerin çoğaltılmasında LB miller (%0.5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %1 NaCl); klonlanan plazmidin çoğaltılmasında LB Lennox (%0.5 maya ekstraktı %1 pepton ve %0.5 NaCl) besiyerleri kullanılmıştır.

P. pastoris hücresinin gelişimi için YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glikoz), BMGY (%1 maya ekstraktı %2 pepton, %20 gliserol, %13.4 g/L YNB, 4×10^{-5} g/L biotin ve 100 mM fosfat tamponu pH 6.0), BYED (30 g/L maya ekstraktı, 1.34 g/L YNB, 4×10^{-5} g/L biotin, 20 g/L glikoz ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu pH 6.0),

BMEY (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-5} g/L biotin, %10 saf etanol ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu pH 6.0) besiyerleri kullanılmıştır.

Beş litre hacimli biyoreaktörde üretim için FM22 besiyeri kullanılmıştır. FM22 besiyeri hazırlanırken manyetik karıştırıcı üzerindeki 2000 mL hacimli beher içerisindeki 700 mL çift distile su üzerine Çizelge 3.1.'deki kimyasallar eklenir. Eklenen kimyasallar tamamen çözününceye kadar karıştırılmaya devam edilir daha sonrasında son hacmi 1 L'ye çift distile su ile tamamlanarak kültür kabının içine aktarılır. Son olarak kültür kabının içerisine pipet ile 375 µl köpük kırıcı ilave edilerek biyoreaktör cam vessel üzerindeki diğer bağlantıları yapılır otoklava hazır hale getirilir. FM 22 besiyerini otoklava girmeden önceki pH değeri 4.21 olmaktadır.

Çizelge 3. 1. FM 22 besiyeri hazırlanması

Tanım	FM 22 BESİYERİ
Hazırlanacak miktar	1 L
Kimyasal madde	Tartılacak miktar
Çift distile su	1 L'ye tamamlanır
Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4	42.9 g
Ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0 g
Calcium sulfate dihydrate, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5 g
Potassium sulfate, K_2SO_4	14.3 g
Magnesium sulfate heptahydrate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11.7 g
Gliserol	40 g
Köpük kırıcı	375 µl

PTM4 tuz çözeltisini hazırlamak için 1000 mL beher içerisine 400 mL su eklenir ve sırasıyla Çizelge 3.2.'deki kimyasallar eklenerek çözünene kadar manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılır. Çözeltinin son hacmi 500 mL'ye su ile tamamlanmıştır. Çözelti steril kabin içerisinde steril 0.22 µm PES (polyethersulfone) vakum filtreden geçirilerek steril edilmiş ve karanlık ortamda $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3. 2. PTM4 hazırlanması

Tanım	PTM4
Hazırlanacak miktar	500 mL
Depolama sıcaklığı	+4°C
Kimyasal madde	Tartılacak miktar
Cupric sulphate-5H ₂ O, CuSO ₄ -5H ₂ O	1.0 ±0.02 g
Sodium iodide- NaI	40 ±0.8 mg
Manganase sulphate-H ₂ O, MnSO ₄ -H ₂ O	1.5 ±0.03 g
Sodium molybdate-2H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	100 ±2 mg
Boric acid-H ₃ BO ₃	10 ±0.2 mg
Cobalt chloride-CoCl ₂	250 ±5 mg
Zinc chloride-ZnCl ₂	3.5 ±0.07 g
Ferrous sulfate-7H ₂ O, FeSO ₄ -7H ₂ O	11 ±0.22 g
Biotin	100 ±2 mg
Calcium Sulfate-2H ₂ O, CaSO ₄ -2H ₂ O	250 ±5 mg
Sulfuric acid-H ₂ SO ₄	0.5±0.01 mL
Çift distile su	500 mL ye tamamlanır

Kullanılan sıvı ve katı besiyerlerine plazmidin üzerindeki direnç genine uygun antibiyotik ilaveleri yapılmıştır. Kullanılan amfisilin (Roche, Almanya) ve zeosin (InvivoGen, CA, ABD) antibiyotiklerinin stok solüsyonları 100 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış ve 0.22 µm filtreden (Corning, MA, AB) geçirilerek sterilize edilmiş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir. Antibiyotikli besiyeri hazırlamak için sterilize edilen besiyerleri soğutulduktan sonra buz üzerinde çözdürülmüş olan antibiyotiklerden, *E. coli* için 50-100 µg/mL zeosin veya 50-100 µg/mL amfisilin, *P. pastoris* için ise 100-500-1000 µg/mL zeosin olacak şekilde ilave edilmiştir.

Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, ABD) firmasından temin edilmiş ve üretici talimatları uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasallar moleküler biyoloji saflığında olup Sigma-Aldrich (ABD), Difco (Fransa) ve Merck (Almanya) markalarından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Liyofilize Halde Gelen Plazmid DNA'nın Açılması

Liyofilize halinde gelen plazmid DNA üretici firmanın talimatları esas alınarak soğutmalı santrifüjde 4°C'de 6000×g 1 dakika çöktürülmüş ve 40 µl EB içerisinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Konakçı Suşların Kompetent Hücre Haline Getirilmesi

E. coli hücreleri CaCl₂ yöntemine göre kompetent hücre haline getirilmiştir (Chang vd., 2017). Bu amaçla, -80°C'de muhafaza edilen stok kültürden alınan *E. coli* NEB5α suşu 3mL LB Miller besiyerine ekilmiş, 225 rpm 37°C'de çalkalamalı inkübatörde gece boyu gelişime bırakılmıştır. Sonraki gün gelişimi gözlenen hücreler OD_{600nm} başlangıç değeri 0.01 olacak şekilde 500 mL hacimdeki erlenmayerde 150 mL LB Miller besiyeri içerisine ekimi yapılmıştır. OD_{600nm} değeri 0.35-0.4 olana kadar aynı sıcaklık ve çalkalama hızında geliştirilmeye devam edilmiştir. İstenilen OD_{600nm} değerine ulaşıldıktan sonra kültür 20 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. Sonrasında +4 °C'de 3000×g hızında 10 dakika santrifüjlenerek pelet ve süpernatant kısmı ayrılmış, pelet kısmı alınmıştır. Bu aşamadan sonra tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre peleti 20 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içinde pipetaj yöntemi ile çözündürülmüştür. Buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda +4 °C'de 3000×g dönme hızında 10 dakika süre santrifüjlenerek pelet ve süpernatant kısmı ayrılmış, pelet kısmı alınmıştır. Hücre peleti %15 gliserol içeren 5 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içerisinde resüspanse edilmiş ve ardından steril 1,5 mL'lik tüpler içerisine 100 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Hazırlanan hücreler -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

P. pastoris MK115 (PDI) suşu Lityum Asetat (LiAc) yöntemine göre kompetent hücre haline getirilmiştir (Wu & Letchworth, 2004). -80°C'de muhafaza edilen stok kültürden *P. pastoris* MK115 (PDI) suşu alınıp 3 mL YPD besiyerine ekimi yapılmış, 225 rpm 28°C'de çalkalamalı inkübatörde gece boyu gelişime bırakılmıştır. Sonraki gün gelişimi gözlenen hücreler OD_{600nm} başlangıç değeri 0.1 olacak şekilde 250 mL hacimdeki erlenmayerde 80 mL YPD besiyeri içerisine ekimi yapılmıştır. OD_{600nm} değeri 2-2.5 olana kadar aynı sıcaklık ve çalkalama hızında geliştirilmeye devam edilmiştir. İstenilen OD_{600nm} değerine ulaşıldıktan sonra +4 °C'de 3000×g dönme hızında 5 dakika santrifüjlenerek pelet ve süpernatant kısmı ayrılmış, pelet kısmı alınmıştır. Bu aşamadan sonra tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre peleti, 10 mLml lityum asetat karışımı (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0.6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) içinde resüspanse edilmiş ve buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler +4 °C'de 3000×g dönme hızında 5 dakika santrifüjlenerek pelet ve süpernatant kısmı ayrılmış, pelet kısmı alınmıştır. Alınan hücre peleti 3 kez 2 mL 1 M buza koyarak soğutulmuş sorbitol ile yıkanmıştır. Yıkama yaparken sorbitol hücre peletinin üzerine eklenip hücreler resüspanse edilmeden santrifüjlenmiştir ve süpernatant kısmı dökülmüştür. Son konsantrasyon 10¹⁰ hücre/mL olacak şekilde buz soğukluğuna getirilmiş maya resüspansiyon tamponu (1 M sorbitol, %20 gliserol) içinde çözündürülmüş 80 µl'lik hacimler halinde paylaştırılarak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. pUC57_Lac Plazmid DNA'sının *E. coli*'ye Aktarılması

-80 °C'de muhafaza edilen kompetent *E. coli* NEB5α hücreleri alınarak çözünmesi bekledikten sonra üzerine 1 ng/μl'ye seyreltilmiş olan pUC57_Lac plazmidinden 1 μl alınarak kompetent hücreye eklenmiştir. 30 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 42°C'de 2 dakika ısı bloğunda bekletilmiştir. Hücreler ısı bloğundan buz üzerine alınarak 5 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin üzerine 200 μl LB Miller sıvı besiyeri eklenip 1 saat boyunca 37°C 'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra transformasyon karışımı 100 μg/mL amfisilin antibiyotiği içeren LB Miller agar plakalara farklı hacimlerde (50-75-100 μl) ekilmiştir. Sonrasında 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerden 4 tane seçilerek 3 mL sıvı LB lennox (25μg/mL zeosin) besiyerinde 37°C'de 18 saat geliştirilmiştir. Ardından steril kabin içinde %50 gliserol stokları hazırlanmış -80 °C'de saklanmıştır. Kalan sıvı besiyeri 20000×g'de 5 dakika çöktürülerek pelet ve süpernatant kısmı ayrılmış pelet kısmı alınmıştır. Hücre peletleri Bio Basic Plazmid Mini- Prep Kiti (Canada, USA) kullanılarak izole edilmiştir. Plazmid DNA konsantrasyonları (ng/μl), SpectroStar Nano spektrofotometresi (Ortenberg, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Plazmidler -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.4. pSNT5ZαLac Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

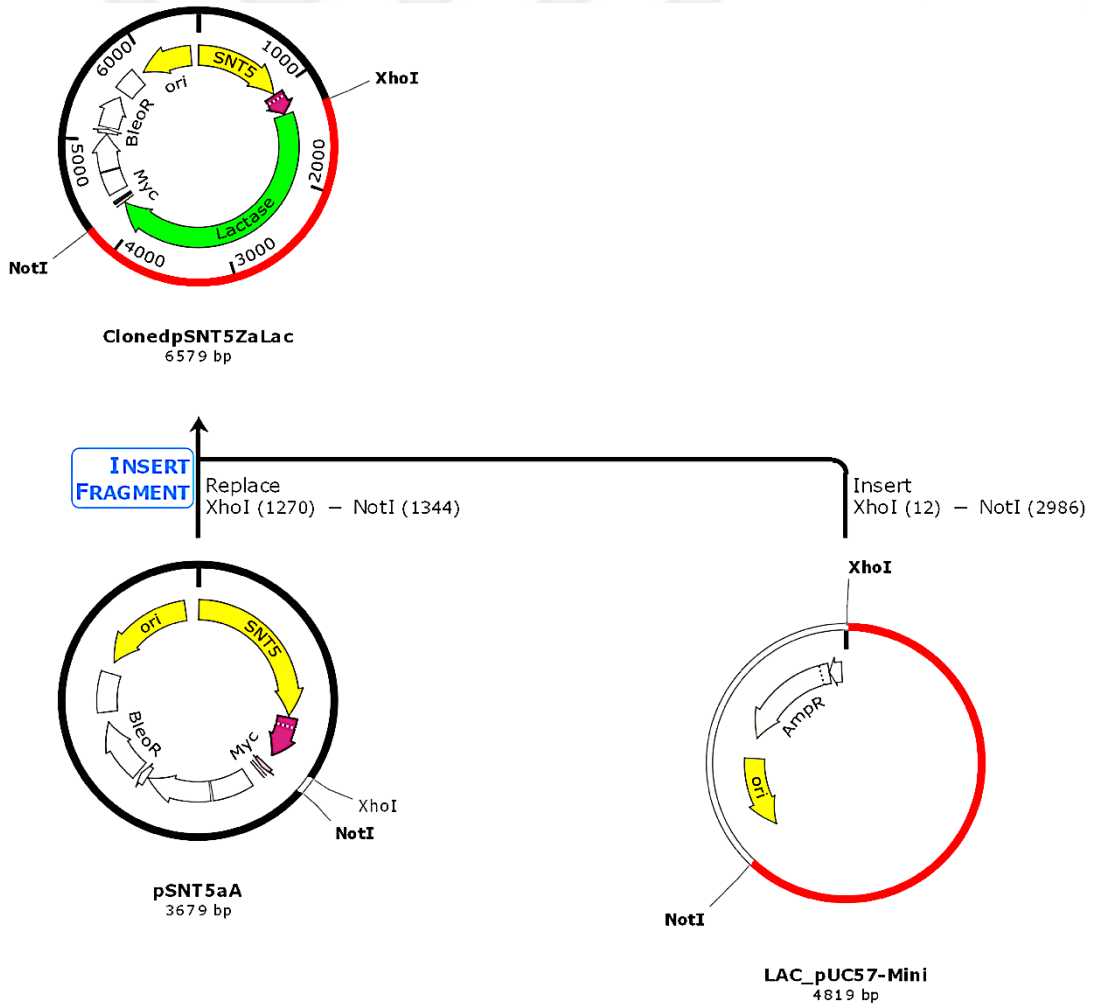
pSNT5ZαLac ekspresyon vektörünün oluşturulması Şekil 3.3'de şematize edilerek gösterilmiştir. Laboratuvarımızda -80 °C'de gliserol stokta bulunan pSNT5ZαA vektörü ve pUC57_Lac plazmid DNA içeren *E. coli* hücreleri zeosin antibiyotiği içeren LB Lennox sıvı besiyerine ekilmiş ve 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından sıvı besiyeri 20000×g 5 dakika çöktürülerek pelet kısmı alınmıştır. Hücre peletleri Bio Basic Plazmid Mini- Prep Kiti (Canada, USA) kullanılarak izole edilmiştir. Plazmid DNA konsantrasyonları (ng/μl), SpectroStar Nano spektrofotometresi (Ortenberg, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir.

pSNT5ZαA vektörü ve pUC57_Lac plazmid klonlama enzimleri olan *XhoI* ve *NotI* ile kesilerek doğrulanmıştır. Doğrulama kesimi yaparken 1 μg plazmidde 1 U enzim olacak şekilde enzimler eklenmiştir, enzim miktarının 10 katı olacak şekilde karışım hacmi belirlenmiş, karışım hacminin 1/10'u kadar 10X enzim tamponu eklenmiştir. Kalan hacim ultra saf su (NFW; Nuclease Free Water) ile tamamlanmıştır. 10 μl'de reaksiyon hacmi oluşturulmuştur. 37°C' de 1 saat inkübasyona bırakılarak plazmidlerin 2 farklı noktadan kesilmesi sağlanmıştır. Kesilen plazmidleri görüntülemek için agaroz jel elektroforezi işlemi uygulanmıştır. Doğrulanmış plazmidlerle ligasyon işlemine geçilmiştir.

pSNT5αLac ekspresyon vektörünü oluşturmak için gereken insert ve vektör parçalarının elde edilmesi amacıyla pSNT5ZαA vektörü ve pUC57Lac plazmidleri restriksiyon kesimi yapılarak 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiş sonra agaroz jelde DNA parçaları birbirinden ayrılmıştır. pSNT5ZαA vektör DNA ve pUC57Lac plazmidinden düşürülen insert DNA (Lac) jelden bistüri yardımıyla kesilmiştir. Jel ekstraksiyon işlemi MinElute® Gel Extraction Kit (Qiagen, GERMANY) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Lac genini içeren insert DNA'nın seçilen vektöre ligasyon işlemi Rapid DNA Dephosphate and Ligation Kit (Roche, GERMANY) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Vektör ve insert DNA'nın molar oranları 3:1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ligasyon işlemi için son hacim 20 µl olacak şekilde 50 ng vektör DNA'sı 150 ng insert DNA'sı ile karıştırılmış, karışım hacminin 1/10'u kadar 10X T4 DNA ligasyon tamponu ve 1 U T4 DNA ligaz enzimi eklenmiştir. 25 °C sıcaklıkta 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından ligasyon karışımının 5 µl'si alınıp *E. coli* NEB5α hücrelerine 3.2.3 bölümünde anlatıldığı gibi transformasyonu yapılmıştır. Plakalar 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerden seçilerek 3 mL sıvı LB lennox (25µg/mL zeosin) besiyerinde 37°C'de 18 saat geliştirilmiş, daha sonra steril kabin içinde %50 gliserol stokları hazırlanarak -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Kalan sıvı besiyeri 20000×g 5 dakika çöktürülerek pelet kısmı alınmış, plazmid izolasyonları ve konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır. Plazmidlerin doğrulanması amacıyla *Hind*III enzimi ile restriksiyon kesimi yapılmış, agaroz jelde 90V elektrik akımında 30 dakika yürütülerek görüntülenmiştir.



Şekil 3. 3. pSNT5ZαLac ekspresyon vektörünün elde edilmesi

3.2.5. pSNT5ZαLac Plazmidinin Lineer Hale Getirilmesi ve Konakçı *P. pastoris* MK115 (PDI) Suşuna Aktarılması

Doğrulanmış plazmidin kompetent *P. pastoris* MK 115 (PDI) suşuna aktarılması amacıyla vektörü tek bir noktadan kesen *Bsi*WI enzimi kullanılarak lineer hale getirilmiştir. Üretici talimatları doğrultusunda hazırlanan reaksiyon karışımı ile 2 saatlik kesim sonucunda lineer hale getirilen plazmidler kontrolü amacıyla %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. DNA parçaları doğrulandıktan sonra transforme edilmek üzere konsantrasyonları ölçülmüştür. Doğrulanmış plazmidlerin kompetent *P. pastoris* MK115 (PDI) hücrelerine transformasyonları elektroporasyon yöntemi ile yapılmıştır. Buz üzerinde bekletilerek çözödürölen 80 µl kompetent *P. pastoris* MK115 (PDI) hücrelerine 3-5 µg lineer DNA eklenmiş, pipetlenerek karıştırılmış ve buz soğukluğundaki 2 mm elektroporasyon küvetine (Eschau, GERMANY) aktarılmıştır. Küvetler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek elektroporasyon cihazında 5 ms süre ile 1500 V elektrik akımına tabi tutulmuştur. Hemen ardından buz soğukluğundaki 1mL 1 M sorbitol eklenmiş ve 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. 30°C'de 1-2 saat inkübe edilen hücreler zeosin antibiyotiğı içeren YPD agar besiyeri plakalarına olacak şekilde yayılmış, 3 gün 28°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

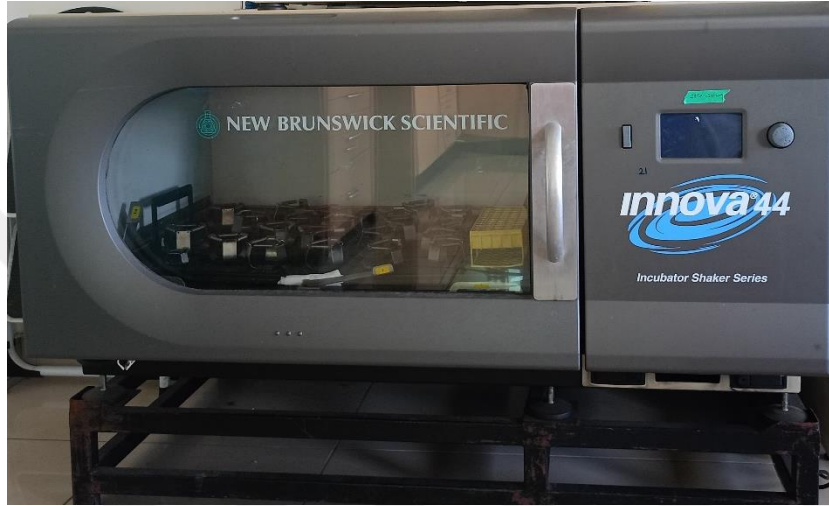
3.2.6. Mavi/Beyaz Tarama Testi (X-Gal Deneyi)

Elde edilen maya suşlarında laktaz enziminin üretimini test etmek için 5-bromo-4-chloro-3- idöyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) (Pennsylvania, USA) kullanılmıştır. X-gal, enzim tarafından hidrolize edildiğinde, ortamda indigo benzeri çözünmeyen mavi bir bileşik oluşturarak pozitif reaksiyonları kolaylıkla görünür kılar (Kiernan, 2007). Laktaz (β-galaktosidaz) aktivitesini değerlendirmek için sıklıkla X-gal adlı bir substrat kullanılır. Enzim bu maddeyi parçaladığında ortaya çıkan yoğun mavi renk, reaksiyonun gerçekleştiğini kolaylıkla gösterir. Bu yöntem, özellikle gen ifadesinin görsel olarak izlenmesi gereken çalışmalarda tercih edilir (Cooper & Zhou, 2013). Bu nedenle X-gal kullanılarak kolonilerin laktaz enzimi üretilip üretilmediğı tespit edilmek istenmiştir. Oluşan klonların YPD sıvı kültüre ekimleri yapılarak 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen hücreler, 100 mL YPD agar içerisine %1 etanol olacak şekilde saf etanol eklenmiş ve plakalara dökölerek donması beklenmiştir. 100 µl 20 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan X-gal substratı YPD agar plakalara drigalski çubuğı ile yayılmıştır ve YPD sıvı besiyerinde geliştirilen hücrelerin ekimi yapılmıştır. 28°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Protein üretiminde kullanılan *SNT5* promotörü etanol ile indüklenebilen bir promotor olduğı için 12, 24, 48 ve 72. saatlerde plakaların kapaklarına 100 µl etanol eklenmiştir. Laktaz enzimi üreten koloni çevresinde mavi renkte çökelti şeklinde oluşum gösteren kolonilerin laktaz enzimini ürettiğı belirlenmiştir.

