

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Pichia pastoris* MAYASI İLE REKOMBİNANT KSİLANAZ ENZİM
ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

Hilal YILDIZ KURAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Pichia pastoris* MAYASI İLE REKOMBİNANT KSİLANAZ ENZİM
ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

Hilal YILDIZ KURAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez 2013.02.0121.018. proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.)**

2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Pichia pastoris* MAYASI İLE REKOMBİNANT KSİLANAZ ENZİM
ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

Hilal YILDIZ KURAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 14/01/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Cengiz TOKER

Doç. Dr. İrfan TURHAN

ÖZET

***Pichia pastoris* MAYASI İLE REKOMBİNANT KSİLANAZ ENZİM ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

Hilal YILDIZ KURAL

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Ocak 2015, 44 Sayfa

Son yıllarda, ksilanazların çok farklı endüstriyel alanlarda kullanılmasının yanında, hayvan yemlerinin formülasyonuna giren önemli bir bileşim unsuru olduğu görülmektedir. Günümüzde endüstriyel kullanımı olan enzim preparatları için en önemli konu enzim üretim maliyetinin ve buna bağlı olarak da prosese girdi maliyetinin düşürülmesidir. Ksilanazın da aralarında bulunduğu alfa amilaz, selüloz, pektinaz, proteazlar, lipazlar gibi enzimlerin üretimi üzerine sürdürülen araştırmalar, uygun bir üretici mikroorganizmanın bulunması ve aynı zamanda ucuz ve bol bulunabilen kaynaklardan oluşan bir üretim ortamı kompozisyonunun oluşturulması yönünde devam etmektedir. Enzim üretim prosesine ilişkin diğer problemler önemli ölçüde aşılmıştır. Ksilanaz enzimi bakteri, maya ve fungus grubunda yer alan çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir.

Bu çalışma üç bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde ksilanaz enziminin rekombinant ve ekstraselüler olarak dört farklı sinyal protein, HSA(İnsan serum albumin), PIR(Protein with Internal Repeats), PHO(Asit fosfotaz) ve α -mating faktör, kullanılarak *P. pastoris* te üretimi yapılmıştır. Bu bölüm sonucunda hepsinde üretim görülmüştür.

İkinci bölümde üretim verimleri karşılaştırılmış ve verimin en yüksek olduğu sinyal protein belirlenmiştir. Bu bölüm sonucunda, HSA 4147 U/ml, PIR 5366 U/ml, PHO 4252 U/ml ve α -mating faktör 4247 U/ml enzim ürettiği belirlenmiştir. En yüksek üretimin PIR sinyal proteininde olduğu görülmüştür. Üçüncü bölümde ise üretilen enzim saflaştırılmış ve enzimin optimum çalışma sıcaklığı ve pH sı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, *Pichia pastoris* mayası ile ksilanaz üretimi gerçekleştirilmiş ve en uygun sekresyon sinyalinin PIR olduğu belirlenmiştir. Ksilanaz enziminin sonundaki polihistidin kuyruğu uzaklaştırıldığında fırıncılık ürünlerinde ve hayvan yemlerinde kullanılma imkanı bulunmaktadır. .

ANAHTAR KELİMELER: *Pichia pastoris*, ksilanaz, HSA(İnsan serum albumin), PIR(Protein with Internal Repeats), PHO(Asit fosfotaz), α -mating faktör

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

Prof. Dr. Cengiz TOKER

Doç. Dr. İrfan TURHAN

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF RECOMBINANT XYLANASE PRODUCTION IN *Pichia pastoris*

Hilal YILDIZ KURAL

MSc Thesis in Food Engineering
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet INAN
January 2015, 44 Pages

In recent years, xylanases are important ingredient of animal feed formulations in addition to other industrial applications. The most important issue for use of enzymes for industrial applications is reduction of production cost and the cost of goods. Studies are ongoing to determine the best production host and cheap media compositions for production of enzymes including xylanases, alpha amylase, cellulase, pectinase, proteases and lipases etc. The other problems related to the enzyme production process relatively solved. Xylanase are produced in bacteria, yeast and by various microorganisms.

This study consists of three parts. In the first part, four secretion signal sequences were evaluated for extracellular production of *Aspergillus niger* xylanase (XylB) in *Pichia pastoris*. These sequences were namely; *Saccharomyces cerevisiae* α -matingfactor (α -MF), Human Serum Albumin (HSA), *P. pastoris* Acid Phosphatase (PHO1) and *P. pastoris* Protein with Internal Repeats (PIR1) secretion signals. Xylanase production was achieved with all constructs.

In the second part of the study, the production efficiency of xylanase was compared with four leader sequences and best signal for secretion was determined. Xylanase enzyme activities for single-copy clones with α -MF, HSA, PHO1 and PIR1 as secretion sequence were 4247, 4147, 4252 and 5366 U/mL, respectively. The best production signal was determined to be PIR. The last part of the study consist of purification of the enzyme product and determination of the optimum temperature and pH.

Consequently, xylanase production in *Pichia pastoris* was achieved and PIR secretion signal was determined to be the best secretion signal among the tested signals. Xylanase produced in *Pichia pastoris* can be utilized in animal feed and bakery products after removing the His-tag sequence.

KEYWORDS: *Pichia pastoris*, xylanase, HSA(Human serum albumin), PIR(Protein with Internal Repeats), PHO(acid phosphatase), α -mating factor

COMMITTEE : Prof. Dr. Mehmet INAN (Supervisor)
Prof. Dr. Cengiz TOKER
Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

ÖNSÖZ

Moleküler biyoloji tarihsel süreç açısından ele alındığında çok yakın bir dönemde karşımıza çıkmasına rağmen son yıllarda oldukça fazla gelişmiştir. İnceleme alanı ve özellikleri itibarıyla moleküler biyoloji, geleceğin araştırma alanı olarak görülmekte ve daha da gelişen teknolojiyle daha üst seviyelere ulaşacağı aşiktardır. Moleküler biyolojiden tıp, ilaç, gıda, tarım, biyomedikal gibi geniş bir alanda faydalanılmaktadır.

Bu çalışmayla yem sanayinde besin değerini artırıcı katkı maddesi olarak kullanılan ksilanaz enziminin en yüksek verimde üretimini sağlayan sinyal peptidi belirlenmiştir. Bu çalışmada PHO, HSA, a-mating faktörü ve PIR sinyal peptidlerinin hücre dışı ksilanaz üretimine etkileri araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Daha önce, *Pichia pastoris*'te ksilanaz enzimi üretilmesine rağmen, enzim verimini etkileyen en önemli faktörlerden biri olan ve üretilen proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan sinyal proteinlerinin verime etkileri karşılaştırmalı olarak literatürde mevcut olmadığından literatüre katkısı olacaktır.

Bu çalışmamda benden bilgisini, sabrını ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a, laboratuvar arkadaşlarıma, ayrıca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan annem Bilir YILDIZ'a, babam Mehmet YILDIZ'a, özellikle eşim Ramazan Özgür KURAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1. Ksilan ve Ksilanaz.....	4
2.2. Üretim Suşu Olarak <i>Pichia Pastoris</i>	7
2.3. Metanol Metabolizması ve Metanol Kullanım Fenotipleri.....	9
2.4. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan <i>Pichia Pastoris</i> Promotorları ...	11
2.5. <i>Pichia Pastoris</i> Seleksiyon Markırları.....	13
2.6. Seleksiyon Stratejisi.....	13
2.7. Ekspresyon Suşları.....	13
2.8. Ekspresyon Vektörleri, Transformasyon ve <i>Pichia Pastoris</i> Genomuna Entegrasyonu.....	15
3. MATERYAL VE METOT.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Ksilanaz gen kaynağı.....	17
3.1.2. Sinyal peptitler.....	17
3.1.3. Konakçı plazmitler.....	17
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve restriksiyon enzimleri.....	18
3.2. Metot.....	18
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu.....	18
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	18
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve jelin görüntülenmesi.....	19
3.2.4. Ligasyon ve transformasyon.....	19
3.2.5. Plazmit izolasyonu.....	20
3.2.6. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	20
3.2.7. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu.....	20
3.2.8. SDS-PAGE ve Western blot analizi.....	21
3.2.9. DNA ve plazmit miktarlarının ölçülmesi.....	21
3.2.10. Southern blot analizi.....	21
3.2.11. Rekombinant protein üretimi.....	22
3.2.12. Ksilanaz enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	22
3.2.13. Rekombinant proteinin saflaştırılması.....	23
3.2.14. Rekombinant proteinin karakterizasyonu.....	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	24
4.1. Plazmitlerin Sinyal Peptitler İçin Hazırlanması.....	24
4.2. Ksilanaz Geninin Farklı Sinyal Peptit İçeren Plazmitlere Klonlanması.....	24
4.3. Ekspresyon Vektörlerinin <i>Pichia Pastoris</i> KM71H Suşuna Transformasyonu.....	24
4.4. Protein Üretimi.....	27
4.5. Gen Kopya Sayısının Belirlenmesi (Southern Blot Analizi).....	28

4.6. Ksilanaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	29
4.7. Ksilanaz Enziminin HİS-TAG Kolon ile Saflaştırılması	31
4.8. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH Değerinin Etkisi	31
4.9. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklık Değerinin Etkisi	32
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ	34
7. KAYNAKLAR	35
8. EKLER	40
Ek 8.1. Çalışma Süresince PZR Denemelerinde Kullanılan Primerler	40
Ek 8.2. Ksilanaz Geninin Sekansı	41
Ek 8.3. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları	42
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	santimetre
d	devir
dak	dakika
kbç	kilo baz çifti
kV	kilo volt
L	litre
μ	mikro(10^{-6})
m	mili(10^{-3})
M	molar
n	nano(10^{-6})
OD	optik yoğunluk (optical density)
g	göreceli santrifüj kuvveti (relative centrifugal force, rcf)
s	saniye
sa.	saat
t	süre (saat cinsinden)
Tm	erime sıcaklığı (melting temperature)
U	ünite
∞	sonsuz