3.2.7. Erlenmayer Ortamında Laktaz Üretimi

Teke düşürme çizimi sonrasında YPD agar plakada gelişen maya hücreleri YPD sıvı besiyerine ekilmiş ve 225 rpm, 28°C'de OD_{600nm} değeri 6-8 olana kadar geliştirilmiştir. Ardından 250 mL'lik engelli erlenmayerde 30 mL BMGY (pH6) besiyerine başlangıç OD_{600nm}'si 0.1 olacak şekilde hücreler inoküle edilmiş ve 18-20 saat boyunca 28°C ve 225 rpm'de gelişime bırakılmıştır. BMGY besiyerinde geliştirilerek yaklaşık 10-13 OD arasında hücreler +4°C 3000xg'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantları dökölerek elde edilen hücre peleti, farklı pH'lardaki 30 mL BMEY (pH

3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0) besiyeri içinde süspanse edilmiş ve inkübasyona 120 saat boyunca farklı sıcaklık (20°C, 24°C, 28°C) ve 225 rpm karıştırma hızında devam edilmiştir. Üretimde kullanılan çalkalamalı inkübatör Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Protein üretimi etanol ile indüklenebilen *SNT5* promotörü kontrolünde yapılmış olup her 12 saatte bir BMEY besiyerindeki son konsantrasyon %1 olacak şekilde etanol eklemesi yapılmıştır. Üretim sürecinde 48., 72., 96. ve 120. saatlerde örnek alınmış ve 120 saatlik üretim sonunda hasat edilmiştir. Filtre edilen (0.45 lik PES filtre) süpernatant örnekleri toplam protein, enzim aktivitesi ve SDS-PAGE analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 4. Çalkalamalı inkübatörde engelli erlenmayerlerde laktaz enzimi üretimi

3.2.8. SDS- PAGE Analizi

SDS-PAGE (SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Mini-PROTEAN Tetra Dikey Elektroforez (BioRad, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlamak için %5 poliakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli aşağıdaki çizelgelerde verildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3. 3. Ayırma jeli içeriği

AYIRMA JELİ BİLEŞENİ	KULLANILAN MİKTAR (1 JEL)
Çift distile su	4.1 mL
%30 akrilamid karışımı	3.3 mL
4X Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8)	2.5 mL
%20 SDS	50 µl
%20 APS	50 µl
TEMED	4 µl
Toplam	10 mL

Çizelge 3. 4. Yükleme jeli içeriği

YÜKLEME JELİ	KULLANILAN MİKTAR (1 JEL)
Çift distile su	1.725 mL
%30 akrilamid karışımı	425 mL
8X Yükleme Jeli	
Tamponu 1 M Tris-Cl, pH 6.8	312.5 µl
%20 SDS	12.5 µl
%20 APS	12.5 µl
TEMED	2.5 µl
Toplam	2.49 mL

Ayırma jeli Çizelge 3.3' deki gibi hazırlandıktan sonra uygun bir şekilde hazırlanan cam plakalar arasına dökülmüş sonrasında üzeri saf suyla kapatılarak jelin polimerleşmesi için 45 dk beklenmiştir. Polimerleşen ayırma jelinin üzerine Çizelge 3.4'te hazırlanan yükleme jeli dökülmüş ve kuyucuk oluşumu için tarak takılarak polimerleşmesi beklenmiştir. Polimerleşmesi tamamlanan jel cam plakalar arasından alınarak 1X TGS tamponu içeren tanka yerleştirilmiş, kuyucuk yıkama işlemlerinden sonra ön yürütmesi yapılarak elektroforez işlemine hazır hale getirilmiştir.

Protein üretimi tespit edilecek olan 20 µl süpernatant örnekleri, toplam 30 µl olacak şekilde 7 µl 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 Bromphenol Blue, %40 gliserol, 100 mM DTT) ve 3 µl 1 M DTT karışımı ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 20 µl alınarak kuyucuklara yüklenmiştir.

Elektroforez işlemi 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glisin, %0,1 SDS, pH 8.3) tamponunda 100 V akımda 120 dakika gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminden sonra jel Coomassie brilliant blue içeren boyama tamponu (%10 Asetik asit, %50 Metanol, %0,1 coomassie blue staining) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmıştır. Daha sonrasında, boya içermeyen yıkama tamponu (%10 Asetik asit, %10 Metanol) ile fazla boyanın arınması için protein bantları görünür hale gelene kadar 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir akrilamid jel ChemiDoc MP görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş, aynı jel içerisindeki bir kuyucuğa yüklenen protein standardı (Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, ABD) yardımıyla hizalama yöntemi ile proteinin moleküler ağırlığının doğrulaması yapılmıştır.

3.2.9. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Süpernatant örneklerinde enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla 100 µL süpernatant örneği (0,1 mol/L sodyum asetat tamponu, pH 5.2 ile seyreltilmiş) içerisinde 400 µl orto -Nitrofenil-β-galaktozid (oNPG) (0.1 mol/L sodyum asetat tamponu (pH 5.2) içindeki %0,25 (a/h)) bulunan ependorf tüpüne ilave edilmiş ve 60°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonrasında reaksiyon 500 µL 1 M Na₂CO₃ eklenerek söndürülmüştür.

Spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda ölçülerek absorbans değeri alınmış ve aşağıda verilen formül denklemi 3.1' göre hesaplaması yapılmıştır. Hem standartların hem de örneklerin absorbansları 100 µl 0.1 mol/L sodyum asetat tamponu (pH 5.2) ve 400 µl orto -Nitrofenil-β-galaktozid (oNPG) 60°C sıcaklıkta dakika inkübe edilmesinin ardından 500 µl 1 M Na₂CO₃ eklenen köre karşı okutularak ölçülmüştür. Enzim aktivitesinde kullanılan bileşenler ve bileşen miktarları EK-2'de verilmiştir. Standart olarak o -nitrofenol (oNP) kullanılmıştır. Standart grafiği EK-4' de verilmiştir. Seri dilüsyon yapıp örnekler enzim aktivitesi uygulanmış ve 420 nm'de ölçülmüştür. Bir ünite β-galaktosidaz, dakikada salınan 1 µmol oNP olarak tanımlanmıştır (Sun vd., 2017b).

Aktivite tayininde kullanılan formül denklem 3.1'de verilmiştir.

$$\text{Aktivite } \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{OD}{Eğim} * \frac{\text{Toplam hacim (mL)} * \text{Seyreltme Faktörü}}{\text{Enzim miktarı (mL)} * \text{İnkübasyon süresi (dk)}} \quad (3.1)$$

3.2.10. ONP Standart Grafiğinin Oluşturularak Grafik Eğiminin Hesaplanması

ONP standart grafiğinin oluşturulması amacıyla 0.2 g ONP tartılıp 100 mL içinde çözdürülerek ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stoktan 10, 25, 50, 100 µl alınarak 1 mL 'ye tamamlanır (ONP Mw=139.11) ve seri dilüsyonları hazırlanmış olur. Enzim aktivitesi Sun vd. (2017) tarafından verilen metoda göre ölçülmüş olup her bir dilüsyondan alınan absorbans değerleri kaydedilmiş ve absorbansa karşılık gelen ONP konsantrasyonunun (µM) değeri hesaplanmıştır. Absorbans ve ONP konsantrasyonu (µM) değerleri kullanılarak standart grafik oluşturulmuş ve örneklerin enzim aktivitesi hesaplanırken bu grafiğin eğim değeri kullanılmıştır. Standart olarak o -nitrofenol (oNP) kullanılmıştır. Standart grafiği EK-4' de verilmiştir.

3.2.11. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Süpernatant örneklerindeki toplam protein konsantrasyonu Coomassie Plus- The Better Bradford Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Kit içerisinde temin edilen BSA (Bovine serum albümin) standart olarak kullanılmış, seri dilüsyonları hazırlanmış 595 nm dalga boyundaki absorbansları ile standart eğim grafiği oluşturulmuştur (EK-5). Aynı dalga boyunda örneklerin de absorbansları alınarak eğim grafiğinden elde edilen denklem ile protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.12. Laktaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

Laktaz enziminin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi için en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir. Daha sonrasında ise aktivitesini en uzun süre koruyabildiği (stabilitesi) sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir.

Enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla standart enzim aktivitesi ölçüm metodunda belirtilen pH 5.2 değerinde farklı sıcaklıklarda (20-80°C) reaksiyon gerçekleştirilmiş ve absorbans değerleri alınarak enzim aktivitesi hesaplanmış ve enzimin en yüksek etkinlikte çalıştığı optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Sıcaklık stabilitesinin ölçülmesi içinse, enzim farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilmiş ve standart

enzim aktivitesi ölçüm yöntemi ile aktivitesi hesaplanmış ve başlangıç enzim aktivitesine kıyasla (%100 referans) kalan enzim aktivitesi rölatif olarak ölçülmüştür.

Enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla optimum sıcaklık olarak belirlenen 60°C’de pH 3.0-7.0 aralığındaki sodyum asetat tamponlarının ile enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen enzim aktivite sonuçlarına göre optimum pH değeri belirlenmiştir. Enzimin pH stabilitesinin ölçülmesi içinse, enzim farklı pH değerlerindeki tamponlar içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş standart enzim aktivitesi ölçüm yöntemi ile aktivitesi hesaplanmış ve başlangıç enzim aktivitesine kıyasla (%100 referans) kalan enzim aktivitesi rölatif olarak ölçülmüştür. Bağlı aktiviteler, standart metotta belirtilen sıcaklık ve pH’da enzimin aktivitesi %100 kabul edilerek hesaplanmıştır.

3.2.13. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Tespit Edilmesi

Metal iyonlarının laktaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için, 0,1 M stok çözeltisi şeklinde hazırlanmış olan CaCl_2 , FeCl_2 , MgCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , NiCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , KCl ve EDTA çözeltileri kullanılarak enzim içeren reaksiyon ortamına 1mM ve 10mM olacak şekilde ortama eklenmiştir. Kontrol olarak metal iyonları içermeyen ortam kullanılarak metal iyonlarının etkisi % rölatif olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.5, 3.6 ve 3.7’te eklenecek miktarlar gösterilmiştir.

Çizelge 3. 5. 1mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam

Tepkime Bileşen Miktarları	Enzim	Kör
0.1 mol/L sodyum asetat tamponu (pH 5.2)	-	100 μl
Süpernatant örneği	100 μl	-
0.1 M metal iyonu	10 μl	10 μl
Reaksiyon karışımı	400 μl	400 μl
60 °C 10 dk inkübasyon		
1 M Na_2CO_3	490 μl	490 μl
420 nm spektrofotometre absorbans ölçümü		

Çizelge 3. 6. 10 mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam

Tepkime Bileşen Miktarları	Enzim	Kör
0.1 mol/L sodyum asetat tamponu (pH 5.2)	-	100 μl
Süpernatant örneği	100 μl	-
0.1 M metal iyonu	100 μl	100 μl
Reaksiyon karışımı	400 μl	400 μl
60 °C 10 dk inkübasyon		
1 M Na_2CO_3	400 μl	400 μl
420 nm spektrofotometre absorbans ölçümü		

Çizelge 3. 7. Kontrol ortamı

Tepkime Bileşen Miktarları	Enzim	Kör
0.1 mol/L sodyum asetat tamponu (pH 5.2)	-	100 µl
Süpernatant örneği	100 µl	-
Reaksiyon karışımı	400 µl	400 µl
60 °C 10 dk inkübasyon		
1 M Na ₂ CO ₃	500 µl	500 µl
420 nm spektrofotometre absorbans ölçümü		

3.2.14. Biyoreaktörde Üretim

Üretilecek olan klon, -80°C’de bulunan gliserol stoktan alınarak 3 mL YPD besiyerine ekim yapılmış ve gece boyu 28 °C 225 rpm çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Gelişen kültürün OD’si ölçülerek 250 mL engelli erlen de 30 mL BYED besiyerine başlangıç OD_{600nm} 0.1 olacak şekilde ekim yapılmış ve aynı koşullarda Hücre yoğunluğu 10-12 OD_{600nm} olana kadar (yaklaşık 18 saat) çalkalamalı inkübatörde tekrar gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen kültürün tamamı (30mL) steril falkona alınmış üzerine 10 mL %80 gliserol eklenmiştir. Daha sonrasında kriyojenik tüplere 1’er mL paylaştırılarak -80 °C ‘de muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan FM22 besiyeri vessel içerisine aktarıldıktan sonra pH probu kalibrasyonu yapılmış, biyoreaktör üzerindeki gerekli bağlantılar yapıldıktan sonra 121 °C 30 dk otoklavlayarak steril edilmiş daha sonrasında gece boyu boş çalıştırılmıştır. Sürenin sonunda Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi hazırlanan PTM4 tuzu 1mL/L olacak şekilde steril şırınga ile aseptik şartlarda biyoreaktör ortamına verilmiştir. Sonrasında içeride çözünmüş oksijen (DO) kalibrasyonu yapılmıştır. DO kalibrasyonundan sonra 12-13 OD civarına geliştirilen kültür inokulum olarak steril şırınga ile aseptik şartlarda biyoreaktör ortamına ilave edilmiştir. Hücreler pH 6 28°C ‘de içerideki gliserol bitene kadar geliştirilmiştir (kesikli faz). İçerideki besin bittiğinde çözünmüş DO miktarında ani bir yükseliş görülmekte olup yarı kesikli faz aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada hücreler 30 dk aç bırakılmış sonrasında ise %50 gliserol + %10 etanol + 1mL/L PTM4 tuzu içeren besleme solüsyonu Çizelge 3.8’deki besleme profili tablosuna göre peristaltik pompa (Watson Marlow 120U, İngiltere) hızının ayarlanmasıyla verilerek yarı kesikli faz (fed-batch) aşamasına geçilmiştir. Köpük oluşumu kontrolü biyoreaktör sensörü sayesinde algılanmıştır ve %5 konsantrasyonda hazırlanan köpük kırıcı (Köpük kesici, Tito, Türkiye) ile köpüklenme kontrol edilmiştir. Yarı kesikli faz pH 6 28°C üretim koşullarında yaklaşık 96 saat olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 8. Substrat besleme profili

SAAT	SUBSRAT	POMPA	BESİN MİKTARI (mL)
00:00:00	1.3%	1.1	10.2
72:00:00	4.2%	6.9	62.6
96:00:00	4.2%	6.9	62.6

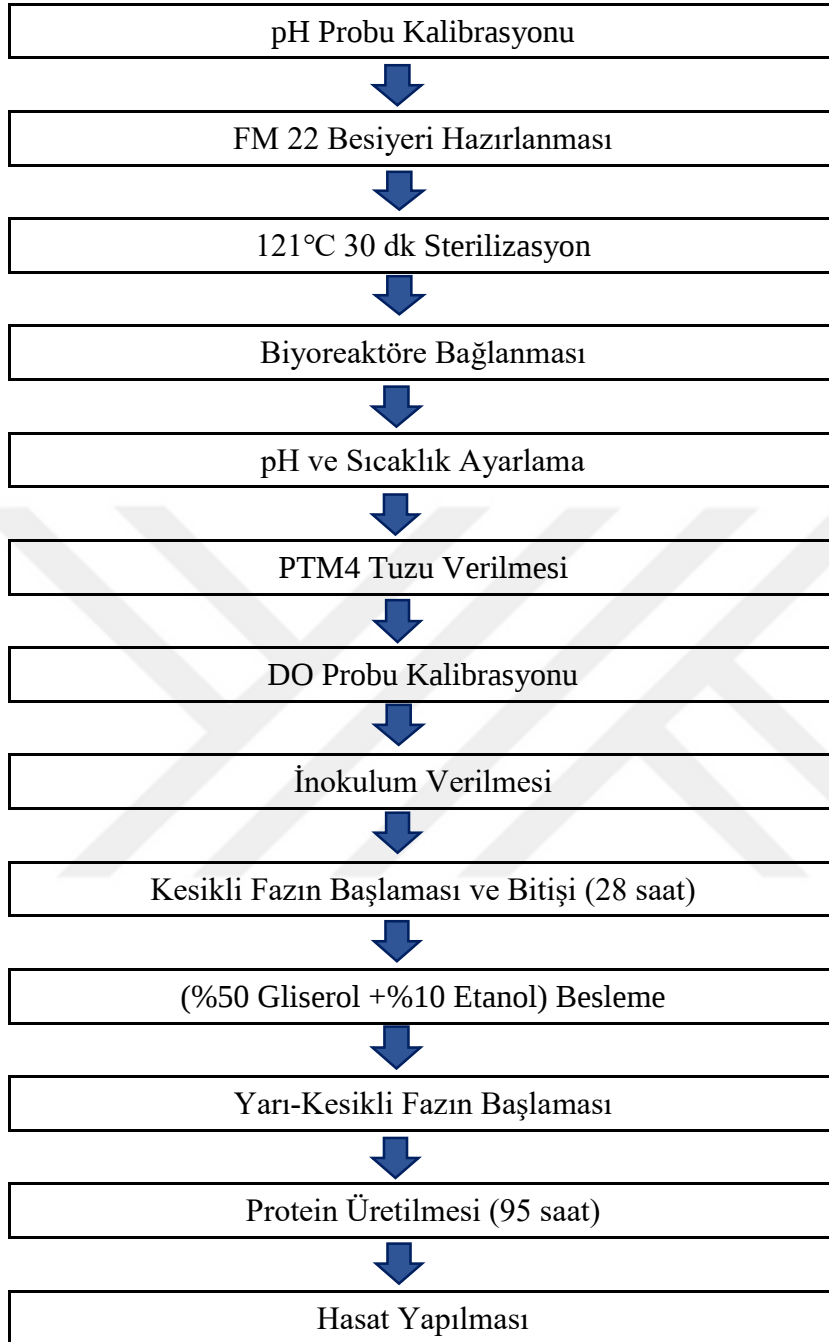
Fermantasyon boyunca ortamda çözünmüş halde bulunan DO miktarı, DO probu (Hamilton, Reno, Nevada) ile kontrol edilerek gerektiğinde saf oksijen takviyesi yapılarak cihazın yazılımında mevcut bulunan “cascad kontrol” modu ile %20 seviyesinde tutulmuştur. Fermantasyon pH değeri ise pH probu (Hamilton, Reno, Nevada) kullanılarak %25 (v/v) NH_4OH ile kontrol edilmiştir.

Fermantasyon boyunca ortamdan alınan örneklerde olarak yaş hücre ağırlığı (WCW; g/L) belirlenmiştir. Yaş hücre ağırlığı ölçümü için darası alınmış 3 adet mikrosantrifüj tüpüne 1'er mL fermantasyon sıvısı eklenmiş $3000\times g$ 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 $0.45\ \mu\text{m}$ por büyüklüğünde PES filtrelerden geçirilerek mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Ardından alınan örneklerde toplam protein miktarı (mg/L), SDS-PAGE analizi ve enzim aktivitesi (U/mL) yapılmıştır. Her bir fermantasyonda, 1.5 L FM 22 içeren besiyeri için, hazırlanan bu kültürden bir vial alınarak kullanılmıştır. Transformasyon sonucunda seçilen klon ile erlenmayer ölçeğinde üretimler sonucunda belirlenen optimum koşullar altında biyoreaktör ölçeğinde üretim için 5 L hacimli biyoreaktör (Sartorius Stedim BIOSTAT B, Guxhagen, GERMANY) kullanılmıştır. Şekil 3.5'te Laboratuvar ölçekli fermantasyonların gerçekleştirildiği Sartorius Stedim BIOSTAT B fermentörü gösterilmiştir.



Şekil 3. 5. Laboratuvar ölçekli fermantasyonların gerçekleştirildiği Sartorius Stedim BIOSTAT B fermentörü

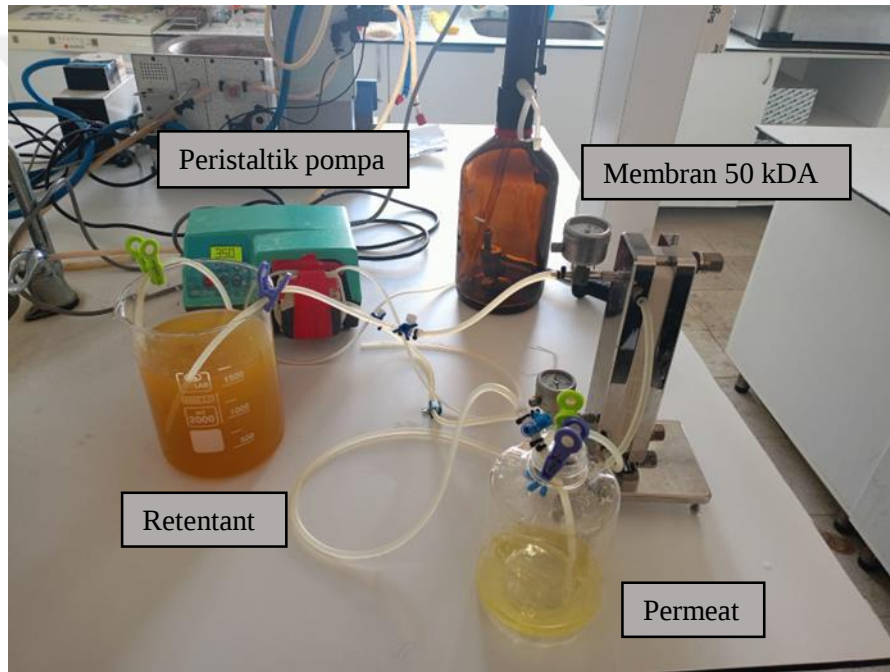
Biyoreaktör üretim aşamaları aşağıda bulunan Şekil 3.6’da bahsedilmiştir.



Şekil 3. 6. Biyoreaktörde enzim üretim adımları

3.2.15. Fermentör Süpernatantların Konsantre Hale Getirilmesi

Süpernatant içerisindeki laktaz enziminin konsantre hale getirilmesi amacıyla Sartocan® Slice Holder (Goettingen, Almanya) cihazı ve 50 kDa Sartocan® Slice Casette (Goettingen, Almanya) kullanılmıştır. Filtre edilecek örnekten belirli bir miktar (60ml/dak) sisteme verilerek filtrenin ve hortumların tamamen örnekle dolması ile şartlandırma yapılmıştır. Daha sonrasında besleme hortumu filtre edilecek örneğe alınmış hedeflenen konsantrasyon oranına ulaşıncaya kadar konsantrasyon işlemi basınç kontrollü şartlarda gerçekleştirilmiştir. Süpernatant örneğin filtrasyonunda retentat çıkışı beslemeye geri döndürülerek hedeflenen permeat / retentat oranına ulaşıncaya kadar işleme devam edilmiştir. Konsantre hale getirilen fermentör örnekleri ile SDS PAGE, enzim aktivitesi ve toplam protein ölçümleri tekrarlanmış ve konsantrasyon oranı ile karşılaştırılmıştır. Şekil 3.7’de ultrafiltrasyon yöntemiyle enzim örneğinin konsantre edilmesinin görseli verilmiştir.



Şekil 3. 7. Süpernatant örneğine ait ultrafiltrasyon işlemi görseli

3.2.16. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Analizi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Üretilen laktaz enziminin laktozu parçalamasını belirlemek amacıyla HPLC analizi yapılmıştır. Bu amaçla hassas terazide gerekli miktarlarda tartılan %100 saflıktaki glikoz, galaktoz ve laktoz 10 mL’lik balon jojeye alınmış, HPLC saflığında su kullanılarak çözeltinin konsantrasyonu 1000 ppm’e ayarlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler standart olarak kullanılmıştır. Analizlerde HPLC Shimadzu LC20AT (Kyoto, JAPAN) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.8).

Laktoz hazırlamak amacıyla 2 gram α -Lactose monohydrate (M_w 360 g/mol) 100 mL pH 5.2 tampon çözeltisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan çözeltiden 2 mL alınarak üzerine konsantre edilmiş süpernatant örneği 10 kat seyreltilerek 1 mL eklenmiş ve 10-

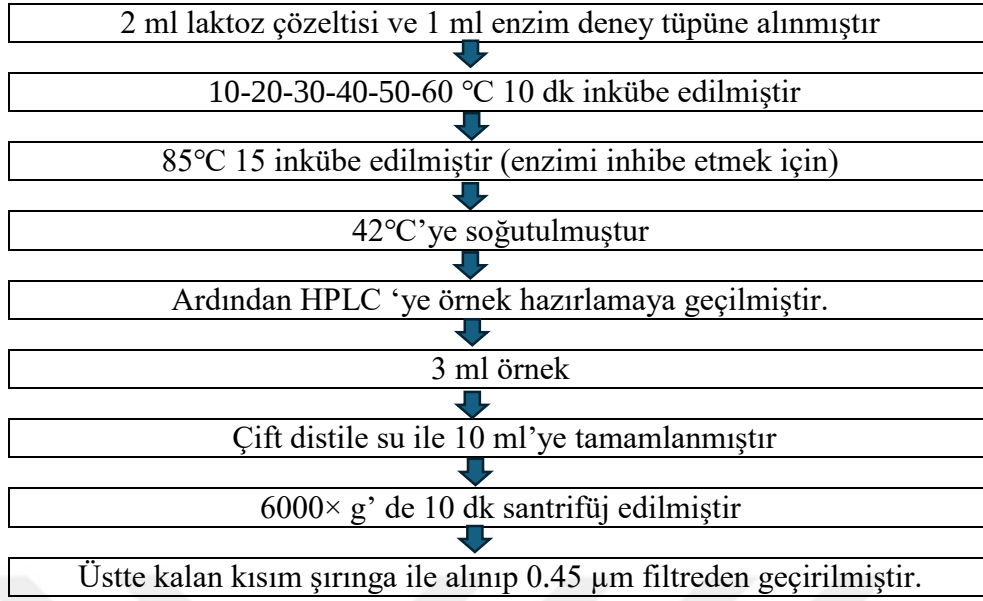
20-30-40-50-60°C’lerde 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 85°C’de 15 dk enzim inhibe edilerek deney tüpüne alınan örnek oda sıcaklığına soğutulmuştur. Hazırlanan α -Lactose monohydrate çözeltisi HPLC saflığında su ile 10 mL’ye tamamlanmıştır. Daha sonra santrifüj cihazında 6000×g 10 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan örnek şırınga yardımı ile alınarak şırınga filtresinden (0.45 μ m, Minisart®, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Almanya) geçirilip vial içerisine aktarılmış ve HPLC’de analiz edilmiştir. Enzim seyreltme oranı ve sıcaklık parametreleri belirlenerek süt denemelerine geçilmiştir.