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Amp	amfisilin
AOX	Alkol Oksidaz
bç	baz çifti
BMGY	tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BMMY	tamponlanmış karmaşık metanol besiyeri (buffered methanol complex medium)
DIG	digoksijenin (digoxigenin)
DHAS	Dihidroksiaseton sentaz
DHA	Dihidroksiaseton
DNA	deoksiribonükleik asit
DNS	Dinitrosalisilik asit
FDH	Format Dehidrogenaz
FLD	Formaldehit Dehidrogenaz
GAP	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
HSA	İnsan Serum Albumin (Human Serum Albumin)
LB	Luria-Bentani
MA	molekül ağırlığı
MD	minimal dekstrozu besiyeri
MDH	minimal dekstrozu histidin içeren besiyeri
PAGE	poliakrilamid jel elektroforezi
PHO	Asit Fosfotaz
PZR	polimeraz zincir tepkimesi (PCR-polymerase chain reaction)

RNA	Ribonükleik asit
SDS	sodyum dodesil sülfat
SSC	tuzlu sodyum sitrat (saline sodium citrate)
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGM	Tris-Glisin-Metanol
TGS	Tris-Glisin-SDS
YNB	maya azot kaynağı (Yeast Nitrogen Base Sulfate without amino acids)
YPD	Maya Pepton Dekstroz (Yeast Peptone Dextrose)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ksilan ve ksilanaz enziminin etki spesifitesi.....	4
Şekil 2.2. Ksilanın hidrolizinde görev alan enzimlerin gösterimi.....	5
Şekil 2.3. <i>Pichia pastoris</i> 'te metanol kullanım izyolu.....	10
Şekil 3.1. Protein ekspresyonu için kullanılacak olan pPICZ ve pPICZB plazmiti.....	17
Şekil 4.1. HSA sekresyon sinyaline bağlı ksilanaz geninin gösterimi.....	25
Şekil 4.2. PIR sekresyon sinyaline bağlı ksilanaz geninin gösterimi.....	25
Şekil 4.3. PHO sekresyon sinyaline bağlı ksilanaz geninin gösterimi.....	26
Şekil 4.4. α -mating faktörü sekresyon sinyaline bağlı ksilanaz geninin gösterimi.....	26
Şekil 4.5. Ksilanaz geni içeren örneklerin SDS-PAGE analizi.....	27
Şekil 4.6. Ksilanaz geni içeren örneklerin kopya sayısını gösteren X-Ray filmi.....	29
Şekil 4.7. DNS analizi için glikoz kalibrasyon eğrisi.....	30
Şekil 4.8. Standart glikoz kurvesi kullanılarak çizilen ksilanaz üretim miktarları.....	30
Şekil 4.9. Saflaştırma işlemi sonucu elde edilen SDS-PAGE görüntüsü.....	31
Şekil 4.10. Optimum pH grafiği.....	32
Şekil 4.11. Optimum sıcaklık grafiği.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ksilanazların potansiyel uygulama alanları.....	6
Çizelge 2.2. Metilotrofik mayalarda karbon kaynaklarının AOX geni üzerine represyon ve derepresyon etkisi.....	11
Çizelge 2.3. <i>P.pastoris</i> suşları.....	14
Çizelge 3.1. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları.....	18

1. GİRİŞ

Selülozik maddeleri parçalayan enzimler, yemlerin besin değerini (biyo yararlılığını) arttırmak için tek mideli ve geviş getiren hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, bakteriyel ve fungal kaynaklı enzimler endüstriyel ölçekte üretilip, enzim preparatı olarak kullanılmaktadır. Enzimi doğal olarak üreten organizmaların endüstriyel ölçekte verimlerinin düşük olmasından dolayı, enzim üretimi daha yüksek verimli üretim sağlayacak konukçu organizmalarda (*Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, ve *Pichia pastoris*) gerçekleştirilir.

Günümüzde endüstriyel kullanımı olan enzim preparatları için en önemli konu enzim üretim maliyetinin ve buna bağlı olarak da prosese girdi maliyetinin düşürülmesidir. Ksilanazın da aralarında bulunduğu alfa amilaz, selülaz, pektinaz, proteazlar, lipazlar gibi enzimlerin üretimi üzerine sürdürülen araştırmalar, uygun bir üretici mikroorganizmanın bulunması ve aynı zamanda ucuz ve bol bulunabilen kaynaklardan oluşan bir üretim ortamı kompozisyonunun oluşturulması yönünde devam etmektedir. Enzim üretim prosesine ilişkin diğer problemler önemli ölçüde aşılmıştır. Ksilanaz enzimi bakteri, maya ve fungus grubunda yer alan çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilebilmektedir.

Ksilan, bitkilerde en fazla bulunan hemiselülozdur ve selülozdan sonra ikinci en büyük bileşim unsurudur. Ksilanaz enzimi, ksilanın β -1,4 bağlarını hidrolize ederek hemiselülozik maddelerin biyo yararlılığını artırır. Ksilanaz enziminin yem katkı maddesi olarak kullanımı mevcuttur. Bu enzimin hayvanların verim ve performansını olumlu yönde değiştirdiği belirtilmektedir.

Ksilanazlar, gıdaların fiziksel özelliklerini geliştirmede, tek hücre proteini, sıvı ya da gaz yakıtların üretimi, çözücüler ve şeker şuruplarının üretimi gibi genel uygulamalarda, ligno-selülozik materyallerin dönüşümü, tarımsal atıkların fermentatif ürünlere parçalanarak dönüşümü, meyve sularının berraklaştırılması, biranın kıvamının düzenlenmesi, kâğıt endüstrisinde ağartmayı iyileştirici olarak kullanılırlar ve biyoteknolojik uygulamalar için yaygın potansiyelleri vardır (Beg vd 2001; Subramaniyan ve Prema, 2002). Ayrıca ksilanazların önemli bir kullanım özelliği de zirai alanda, kanatlı hayvanların (Bedford ve Classen 1992, Wu vd 2004), domuzların (Thacker ve Baas 1996, Barrera vd 2004) ve sığırların (Beachemin vd 1999) polisakkarit ve proteinlerden daha fazla yararlanmasını sağlayarak verim ve performanslarını artırmasıdır.

Pichia pastoris, rekombinant protein üretiminde kullanılmak üzere ekspresyon platformu olarak geliştirilmiş metilotrofik bir mayadır. *Pichia pastoris*'te bugüne kadar çok sayıda farklı proteinin üretimi gerçekleştirilmiştir. *Pichia* ekspresyon sisteminin endüstriyel rekombinant protein üretiminde giderek artan popülerliğini sağlayan özellikler;

- 1) genetik modifikasyon için gereken tekniklerin kolaylığı ve mayanın gelişimi için gerekli ortam ve kültür koşullarının basitliği,
- 2) hücre içi ve hücre dışı olarak yüksek protein ekspresyon seviyelerine ulaşabilmesi,

3) translasyon sonrası ökaryotik protein modifikasyonlarını (glikozilasyon, disülfid bağlarının oluşması gibi) gerçekleştirebilme yetisi,

4) ticari ekspresyon kitlerinin var olması şeklinde sıralanabilir (Lin-Cereghino ve Cregg 2000).

Pichia pastoris sisteminde heterolog proteinlerin ekspresyonu, genellikle alkol oksidaz I geninin (*AOX1*) promotörü kontrolünde gerçekleştirilir. *AOX1*, metanol metabolizmasındaki ilk enzim olan alkol oksidazı kodlayan genidir. *AOX1* promotörünün araştırmalarda ve uygulamada en fazla kullanılan promotör olmasının sebebi, *Pichia pastoris*'te karakterize edilen ilk promotör olması ve ticari kit olarak (Invitrogen, CA, ABD) piyasaya sürülmesinin yanında çok güçlü olması ve karbon kaynakları tarafından çok sıkı bir şekilde regüle edilmesidir. *AOX1* ekspresyonu, farklı karbon kaynaklarına tepki olarak gelişen represyon, derepresyon ve indüksiyon mekanizmaları ile regüle edilir. *AOX1* promotörü metanol tarafından çok kuvvetli bir şekilde tetiklenmekte fakat glukoz, gliserol, asetat, etanol gibi diğer karbon kaynakları tarafından baskılanmaktadır. Sorbitol, mannitol, trehaloz ve alaninde ise *AOX1* promotörü baskılanmamakta fakat indüksiyon için metanole gereksinim duyulmaktadır (İnan ve Meagher 2001b).

AOX1 promotörünün indüksiyonunun derecesi, karbon kaynağı olarak metanolün varlığına bağlıdır. Metanol esas olarak, gıda ürünleri ve katkılarının üretiminde kullanılmaya pek uygun olmayan petrokimyasal kaynaklardan elde edilir. Büyük ölçekli fermentasyon endüstrisinde metanol kullanımı ve depolanması, toksik ve yanıcı olduğundan tehlike arz etmektedir. Ayrıca, metanolde biyokütle üretimi için gerekli olan oksijen miktarı, karbon kaynağı glukoz olduğunda gerekli olan miktardan 3-4 kat daha fazladır. Oksijenin fazla miktarda kullanımı ısı üretimini arttırmakta ve biyoreaktörün sıcaklığını yükseltmektedir (Zhang vd 2010). Yüksek oksijen temini ve soğutma ihtiyacı üretim maliyetini arttırmakta ve ölçek büyütmede zorluklara neden olmaktadır.