Sütte HPLC ile laktoz miktarı (Horner vd., 2011) metoduna göre belirlenmiştir. Bir mL süt numunesine seyreltilmemiş, 2 ve 5 kat seyreltilmiş konsantre edilmiş örnekten 1 mL eklenmiş ve 37 °C’de 15 ve 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından enzimi inhibe etmek için 85°C’de 15 dk bekletilmiştir. Örneğin üzerine pipet kullanılarak 0,9 N sülfürik asitten 100 μ L eklenmiştir. Proteinleri çöktürmek için karışım çalkalanmıştır. Süt-asit karışımına deiyonize damıtılmış su ile 10 mL’ye tamamlanmış ve karışım tekrar çalkalanmıştır. Örnekler en az 5 dakika bekletildikten sonra santrifüj cihazında 6000×g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan örnek şırınga yardımı ile alınarak şırınga filtresinden (0.22- μ m politetrafloroetilen (PTFE geçirildikten sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar yüzde olarak hesaplanmıştır.

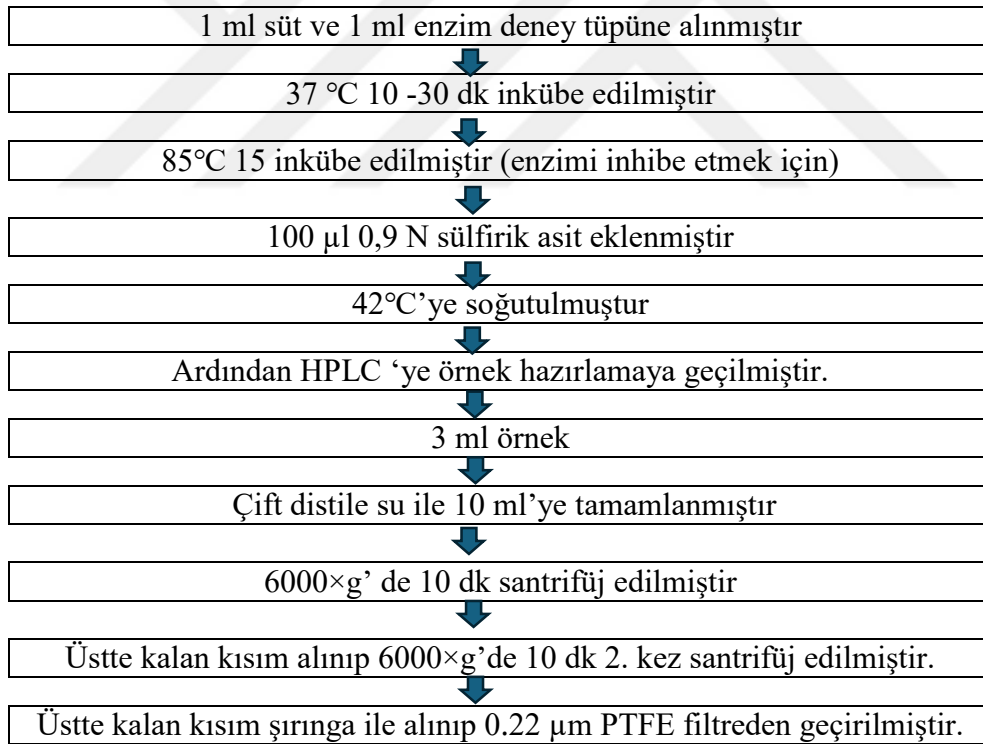


Şekil 3. 8. Analizlerin yapıldığı HPLC Shimadzu LC20AT cihazı

Enzim eklenerek laktoz çözeltisi ve sütte yapılan denemelerin uygulama adımları aşağıdaki Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’ da verilmiştir.



Şekil 3. 9.Laktoz çözeltisinde enzim uygulama adımları

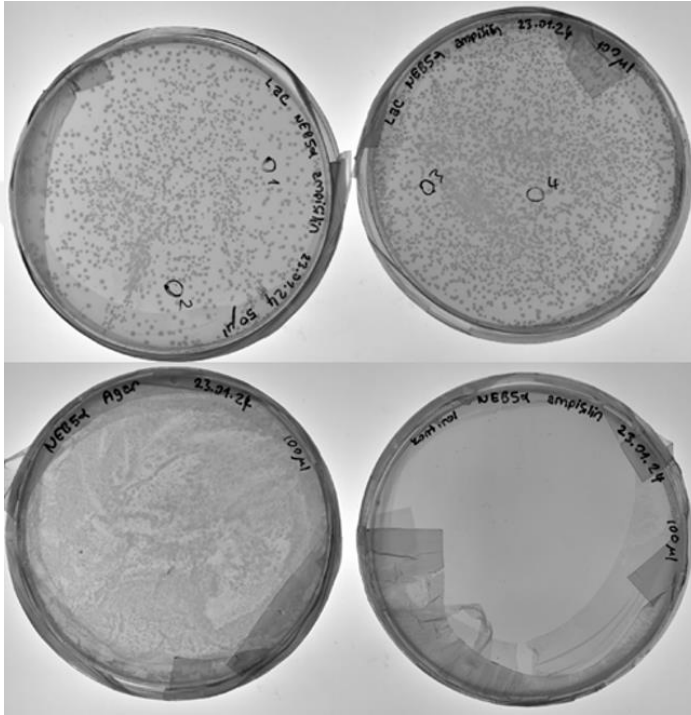


Şekil 3. 10. Sütte enzim uygulama adımları

4. BULGULAR

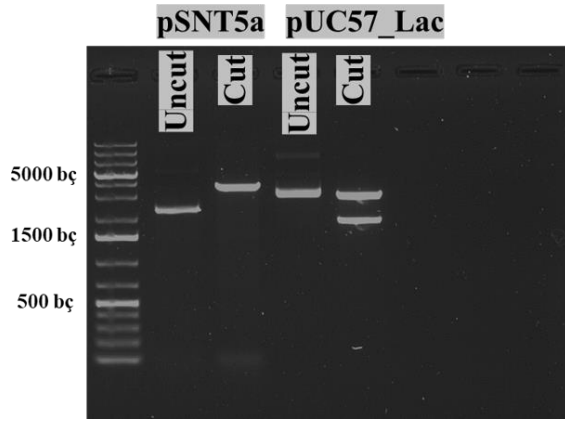
4.1. Liyofilize pUC57_Lac Plazmidinin *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu ve Doğrulanması

A. oryzae laktaz enzimini kodlayan DNA bölgesini içeren pUC57-Lac vektörü liyofilize olarak temin edilmiş olup, üretici firma talimatları doğrultusunda kullanıma hazır hale getirilmiştir. Daha sonrasında *E. coli* NEB5 α hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilerek amfisilin içeren LB miller agar plakalara yayılarak 37°C’ de gece boyu inkübe edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 1. pUC57_Lac plazmidinin *E. coli* NEB5 α hücrelerine transformasyonu sonucu plaka görüntüsü

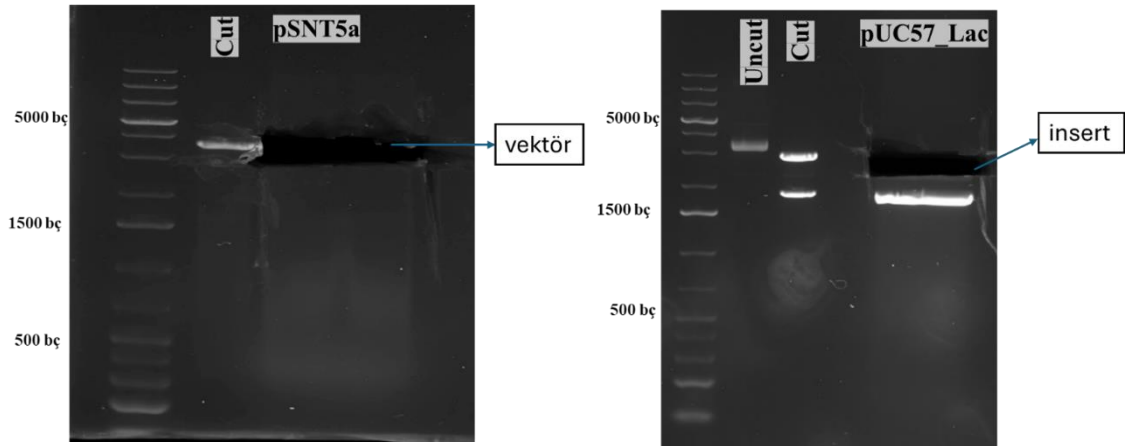
LB miller+amfisilin besiyerinde gelişen kolonilerden 4 adet seçilmiş amfisilin içeren LB miller sıvı besiyerine öze yardımıyla ekilip 37°C 200 rpm 18 saat çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Süre sonunda gliserol stok alınıp kalan hücreler çöktürülmüştür. Çöktürülen hücrelere plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu sonrasında pUC57-Lac#1 ve pSNT5 α vektörü *Xho*I ve *Not*I restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğrulanmıştır. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu beklenen fragmentler pUC57-Lac#1 vektörü için 2974 bp ve 1845 bp, pSNT5 α vektörü için 3605 bp olarak agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4. 2. pSNT5α vektörünün ve pUC57_Lac plazmit *XhoI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile doğrulama kesimi. M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD), pSNT5α vektörü ve pUC57_Lac#1 plazmidi sırasıyla kesilmemiş ve enzimlerle kesilmiş halleri yüklenmiştir.

4.2. Vektör (pSNT5α) ve İnsert (Lac) Parçalarının Jelden Ekstraksiyonu

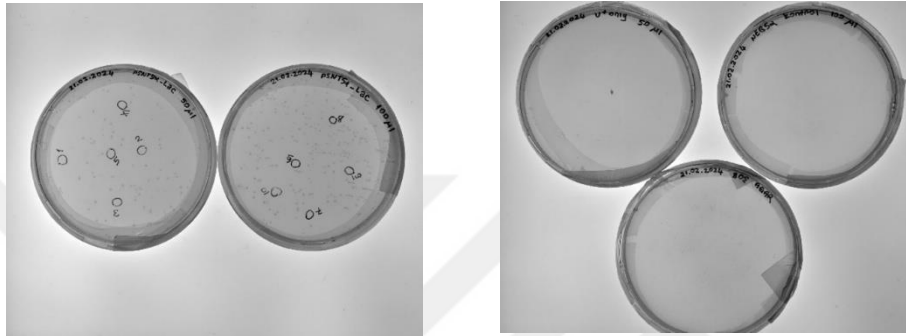
pSNT5α vektörü ve pUC57_Lac plazmidi *XhoI* ve *NotI* klonlama enzimleri ile kesilerek jele yüklenmiş (Şekil 4.3.). pUC57_Lac plazmidi kesildiğinde 2974 bp ve 1848 bp olmak üzere iki farklı parça elde edilmiş ve laktaz enzimini kodlayan DNA bölgesini elde etmek için 2974 bp büyüklüğündeki (Lac) bant jelden kesilerek izolasyonu yapılmıştır. Ardından pSNT5α plazmidi *XhoI* ve *NotI* enzimleriyle kesildiğinde 3605 bp büyüklüğündeki parça jelden kesilerek izole edilmiş ve ligasyona hazır pSNT5α vektörü elde edilmiştir.



Şekil 4. 3. pSNT5α vektörünün ve Lac genine ait DNA parçasının jelden kesilmesi (M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD), pSNT5α vektörü ve pUC57-Lac#1 plazmidi uncut ve cut halleri sırasıyla jele yüklenmiştir.

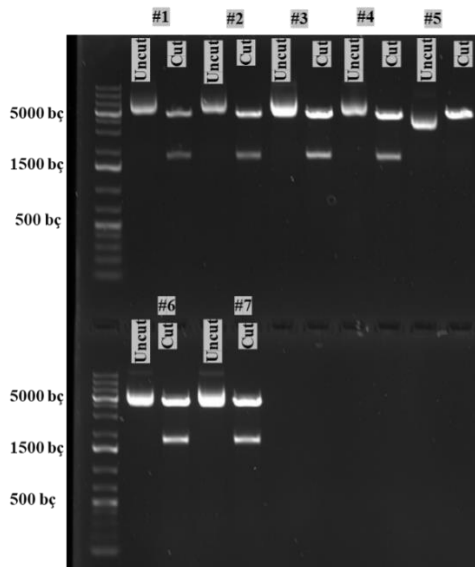
4.3. pSNT5 α -Lac Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması ve Restriksiyon Analizi ile Doğrulanması

Jelden ekstraksiyonu yapılan vektör (pSNT5α) ve kataz gen parçası (Lac) ligasyonu yapılarak ekspresyon vektörü oluşturulmuştur. Oluşturulan ekspresyon vektörü *E. coli* NEB5α hücrelerine transforme edilmiş ve farklı konsantrasyonlarda zeosin antibiyotiği içeren LB Lenox agarda seçilimi gerçekleştirilmiştir. pSNT5α-Lac ekspresyon vektörünü bulundurmeyen boş host *E. coli* NEB5α hücreleri gelişmemiş ve pSNT5α-Lac plazmidini hücre içine alan *E. coli* NEB5α hücreleri antibiyotikli seçim ortamında gelişmiştir (Şekil 4.4.).



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

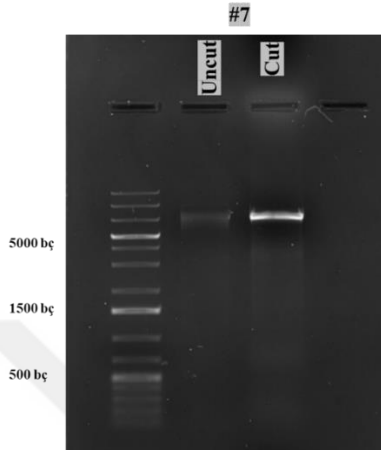
Zeosinli LB Lenox agarda gelişen kolonilerden 7 tane seçilerek stok kültür hazırlanmıştır. Transformasyon sonucu elde edilen hücrelere plazmid izolasyonu yapılmıştır. Oluşturulan plazmidler, doğrulama kesim analizi için hem promotordan hem gen bölgesinden kesen *Hind*III restriksiyon enzimiyle kesilerek doğrulama analizi yapılmıştır (Şekil 4.5.). Restriksiyon kesimi sonucu 4753 bp ve 1826 bp parçaları hizasında bantlar beklenmekte olup agaroz jelde kontrol edilmiş, plazmitlerden 5 numaralı plazmit dışındaki tüm plazmidler doğrulanmıştır.



Şekil 4. 5. pSNT5α_Lac ekspresyon vektörünün, *Hind*III enzimiyle doğrulanması M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

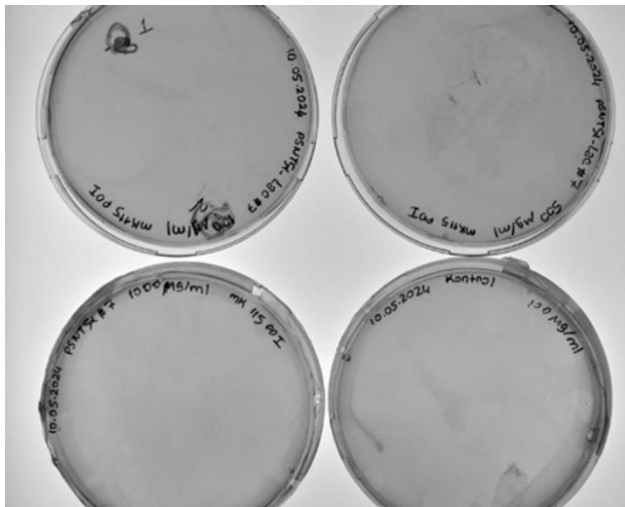
4.4. pSNT5 α _Lac Ekspresyon Vektörünün Lineer Hale Getirilmesi ve *P. pastoris* MK115 (PDI) Suşuna Transformasyonu

pSNT5 α -Lac ekspresyon vektörünün *P. pastoris* MK115 (PDI) suşuna transforme edilmesi için *Bsi*WI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiş jelde kontrol edilmiştir. pSNT5 α -Lac#7 plazmidi seçilmiştir (Şekil 4.6.).

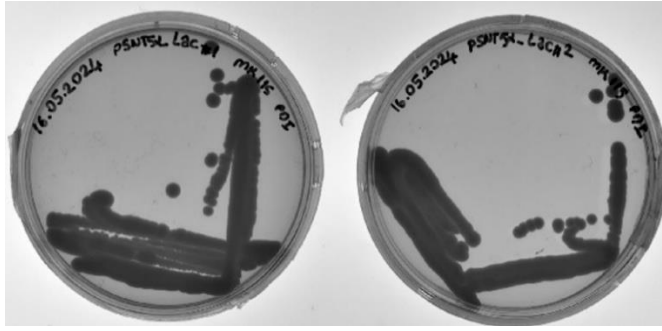


Şekil 4. 6. *Bsi*WI restriksiyon enzimiyle lineer edilen pSNT5 α -Lac ekspresyon vektörünün agaroz jel görüntüsü M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD).

Lineer haldeki ekspresyon vektörü kompetent *P. pastoris* MK115 (PDI) hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle transforme edilmiştir. Transformasyondan sonra farklı konsantrasyonlarda zeosin (100 μ g/mL, 500 μ g/mL ve 1000 μ g/mL) içeren YPD plakalara ekim yapılarak gelişime bırakılmıştır (Şekil 4.7.). Sadece 100 μ g/mL zeosin içeren plakada 2 tane koloni gelişimi gözlenmiş ve teke düşürme çizimleri yapılmıştır (Şekil 4.8.). 28°C’de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında YPD broth’a ekimi yapılarak 28°C 225 rpm 18 saat geliştirip stok alınarak -80°C’de saklanmıştır.



Şekil 4. 7. pSNT5 α -Lac ekspresyon vektörünün *P. pastoris* MK115 (PDI) transformasyonu sonucu zeosin içeren YPD plakada gelişen klonlar



Şekil 4. 8. pSNT5 α -Lac *P. pastoris* MK115 (PDI) hücrelerinin teke düşürme çizimi

4.5. Mavi/Beyaz Tarama Testi (X-Gal Deneyi)

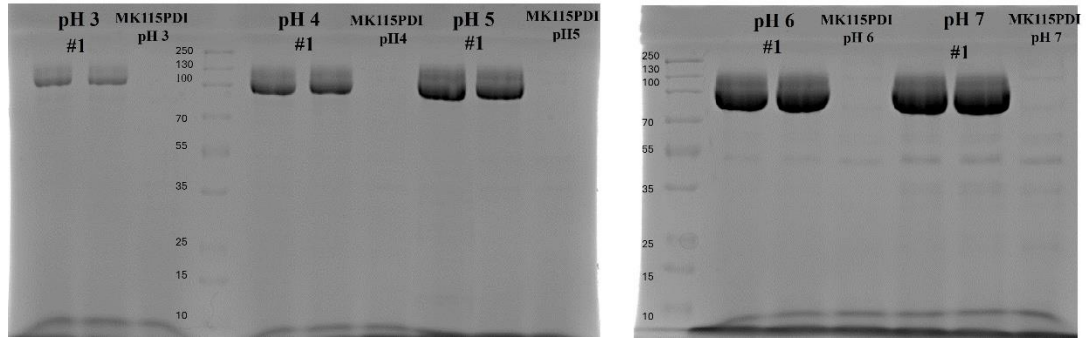
Erlenmayer üretimi öncesinde hızlı klon tarama amacıyla YPD broth besiyerinde geliştirilen klonlar %1 etanol içeren YPD agar ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundaki 100 μl X-Gal substratı içeren plakalarına ekimi yapılarak gelişime bırakılmış ve 12 saat aralıklarla 100 μl etanol eklenmiştir. Üç gün sonunda plaka larda mavi renk gözlenmiştir ve laktaz enzimi üreten klonlar doğrulanmıştır. MK115 (PDI) suşu negatif kontrol olarak kullanılmış ve mavi renk oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.9.).



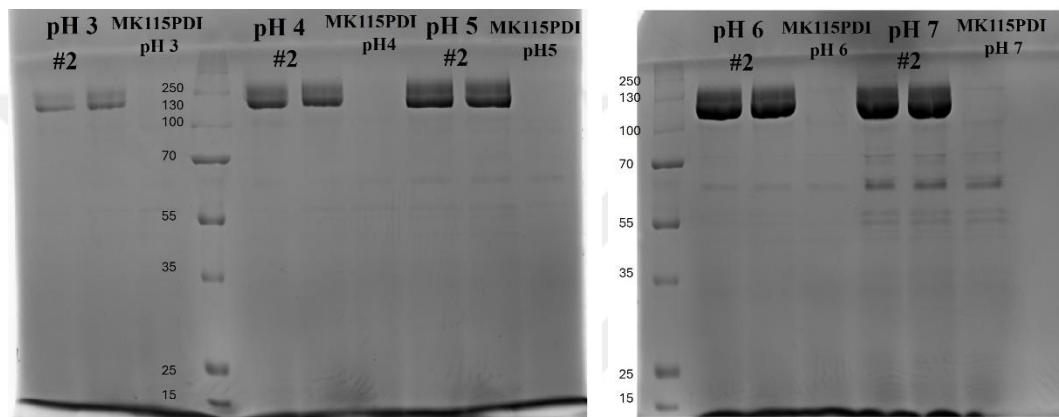
Şekil 4. 9. X-Gal Deneyi plaka görüntüleri (klon1, klon 2 ve kontrol)

4.6. Engelli Erlenmayer Ölçeğinde Laktaz Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

-pSNT5 α -Lac #1 ve #2 *P. pastoris* MK115 (PDI) klonları engelli erlenmayer ölçeğinde üretime alınmıştır. YPD broth besiyerine ekilerek 28°C 225 rpm çalkalama hızında 18 saat geliştirilmiş, ardından BMGY (pH:6) besiyerine OD₆₀₀ absorbans değerleri 12-13 olana kadar 28 °C 225 rpm’de geliştirilmiştir. Süre sonunda santrifüjleme yardımıyla süpernatantından ayrılan hücreler, farklı pH değerli BMEY (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0) besiyerlerine aktarımı yapılarak 24 °C 225 rpm’de iki paralelli olarak 72 saat protein ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve optimum pH değeri belirlenmiştir. *P. pastoris* MK115 (PDI) pSNT5 α -Lac #1 (a) ve #2 (b) klonunun iki paralelli farklı pH’larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) laktaz enzimi üretimi Şekil 4. 10’ da gösterilmiştir.