Pichia pastoris'te yapısal ve tetiklenebilir başka promotörler de bulunmasına rağmen (*AOX2*, *DAS*, *GAP*, *ICLI*, *FLD1*, *PEX8*, *TEF1*, *PGK1*, *YPT1* gibi) çoğu çalışmada ve uygulamada bazı avantajlarından dolayı *AOX1* promotörü kullanılmaktadır. Örneğin, *FLD1*, *AOX1* promotörüne iyi bir alternatif olarak görünse de indüksiyon için başka bir toksik ve yanıcı madde olan metilamin ya da formaldehite ihtiyaç duymaktadır. Diğer promotörler ise düşük ekspresyon düzeylerinden dolayı *AOX1* promotörü kadar yaygın kullanılmamaktadırlar. *Pichia pastoris* ekspresyon sistemini kullanan çoğu araştırmacının temel amacı maksimum miktarda rekombinant protein eldesi olduğundan, yüksek promotör fonksiyonu istenen bir özelliktir. Örneğin; *YPT1* promotörü altında üretilen α -glucuronidaz ekspresyon seviyesi, glukozda gelişen *GAP* promotörü altında üretilen miktardan 10 kat az iken metanolde gelişen *AOX1* promotörü altında elde edilen miktardan 80 kat daha az bulunmuştur (Sears vd 1998). Diğer taraftan, *GAP*, *TEF1*, *PGK1* ve *YPT1* promotörleri yapısal olduklarından, kontrol ettikleri genlerin transkripsiyonlarını tetikleyici ihtiyacı olmadan sürekli bir şekilde gerçekleştirirler. Yapısal promotör kullanılırken genin ekspresyona başladığı an kontrol edilemez. Bu yüzden, konukçu organizmaya toksik etkisi olan rekombinant bir protein üretiminin yapısal bir promotör altında gerçekleştirilmesi beklenemez.

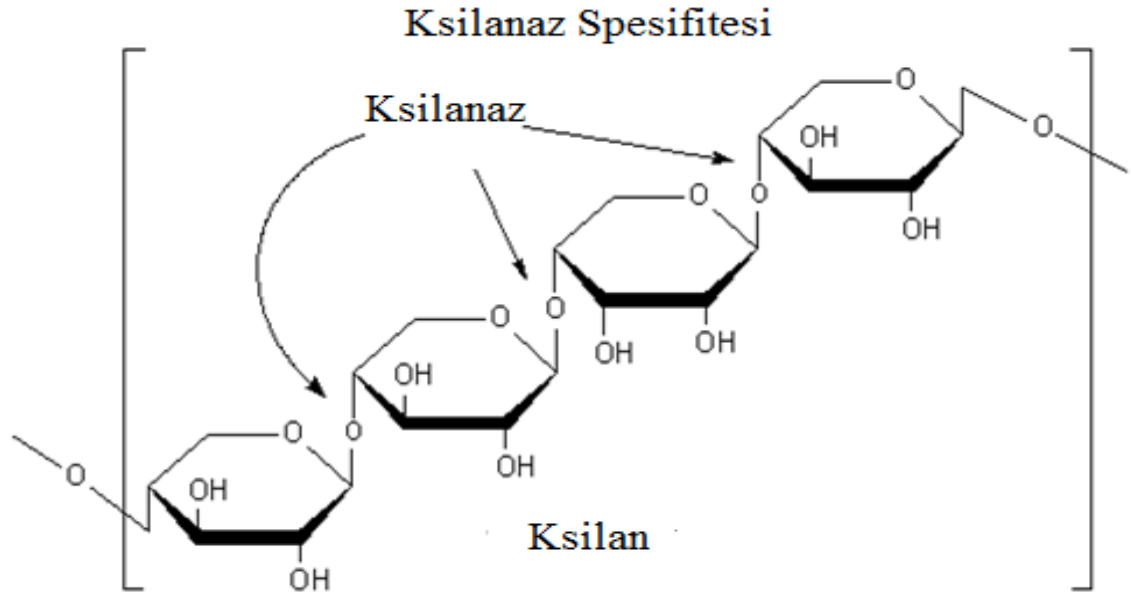
Bu çalışmanın amacı, gıda, yem, kâğıt sanayisinde çokca kullanılan ksilanaz enziminin farklı sinyal peptitler kullanılarak rekombinant ve ekstraselüler olarak *Pichia pastoris*'te üretimini yapmak, verimleri karşılaştırmak, üretilen enzimin optimum çalışma sıcaklık ve pH sınımlarını belirlemektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Ksilan ve Ksilanaz

Ksilan, bitkilerin hücre duvarında, selülozdan sonra en fazla bulunan hemiselülozik bir polisakkarittir. Bazı bitkilerin toplam kuru maddesinin %35'ini oluşturur (Coughlan, 1985). Tahıl danelerinin lif içeriklerinin önemli bir kısmı ksilanlardan oluşur (Cowan, 1996). Ksilanlar, ksilanazlar (β -1,4-D-endoksilanaz (EC 3.2.1.8)) tarafından β -1,4 bağlarının hidrolizi ile D-ksiloz ünitelerine parçalanır (Biely, 1985) (Şekil 3.1). Ksilan, selüloz ve lignin, birlikte bitki hücre duvarının ana yapısını oluştururlar ve birbirlerine kovalent ya da non-kovalent bağlarla bağlanmış haldedirler (Beg vd 2001).

Ksilanaz enzimleri, ksilandaki β -1,4-D-ksilozidik bağlarını zincirin iç kısımlarından hidrolizle kıran glikosidazlardır (o-glikozid hidrolazlar; E.C. 3.2.1). Bunlar, hücre metabolizması için karbon kaynağının sağlanmasında ve bitki patojenlerince bitki hücresinin enfeksiyonunda gerekli olan ve doğada yaygın bir enzim grubudur (Collins vd 2004). Şekil 2.1'de ksilanaz enzimlerinin ksilan omurgasındaki etki noktaları şematik olarak gösterilmektedir (Collins vd 2004).



Şekil 2.1. Ksilan ve ksilanaz enziminin etki spesifitesi

Ksilanın, heterojen ve karmaşık yapısı nedeni ile tamamen hidrolizi, işbirliği içerisinde ilişkili geniş bir grup mikrobiyal enzimi gerektirmektedir ki bu grubu oluşturan enzimler şunlardır (Gilbert ve Hazlewood 1993, Collins vd 2004);

1) Ksilan iskeletindeki iç glikozid bağları rast gele kıran β -1,4-endoksilanazlar (β -1,4-D-ksilanazlar; β -1,4-D-ksilan ksilanohidrolazlar; E.C. 3.2.1.8),

2) Ksilobiyozu ksiloza hidrolize eden, başka bir deyişle ksilooligosakkaritleri indirgen olmayan uçlarından kıran β -D-ksilosidazlar (β -1,4-D-ksilozid ksilohidrolazlar; E.C.3.2.1.37),

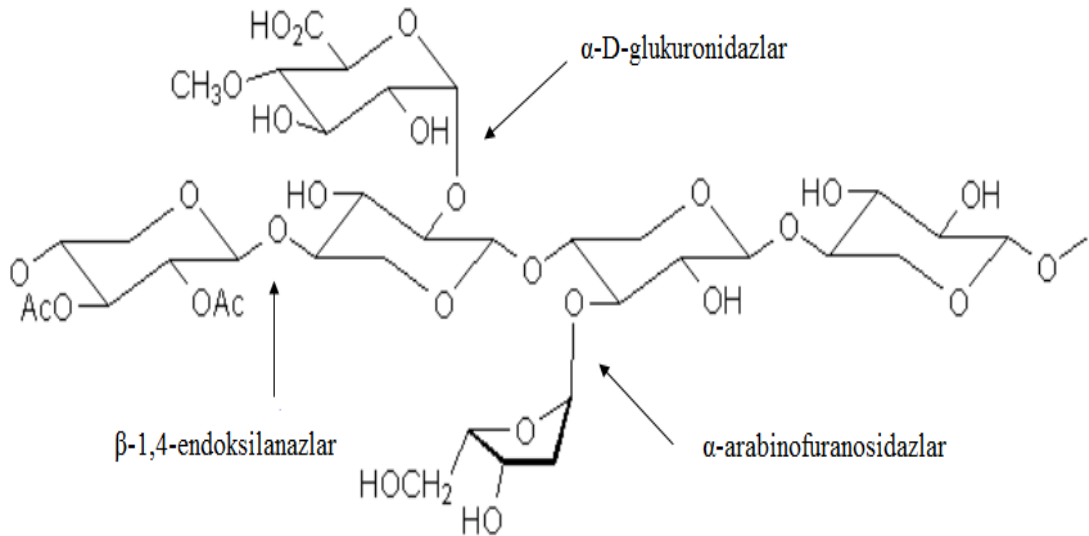
3) Ksilandaki arabinoz yan zincirlerini hidrolize eden α -L-arabinofuranosidazlar (E.C. 3.2.1.55),

4) Ksiloz gruplarından glukuronik asit yan zincirlerini ayıran α -D-glukuronidazlar (E.C. 3.2.1.139),

5) Asetat gruplarını serbestleştiren asetil-ksilan esterazlar (E.C.3.1.1.72), 6. Ferulik asit esterazlar (E.C. 3.1.1.73),

7) p-kumarik asit esterazlar (E.C. 3.1.1.-),

8) Ekzo- β -1,4-ksilanazlar (α -1,4-D-ksilan ksilohidrolazlar).



Şekil 2.2. Ksilanın hidrolizinde görev alan enzimlerin gösterimi

Bunlardan en önemlisi 1.gruptaki 1,4- β -endoksilanazlar'dır. Endoksilanazlar, ksilan omurgasındaki iç glikozid bağları, ekzoksilanazlar ise endoksilanazların etkisi sonucu oluşan ksilooligosakkaritleri hidrolize ederler; ve bu yolla ksilanın hidroliz oranı yükseltilmiş olmaktadır (Wong et al.1988).

Ksilanazların birçok kullanım alanı bulunmakla beraber kullanımlarını yaygın hale getirmek, teknolojik proses koşullarına dayanıklı, verimliliği yüksek ve maliyeti düşük kaynakların belirlenmesiyle mümkün olabilecektir.