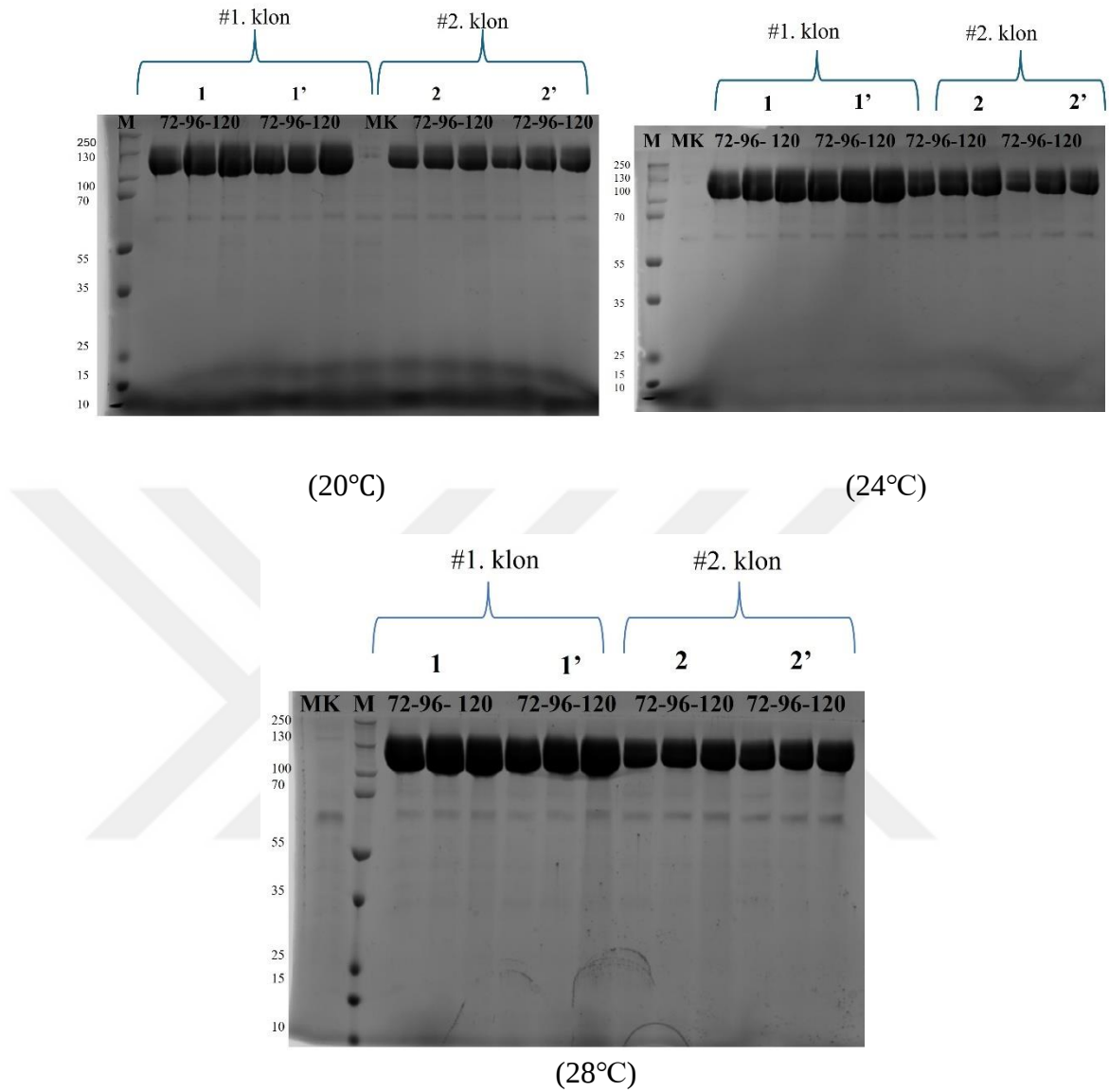
(a)



(b)

Şekil 4. 10. *P. pastoris* MK115 (PDI) pSNT5 α -Lac #1 (a) ve #2 (b) klonunun iki paralelli farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) laktaz enzimi üretimi. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). MK115 (PDI): Negatif kontrol. Her bir pH için sırasıyla; 72, 96 ve 120. saat süpernatant örnekleri 20 μ l SDS-PAGE jeline yüklenmiştir.

Şekil 4.10'da görüldüğü üzere optimum pH değeri 6.0 olarak belirlenmiş olup 20-24-28°C sıcaklıklarda 225 rpm çalkalama hızında 2 paralel olacak şekilde üretimlere yapılmıştır. 120.saate kadar üretime devam edilmiş, süre sonunda hasat edilerek süpernatant örneklerine SDS PAGE, toplam protein ve enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır. *P. pastoris* MK115 (PDI) pSNT5 α -Lac #1 ve #2 klonunun iki paralelli pH 6.0'da farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) laktaz enzimi üretimi SDS-PAGE analizi Şekil 4.11' de gösterilmiştir.

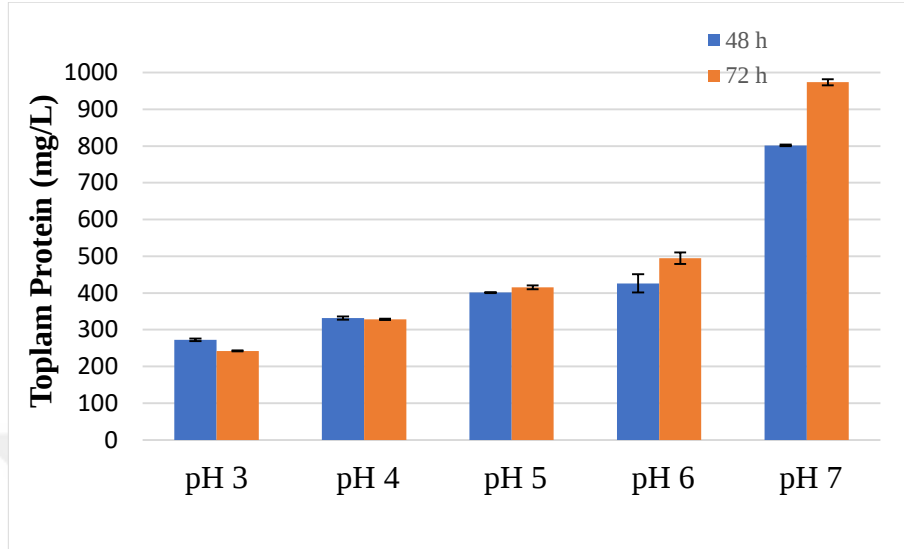


Şekil 4. 11. *P. pastoris* MK115 (PDI) pSNT5 α -Lac #1 ve #2 klonunun iki paralelli pH 6.0'da farklı sıcaklıklarda (20°C, 24°C, 28°C) laktaz enzimi üretimi. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). MK115 (PDI): Negatif kontrol Sırasıyla; 72, 96 ve 120. saat örnekleri 20 μ l SDS-PAGE jeline yüklenmiştir.

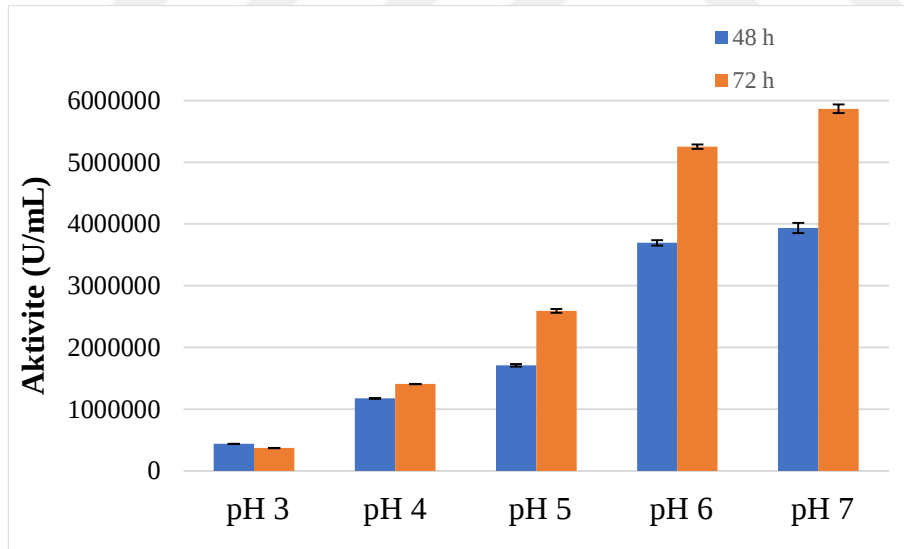
SDS-PAGE analizi sonucunda, pSNT5 α -Lac #1 MK115 (PDI) klonunda, 110 kDa büyüklüğündeki hedef proteine karşılık gelen bantın diğer klonlara kıyasla daha belirgin ve yoğun olması nedeniyle, ileri analiz ve üretim çalışmaları bu klon ile sürdürülmüştür.

pSNT5 α -Lac #1 MK115 (PDI) klonunu ile erlenmayer ölçeğinde farklı pH değerlerinde yapılan üretimler sonucu alınan süpernatant örneklerinde toplam protein ve enzim aktivitesi miktarı hesaplanmıştır. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13' de gösterildiği gibi enzim üretimi için en yüksek aktivitenin görüldüğü pH değeri 7 olarak belirlenmiştir. Hasat sonrası ölçülen pH değerlerinde, başlangıçta pH 7.0 olarak ayarlanan kültür ortamının pH'ı 6.0'a, pH 6.0 olarak ayarlanan ortamın ise 5.3'e düştüğü gözlemlenmiştir.

Ayrıca biyoreaktör koşullarında pH 7.0 seviyesinde tuz çökmesi gibi proses verimini olumsuz etkileyen sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle hem stabilite hem de verimlilik açısından optimum pH değeri olarak pH 6.0 tercih edilmiştir.



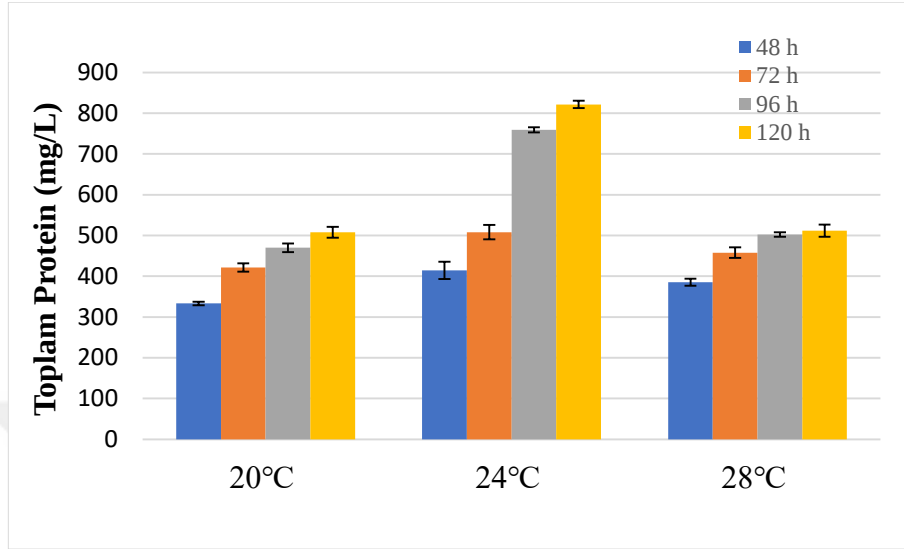
Şekil 4. 12. pSNT5α-Lac #1 MK115 (PDI) klonunda farklı pH’larda gerçekleştirilen üretilere ait toplam protein miktarları



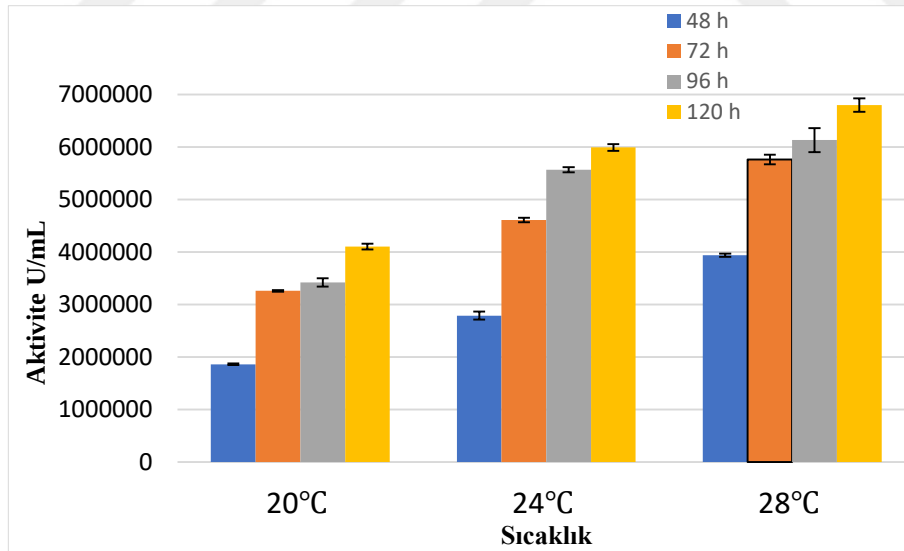
Şekil 4. 13. pSNT5α-Lac #1 MK115 (PDI) klonunda farklı pH’larda gerçekleştirilen üretilere ait enzim aktivitesi miktarları

Erlenmayer ölçeğinde farklı sıcaklıklarda yapılan üretim sonucu alınan pSNT5α-Lac #1 MK115 (PDI) klonuna ait örneklerinden toplam protein ve enzim aktivitesi miktarları Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’te verilmiştir. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 sonuçlarına bakıldığında 24 °C sıcaklıkta daha yüksek oranda toplam protein elde edilmişken, 28 °C

sıcaklıkta daha yüksek enzim aktivitesi elde edilmiştir. Bu sebeple biyoreaktör üretimleri için 28 °C sıcaklık seçilmiştir.



Şekil 4. 14. pSNT5α-Lac #1 MK115 (PDI) klonu kullanılarak farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretilere ait toplam protein miktarları

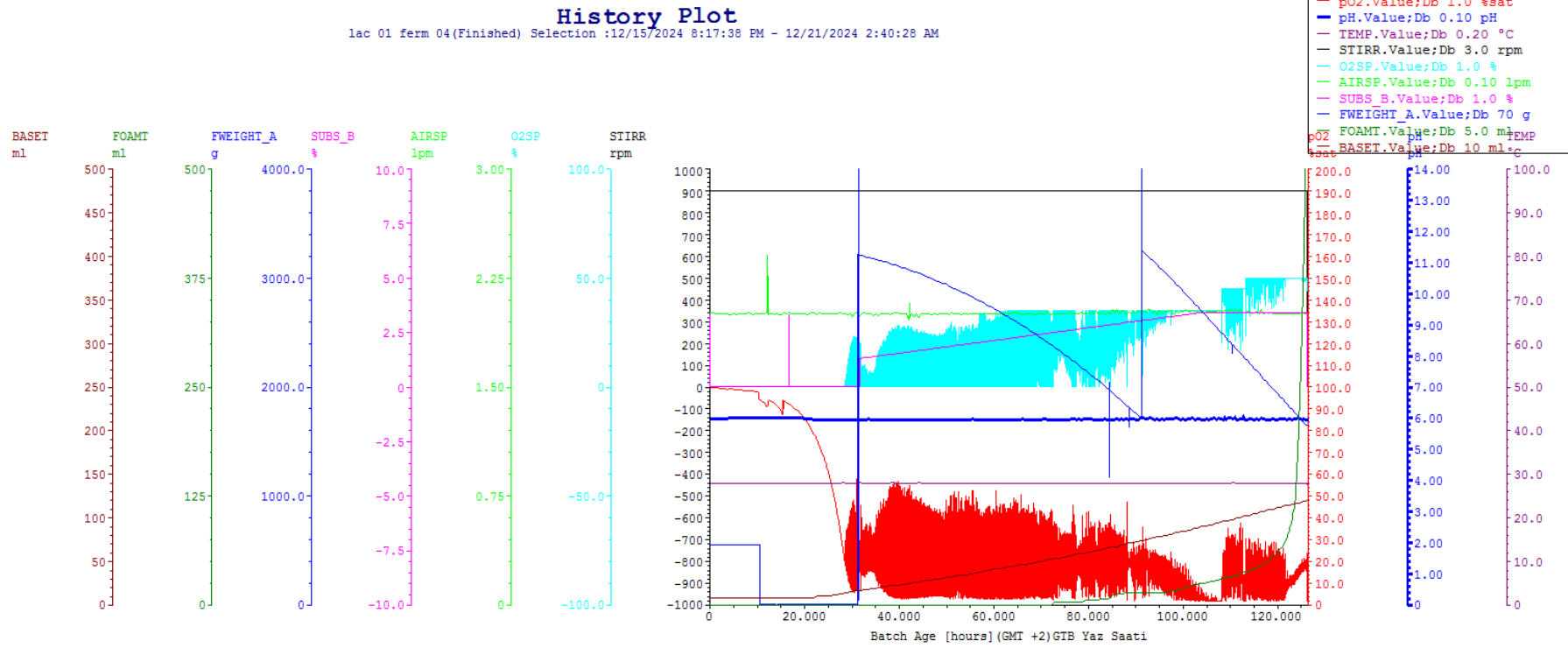


Şekil 4. 15. pSNT5α-Lac #1 MK115 (PDI) klonu kullanılarak farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretilere ait enzim aktivitesi miktarları

4.7. Biyoreaktörde Laktaz Enzimi Üretimi

Biyoreaktör üretimi için pSNT5 α -Lac#1 MK115 (PDI) klonu seçilerek optimum koşullar olarak belirlenen 28°C ve pH 6 koşullarında üretimler yapılmıştır. Biyoreaktör üretimleri sırasında bir standart sağlanması için daha önceden oluşturulan hücre bankası kullanılmıştır. Fermantasyonlar 5 L Biostat B (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) biyoreaktöründe FM22 Media kullanılarak iki aşamalı olarak kesikli ve yarı kesikli faz olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Besleme solüsyonu olarak %50 gliserol %10 etanol kullanılmıştır. Erlenmayer koşullarında optimum pH değeri 7.0 olarak belirlenmesine rağmen FM 22 besiyerinin kullanımında pH 7.0 değerinde tuzların çökmesi problemi ile karşılaşıldığı için ve başlangıçta pH 7.0 olarak ayarlanan kültür ortamının pH'ı 6.0'ya düştüğü gözlemlendiği için pH 6.0 ile devam edilmiştir.

Fermantasyon süresi boyunca ortam parametrelerinin değerleri sistem tarafından kayıt altına alınmıştır. Sistem tarafından otomatik olarak oluşturulan grafik (*history plot*) Şekil 4.16'da verilmiştir.



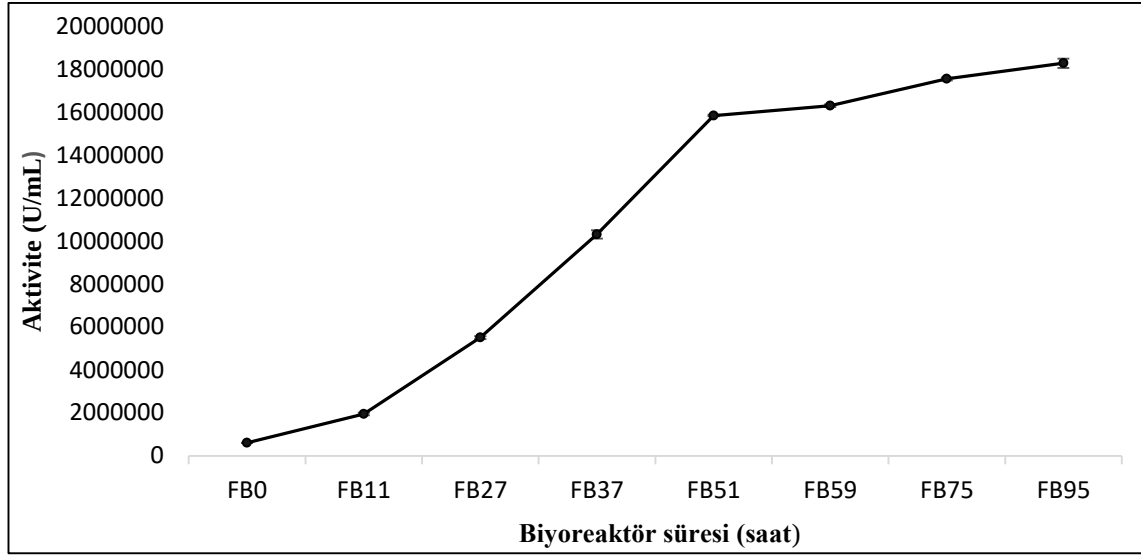
Şekil 4. 16. pSNT5 α -Lac #1 *P. pastoris* MK115 (PDI) klonuna ait fermentör üretimi kontrol parametreleri grafiği

Fermantasyon süresi boyunca ortamdan belirli aralıklarla alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı ölçülmüş daha sonra hücre süpernatantları alınmış, SDS-PAGE, toplam protein ölçümü ve enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır. 95 saat süren fermantasyon süresi boyunca enzim aktivitesi ve toplam protein miktarları artış göstermiştir. Biyoreaktör süreci boyunca alınan örneklerden yapılan SDS-PAGE analiz sonucu Şekil 4.17’te verilmiş olup 110 kDa büyüklüğündeki protein bandının yoğunluğunun fermantasyon boyunca zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür.