Ksilanazlar, gıdaların fiziksel özelliklerini geliştirmede, tek hücre proteini, sıvı ya da gaz yakıtların üretimi, çözücüler ve şeker şuruplarının üretimi gibi genel uygulamalarda, ligno-selülozik materyallerin dönüşümü, tarımsal atıkların fermentatif

ürünlere parçalanarak dönüşümü, meyve sularının berraklaştırılması, biranın kıvamının düzenlenmesi, kağıt endüstrisinde ağartmayı iyileştirici olarak kullanılırlar ve biyoteknolojik uygulamalar için yaygın potansiyelleri vardır (Beg vd 2001; Subramaniyan ve Prema 2002). Ayrıca ksilanazların önemli bir kullanım özelliği de zirai alanda, kanatlı hayvanların (Bedford ve Classen 1992, Wu vd 2004), domuzların (Thacker ve Baas 1996, Barrera vd 2004) ve sığırların (Beachemin vd 1999) verim ve performanslarını artırmasıdır. Ksilanazların endüstriyel alanda kullanımı uygulama alanı ve fonksiyonu ile birlikte daha ayrıntılı olarak Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ksilanazların potansiyel uygulama alanları (Collins vd 2005)

ENDÜSTRİSİ	UYGULAMA ALANI	FONKSİYONU
Meyve ve sebze işleme süreçleri, demleme, şarap imalatı	Meyve ve sebze suyu, nektar ve pürele eldesi ile bitkisel yağ, şarap imalatı	Meyve suları viskozitesini azaltıcı etkisi yanında yumuşatma özelliği ile kaliteyi artırır.
Fırıncılık	Hamur ve pastacılık ürünleri	Hamur elastikiyetini ve dayanıklılığını artırır.
Hayvan beslemesi	Monogastrik (domuz ve kümes hayvanları) ve geviş getirenlerin yemleri	Nişasta ihtiva etmeyen polisakkaritlerin içeriğini azaltır, intestinal viskoziteyi azaltarak hayvanın protein ve nişastadan maksimum ölçüde faydalanmasını sağlar.
Kağıt ve kağıt hamuru üretimi	Kağıt hamurunun ağartılması	Kağıt imalatı esnasında klorin ve toksik disakkaritlerin kullanımlarının azaltılması
	Biyoleke yok edilmesi	Alkali kullanımının azaltılması ve biyoleke çıkarılması süreçlerinin kolaylaştırılması
Nişasta	Nişasta gluten ayırımı	Pasta hamuru viskozitesinin azaltılması ve gluten topaklanmasının artırılması.
Tekstil	Keten, kendir, jüt ve rami işlenmesi	Enzimatik yüzey düzleştirimi
Biyodönüşüm	Tarımsal, evsel ve endüstriyel atıkların çevreye zararsızlaştırılması	Çöp arıtımı, fermente edilebilen ürünlerin üretimi, yenilenebilir bioetanol ve zararsız kimyasalların üretimi

Yemlere enzim ilavesiyle hayvanların yeterince veya hiç salgılayamadıkları enzimler sağlanarak, yemlerdeki sindirimi güç yapısal karbonhidrat unsurları ile diğer organik ve inorganik unsurlardan daha iyi yararlanılması, istenilmeyen kimi maddelerin etkisiz hale getirilmesi amaçlanmaktadır (Güçlü ve Kara 2009).

Günümüzde giderek popularite kazanan ksilanazların, bitki hücre duvarının hemiselüloz kısmını parçaladığı; ot yiyen hayvanların ve bazı bitki patojenlerinin bitkileri parçalamak için ksilanaz içerdikleri saptanmıştır. Pek çok bakteri ve küf mantarının, hemiselüloz-ksilan içeren ortamlarda heterotrofik olarak gelişmesini sağlayan ve ortamda son ürün olarak serbest ksiloz oluşturan hücre dışı ksilanazlar oluşturduğu anlaşılmıştır (Kulkarni vd 1999). Birçok mikroorganizmaya ek olarak, bazı otçul böcekler, kabuklular ve bazı alglerin üretebildiği ksilanazı, memeliler üretememektedirler.

Ksilanazlar, genellikle saf ksilan veya ksilanca zengin ortamlarda gelişen mikroorganizmalarda bulunan indüktif enzimlerdir. Ksilanazların; L-sorboz, bazı ksilooligosakkaritler, ksiloz ve lignoselüloz birimleri gibi bileşiklerle indüklendikleri ve bakteriler, funguslar, protozoalar, algler, karındanbacaklılar ve antropodları da içine alan bir grup organizma tarafından üretildikleri bildirilmiştir (Beg vd 2001).

Bazı genel özelliklerine göre, ksilanaz üreten mikroorganizmaları aşağıdaki gibi gruplandırmak mümkündür (Köksal 1998):

- 1) Bakteriler; *Bacillus sp.*, *Cellulomonas fimi*, *Micrococcus sp.* AR-135, *Staphylococcus sp.* SG-1, *Thermotoga maritima* MSB8 vb.
- 2) Küf mantarları; *Aspergillus niger* ve *Aspergillus nidulans* gibi *Aspergilli*, *Aureobasidium pullulans* vb.
- 3) Funguslar; *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Thermomyces* vb.
- 4) *Actinomycetes*; *Streptomyces sp.*, *Thermomonospora curvata* vb.
- 5) Rekombinant mikroorganizmalar.

Bunların dışında moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojileri ile üretilip endüstride kullanılan çok sayıda ticari ksilanaz da bulunmaktadır. Ksilanazların ticari üretiminde kullanılan suşlar *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis* ve *Streptomyces lividans*'dır (Beg vd 2001).

2.2. Üretim Suşu Olarak *Pichia pastoris*

Çalışmamızda konukçu sistem olarak kullanılan metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris* ve fermentör ortamında çok yüksek hücre yoğunluğuna çıkabildiği için 1970'li yıllarda tek hücre proteini üretimi için geliştirilmiştir. Son yıllarda, özellikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için kullanılan mükemmel bir konukçu durumundadır (Daly ve Hearn 2005, Jungo vd 2007). *Pichia pastoris*, bakteriler gibi, ucuz besiyerlerinde hızla gelişme göstermektedir. Ayrıca, ökaryotik bir organizma olduğu için hücre içi ortamı ökaryotik proteinlerin katlanması için daha iyi olanak sağlamaktadır ve proteolitik işlemler, disülfid köprüsü oluşumu ve glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. Kancalı kurt (Hookworm) enfeksiyonuna karşı aşı, botulizm nörotoksinine karşı aşı ve insan serum albümini *Pichia pastoris*'de üretilen eczacılık proteinlerine örnek verilebilir.

Pichia pastoris mayası kültivasyonu sırasında çok farklı karbon kaynaklarından yararlanabilmektedir. Başta glukoz ve metanol olmak üzere gliserol, etanol, mannitol,

sorbitol, trehaloz, alanin vb. karbon kaynaklarını kullanabilmektedir. Ayrıca çok kuvvetli indüklenebilir *AOXI* ve yapısal *GAP* promotorlarına sahiptir. Cregg vd. (1989) *Pichia pastoris*'in metanol tarafından indüklenen *AOXI* promotorunun, glukoz, etanol ve gliserol gibi karbon kaynakları tarafından baskılandığı belirtilmiştir (İnan ve Meagher 2001). Fakat *GAP* promotoru kontrolü altında yapılan rekombinant protein ekspresyonu sırasında üretilen bir miktar etanolün *AOXI* promotorunun tersine, *GAP* promotoru üzerine her hangi bir represif etkisinin olmadığı, hatta *GAP* promotoru kullanılarak yapılan rekombinant protein üretiminde ekspresyon seviyesinin arttığı belirtilmiştir (Baumann, 2008). Sonuç olarak, rekombinant protein üretiminde *AOXI* promotorunun kullanımının en önemli dezavantajı, bu promotorun indüksiyonu için metanole gerek duyulması nedeniyle, yüksek ölçekli üretimlerde kullanıldığında yangın tehlikesine karşı depolanması için gerekli önemlerin pahalı olmasıdır. Bu sebeple yüksek ölçeklerde kullanımı sınırlıdır.

Pichia pastoris'te rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan *GAP* promotoru, *AOXI* promotoruna göre glukoz içeren ortamda güçlü yapısal ekspresyon gösterir. Gliserol ve metanolde gelişen hücrelerin *GAP* promotor aktivite seviyesi, glukozda gelişen hücelere göre sırasıyla 2/3 ve 1/3 seviyesindedir. *GAP* promotoru kullanımının avantajı indüksiyonu için metanol gerektirmemesidir. Ayrıca kolay gelişim için bir karbon kaynağından başka bir karbon kaynağına değişime ihtiyaç duymamasıdır. Fakat *GAP* promotoru yapısal (constitutive) olarak ifade edildiği için, maya hücresine toksik olan bir proteinin üretimi için iyi bir seçim değildir (Cereghino ve Cregg 2000).

Heterolog protein üretiminde *Pichia pastoris* ekspresyon sistemleri, kolay genetik manipulasyon olanağı ile birlikte ölçeklendirilebilir hücre yoğunluklarına da ulaşılmasını sağlar. *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında, *Pichia pastoris* sisteminde, daha iyi bir sekresyon verimi yanında daha yüksek miktarlarda doğru katlanmış ve glikozillenmiş rekombinant protein üretimi gerçekleştirilir (Cereghino ve Cregg 2000, Macauley-Patrick vd 2005). Bunun yanında, çok güçlü tetiklenebilir *AOXI* ve yapısal *GAP* gibi promotorlara sahip vektörlerin varlığı, rekombinant protein üretiminde konakçı-vektör dizaynı yaparken çok büyük esneklik ve kolaylıklar sağlamaktadır.

Pir (iç tekrarlı protein, protein with internal repeat) proteinleri yalnızca mayalarda tanımlanmış yaygın bir şekilde korunmuş hücre duvarı proteinlerdir (Khasa vd 2011; De Groot vd 2005). *S.cerevisiae*'de, belli bir sekansın farklı sayılarda tekrar ettiği 5 farklı *Pir* proteini tanımlanmıştır (Mrsa vd 1997). *Pir* glikoproteinlerinde tekrar eden bu sekanslar membran yapısı için gerekli olup hücre yüzeyinde bulunan β -(1-3) glukana alkali-sensitif bağlarla bağlanırlar (Kapteyn vd 1999, Castillo vd 2003). *S. cerevisiae* α -mating sinyal peptidi 19 aminoasit içeren pre bölge, 67 aminoasit içeren pro bölge, üç N bağlı glikolasyon bölgesi ve dibazik Kex2 endopeptidaz bölgesinden oluşmaktadır (Kurjan and Herskowitz 1982). α -mating sinyal peptidinin çalışması 3 adımda gerçekleşir: önce endoplazmik retikulumdaki ilk sinyal sinyal peptidaz ile kaldırılır, daha sonra Kex2 peptidaz arginin ve lizin arasındaki pro lider sekansı ayırır ve son olarak Ste13 proteini golgideki Glu-Ala tekrarlarını parçalar (Brake vd 1984).