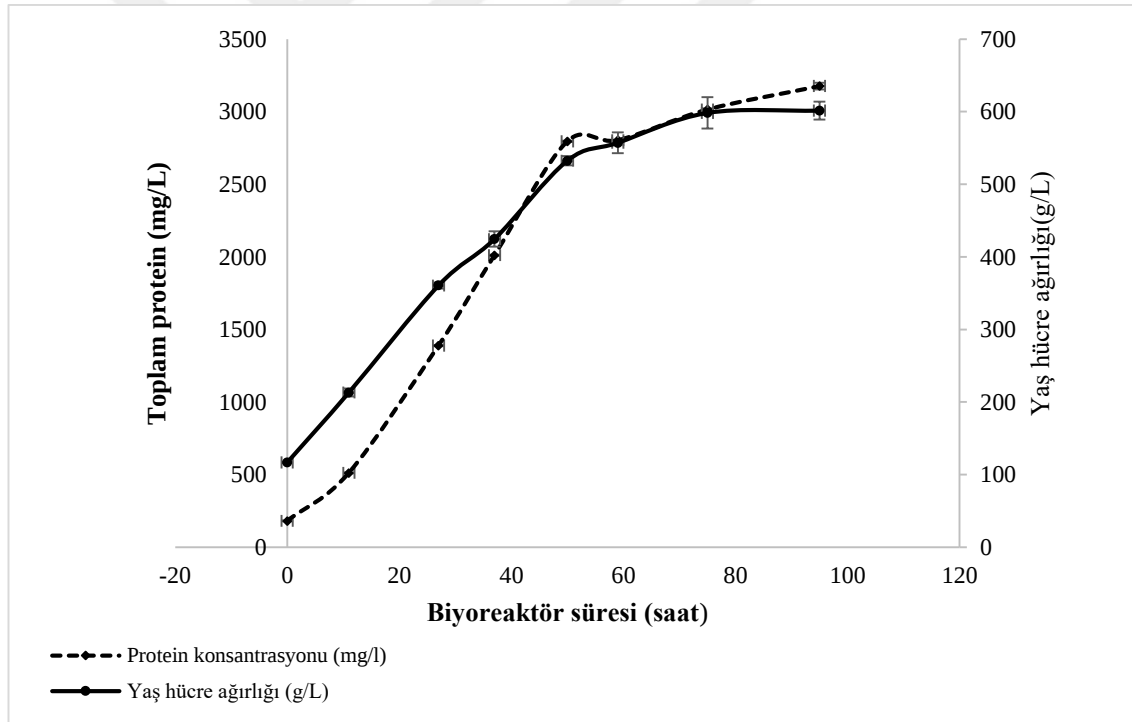


Şekil 4. 17. 5L’lik biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerde zamana bağlı alınan örneklere ait SDS-PAGE analizi

Fermantasyon sonucunda belirli aralıklarda alınan örneklerine ait enzim aktivitesi, sonucu Şekil 4.18’de, toplam protein ve yaş hücre ağırlıkları sonucu Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Enzim aktivite değerleri zamana bağlı olarak artmakla beraber en yüksek enzim aktivitesi 18,400,000 U/mL olarak hasat saati olan FB95 örneğinde tespit edilmiştir (Şekil 4.18.). Aynı örneklere ait yaş hücre ağırlığı ve toplam protein miktarları ölçüm sonuçları Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Hasat saatine ait FB95 örneğinde yaş hücre ağırlığı 601 g/L şeklinde ölçülmüşken, toplam protein miktarı ise 3176 mg/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 18. 5L'lik biyoreaktörde gerçekleştirilen üretilere ait enzim aktivitesi değerleri



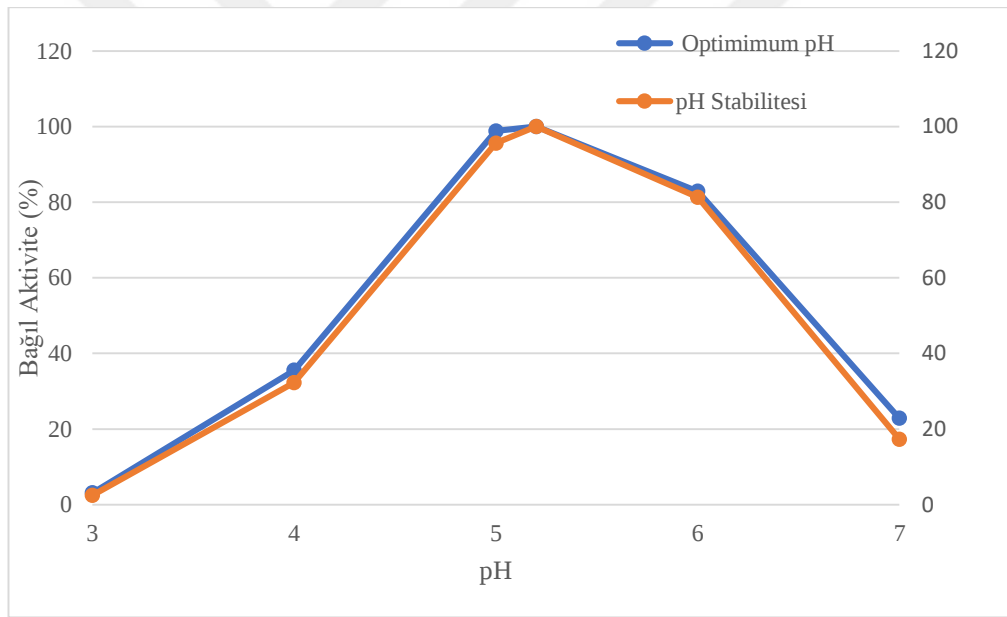
Şekil 4. 19. 5L'lik biyoreaktörde *SNT5* promotörü kontrolü altında yapılan rekombinant laktaz ekspresyonunun toplam protein miktarı ve yaş hücre ağırlığı

4.8. Rekombinant Laktaz Enziminin Karakterizasyonu

4.8.1. Sıcaklık ve pH

Laktaz enzimin optimum pH değeri ve pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla karakterizasyon testleri bölüm 3.2.12’de belirtildiği şekilde 3.0-7.0 arası pH’larda 0.1 M sodyum asetat tamponu kullanılarak yapılmış ve grafiği çizilmiştir (Şekil 4.20.). Optimum pH değeri en yüksek aktivitenin görüldüğü değer olan 5.2 olarak belirlenmiştir. Laktaz enzimin en yüksek aktivite gösteren değeri (pH 5,2) 100 olarak alınmıştır. Optimum pH denemesinde pH 3.0’da %3, pH 4.0 %35, pH 5.0 %98, pH 6.0 %82, pH 7.0 %22 olarak gözlenmiştir.

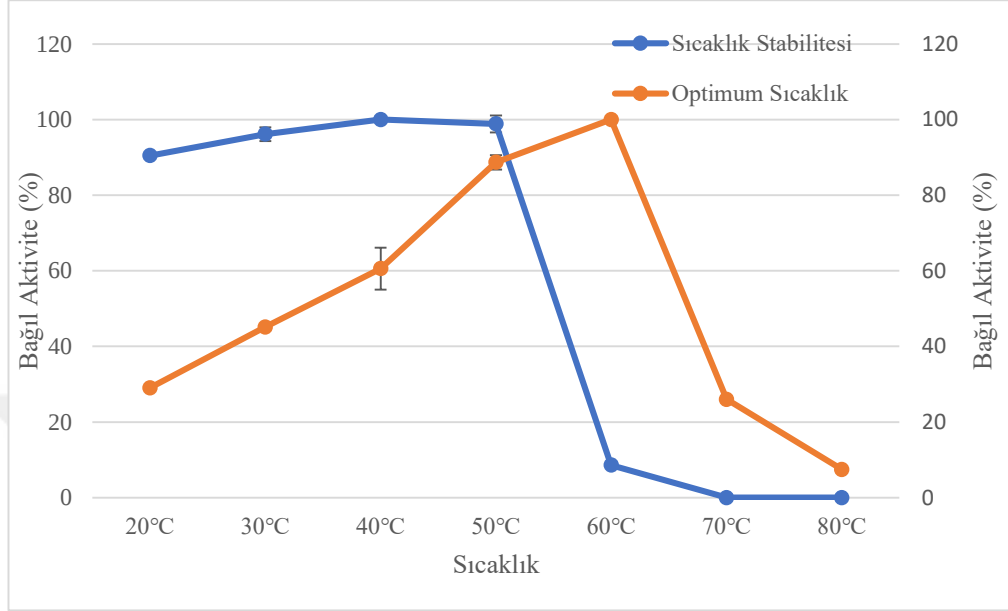
Laktaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla enzimler pH 3.0-7.0 değerleri arasındaki pH tamponları içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Sonrasında enzim aktivitesi uygulanmıştır. En yüksek pH stabilitesi gösteren değer 100 olarak alınmıştır. Maksimum enzim stabilitesi pH 5.2 olarak belirlenmiştir. pH 3.0 %2, pH 4.0 %32, pH 5.0 %95, pH 6.0 %81, pH 7.0 %17 enzim stabiliteğini koruduğu gözlenmiştir.



Şekil 4. 20. Laktaz enzimine ait optimum pH ve pH stabilitesi grafiği

Laktaz enzimin optimum sıcaklık değeri ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla karakterizasyon testleri bölüm 3.2.12’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Laktaz enzimin optimum pH değeri olan 5.2’de 20-80°C arası sıcaklıklardaki aktivite ölçülerek grafiği çizilmiştir (Şekil 4.21.). %100 aktivite değeri gösterdiği enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. Sıcaklık 60°C’ye kadar enzim aktivitesi artarken 60°C’den sonra hızla düştüğü gözlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde 20°C’de %29, 30°C’de %45, 40°C’de %60, 50°C’de %88 aktivite gözlenmiştir. 70°C’de %26 değer gözlenirken 80°C’de %7’ye düşmüştür.

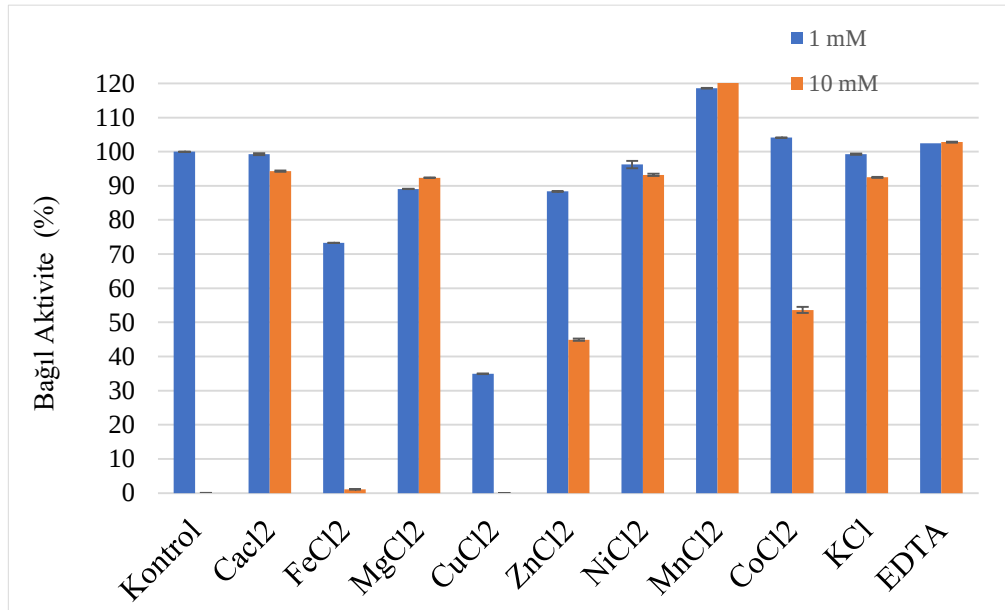
Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla 20-80°C sıcaklıklarda enzim 1 saat bekletildikten sonra enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesi 20°C’de %90 aktivitesi korunurken 30°C’de %96, 40°C’de %100, 50°C’de %98, 60°C’de %8 aktivite göstermiştir. 70°C ve 80°C’lerde inhibe olmuş aktivite göstermemiştir.



Şekil 4. 21. Sıcaklığın laktaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkileri

4.9. Metal İyonlarının Aktiviteye Etkisi

CaCl₂, FeCl₂, MgCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, NiCl₂, MnCl₂, CoCl₂, KCl metal iyonlarının ve EDTA 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında ortama eklenmesi sonucu elde edilen aktivite değerleri Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4. 22. Laktaz enzimi aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

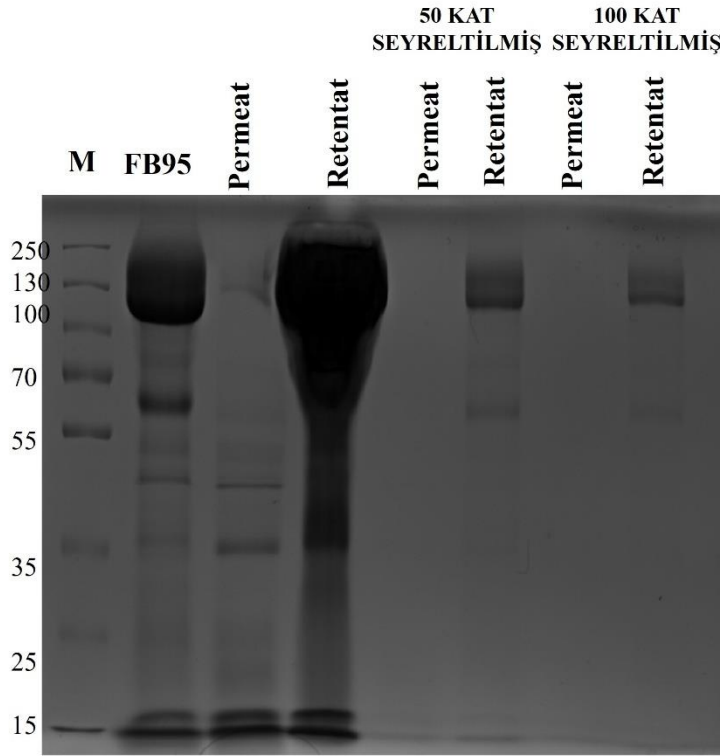
Kontrol grubunun %100 referans alınması durumunda, Ca^{+2} iyonunun 1mM konsantrasyonunda %99, 10 mM 'da %94 aktivite göstermiştir. Fe^{+2} iyonunun 1mM konsantrasyonunda enzim aktivitesi %73'e düşmüş 10 mM varlığında %1 aktivite göstermiş, neredeyse inhibe olmuştur. Mg^{+2} iyonunun 1mM varlığında %89, 10 mM 'da %92 aktivite gözlenmiştir. Cu^{+2} iyonunun 1mM konsantrasyonunda %34 aktivite verirken 10mM'da sıfıra inmiştir. Enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Zn^{+2} iyonunun 1 mM konsantrasyonunda %88, 10 mM 'da %44 aktivite göstererek yarıya inmiştir. Ni^{+2} iyonunun 1 mM konsantrasyonunda %96, 10 mM 'da %93 aktivite gözlenmiştir. Mn^{+2} iyonunun 1mM konsantrasyonunda %118, 10mM'da %124 aktivite göstererek artış gözlenmiştir. Co^{+2} iyonunda 1 mM konsantrasyonda %102, 10 mM 'da %53 aktivitesi göstermiştir. İyon konsantrasyonu arttıkça aktivite neredeyse yarıya inmiştir. K^{+} iyonunun 1mM 'da %99 10mM'da %92 aktivite göstermiştir. Konsantrasyon arttıkça enzim aktivitesi yavaş bir şekilde azalma eğilimindedir. EDTA iyonunda 1 ve 10 mM konsantrasyonda %102 aktivite göstermiştir. Enzimin stabil olduğunu göstermektedir. Özetle Fe^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} iyonlarının konsantrasyonları arttıkça laktaz enzimi aktivitesi inhibe ettiği gözlenmiştir. Özellikle Fe^{+2} metalinin 10 mM konsantrasyonu enzim aktivitesini durdurmaktadır. Mn^{+2} iyonunun enzim aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. EDTA sabit kalmıştır. Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} , K^{+} enzim aktivitesini kayda değer ölçüde değiştirmemiştir.

4.10. Biyoreaktör Süpernatantların Konsantre Hale Getirilmesi

Biyoreaktör üretimi sonucunda hasat edilen süpernatantlar, 50 kDa cut-off değerine sahip filtrasyon sistemlerinden geçirilerek 10 kat konsantre edilmiştir. Ardından, enzim aktivitesi tayininde kullanılan tampona aktarılmasını sağlamak amacıyla buffer exchange işlemi uygulanmıştır. Konsantrasyon işlemi sonrasında enzim aktivitesinde 5 kat, toplam protein miktarında ise 8.3 kat artış gözlenmiştir (Çizelge 4.1.). Konsantre edilen süpernatant örneğine ait SDS-PAGE analizi Şekil 4.23' de gösterilmiştir. Permeat kolonun gözenek çapını geçemeyen bileşenler retentat (üstte kalan kısım), geçebilenler ise permeat (alta geçen kısım) olarak tanımlanmaktadır.

Çizelge 4. 1. FB 95 ve konsantre edilmiş örneklerin enzim aktivitesi, toplam protein ve spesifik aktivite miktarları

	Ham Süpernatant	Konsantre Örnek
Aktivite (U/mL)	18,400,000	90,888,889
Toplam protein (mg/L)	3177	26539
Spesifik aktivite (U/mg)	5789	3426



Şekil 4. 23. Konsantre edilmiş süpernatantlara ait SDS-PAGE analizi (Permeat: Kolonun üstünde kalan kısım; retentat: kolonun altına geçen kısım M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD). Sırasıyla FB 95 hasat örneği, konsantre edilmiş permeat ve retentat, 50 ve 100 kat seyreltilmiş permeat ve retentat örnekleri 10 µl SDS-PAGE jeline yüklenmiştir.

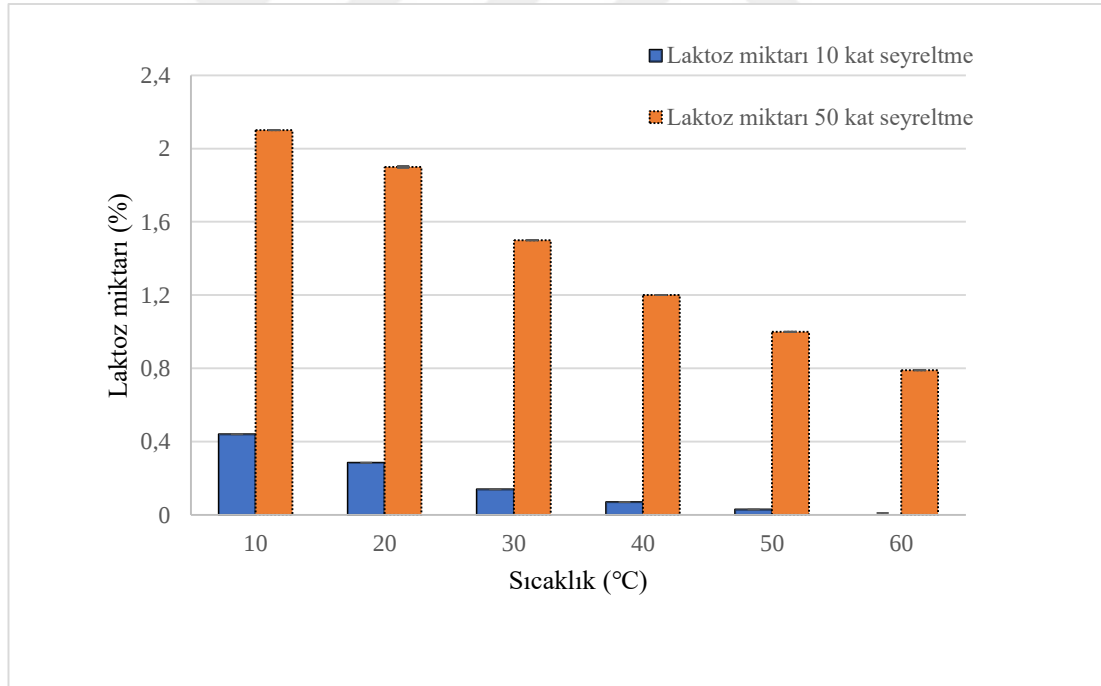
4.11. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizi

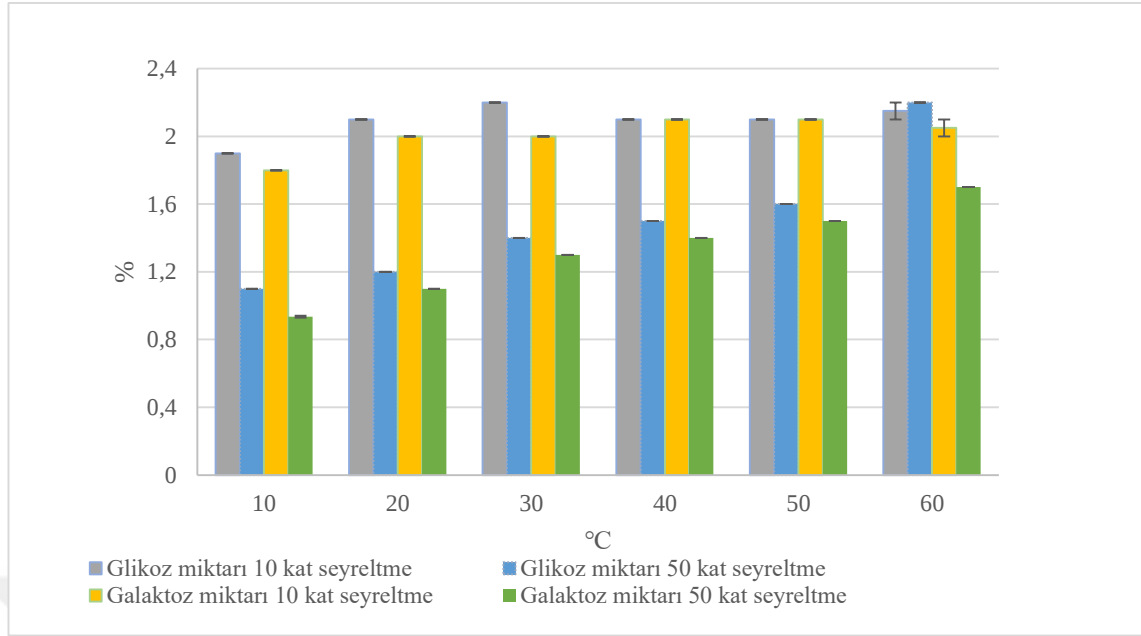
HPLC analizi sonucuna göre (α -Lactose monohydrate) laktoz çözeltisi yapılan analizde 60°C sıcaklıkta 10 kat seyreltmede laktozun tamamının parçalandığı görülmüştür. Çizelge 4.2’de yüzde olarak laktoz, glikoz, galaktoz miktarları verilmiştir. Laktozun parçalanması sonucu glikoz ve galaktoz oluşmaktadır. Veriler incelendiğinde laktoz miktarı azalırken glikoz ve galaktoz miktarı artmaktadır. Laktoz miktarı Şekil 4.24’te gösterilmiştir. Sıcaklık arttıkça parçalanarak laktoz miktarı artmıştır. 10 katta yapılan seyreltmede galaktoz oluşumu 50 kat seyreltmeye göre yaklaşık 2 kat fark göstermiştir. Laktoz miktarının (%) sıcaklık ile azalışı seyreltme oranı arttıkça laktozun miktarındaki artış azalmıştır. Laktoz miktarı 10°C 10 dakika inkübasyon süresinde %0.44 iken, 60°C’de tamamen parçalanmaktadır. Galaktoz ve glikoz miktarı sıcaklık arttıkça artmaktadır, 10 kat seyreltmede oluşan galaktoz miktarı daha fazladır (Şekil 4.25.).

Çizelge 4. 2.HPLC Analizi α -Lactose monohydrate çözeltisi numunesi hesaplama sonucu

Örnek	Glukoz	Galaktoz	Laktoz
Kontrol	< R.L.	< R.L.	4.1±0
10°C 10 kat seyreltme	1.9 ±0	1.8±0	0.44±0
10°C 50 kat seyreltme	1.1±0	0.935±0.005	2.1±0.005
20°C 10 kat seyreltme	2.1±0	2±0	0.285±0
20°C 50 kat seyreltme	1.2 ±0	1.1±0	1.9±0
30°C 10 kat seyreltme	2.1±0	2±0	0.14±0
30°C 50 kat seyreltme	1.4±0	1.3±0	1.5±0
40°C 10 kat seyreltme	2.2±0	2.1±0	0.07±0
40°C 50 kat seyreltme	1.5±0	1.4±0	1.2±0
50°C 10 kat seyreltme	2.1±0	2.1±0	0.03±0
50°C 50 kat seyreltme	1.6±0	1.5±0	1±0
60°C 10 kat seyreltme	2.15±0.05	2.05±0.05	< R.L.
60°C 50 kat seyreltme	1.8±0	1.7±0	0.79±0.01

Veriler g/100g için hesaplanmıştır.

**Şekil 4. 24. α -Lactose monohydrate çözeltisi laktoz miktarı (%) sıcaklık ve seyreltme oranı denemesine ait grafik**



Şekil 4. 25. α -Lactose monohydrate çözeltisi glikoz ve galaktoz miktarı (%) sıcaklık ve seyreltme oranı denemesine ait grafik

0.1 M sodyum asetat tamponu (pH 5.2) içerisinde hazırlanan α -laktose monohidrat çözeltisiyle yapılan reaksiyonlarda, enzimin laktozu hidrolize edebildiği tespit edilmiştir. Süt örnekleriyle yapılacak enzimatik analizlerde, enzim aktivitesinin biyolojik olarak uygun koşullarda değerlendirilmesi amacıyla 37 °C inkübasyon sıcaklığı seçilmiştir. Ayrıca, ölçüm doğruluğunu sağlamak için seyreltme oranı en az 10 kat olarak belirlenmiştir.