Hücre dışı rekombinant protein üretiminde en önemli faktörlerden biri proteinin önünde bulunan sekresyon sinyalidir. *Pichia pastoris* te bugüne kadar, PHO (Asit fosfotaz), *S. cerevisiae* INV (İnvertaz) ve α -mating faktör, HSA(İnsan serum albumin) veya rekombinant proteinde doğal olarak bulunan sekresyon sinyalleri başarı ile kullanılmıştır.

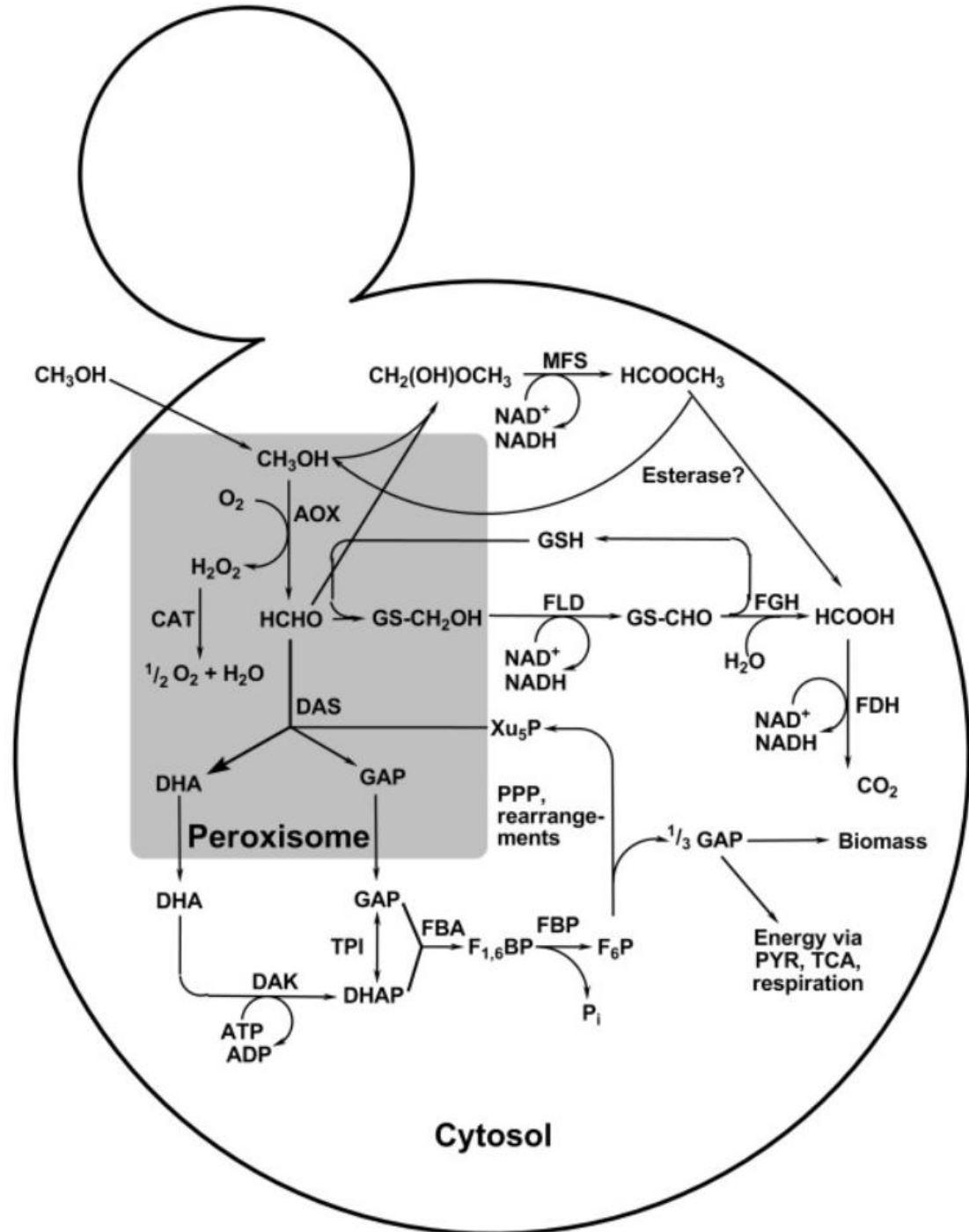
2.3. Metanol Metabolizması ve Metanol Kullanım Fenotipleri

Metanol kullanım yeteneklerine göre 3 tip *Pichia pastoris* konukçu suşu bulunmaktadır. Çoğu suş metanolde doğal tip oranında gelişir (Mut⁺, metanol kullanımı pozitif fenotip). Diğer konukçu suşların (Mut^s ve Mut⁻) bir veya iki AOX genide silinmiştir. Bazen AOX genleri silinmiş suşlar, doğal tip suşlardan daha iyi yabancı protein üreticisi olabilmektedir (Veenhuis vd 1983, Tschopp vd 1987). Ayrıca bu suşlar ekspresyon tetiklemesi için daha az metanol gerektirmektedir. Bu, yüksek miktarda metanolün yangın tehlikesi yarattığı yerlerde, büyük ölçekli fermentasyonlar için avantajdır.

Metilotrofik mayalarda, ekspresyonu transkripsiyon seviyesinde sıkı şekilde kontrol edilen benzersiz bir metanol kullanım izyolu bulunmaktadır. Bu izyolunun bir kısmı peroksizomlarda gerçekleşmektedir. Bu organeller metanol tetiklemesiyle hızla artmaktadır (Hartner and Glieder 2006).

Metanol kullanımında, izyolunun ilk aşamasında metanol, alkol oksidazlar (AOX, EC 1.1.3.13) tarafından oksitlenir, formaldehit ve hidrojen peroksit açığa çıkar. Toksik hidrojen peroksit (H₂O₂), katalaz (Cat, EC 1.11.1.6) enzimiyle oksijen ve suya yıkımlanır. Her iki enzim de peroksizomlarda bulunmaktadır. Tüm ökaryotlarda bulunan peroksizomların tipik özelliği, birbirleriyle çok alakalı olan, hidrojen peroksit üreten oksidazların ve açığa çıkan bu toksik maddeyi yıkımlayan katalazların varlığıdır. Bu sayede, bu zararlı bileşiğin sitoplazmaya difüzyonu engellenmektedir (Veenhuis vd 2006).

Oluşan formaldehit ise iki yoldan birini izlemektedir. Bir kısmı peroksizomdan ayrılır, sitoplazmada bulunan formaldehit dehidrogenaz (FLD) veya format dehidrogenaz (FDH) tarafından oksitlenerek, hücreye enerji sağlanır. Kalan formaldehit ise ksiluloz-5-fosfat ile, bir peroksizom enzimi olan dihidroksiaseton sentaz (DHAS) tarafından katalizlenen kondensasyon reaksiyonuna girer ve 3-karbonlu iki bileşik: dihidroksiaseton (DHA) ve gliseraldehit-3-fosfat (GAP) oluşur. Bu bileşiklerin metabolize edilmesi sitozolde devam eder (Veenhuis vd 2006).



Şekil 2.3. *Pichia pastoris*'te metanol kullanım izyolu (Krainer vd 2012).

Genelde, metanol izyolunun ekspresyonunu glikoz ve etanol baskılamakta, metanol ise güçlü şekilde tetiklemektedir. Metilotrofik mayaların AOX genleri üzerine, karbon kaynaklarının represyon ve derepresyon etkisi tabloda görülmektedir. Derepresyonun etkisi ve seviyesi metanol ile tetiklenmiş seviyelere göre verilmiştir. Her bir genin metanol ile indikasyonu %100 olarak kabul edilmiştir (Hartner and Glieder 2006).

Çizelge 2.2. Metilotrofik mayalarda karbon kaynaklarının AOX geni üzerine represyon ve derepresyon etkisi (Hartner and Glieder 2006)

Suş	Gen	Glukoz, Etanol	Gliserol	Metanol	Gliserol+Metanol
<i>Pichia pastoris</i>	<i>AOX1</i>	Represyon	Represyon	İndüksiyon	Represyon
	<i>AOX2</i>	Represyon	Represyon	İndüksiyon	Represyon
<i>H. polymorpha</i>	<i>MOX</i>	Represyon	Derepresyon (%60-70)	İndüksiyon	İndüksiyon (%100)
	<i>FMD</i>	Represyon	Derepresyon (%60)	İndüksiyon	İndüksiyon
<i>C. boidini</i>	<i>AOD1</i>	Represyon	Derepresyon (3-30)	İndüksiyon	İndüksiyon (%90)
	<i>FLD</i>	Aktivite yok	Derepresyon (%20)	İndüksiyon	İndüksiyon (%70)
	<i>FDH</i>	Represyon	Aktivite yok	İndüksiyon	İndüksiyon (%30)
<i>P. methanolica</i>	<i>DAS</i>	Represyon	Derepresyon (%2)	İndüksiyon	İndüksiyon (%70)
	<i>MOD1</i>	Represyon	Derepresyon (%60-70)	İndüksiyon	İndüksiyon (%100)
	<i>MOD2</i>	Represyon	Aktivite yok	İndüksiyon	İndüksiyon (%100)
	<i>FLD</i>	Aktivite yok	Derepresyon (%20)	İndüksiyon	İndüksiyon (%70)

2.4. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan *Pichia pastoris* Promotorları

Heterolog protein üretiminde *Pichia pastoris* ekspresyon sistemlerinin kullanımı, kolay genetik manipulasyon olanağı ile birlikte ölçeklendirilebilir hücre yoğunluklarına da ulaşılabilmesini sağlar. *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında, *Pichia pastoris* sisteminde, daha iyi bir sekresyon verimi yanı sıra daha yüksek miktarlarda doğru katlanmış ve glikozillenmiş rekombinant protein üretimi gerçekleştirilir (Cereghino ve Cregg 2000, Macauley-Patrick vd 2005). Bunun yanında, çok güçlü tetiklenebilir *AOX1* ve yapısal *GAP* gibi promotorlara sahip vektörlerin varlığı, rekombinant protein üretiminde konakçı-vektör dizaynı yaparken çok büyük esneklik ve kolaylık sağlamaktadır.