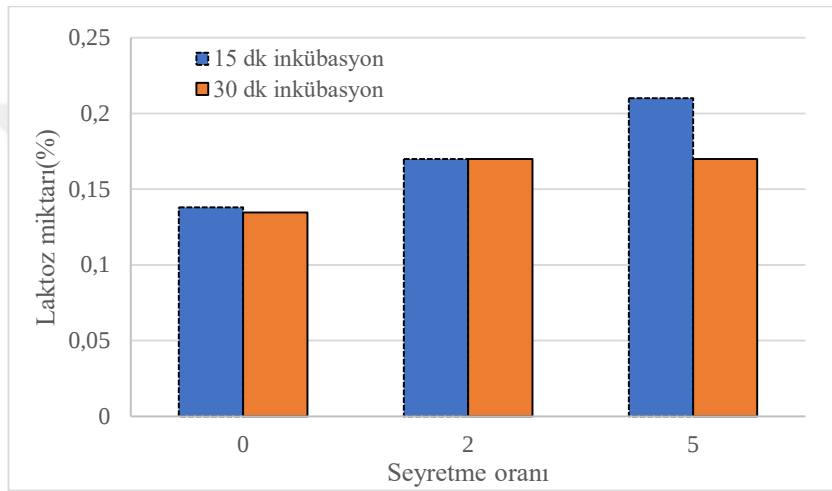
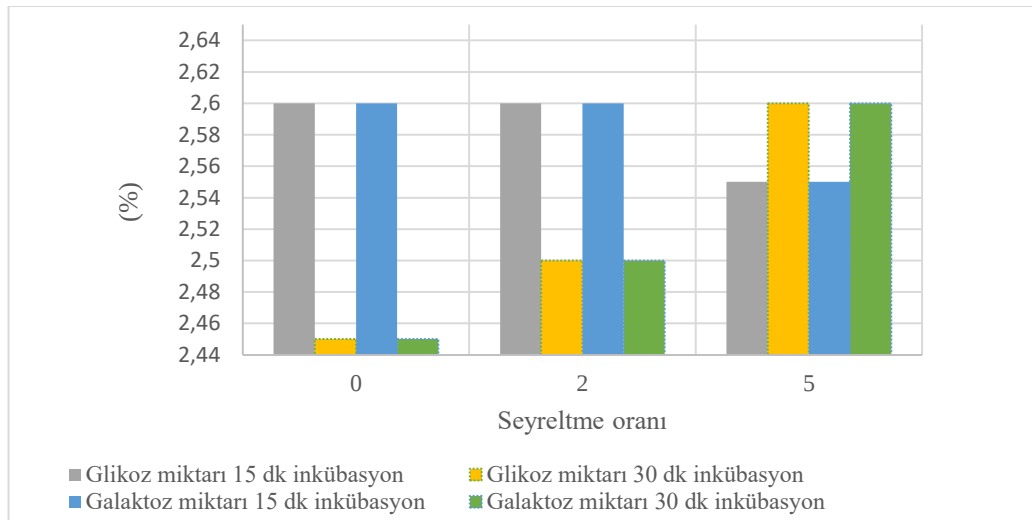
Sütte yapılan analizlerde 37°C’de seyreltilmemiş, 2 ve 5 kat seyreltilmiş enzim eklenerek 15 ve 30 dk süre denemesi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.2’de yüzde olarak hesaplama sonucu verilmiştir. Glikoz, galaktoz ve laktoz miktarları hesaplanmıştır. Sütün pH değeri 6,6 değerinde ürettiğimiz laktaz enzimi %56 aktivite göstermektedir. pH 5.2 tampon çözeltisi ile hazırlanan α -Lactose monohydrate değerlerinden farklılık göstermektedir.

Sütte yapılan analizlerde 37°C’de seyreltilmemiş, 2 ve 5 kat seyreltilmiş enzim eklenerek 15 ve 30 dk süre denemesi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.3’te yüzde olarak hesaplanan glikoz, galaktoz ve laktoz değerleri verilmiştir. Şekil 4.26’da laktoz miktarı grafik olarak verilmiştir. Laktoz miktarı azalırken glikoz ve galaktoz miktarı artmıştır (Şekil 4.27.). 15 dk ile 30 dk inkübasyon süresi arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. 37°C’ 15 dk inkübasyonda laktoz miktarı %0.2 olarak gözlenmiştir.

Çizelge 4. 3. HPLC analizi süt numunesi hesaplama sonucu

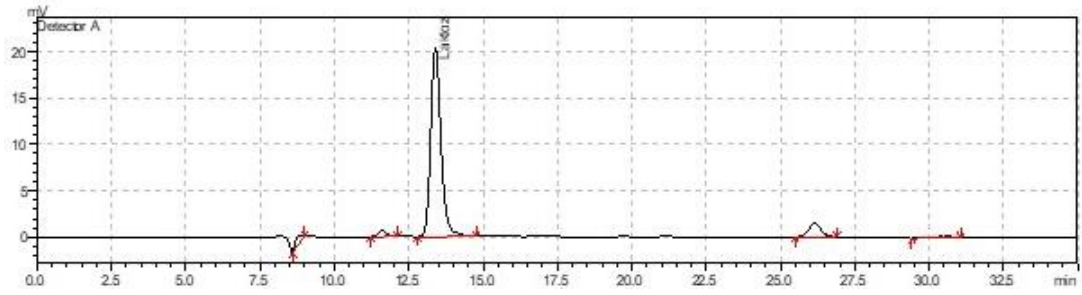
Örnek	Glukoz	Galaktoz	Laktoz
Kontrol	< R.L.	< R.L.	5
37°C 15 dk seyreltilmemiş	2.6±0	2.6±0	0.138±0.001
37°C 30 dk seyreltilmemiş	2.45±0,05	2.45±0.05	0.1345±0.0005
37°C 15 dk 2 kat seyreltme	2.6±0	2.6±0	0.17±0
37°C 30 dk 2 kat seyreltme	2.5±0	2.5±0	0.17±0
37°C 15 dk 5 kat seyreltme	2.55±0,05	2.55±0.05	0.21±0.01
37°C 30 dk 5 kat seyreltme	2.6±0	2.6±0	0.17±0

Veriler g/100g için hesaplanmıştır.

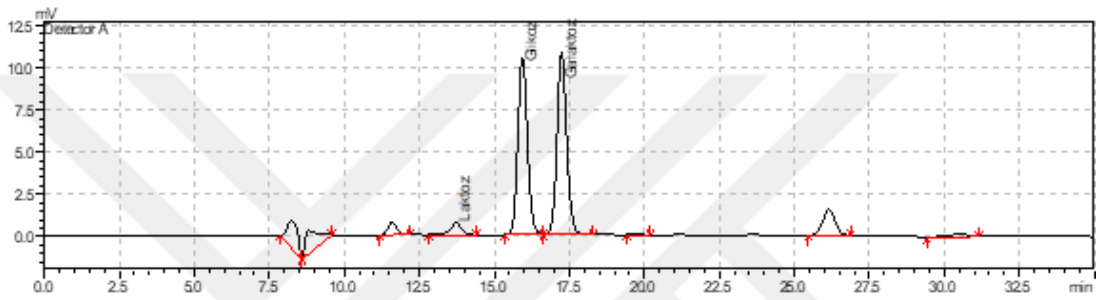
**Şekil 4. 26.** Sütte 37°C’de laktoz miktarı (%) ait grafik**Şekil 4. 27.** Sütte 37°C’de glikoz ve galaktoz miktarı (%) ait grafik

HPLC analizi kromatogram görselleri süt kontrol örneği Şekil 4.28, süt 37°C’de 15 dk inkübasyon 5 kat seyreltme örneği HPLC kromatogram görseli Şekil 4.29, α-Lactose monohydrate çözeltisi kontrol örneği HPLC kromatogram görseli Şekil 4.30, α-

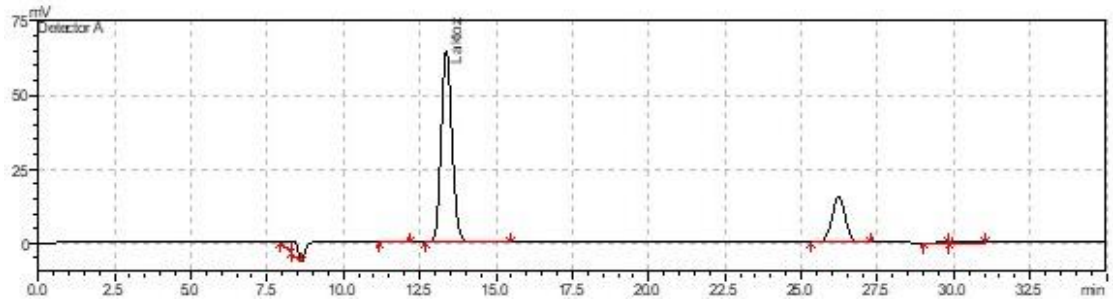
Lactose monohydrate çözeltisi 60°C’de 10 kat seyreltme örneği HPLC kromatogram görseli Şekil 4.31’de gösterilmiştir.



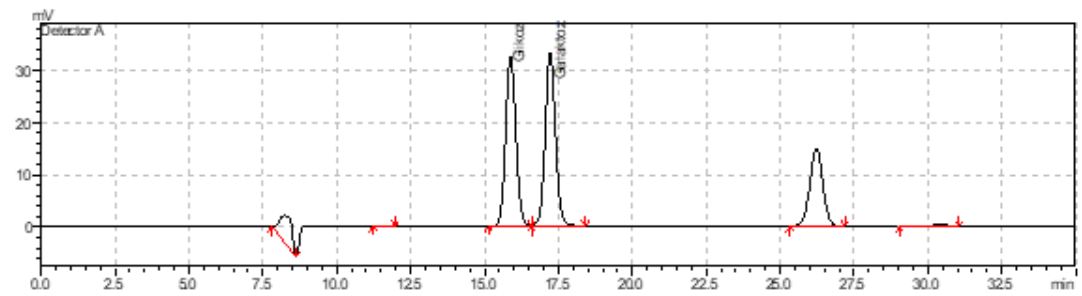
Şekil 4. 28. Süt kontrol örneği HPLC kromatogram görseli



Şekil 4. 29. Süt 37°C’de 15 dk inkübasyon 5 kat seyreltme örneği HPLC kromatogram görseli



Şekil 4. 30. α -Lactose monohydrate çözeltisi kontrol örneği HPLC kromatogram görseli



Şekil 4. 31. α -Lactose monohydrate çözeltisi 60°C’de 10 kat seyreltme örneği HPLC kromatogram görseli

5. TARTIŞMA

Laktaz enzimi gıda sanayisinde özellikle süt sektöründe sıklıkla kullanılan bir enzimdir. Özellikle laktoz intoleransı olan bireylerin laktozsuz süt ve süt ürünlerine ulaşımında bu enzim önem arz etmektedir. Gıda sanayisinde kullanılan birçok enzimde olduğu gibi laktaz enzim üretiminde de rekombinant DNA teknolojisi kullanımı ile enzimlerin yüksek verimde laboratuvar koşullarında üretimi mümkündür.

Bu tez kapsamında gıda sanayisinde kullanılan laktaz enzimini *P. pastoris* MK115 (PDI) suşunda bir *ADH* promotorunun yeniden tasarlanması ile elde edilen sentetik *SNT5* promotoru kontrolünde yüksek miktarda üretilerek, hücre dışına salgılanması şeklinde üretimi amaçlanmıştır. *P. pastoris*'te *SNT5* promotoru altında laktaz üretiminin ilk kez yapıldığı bu çalışmada gen kaynağı olarak *A. oryzae* laktaz geni kullanılmış, *P. pastoris*'in diğer promotorlarına kıyasla daha güçlü olduğu bilinen *SNT5* promotoru kontrolünde *P. pastoris* MK115 (PDI) suşunda protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

Klonlama çalışmaları sonucunda oluşturulan #1 numaralı klon ile engelli erlenmayer ölçeğinde, 28°C, pH 6.0 ve 225 rpm koşullarında, her 12 saatte %1 etanol ile indüklenerek laktaz enzimi üretilmiştir. Hücre dışına sekresyon şeklinde gerçekleştirilen 120 saatlik üretimde laktaz aktivitesi 6,800,000 U/mL ve protein konsantrasyonu 512 mg/L olarak tespit edilmiştir. Aynı koşullar altında, 5 L hacimli biyoreaktörde yapılan 95 saatlik üretimde ise enzim aktivitesinin fermantasyon süreci boyunca sürekli artış gösterdiği ve en yüksek aktivitenin 95. saatte 18,400,000 U/mL olduğu tespit edilmiştir. Hasat saatine ait örnekte toplam protein miktarının 3177 mg/L'ye ulaştığı görülmüşken yaş hücre ağırlığı 601 g/L±12 olarak hesaplanmıştır. Biyoreaktör üretimi ile enzim aktivitesinin yaklaşık 3 kat arttığı gözlemlenmiştir. Biyoreaktör üretimine ait süpernatant örneği 50kDa kolon ile konsantre edildikten sonra enzim aktivitesi miktarı 90,888,889 U/mL; toplam protein miktarı ise 26539 mg/L olarak hesaplanmıştır. Konsantrasyon işleminden sonra enzim aktivitesi miktarında yaklaşık 5 kat; toplam protein miktarında 8.3 kat artış gözlenmiştir.

P. pastoris SMD1168H suşunda kodon optimize *Aspergillus oryzae* β -galaktosidaz enzimini *GAP* promotoru kontrolünde rekombinant olarak üretimi yapılmıştır (Zhao vd., 2014). 50 L'lik biyoreaktörde 96 saat boyunca yapılan fermantasyon sonucunda enzim aktivitesi değeri 4239.07 U/mL, toplam protein 7.267 g/L olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE analizi ile yaklaşık 120 kDa büyüklüğüne sahip protein olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda aynı gen kaynağının kullanımı ile tarafımızca yapılan bu tez çalışmasından elde edilen 18,400,000 U/mL aktivite değeri ile ilgili çalışmaya göre 4340 kat daha fazla enzim aktivitesi elde edilmiştir. Yine aynı yapısal *GAP* promotorun kullanımı ile Li vd., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada *P. furiosus* gen kaynaklı β -galaktosidaz geni (*CelB*) pGAPZ α A vektörüne klonlanmış ve *P. pastoris* X-33 suşuna transforme ederek enzim üretilmiştir. 5 L'lik fermentörde 120 saat yaptıkları fermantasyonda enzim aktivitesi 271 U/mL olarak hesaplanmış olup çalışma sonuçlarımıza göre oldukça düşük seviyelerde kalmaktadır.

İndüklenebilen bir promotor olan *AOXI* promotoru kontrolünde Nie vd.,(2013) tarafından yapılan bir çalışmada *L. crispatus* B470 kaynaklı β -galaktosidaz enziminin *P. pastoris* GS115 suşunda 2 L'lik bir biyoreaktörde yarı kesikli üretim gerçekleştirilmiştir.

Enzim aktivitesi 24.52 ± 1.16 U/mL olarak bulunmuş olup *SNT5* promotoruna göre bir hayli düşük seviyelerde kalmıştır.

Sun vd., (2017) *Aspergillus oryzae* ve *Kluveromyces lactis* gen kaynağı olarak kullanılmış olup *P. pastoris* GS115 suşunda *AOX1*, *SDH* ve *TEF1 GAP* promotorları kontrolünde β -galaktosidaz üretimi yapılmıştır. 1 L' lik fermentör üretiminde 96 saatlik üretim sonucunda ise 1434.75 U/mL olarak hesaplanmıştır.

Shi vd., (2022) tarafından yapılan çalışmada *A. oryzae* gen kaynağı seçilen kodon optimize *lacA* enziminin *AOX1* promotoru altında *P. pastoris* X33 suşunda üretimi yapılmış ve 185,52 U/mg enzim aktivitesi değeri elde edilmiştir. Miao vd. (2024) tarafından yapılan çalışmada laktozsuz ve şeker ilavesiz yoğurt yapmak için *A. oryzae*'den β -galaktosidaz enzimi *AOX1* promotoru kontrolünde *P. pastoris* GS115 suşunda üretilmiştir. pPIC9K- AoBgal35A kullanılarak üç mutant klon (T955A-AoBgal35A, T955R-AoBgal35A, T955W-AoBgal35A) oluşturulmuştur. Seçilen T955R-AoBgal35A klonu ile 5 L'lik biyoreaktörde 168 saatlik üretim gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süpernatantının protein içeriği ve β -galaktosidaz aktivitesi, sırasıyla 20 mg/mL ve 4.528 U/mL bulunmuştur. SDS-PAGE analizi sonucunda fermantasyon süpernatantındaki T955R-AoBgal35A'ya karşılık gelen 110 kDa'da bir protein bandı tespit edilmiş ve fermantasyon süresiyle artışı gözlemlenmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında SDS-PAGE analizinde beklenen bant değeri 110 kDa büyüklüğünde olup beklenen bant gözlenmiştir. Literatüre baktığımızda 100 -120 kDa bant aralığında bant gözlenmiştir. Aynı gen kaynağını kullandığımız Shi vd., (2022) tarafından yapılan çalışmada 120 kDa protein bandı tespit etmiştir.

Yukarıdaki çalışmalar incelendiğinde farklı gen kaynaklı laktaz enziminin farklı promotorlardan ve farklı konak hücrelerde rekombinant üretimine ait birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak üretim miktarlarına bakıldığında 271 U/mL-4528 U/mL aralığında enzim aktiviteleri elde edilmiş olup tarafımızca yapılan üretimlerde 18,400,000 U/mL değeri ile yaklaşık 4000 kat daha fazla protein üretimi tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak kullanılan *SNT5* promotorun, promotör üzerindeki aktivatör ve represör bölgelerinin yeniden düzenlenmesi diğer promotorlara göre daha güçlü olması, *Pichia pastoris* MK115 (PDI) suşunun olabileceği düşünülmektedir (Erden Karaoğlu-2022). Ayrıca üretim koşullarının kısmi olarak optimizasyonu ile de enzim üretim miktarının artırılmış olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında enzimin optimum çalışma koşulları (sıcaklık ve pH) belirlenerek kısmi olarak karakterizasyonu yapılmıştır. Bu tez kapsamında yapılan optimum pH analizinde 60°C'de pH 3.0-7.0 aralığı denenmiştir. Enzimin optimum pH değeri 5.2 olarak bulunmuştur. pH 3.0 değerinde %3 aktivite gösterirken pH 4.0 değerinde %35, pH 5.0' da %98 aktivite göstermektedir. pH 5.2 değerinden sonra düşüş görülmektedir. pH 6.0 değerinde %88 aktivite gösterirken pH 'da %22'ye düşmektedir. pH stabilitesi optimum pH değerleri ile doğru orantılı olarak artıp azalmaktadır. Stabilite değeri pH 5.2'de en iyi aktivite değerine sahiptir. Sütün pH değeri 6.6'da ürettiğimiz rekombinant laktaz enzimi %56 aktivite göstermektedir. Enzimin optimum pH değeri 5.2 olarak bulunmuş olup bu bağlamda literatürle uyumludur. Maksimainen vd., (2013) yaptığı çalışmada laktaz enziminin optimum pH değerini 4,5; Bernal vd., (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada optimum pH değeri 6.0, Jeong vd., (2009)

tarafından yapılan çalışmada ise pH 6.5 değeri optimum olarak bulunmuştur. Bu açıdan değerlendirildiğinde laktaz enziminin en yüksek etkinlikte çalışabilmesi için ideal pH aralığının çalışma şartlarındaki farklılıklara bağlı olarak 4.5-6.5 aralığında olduğu görülmektedir. Tez kapsamında, tarafımızca bulunan sonuçlar literatüre uyum sağlamaktadır. Yapılan çalışmada maksimum enzim stabilitesi pH 5.2 olarak belirlenirken; pH 3.0 %2, pH 4.0 %32, pH 5.0 %95, pH 6.0 %81, pH 7.0 %17 enzim stabilitesini koruduğu gözlenmiştir. Literatüre bakıldığında Kittibunchakul vd., (2019) yaptığı çalışmada enzimin stabilitesinin en karalı olduğu aralığı pH 5.5-6.0 olarak bulmuştur. Xu vd., (2019) yaptığı çalışmada enzim 37 °C'de pH 5.0 ile 8.0 arasında 1 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesinin neredeyse tamamını korumuş, pH 4.0'un 0'ın altında veya pH 9.0'un üzerinde aktivitesini önemli bir şekilde kaybetmiştir. Bulunan sonuçlar literatür ile uyumludur.

Nie vd., (2013) yaptığı çalışmada optimum sıcaklık değerini 50°C olarak bulmuş, sıcaklık stabilitesi 20-30-40°C'de korunurken 50 ve 55°C'de aktivitesini kaybetmiştir. Mahdian vd. (2016) optimum sıcaklığı 55°C'de maksimum aktivite gösterirken Kittibunchakul vd., (2019) yaptığı çalışmada 60°C olarak bulunmuştur. Bu tez kapsamında yapılan çalışmada optimum sıcaklık değeri 60°C olarak bulunurken 50°C'de %98 enzim aktivitesi değeri hesaplanmıştır. Sıcaklık stabilitesi 20-30-40°C'de korunurken 60°C'de %8'e inmiştir, 70 ve 80°C'de inhibe olmuştur. Literatürle uyumlu veriler elde edilmiştir.

Metal iyonları etkisi değerlendirildiğinde Fe^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} iyonlarının konsantrasyonları arttıkça laktaz enzimi aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Özellikle Fe^{+2} metalinin 10 mM konsantrasyonu enzim aktivitesini durdurmaktadır. Mn^{+2} iyonunun enzim aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. EDTA sabit kalmıştır. Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} , K^{+} iyonlarının enzim aktivitesini kayda değer ölçüde değiştirmedığı gözlenmiştir. Nie vd., (2013) yaptığı çalışmada β -galaktosidaz aktivitesi Fe^{+2} ve Cu^{+2} varlığında büyük ölçüde inhibe olmuştur. Ni^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} ve Zn^{+2} metal iyonları enzim aktivitesini orta derecede inhibe ettiği ve 5 mM konsantrasyonunda Mn^{+2} , Mg^{+2} ve K^{+} enzim aktivitesini %20'den fazla arttırdığı gözlenmiştir. Xu vd., (2019) yaptığı çalışmada Cu^{+2} , Fe^{+2} enzimatik aktiviteyi %44 ila %65 oranında inhibe etmiştir. Diğer metal iyonları (K^{+} , Co^{+2} , Zn^{+2} ve Ni^{+2}) ve EDTA'nın aktivite üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında Fe^{+2} ve Cu^{+2} 'nin enzim aktivitesini inhibe ettiği Mn^{+2} 'nin enzim aktivitesini arttırdığı ve EDTA'nın sabit kalması literatür ile aynı sonuçları bulduğumuzu göstermektedir.

Zhao vd., (2014) yaptığı çalışmada HPLC analizi ile 100 mL sütte 1.000 U enzim ile 60 °C'de 24 saat içinde %92.44 laktoz parçalandığı ve enzim hidrolizi 37, 25 ve 10 °C'lik düşük sıcaklıklarda da gerçekleştiği gösterilmiştir.