Pichia pastoris mayası besiyerinde gelişimi sırasında çok farklı karbon kaynaklarından yararlanabilmektedir. Başta glukoz ve metanol olmak üzere gliserol, etanol, mannitol, sorbitol, trehaloz, alanin vb. karbon kaynaklarını kullanabilmektedir. Ancak bazı karbon kaynaklarının ortamda bulunması (glukoz, etanol, gliserol, asetat) diğer karbon kaynaklarının (metanol) kullanımını baskılamaktadır (Tshopp vd 1987, İnan ve Meagher 2001a). *Pichia pastoris* ve diğer metilotrofik mayalarda katabolit

represyonu ve alkol oksidaz aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, glikoz ve etanolün ortamda bulunmasının alkol oksidaz aktivitesi üzerine baskılayıcı etki yaptığı ortaya konulmuştur. Ayrıca bu baskılayıcı etkinin katabolit represyonu ve katabolit inaktivasyonu olmak üzere iki farklı regülasyon mekanizması tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Bruinengberg vd 1982, Eggeling ve Sahm 1980, Veenhuis vd 1983). Van Der Klei vd (1991) *Hansenula polymorpha* (*P. angusta*) mayasında *AOXI* promotorunun glukoz ve etanol tarafından baskılandığını, Cregg vd (1989) ise benzer şekilde *Pichia pastoris*'in metanol tarafından indüklenen *AOXI* promotorunun, glukoz, etanol ve gliserol gibi karbon kaynakları tarafından baskılandığını belirtmişlerdir. Fakat *GAP* promotoru kontrolü altında yapılan rekombinant protein ekspresyonu sırasında üretilen bir miktar etanolün *AOXI* promotorunun tersine, *GAP* promotoru üzerine herhangi bir represif etkisinin olmadığı, hatta *GAP* promotoru kullanılarak yapılan rekombinant protein üretiminde ekspresyon seviyesinin arttığı belirtilmiştir (Baumann 2008). Sonuç olarak, rekombinant protein üretiminde *AOXI* promotorunun kullanımının en önemli avantajı, *AOXI* promotorunun indüksiyonu sonucu yüksek hücre yoğunluklarına çıkılması nedeni ile yüksek verimlilik ile sonuçlanan rekombinant proteinin üretimini gerçekleştirebilmesidir. Yapısal ekspresyon gösteren *GAP* promotoru ile yapılan rekombinant protein üretiminde *AOXI* promotoruna göre verim daha düşük olmaktadır. Sonuç olarak güçlü ekspresyon gösteren ve katı denetiminde bulunan *AOXI* promotoru rekombinant protein üretiminde daha fazla tercih edilmektedir.

AOXI promotorunun indüksiyonunun derecesi, karbon kaynağı olarak metanolün varlığına bağlıdır. Metanol esas olarak, gıda ürünleri ve katkılarının üretiminde kullanılmaya pek uygun olmayan petrokimyasal kaynaklardan elde edilir. Büyük ölçekli fermentasyon endüstrisinde metanol kullanımı ve depolanması, toksik ve yanıcı olduğundan tehlike arz etmektedir. Ayrıca, metanolde biyokütle üretimi için gerekli olan oksijen miktarı, karbon kaynağı glukoz olduğunda gerekli olan miktardan 3-4 kat daha fazladır. Oksijenin fazla miktarda kullanımı ısı üretimini arttırmakta ve biyoreaktörün sıcaklığını yükseltmektedir (Zhang vd 2010). Yüksek oksijen temini ve soğutma ihtiyacı üretim maliyetini arttırmakta ve ölçek büyütmede zorluklara neden olmaktadır.

Pichia pastoris'te rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan diğer bir promotor da *GAP* promotorudur. *GAP* promotoru, *AOXI* promotoruna göre glukoz içeren ortamda güçlü yapısal ekspresyon gösterir. Gliserol ve metanolde gelişen hücrelerin *GAP* promotor aktivite seviyesi, glukozda gelişen hücrelere göre sırasıyla 2/3 ve 1/3 seviyesindedir. *GAP* promotoru kullanımının avantajı indüksiyonu için metanol gerektirmemesidir. Ayrıca kolay gelişim için karbon kaynağından başka bir karbon kaynağına değişime ihtiyaç duyulmamaktadır. Fakat *GAP* promotoru yapısal (constitutive) olarak ifade edildiği için, maya hücresine toksik olan bir proteinin üretimi için iyi bir seçim değildir (Cereghino and Cregg 2000).

Pichia pastoris'te kullanımı yaygın olmayan ancak alternatif promotor olarak kullanılabilen farklı promotorlar da bulunmaktadır. Ancak çoğu çalışmada avantajlarından dolayı en fazla *AOXI* promotoru kullanılmaktadır. *FLDI* promotoru (tek karbon kaynağı olarak) metanol ya da (tek azot kaynağı olarak) metilamin varlığında tetiklenir (Shen vd 1998). *FLDI* promotorunun metanol ile indüksiyon seviyesi kullanılan azot kaynağına bağlıdır (Resina vd 2004). Karbon kaynağı-azot kaynağı: metanol-amonyum sülfat ya da glukoz-metilamin olarak düzenlenir. Fakat

glukoz ve amonyum sülfat içeren besiyerinde baskılanır. Ucuz bir azot kaynağı olan metilamin ile yüksek seviyede protein ekspresyonu için bu promotor önerilebilir.

PEX8 ve *YPT1* promotorları daha düşük ekspresyon seviyeleri tercih edildiğinde kullanışlıdır (Brierley 1998). *PEX8* geni, peroksizom biyogenezi için gerekli olan, peroksizomal matriks proteinini kodlamaktadır (Liu vd 1995). Metanolde *PEX8* promotoru ile ekspresyonun seviyesi, *FLD1* ve *AOX1* promotorlarından önemli oranda daha düşüktür. *YPT1* geni salgılamada rol alan GTPaz enzimini kodlamaktadır. *YPT1* promotoru, karbon kaynağı olarak glikoz, metanol veya mannitol içeren besiyerinde, düşük seviyede fakat yapısal ekspresyon sağlamaktadır (Sears vd 1998).

2.5. *Pichia pastoris* Seleksiyon Markırları

Pichia pastoris için klasik ve moleküler genetik teknikler oldukça iyi geliştirilmiş olmasına rağmen, mayaların moleküler genetik işlenmesi için sadece birkaç seçici markır tanımlanmıştır. Var olan markırlar biyosentetik izyolu genleri ile sınırlıdır. Bunlar, *HIS4* (*Pichia pastoris* ve *S. cerevisiae*), *ARG4* (*S. cerevisiae*), bakteriyel kanamisin direnç geni (*kan^R*) ve zeosin direnç genleridir.

Son zamanlarda, *Pichia pastoris*'ten yeni biyosentetik markırlar izole edilerek ve karakterize edilmiştir. Bunlar; *ADE1* (PR-amidoimidazole succinocarboxamide synthase), *ARG4* (argininosuccinate lyase) ve *URA3* (oroditine 5'-phosphate decarboxylase) genleridir. Bu seleksiyon markırlarının her biri ekspresyon vektörlerine uyarlanarak kullanımı mümkün olmuştur (Cereghino vd 2001b).

2.6. Seleksiyon Stratejisi

Doğru transformantların belirlenmesinde etkili bir seleksiyon stratejisi olarak bu farklı markırların kombinasyonları kullanılmaktadır. *Pichia pastoris* transformantlarının etkin seleksiyonunun önemli yönü çoklu kopya transformantlarının seçilmesi ve sonra gerçek kopya sayısının belirlenmesidir. Transformantları görüntülemek için, hücre lizatlarının hızı ve yarı kantitatif DNA Dot Blot metodu kullanılabilir. Bu seleksiyon yöntemi G418 ile seleksiyondan farklıdır. Bu metotla çok yüksek sayıda klon tanımlanabilir (Sreerikshna vd 1988).

Vektörün kesin kopya sayısını belirlemek için transformasyon işlemi yapılmış suşlardan, ilk olarak toplam genomik DNA izolasyonu yapılır. Sokulmuş vektör DNA'sının kromozomal yapısını belirlemek için Southern Blot analizi kullanılır. Bazen, kantitatif Dot-Blot analizidaha doğru sonuçlar vermektedir (Clare vd 1991). Bazen de, ifade edilen protein için iyi bir analiz mevcutsa, transformantların önce yüksek ekspresyon görüntülemeleri ile direkt olarak seleksiyonu yapılabilir (Laroche vd 1994).