Ürettiğimiz laktaz enziminin etkinliğinin test edilmesi amacıyla HPLC cihazı ile tez kapsamında üretilen belli oranda seyreltilmiş laktaz enzimi içeren α -Lactose monohydrate çözeltisi ve sütte laktoz miktarı belirlenmiştir. Laktaz enziminin laktozu parçalaması için optimum sıcaklık ve seyretme oranı denemeleri yapılmıştır. HPLC analizi sonucuna göre α -Lactose monohydrate çözeltisi yapılan analizde sıcaklık arttıkça laktozu parçalama oranı artmıştır. Kontrol örneğinde %4 laktoz bulunmaktadır. 10°C 10 kat seyreltme örneğinde laktoz miktarı %0,44, 20°C 10 kat seyreltme 0.285; 30°C'de %0.14; 40°C'de %0.07; 50°C'de %0.03 gözlenmiştir. Laktoz miktarı sıcaklık arttıkça

azalmaktadır. 60°C sıcaklıkta 10 kat seyreltmede laktozun tamamı parçalandığı görülmüştür. Aynı şekilde 10 °C 50 kat seyreltmede %2.1; 20°C’de %1.9; 30°C’de %1.5; 40°C’de %1.2; 50°C’de %1; 60°C’de %0.79 laktoz miktarı gözlenmiştir. α -Lactose monohydrate çözeltisinde yapılan analizden sonra sütte 37°C sıcaklık belirlenmiş Süre denemesi (15,30 dakika) ve seyreltme denemesi (seyreltilmemiş, 2 ve 5 seyreltilmiş) yapılmıştır. Süt denemesinde 37°C 15 dk seyreltilmemiş %0.138; 37°C 30 dk seyreltilmemiş %0.1345; 37°C 15 dk 2 kat seyreltme %0.17; 37°C 30 dk 2 kat seyreltmede %17; 37°C 15 dk 5 kat seyreltmede %0.21; 37°C 30 dk seyreltme 0.17 laktoz miktarı gözlenmiştir. Türkomp Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanına göre laktozsuz sütte laktoz miktarı en fazla %,0.22 olduğu bildirilmiştir. Bu değeri 37°C’de 15 dakika inkübasyon süresi ve 5 kat seyreltmede %0.2 laktoz miktarı ile sağlanmaktadır.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında laktaz enziminin etanol ile indüklenebilen SNT5 promotörü kontrolünde *P. pastoris*'te rekombinant olarak ilk kez üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda laktaz enziminin ekspresyonu, biyoreaktörde üretimi ve kısmi karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- *A. oryzae* gen kaynaklı laktaz enzimi sentetik olarak temin edilmiş olup SNT5 promotörüne klonlanarak ekspresyon vektörü oluşturulmuştur.
- pSNT5 α -Lac ekspresyon vektörünün *P. pastoris* MK115 (PDI) transformasyon sonucu iki adet maya klonu oluşturulmuştur. Oluşturulan klonlar ile erlenmayer ölçeğinde enzim üretimi gerçekleştirilmiş yapılan SDS-PAGE analizi sonucuna göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu için # 1 nolu klon üretim klonu olarak seçilmiştir.
- Laktaz enzimi ekspresyonun en yüksek olduğu parametreleri bulmak için farklı sıcaklık (20°C, 24°C ve 28°C) ve pH (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 değerlerinde BMEY besiyerinde üretimler yapılmıştır. Analizler sonucunda 28°C'de, pH 7.0 koşullarının ideal şartlar olduğu belirlenmiştir. Ancak pH 7.0 değeri enzimin glikozilasyona uğramasından dolayı ve fermentör üretimi sırasında yüksek pH değerinde besiyeri içindeki tuzların presipitasyona uğramasından dolayı biyoreaktör üretimi için seçilmemiş pH 6.0 optimum pH olarak belirlenmiştir.
- Optimum pH denemesinde #1 numaralı klonda pH 7,0, 24°C, 225 rpm koşullarında, 72.saat boyunca, %1 etanol ile indüklenerek en yüksek enzim aktivitesi 5,866,667 U/mL ve toplam protein 974 mg/L olarak bulunmuştur. Sıcaklık denemesinde #1 numaralı klonda pH 6.0, 28°C'de 120.saatte en yüksek enzim aktivitesi 6,800,000 U/mL ve toplam protein 512 mg/L olarak bulunmuştur.
- Biyoreaktörde üretim için ideal koşullar olan pH 6 ve 28 °C şartlarında FM22 besiyeri kullanılarak fermentasyon 95 saat boyunca sürdürülmüştür. Enzim aktivitesi 95.saate kadar artmaya devam etmiş olmasına rağmen biyoreaktör haznesinin dolmasından dolayı fermentasyon sonlandırılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi FB95 hasat örneğinde 18,400,000 U/mL, 3177 mg/L toplam protein değeri olarak tespit edilmiştir.
- Rekombinant laktaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı 60°C ve optimum pH değeri 5.2 olarak belirlenmiştir. Sıcaklık stabilitesi 50°C'de %98 iken 60°C'de %8'e inmekte, 70°C'de ise tamamen kaybolmaktadır. pH stabilitesi pH 3,0'dan 5,2'ye kadar artmakta 5,2'de maksimum değer görülmektedir. pH 6.02'de %81 değeri gözlenirken pH 7,0 değerinde düşerek %17 değeri gözlenmektedir.

- Metal iyonları etkisine bakıldığında ise Fe^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} iyonları laktaz enzimi aktivitesi inhibe ettiği, Mn^{+2} ise %14 arttırdığı gözlenmiştir. EDTA'nın etkisinin olmadığı Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} , K^{+} iyonlarının ise enzim aktivitesini kayda değer ölçüde değiştirmediği gözlenmiştir.
- Fermentör örneklerinin konsantre hale getirilmesi için 50 kDA cut off değerlikli filtreler kullanılmıştır. Laktaz enzimin stabilitesini koruması için sodyum asetat tamponu ile tampon değişimi işlemi yapılmıştır. Konsantre edilen örneğin enzim aktivitesi 90,888,889 U/mL, toplam protein miktarı 26539 mg/L olarak gözlenmiştir. Enzim aktivitesi miktarı 5 kat artırılmışken toplam protein miktarı ise 8.3 kat artmıştır.
- HPLC analizi sonucuna göre α -Lactose monohydrate çözeltisinde yapılan analizde 60°C sıcaklıkta 10 kat seyreltmede laktozun tamamı parçalandığı görülmüştür. 30°C 50 kat seyreltmede %1.5 laktoz miktarı gözlenmiştir. Süt denemesinde 37°C'de 15 dakika inkübasyon süresi ve 5 kat seyreltmede %0.2 laktoz miktarı gözlenmiştir. Türkomp Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı'na (2025) göre laktozsuz sütte laktoz miktarı en fazla %0.22 bildirilmiştir.

Bu çalışma ile rekombinant protein üretiminde, üretim dizaynı yapılırken önemli olan parametrelerden kodon optimizasyonunun yapılması (kodon optimize sentetik gen dizaynı), uygun promotor (*SNT5*) ve sekresyon sinyalinin(a-mating) seçimi, uygun konak hücre MK115 (PDI) seçimi ile ekspresyon vektörü dizaynı seviyesinde bir optimizasyon yapılmıştır. Daha sonrasında ise seçilen üretici klon ile erlenmayer koşullarında (sıcaklık ve pH) optimizasyon yapılmış ve erlenmayerde kontrol edilemeyen şartların biyoreaktör ölçeğinde kontrolü ile biyoproses optimizasyonu kısmen tamamlanmıştır. Böylece uygun ekspresyon vektörü dizaynındaki ideal kombinasyonlar ile, biyoproses dizaynı ile yapılan optimizasyonlar birleştirilerek en yüksek üretici klon ile en ideal koşullarda enzim üretimi yapılmıştır. Bu sayede süt endüstrisinde önemli bir kullanım alanı bulan laktaz enzim üretimi için bir maya klonu geliştirilmiş ve üretim koşulları kısmi olarak karakterize edilerek bazı biyoproses verileri elde edilmiştir.

7. KAYNAKLAR

- Adam, A. C., Rubio-Teixeira, M., & Polaina, J. (2004). Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(7-8), 553-557.
- Anonim 1: Türkomp Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı. (2025). https://turkomp.tarimorman.gov.tr/component_result-laktoz-8 [Son erişim tarihi: 26.05.2025].
- Bernal, C., Sierra, L., & Mesa, M. (2012). Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 84, 166-172.
- Brandão, R. L., Nicoli, J. R., & de Souza Figueiredo, A. F. (1987). Purification and characterization of a β -galactosidase from *Fusarium oxysporum* var. lini. *Journal of dairy science*, 70(7), 1331-1337.
- Cereghino, G. P. L., & Cregg, J. M. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current opinion in biotechnology*, 10(5), 422-427.
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000a). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 45-66.
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000b). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45-66.
- Chang, A. Y., Chau, V., Landas, J. A., & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1(22-25).
- Cooper, M. A., & Zhou, R. (2013). β -Galactosidase staining of LacZ fusion proteins in whole tissue preparations. *Neural Development: Methods and Protocols*, 189-197.
- Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., & Chappell, T. (2009). Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in enzymology*, 463, 169-189.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., & Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/technology*, 11(8), 905-910.
- Daly, R., & Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 18(2), 119-138.

- Damin, B. I. S., Kovalski, F. C., Fischer, J., Piccin, J. S., & Dettmer, A. (2021). Challenges and perspectives of the β -galactosidase enzyme. *Applied microbiology and biotechnology*, 105, 5281-5298.
- Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N., & Fox, M. (2015). Lactose intolerance in adults: biological mechanism and dietary management. *Nutrients*, 7(9), 8020-8035.
- Domingues, L., Lima, N., & Teixeira, J. A. (2005). *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1151-1154.
- Duman-Özdamar, Z. E., & Binay, B. (2021). Production of industrial enzymes via *Pichia pastoris* as a cell factory in bioreactor: current status and future aspects. *The protein journal*, 40(3), 367-376.
- El-Gindy, A. (2003). Production, partial purification and some properties of β -galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. *Folia Microbiologica*, 48, 581-584.
- 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. *Biotechnology Journal*, 17(2), 2100332.
- Fox, P. F. (2008). Milk: an overview. Milk proteins, 1-54.
- Fraissl, L., Leitner, R., & Missbichler, A. (2011). Novel formulation of neutral lactase improves digestion of dairy products in case of lactose intolerance. *Clinical and Translational Allergy*, 1(1), 104.
- Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18(7), 685-694.
- Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375-384.
- Hamilton, S. R., Davidson, R. C., Sethuraman, N., Nett, J. H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T. A., Li, H., Choi, B.-K., Hopkins, D., Wischnewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R. R., Hoopes, J., Wildt, S., & Gerngross, T. U. (2006). Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313(5792), 1441-1443.
- Harju, M., Kallioinen, H., & Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22(2), 104-109.
- Harsa, H. Ş., Türkel, S., Hamamcı, H., Gürakan, C., Göksungur, M. Y., Tarı, C., & Aydın, A. C. (2008). Süt ürünlerimizden izole edilen mikroorganizmalardan laktaz enzimi üretimi, saflaştırılması ve immobilizasyonu.

- He, H., Zhang, X., & Sheng, Y. (2014). Enteric-coated capsule containing β -galactosidase-loaded polylactic acid nanocapsules: enzyme stability and milk lactose hydrolysis under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Dairy Research*, 81(4), 479-484.
- Higgins, D. R., & Cregg, J. M. (1998a). Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia protocols*, 1-15.
- Higgins, D. R., & Cregg, J. M. (1998b). Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia protocols*, 1-15.
- Horner, T. W., Dunn, M. L., Eggett, D. L., & Ogden, L. V. (2011). β -Galactosidase activity of commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3242-3249.
- Inan, M., & Meagher, M. M. (2001). *Pichia pastoris*'in alkol oksidaz (AOX1) promotörü için baskılamayan karbon kaynakları. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), 585-589.
- Jeong, J. K., Kwon, O., Lee, Y. M., Oh, D.-B., Lee, J. M., Kim, S., Kim, E.-H., Le, T. N., Rhee, D.-K., & Kang, H. A. (2009). Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* BgaC protein as a novel surface β -galactosidase with specific hydrolysis activity for the Gal β 1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides. *Journal of bacteriology*, 191(9), 3011-3023.
- Jung, S.-J., & Lee, B.-H. (2008). Production and Application of Galacto-oligosaccharides from Lactose by a Recombinant β -Galactosidase of *Bifidobacterium infantis* Overproduced by *Pichia pastoris*. *Food Science and Biotechnology*, 17(3), 514-518.
- Karaoglan, M., Karaoglan, F. E., & Inan, M. (2016a). Comparison of *ADH3* promoter with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 121, 112-117.
- Karaoglan, M., Karaoglan, F. E., & Inan, M. (2016b). Functional analysis of alcohol dehydrogenase (ADH) genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 38, 463-469.
- Karbalaee, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), 5867-5881.
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International journal of genomics*, 2016(1), 2405954.
- Kiernan, J. (2007). Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes. *Biotechnic & Histochemistry*, 82(2), 73-103.

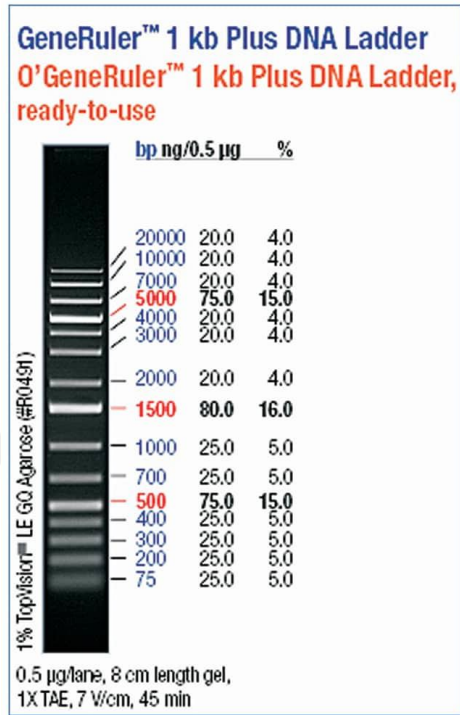
- Kittibunchakul, S., Pham, M. L., Tran, A. M., & Nguyen, T. H. (2019). β -Galactosidase from *Lactobacillus helveticus* DSM 20075: biochemical characterization and recombinant expression for applications in dairy industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 947.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A., & Killian, D. J. (2018). *Concepts of genetics* (12th ed.). Pearson Education.
- Kuchay, R. A. H. (2020). New insights into the molecular basis of lactase non-persistence/persistence: A brief review. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 14(1), 1-7.
- Kurtzman, C. P. (2009). Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1435.
- Li, B., Wang, Z., Li, S., Donelan, W., Wang, X., Cui, T., & Tang, D. (2013). Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *BMC biotechnology*, 13, 1-10.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 142, 105-124.
- Lule, V. K., Garg, S., Tomar, S. K., Khedkar, C. D., & Nalage, D. N. (2016). Food intolerance: lactose intolerance.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270.
- Mahdian, S. M. A., Karimi, E., Tanipour, M. H., Parizadeh, S. M. R., Ghayour-Mobarhan, M., Bazaz, M. M., & Mashkani, B. (2016). Expression of a functional cold active β -galactosidase from *Planococcus* sp-L4 in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 125, 19-25.
- Maksimainen, M. M., Lampio, A., Mertanen, M., Turunen, O., & Rouvinen, J. (2013). The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 109-115.
- McClafferty, H. (2017). *Integrative pediatrics: Art, science, and clinical application*. Routledge.
- Miao, M., Li, S., Yang, S., Yan, Q., Xiang, Z., & Jiang, Z. (2024). Engineering the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for making lactose-free and no-sugar-added yogurt. *Journal of Dairy Science*, 107(9), 6602-6613.

- Misselwitz, B., Butter, M., Verbeke, K., & Fox, M. R. (2019). Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*, 68(11), 2080-2091.
- Nie, C., Liu, B., Zhang, Y., Zhao, G., Fan, X., Ning, X., & Zhang, W. (2013). Production and secretion of *Lactobacillus crispatus* β -galactosidase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 92(1), 88-93.
- Oak, S. J., & Jha, R. (2019). The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(11), 1675-1683.
- Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(4), 530-543.
- Rabert, C., Weinacker, D., Pessoa Jr, A., & Fariás, J. G. (2013). Recombinants proteins for industrial uses: Utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 351-356.
- Rosenberg, Z. M.-M. (2006). Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J Food Nutr Res*, 45(2), 47-54.
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*, 7(1), 79.
- Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458-465.
- Shi, X., Wu, D., Xu, Y., & Yu, X. (2022). Engineering the optimum pH of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for efficient hydrolysis of lactose. *Journal of Dairy Science*, 105(6), 4772-4782.
- Smith, A. (1994). *Gene expression in recombinant microorganisms*. CRC Press.
- Sun, H., Bankefa, O. E., Ijeoma, I. O., Miao, L., Zhu, T., & Li, Y. (2017a). Systematic assessment of *Pichia pastoris* system for optimized β -galactosidase production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(2), 113-120.
- Sun, H., Bankefa, O. E., Ijeoma, I. O., Miao, L., Zhu, T., & Li, Y. (2017b). Systematic assessment of *Pichia pastoris* system for optimized β -galactosidase production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(2), 113-120.
- Swallow, D. M. (2003a). Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual review of genetics*, 37(1), 197-219.
- Swallow, D. M. (2003b). Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual review of genetics*, 37(1), 197-219.

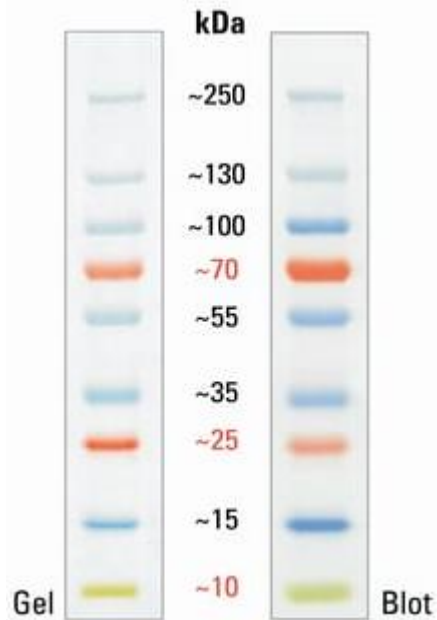
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, 32(10), 992-1000.
- Wu, S., & Letchworth, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, 36(1), 152-154.
- Xu, X., Fan, X., Fan, C., Qin, X., Liu, B., Nie, C., Sun, N., Yao, Q., Zhang, Y., & Zhang, W. (2019). Production Optimization of an Active β -Galactosidase of *Bifidobacterium animalis* in Heterologous Expression Systems. *BioMed Research International*, 2019(1), 8010635.
- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K., & Mikata, K. (1995). The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(3), 439-444.
- Zhao, Q., Liu, F., Hou, Z., Yuan, C., & Zhu, X. (2014). High level production of β -galactosidase exhibiting excellent milk-lactose degradation ability from *Aspergillus oryzae* by codon and fermentation optimization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172, 2787-2799.
- Zuhri, A. R., & Wilda, S. (2024). An Overview of Lactase Enzyme: Microbial Sources, Substrate Range, Fermentation Approaches, Extraction Techniques, and Industrial Applications. *Journal of Integrative Natural Science*, 1(1), 1-9.

8. EKLER

EK-1. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları



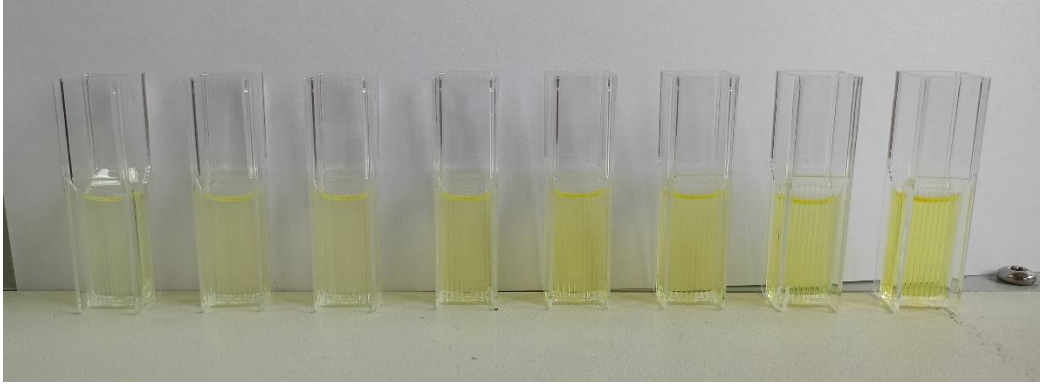
DNA standardı (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD))



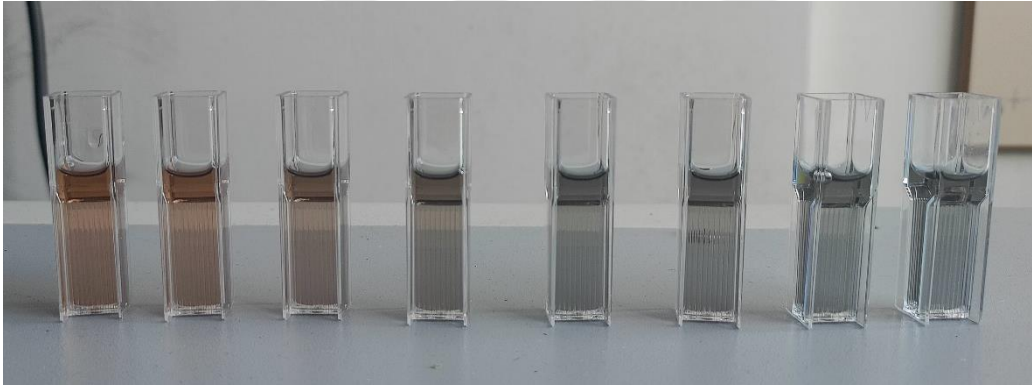
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD)

EK-2. Enzim aktivitesinde kullanılan bileşenler ve bileşen miktarları

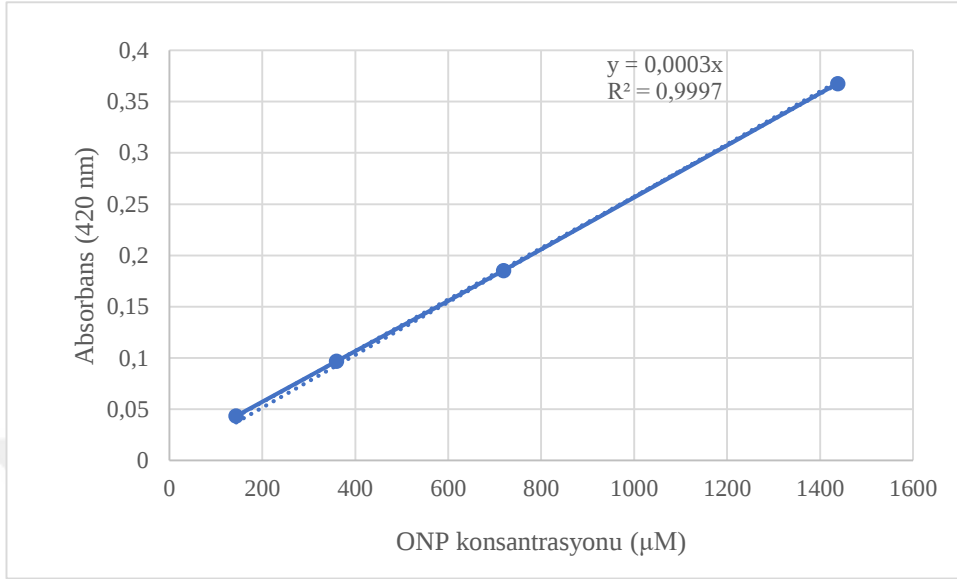
Tepkime Bileşen Miktarları	Enzim	Kör
0,1 mol/L sodyum asetat tamponu (pH 5,2)	-	100 µl
Süpernatant örneği	100 µl	-
Reaksiyon karışımı	400 µl	400 µl
60 °C 10 dk inkübasyon		
1 M Na ₂ CO ₃	500 µl	500 µl
420 nm spektrofotometre absorbans ölçümü		

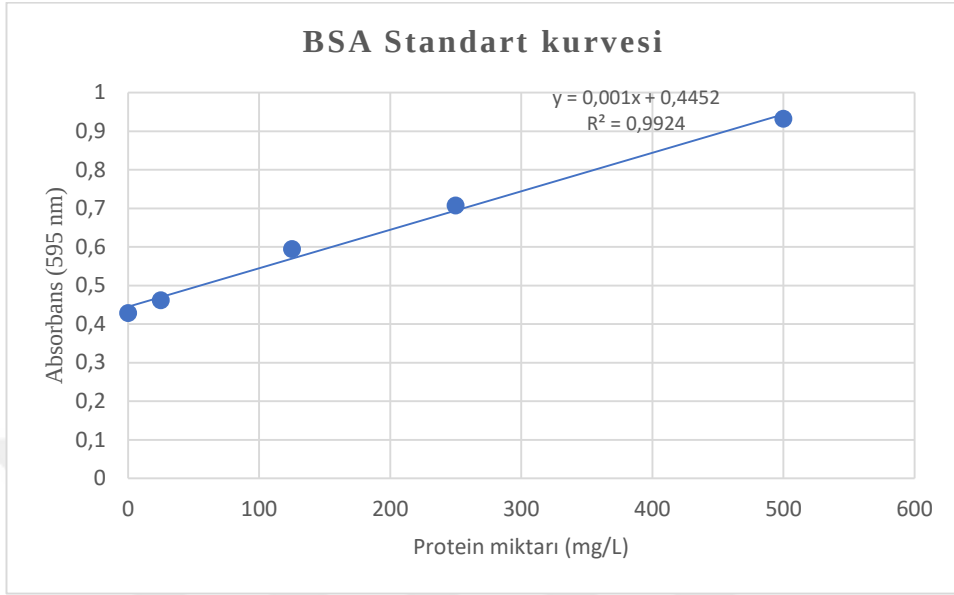
EK-3. Laktaz aktivitesi tayini (b) görselleri

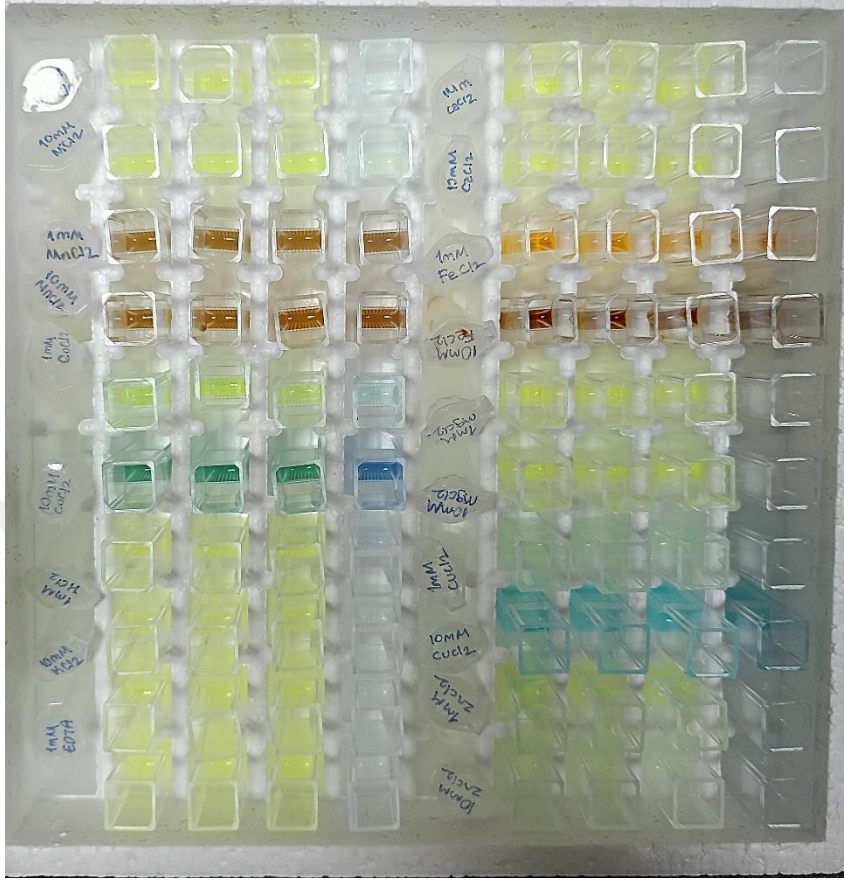
(a)



(b)

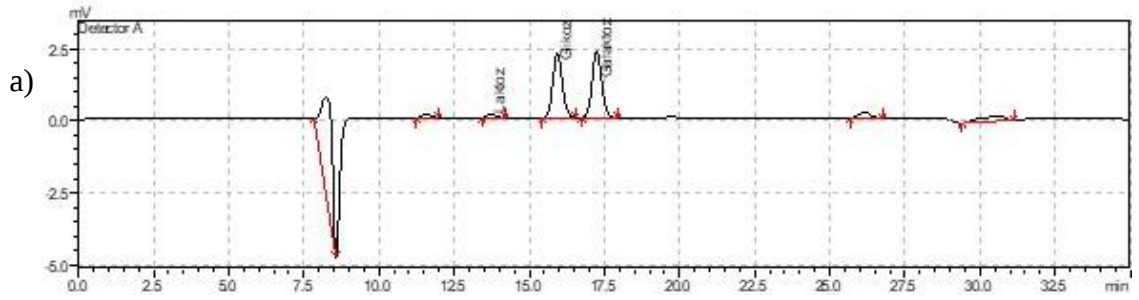
EK-4. ONP standart grafiği

EK-5. Toplam protein tayini standart grafiği

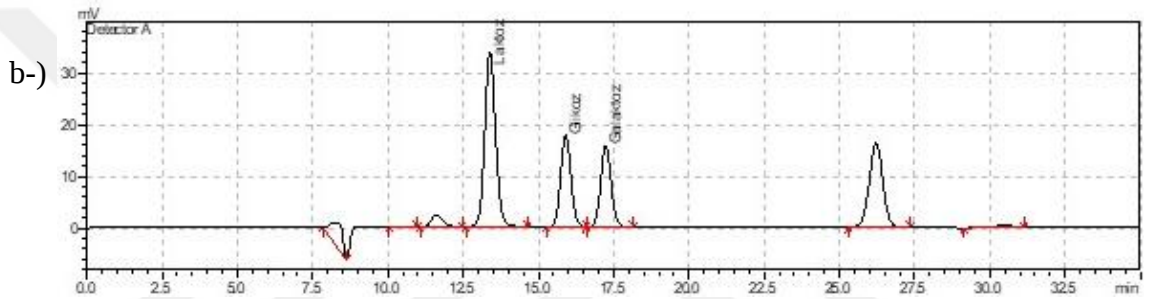
EK-6. Metal İyonları Etkisi

EK-7. α -Lactose monohydrate çözeltisi HPLC kromatogram görselleri

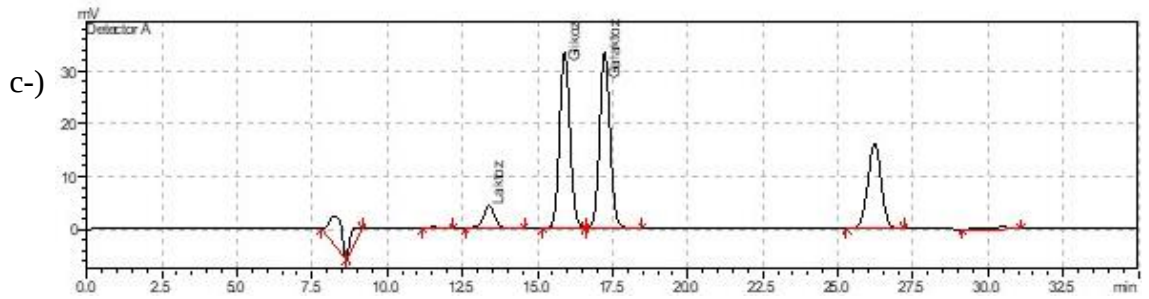
a-) 10°C’de 10 kat seyreltme örneği



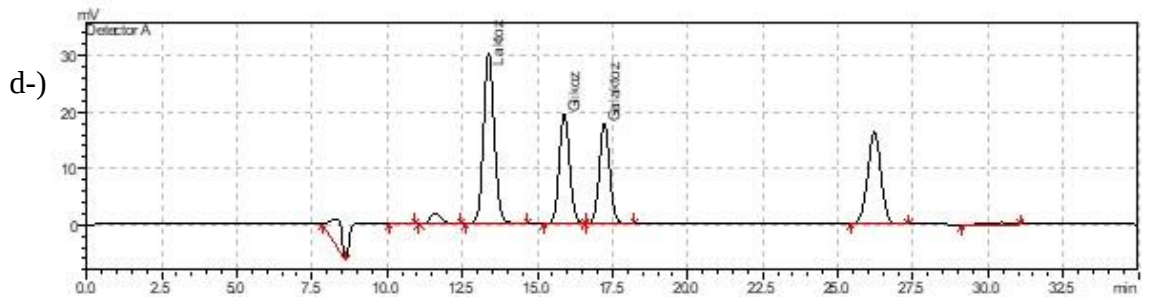
b-) 10°C’de 50 kat seyreltme örneği



c-) 20°C’de 10 kat seyreltme örneği

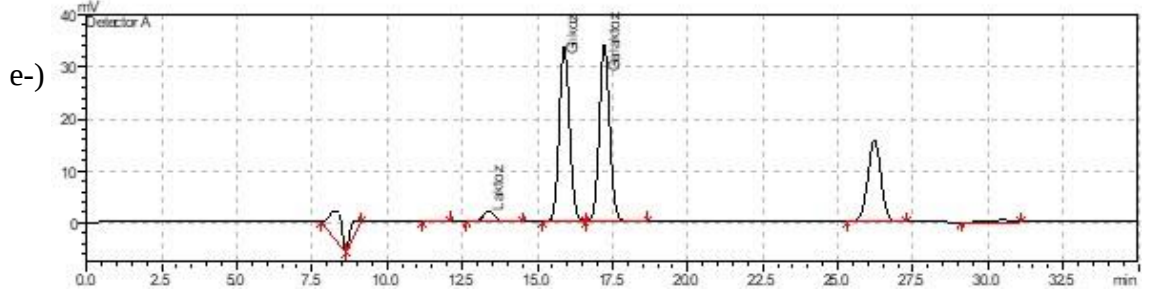


d-) 20°C’de 50 kat seyreltme örneği

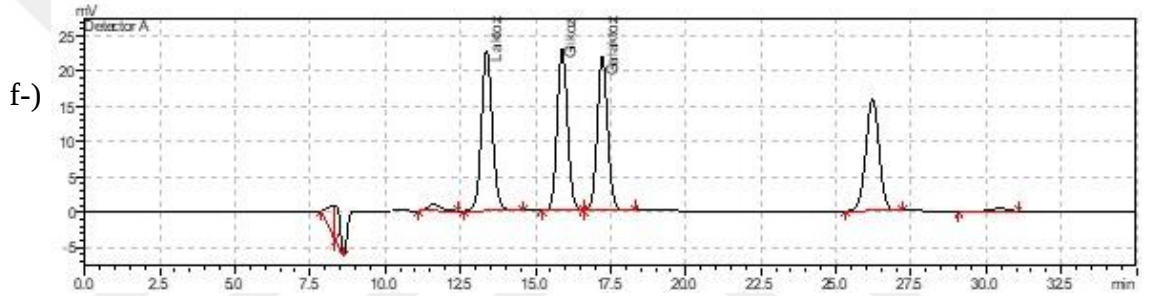


EK-7. α -Lactose monohydrate çözeltisi HPLC kromatogram görselleri (Devamı)

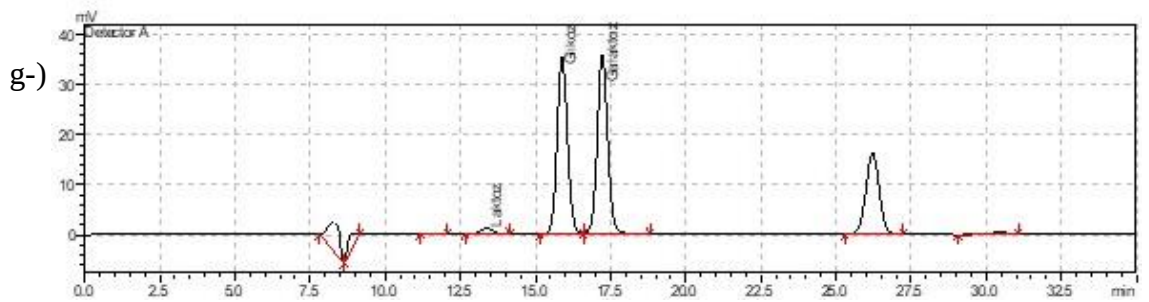
e-) 30°C'de 10 kat seyreltme örneği



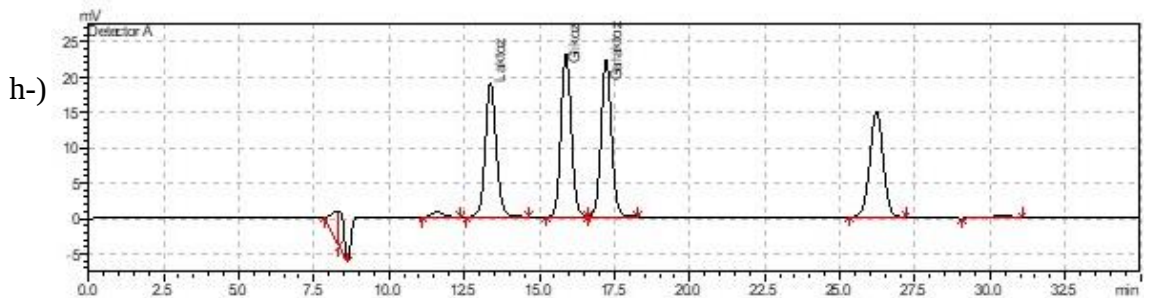
f-) 30°C'de 50 kat seyreltme örneği



g-) 40°C'de 10 kat seyreltme örneği

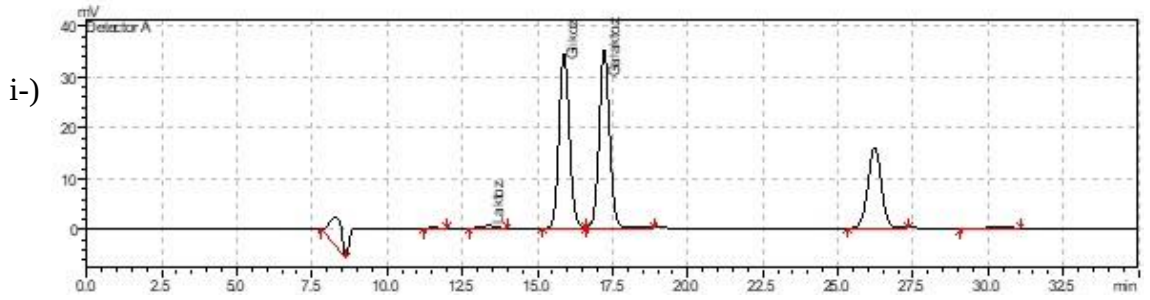


h-) 40°C'de 50 kat seyreltme örneği

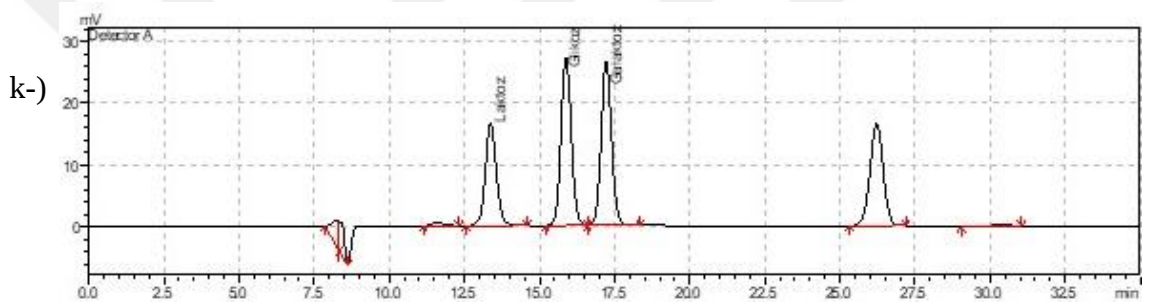


EK-7. α -Lactose monohydrate çözeltisi HPLC kromatogram görselleri (Devamı)

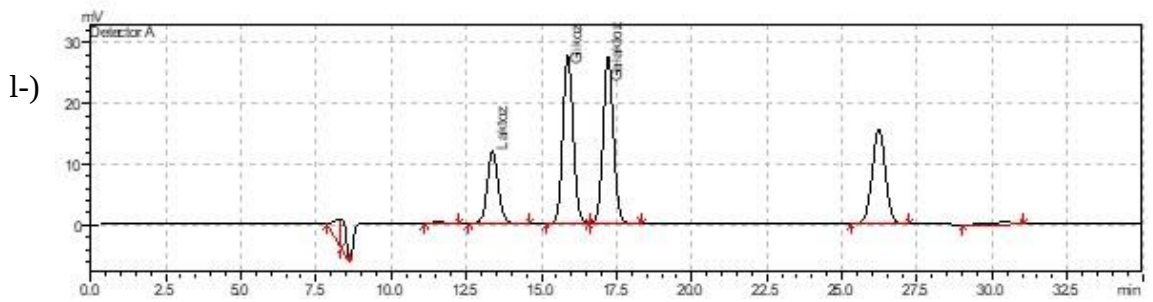
i-) 50°C'de 10 kat seyreltme örneği



k-) 50°C'de 50 kat seyreltme örneği

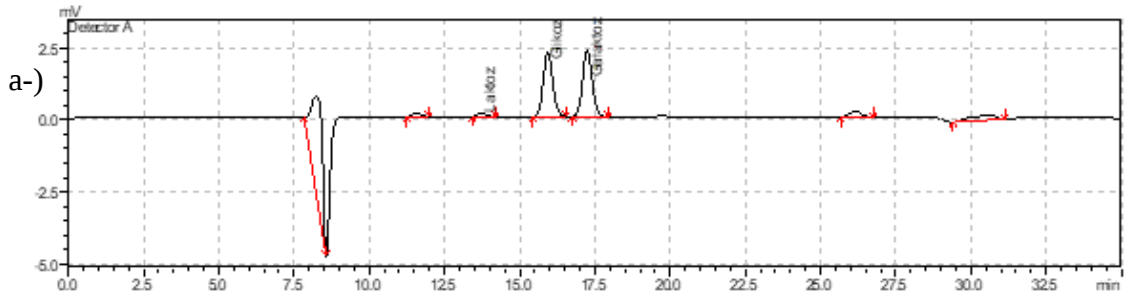


l-) 60°C'de 50 kat seyreltme örneği

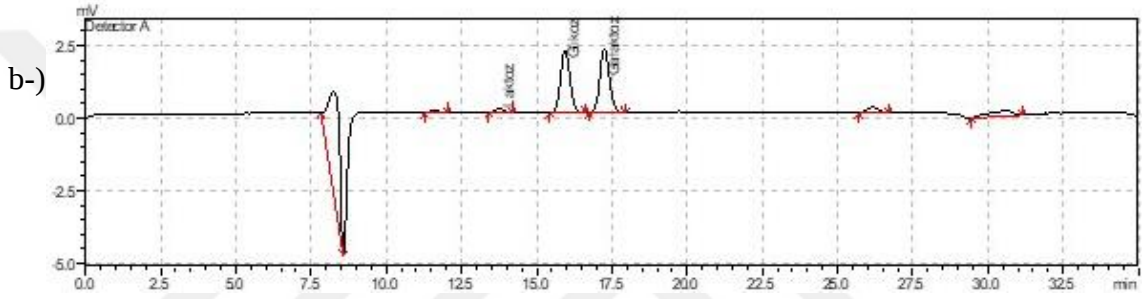


EK-8. Süt HPLC kromatogram görselleri

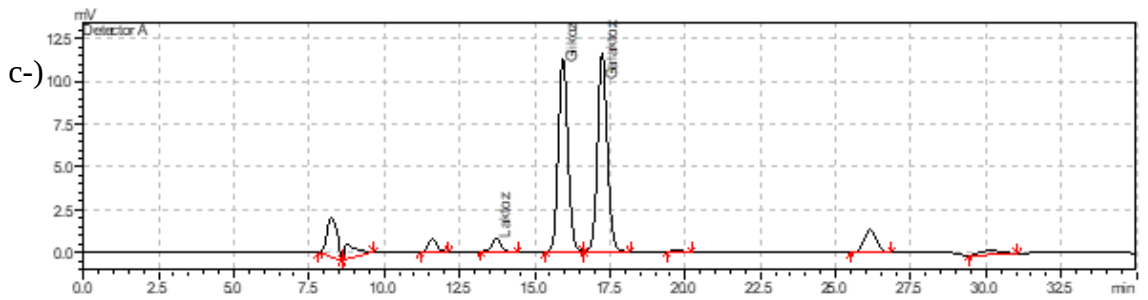
a-) 37°C'de 15 dk inkübasyon seyreltilmemiş örneği



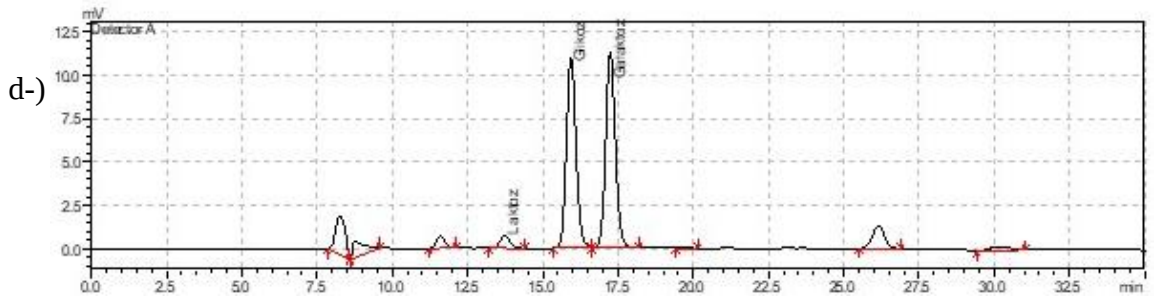
b-) 37°C'de 30 dk inkübasyon seyreltilmemiş örneği



c-) 37°C'de 15 dk inkübasyon 2 kat seyreltilmiş örneği

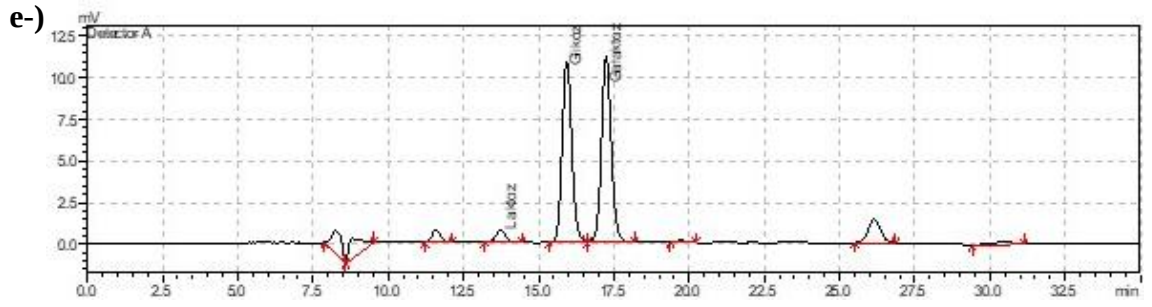


d-) 37°C'de 30 dk inkübasyon 2 kat seyreltilmiş örneği



EK-8. Süt HPLC kromatogram görselleri (Devamı)

e-) 37°C’de 30 dk inkübasyon 5 kat seyreltilmiş örneği



ÖZGEÇMİŞ

Neslihan CEYLAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2023-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2019-2023	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Uluslararası kongrelerde sunulan bildiriler

- Ceylan N, Sarıkaya S., Alınay A., Ersöz F, İnan M, Özçelik A. Recombinant production of pectin lyase used in fruit juice production. 4rd. International Food Chemistry Congress, May 08- 11, 2025, Antalya/TÜRKİYE (presentation).

Projeler

- Meyve Suyu Üretiminde Kullanılan Enzimlerin Rekombinant Üretimi ve Kullanım İmkanlarının Araştırılması (TÜBİTAK Proje No: 222O454)- Bursiyer