2.7. Ekspresyon Suşları

Rekombinant protein üretimlerinde ve konukçu sistemler üzerine çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Bu çalışmalar sonucunda oluşturulan *Pichia pastoris* suşları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. *Pichia pastoris* suşları

Suş Adı	Genotip Yapısı
Okzotrofik Suşlar	
Y-11430	Doğal tip (NRRL*)
X-33	Doğal tip (Invitrogen)
GS115	<i>his4</i>
GS190	<i>arg4</i>
JC220	<i>ade1</i>
JC254	<i>ura3</i>
GS200	<i>arg4 his4</i>
JC227	<i>ade1 arg1</i>
JC304	<i>ade1 his4</i>
JC305	<i>ade1 ura3</i>
JC306	<i>arg4 ura3</i>
JC307	<i>his4 ura3</i>
JC300	<i>ade1 arg4 his4</i>
JC301	<i>ade1 his4 ura3</i>
JC302	<i>ade1 arg4 ura3</i>
JC303	<i>arg4 his4 ura3</i>
JC308	<i>ade1 arg4 his4 ura3</i>
YJN165	<i>ura5</i>
KM71	$\Delta aox1::SARG4 his4 arg4$
KM71H	$\Delta aox1::SARG4 his4 arg4 his4::PHIS4$
MC100-3	$\Delta aox1::SARG4 \Delta aox2::Phis4 his4 arg4$
Proteaz eksikliği olan suşlar	
SMD1168	$\Delta pep4::URA3 his4 ura3$
SMD1165	<i>Prb1 his4</i>
SMD1163	<i>Pep4 prb1 his4</i>
SMD1168 <i>kex1::SUC2</i>	$\Delta pep4::URA3 \Delta kex1::SUC2 his4 ura3$
Diğer suşlar	
GS241	<i>fld1</i>
MS105	<i>his4 fld1</i>

*Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL

Çizelge 2.3'te bulunan tüm okzotrofik ve proteaz eksikliği olan *Pichia pastoris* suşları doğal tip olan NRRL-Y 11430 suşundan türetilmiştir. Bu suşların çoğu bir veya daha fazla okzotrofik özelliğe sahiptir. Okzotrofik olmaları seçici markır içeren uygun vektörler kullanılarak transformantların seçimini mümkün kılmaktadır. Ancak bu özelliğe sahip suşların minimal besiyerinde gelişmesi için ortamda ihtiyaç duyulan besin(ler)in bulunması gerekmektedir. Rekombinant protein ekspresyonlarında en yaygın olarak kullanılan ekspresyon konukçusu *Pichia pastoris* GS115 (*his4*) suşudur. Bu suş *AOX1* ve *AOX2* genleri bakımından doğal tip oranında metanolde gelişme göstermektedir (mut^+) (Cregg vd 1985). *Pichia pastoris* KM71 (*his4 arg4 aox1* Δ : *SARG4*) suşunun kromozomal *AOX1* geni geniş olarak silinmiş ve yerine *S. cerevisiae*'dan *ARG4* geni yerleştirilmiştir (Cregg ve Madden 1987). Sonuç olarak bu suşun alkol oksidaz üretimi için daha güçsüz olan *AOX2* geni çalışmaktadır ve metanolde yavaş oranda gelişmektedir (Mut^S). *Pichia pastoris* KM71 suşuna bozuk olan

HIS4 geni geri kazandırılarak KM71H suşu elde edilmiştir. Proteaz eksikliği olan suşlar, üretilen rekombinant proteinlerinin degradasyonunu önlemeye yönelik geliştirilmiştir. *Pichia pastoris* MC100-3 (*his4 arg4 aox1Δ :: SARG4 aox2Δ::Phis4*) her iki *AOX* geni de inaktif edilmiş suştur (Mut⁻). Bu suş, Cregg vd'nin (1989) yaptıkları bir çalışma ile *Pichia pastoris* PPF1 (*arg4 his4*) ve *Pichia pastoris* KM7121 (*his4 arg4 aox1Δ :: SARG4 aox2Δ::-PHIS4*) suşlarının çiftleştirilmesi sonucu elde edilmiştir. Ancak MC100-3 suşu dahil bütün *Pichia pastoris* suşlarının *AOX1* promotörü ile indüklenen rekombinant protein üretebilme yeteneklerini koruduğunu belirtmişlerdir (Chiruvolu vd 1997). MC100-3 mutant suşunun genetik stabilitesinin çok düşük olması nedeniyle rekombinant protein üretimlerinde konukçu suş olarak tercih edilmemektedir.

Pichia pastoris ile yapılan protein üretimlerinde üretilmek istenen proteinin karalılığının göre proteaz eksikliği olan konukçu suşlara ihtiyaç duyulmaktadır. Kültür besiyerine salgılanan rekombinant proteinler, proteazlar tarafından hızlı bir şekilde parçalanmaya müsait oldukları için stabil değildirler. Kofullarda bulunan proteazlar ise özellikle fermentör kültürlerinde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılmasına bağlı olarak, küçük bir oranda hücre lizatının oluşması ile birlikte, protein degradasyonunda önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. *Pichia pastoris* *PEP4* geni, proteinaz A enzimini kodlayan genidir. *PEP4*, kofullarda bulunan diğer proteazların (karboksipeptidaz Y ve proteinaz B) aktivasyonu için gerekmektedir. Proteinaz B, proteinaz A tarafından inaktiflenmeden ve aktif hale gelmeden önce yarısı kadar aktiviteye sahiptir. *PRB1* geni proteinaz B enzimini kodlamaktadır. Bu yüzden, *pep4* mutant suşlarda, proteinaz A ve karboksipeptidaz Y aktiviteleri azalmıştır ya da sona ermiştir; proteinaz B aktivitesi azalmıştır. *prb1* mutantlarında, sadece proteinaz B aktivitesi sona ermiştir. *pep4 prb1* çift mutantlarında, tüm bu proteinaz aktiviteleri azalmıştır ya da sona ermiştir. *PEP4* veya *PRB1* genleri silinmiş farklı genotiplerde üç *Pichia pastoris* suşu bulunmaktadır. Bu suşlar, *Pichia pastoris* SMD1163 (*his4 pep4 prb1*), *Pichia pastoris* SMD1165 (*his4 prb1*), *Pichia pastoris* SMD1168 (*his4 pep4*) suşlarıdır ve bazı yabancı proteinlerin degradasyonunu azaltmada etkili olduğu belirlenmiştir.

2.8. Ekspresyon Vektörleri, Transformasyon ve *Pichia pastoris* Genomuna Entegrasyonu

Pichia pastoris'de yabancı bir genin ekspresyonu 3 temel aşamada gerçekleşir: (a) Ekspresyonun vektörüne genin sokulması, (b) ekspresyon vektörünün *Pichia pastoris* genomuna sokulması ve (c) yabancı geni potansiyel olarak ekspres eden suşların seçilmesidir (Lin-Cerenghino vd 2001a).

Tüm *Pichia pastoris* ekspresyon vektörlerinin paylaştığı temel özelliklerden biri ekspresyon kasetidir. Ekspresyon kaseti, promotor sekansı (genelde *AOX1*), transkripsiyonel sonlandırma sekansından oluşur ve *AOX1*'in türevidir. Ayrıca bu iki bölgenin arasında bulunan tek veya çoklu klonlama bölgesinden oluşmaktadır (Romanos vd 1992).

Yabancı sekansın ekspresyon vektörüne sokulması genelde *E. coli*'de yapılmaktadır. Bu yüzden *Pichia pastoris*'in tüm ekspresyon vektörleri *E. coli/Pichia pastoris* mekik vektörüdür. Bakteride kalabilmesi için bakteri replikasyon orijini içerir

ve her iki organizmada vektörün transformasyonu için seçici markırlar (zeosin, amfisiilin veya kanamisin direnç genleri) içerir.

Yabancı proteinlerin salgılanması için bazı ekspresyon vektörleri salgılama sinyalinin kodlayan sekanslar içerir. Bunlar yabancı gen ile aynı çerçeve içindedir. Genellikle bu salgılama sinyalleri; *Pichia pastoris* asit fosfataz (PHO1) ve *S. cerevisiae* α -çiftleşme faktörü (α -MF) olmaktadır. *Pichia pastoris*'in DNA aracılığıyla transformasyonu için kullanılan metotlar, *S. cerevisiae* için kullanılan metotlarla aynıdır ve benzer sonuçlar vermektedir.

Pichia pastoris'e transformasyon sferoplast kaynaşması ile, elektroporasyon gibi tam hücre metotları ile veya lityum klorit, lityum asetat, kalsiyum klorit veya polietilen glikol ile DNA'nın eş zamanlı presipitasyonu metotlarıyla sağlanabilir. Elektroporasyon *Pichia pastoris* transformasyonu için basit ve hızlı bir yöntemdir. Sferoplast tekniğine göre daha az sıklıkla çoklu kopya vermesine rağmen, G418 seleksiyon ile kombine edildiğinde genel laboratuvar kullanımı için çoklu kopyalı transformantların hızlı izolasyonu için idealdir.

Pratikte elektroporasyon/G418 seleksiyon metodu en iyi AOX'ten çaprazlama entegrasyon kullanılarak, KM71 suşunda çalışır. Çünkü bu suşla, 2-4 kat daha yüksek transformant frekansı elde edilmektedir (1000-2000 koloni/ μ g DNA).

Elektroporasyonla elde edilen transformasyon frekansı; (gene replacement) gen değişimi ile entegrasyonda, tek çaprazlama metotuna göre 20 kat daha düşüktür. Bu yüzden gen değişimi ile entegrasyonda, özellikle çok yüksek kopya sayılı transformantlar gerektiğinde, sferoplast transformasyon önerilmektedir.

İlk ve en basit olan entegrasyon metodu, vektörü, markır gen veya AOX1 promotör sekansları içinden, bir restriksiyon enzimi ile tek bir bölgeden kesmek ve doğrusal hale getirilmiş bu vektörü uygun okzotrofik mutant suşa aktarmaktır. DNA bölgelerinin vektörü uyarması sonucu yüksek olasılıkla tek çaprazlama ile homolog rekombinasyon gerçekleşmektedir. Geriye kalan transformantlar, gen dönüşüm olaylarına uğrarlar. Bu şekilde, vektörün diğer sekansları haricinde sadece markır geni, mutant konukçuya sokulmaktadır. Alternatif olarak *Pichia pastoris* ekspresyon vektörü benzer şekilde kesilir ve elde edilen doğrusal DNA fragmentlerinde ekspresyon kaseti ve markır gen (*HIS4* veya antibiyotik geni), AOX1 5 ve 3'terminal sekansları arasında dahil edilmektedir. transformantların önemli bir oranı entegrasyonu istenen AOX1 gen lokusunda ekspresyon vektörünü içermeyebilir. Transformant kolonilerde, istenilen genin varlığı Southern Blot veya PZR analizleri ile mutlaka doğrulanmalıdır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Ksilanaz gen kaynağı

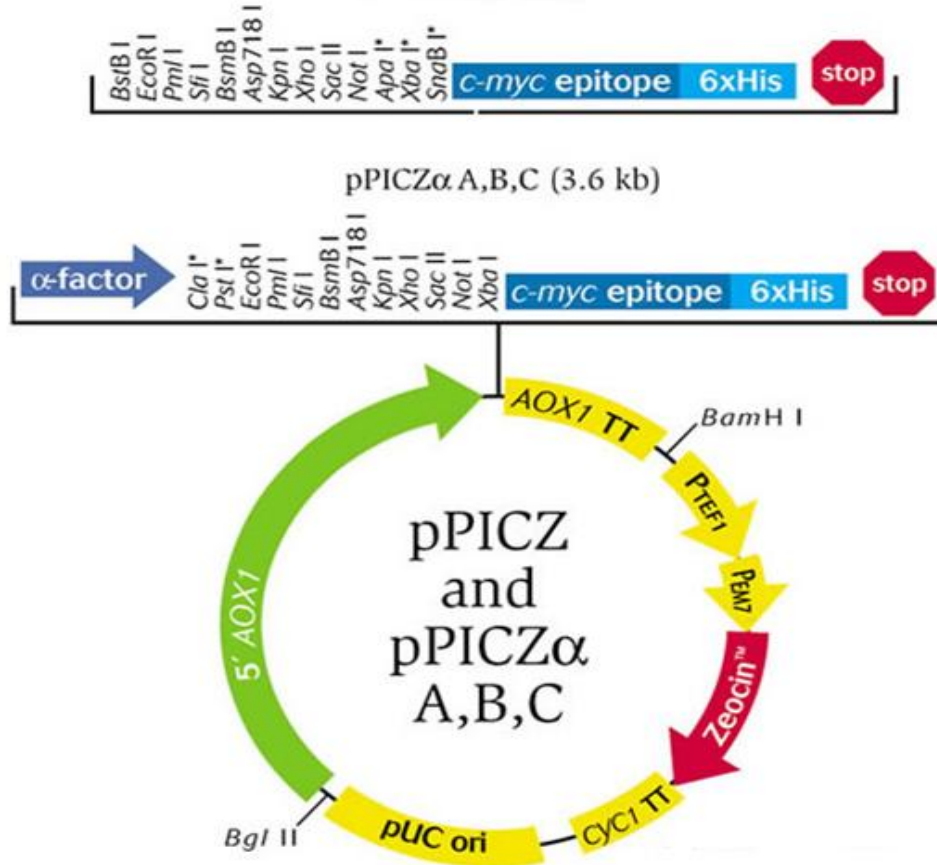
Laboratuvarımızda mevcut olan *Aspergillus niger XylB* geni enzim üretiminde kullanılacaktır. XylB enzimin c-terminal sonunda 6 Histidin kodlayan CAT kodonları mevcuttur. 6xHIS tag western analiz ve His-tag kolon saflaştırmaları için dizayn edilmiştir. Ksilanaz gen sekansı Ek-8.2'de verilmiştir.

3.1.2. Sinyal peptitler (Sekresyon molekülleri, sinyal sekanslar)

Kullanılan sinyal peptitler laboratuvarımızda mevcut olup HSA, PIR1, PHO1 pPICZB plazmitine ligasyon işlemiyle klonlanmıştır. α -mating faktör ise pPICZ α A plazmitinde bulunmaktadır.

3.1.3. Konakçılar plazmitler

Klonlama işlemleri için *Escherichia coli* XL1-Blue hücreleri kullanılmıştır. Protein ekspresyonu için *Pichia pastoris* KM71H suşu tercih edilmiştir.



Şekil 3.1. Protein ekspresyonu için kullanılacak olan pPICZ α A plazmiti

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazları ve bunların tampon çözeltileri Fermentas (MD, ABD) firmasından temin edilmiştir. Endonükleazlar kullanılırken üretici firmanın talimatları uygulanmıştır. Farklı şekilde belirtilmediği takdirde kullanılan kimyasalların tamamı Sigma-Aldrich (MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Metot

Çalışmalarda kullanılan moleküler biyoloji teknikleri Sambrook ve Russel (2001)'a göre gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, *Pichia pastoris*'de klonlama çalışmalarında İnan vd (2007) kaynak olarak kullanılmıştır.

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

PZR reaksiyonlarında ve Southern Blot uygulamalarında kullanılacak toplam genomik DNA izolasyonu ve maya hücrelerinden DNA izolasyonu için MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, WI, ABD) kullanılmıştır.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR-Polimerase Chain Reaction)

Çalışmalarda gerçekleştirilen tüm PZR reaksiyonları için TGradient (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) thermocycler (ısı döngü cihazı) ve KOD HotStart DNA Polymerase (Novagen, Almanya) enzim kiti kullanılmıştır.

Kullanılan gradient PZR cihazında, reaksiyon için kullanılacak primerlerin bağlanma sıcaklık aralıkları, primerlerden düşük erime sıcaklığına sahip olan primerin bağlanma sıcaklığının (T_m) ± 5 °C olacak şekilde programlanmıştır. Yürütülen çalışmada PZR analizlerinde kullanılan primerler ve bunlara ait bazı özellikler Ek-1'de verilmiştir.

PZR cihazında amplifikasyon basamağı için öngörülen süre beklenen PZR ürünün kbç cinsinden büyüklüğü göz önünde tutularak belirlenmiştir. Kapak sıcaklığı tepkime süresince 99 °C'de tutulmuş ve tepkime sonrasında tüplerin bekletileceği sıcaklık ise 4 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. PZR denemelerinde 35 döngü içeren düz program kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de uygulanan döngü programı için uygulanan şartlar verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Isı Döngü Program Akışı			
Sıra	Sıcaklık(°C)	Süre (sn)	Döngü Komutu
1	94	120	
2	94	30	
3	$T_m \pm 5$	30	
4	70	15-150	34 kez 2.'ye git
5	72	300	
6	4	∞	

Primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı, PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 1×TAE tamponu içinde yürütüldükten sonra en yoğun tek bant halinde gözlemlendiği sıcaklık olarak belirlenmiştir. Daha sonraki reaksiyonlar tespit edilen optimum sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri klonlama çalışmalarında kullanılmadan önce MinElute PZR Purification Kit (Qiagen, CA, ABD) yardımıyla veya gerekli görülmesi halinde jelde yürütülüp hedef bant kesilerek MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, ABD) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygun tampon çözelti içine elüsyon edilmiştir.

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve jelin görüntülenmesi

Pichia pastoris genomik DNA izolasyonlarının kalitesi, PZR ürünlerinin varlığı ve doğruluğu, restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim analizlerinin doğruluğunun kontrolünde agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken, 1×TAE tampon çözeltisine (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1mM EDTA) %1 oranında agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilerek çözündürülmüştür. Hazırlanan bu çözeltiye 1µl/50 mL etidiyum bromür çözeltisi (10 mg/mL) ilave edilmiştir. Uygun ebatta ve şekilde seçilen jel kalıplarına dökülerek jel donuncaya kadar beklenmiş ve jel bloğu elde edilmiştir. Jel kuyularına yüklenecek örnekler 5µl örneğin ve 1 µl 6× Loading Dye jel yükleme tamponunun ultra saf su ile seyreltilmesiyle toplam 10-20 µl hacimde hazırlanmıştır. Jel bloğu 1×TAE tampon içinde tutularak örnekler jel kuyularına yüklenmiştir. Daha sonra elektroforez uygulaması ile DNA örnekleri jel içinde yürütülmüştür. Elektroforez uygulamaları 120V doğru akım altında, 45-90 dak süreyle gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel içinde moleküler büyüklüklerine göre yatay bantlara ayrılan DNA molekülleri etidiyum bromür varlığında UV ışık (312nm) kaynağından yararlanılarak jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmant E-Box-VX2) ile görüntülenmiştir. Agaroz jel işlemlerinde markır olarak (M) GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır.

3.2.4. Ligasyon ve transformasyon

Transformasyon işlemlerinde, CaCl₂ metodu ile kimyasal transformasyona yetenekli hale getirilmiş *E.coli* XL-1 Blue suşu kullanılmıştır. Kimyasal transformasyon işlemleri buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

E.coli XL-1 Blue suşu kimyasal transformasyona uygun hale getirilmesi için CaCl₂ metodu ile transformasyona yetenekli hale getirilmiştir. Buz üstünde tutulan hücrelere 1-5 µL plazmit çözeltisi veya ligasyon karışımı doğrudan ilave edilmiş ve 30 dak. süre ile inkübe edilmiştir. Hücrelere 42°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda (Techne Dri-Blok DB-2D) 60 sn tutularak ısı şoku uygulanmış ve tekrar buz üzerinde 5 dak. inkübe edilmiştir. Daha sonra 200 µL sıvı Luria-Bertani (LB) Miller (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 10 g/L NaCl) veya sıvı Luria-Bertani (LB) Lennox (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 5 g/L NaCl) besiyerinden ilave edilen hücreler, 1 saat süreyle 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücre sıvısı 100 µg/mL Amfisilin içeren LB Miller agar veya 25 µg/mL Zeosin içeren LB Lennox agar petrilere yayma yöntemi ile ekilmiştir. Petrilere bir gece 37°C'de üremeye bırakılmıştır.

Pichia pastoris hücrelerinin elektroporasyona uygun hale getirilmesi için Lityum asetat metodu kullanılmıştır (Wu ve Letchworth 2004). Maya hücrelerinde yapılan elektrokimyasal transformasyonda hücreler buz üstünde bekletilerek çözündürülmüştür. Üzerine doğrusallaştırılmış hale getirilmiş DNA parçası veya plazmitlerden 1-10 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Ardından buz üstünde bekletilerek soğutulmuş 2 mm yüzey genişliğine sahip elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmıştır. Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) cihazında 1500 V gerilimde 5 ms süre ile elektrotransformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Akım uygulanan hücreler derhal buz üzerine alınarak 1 mL soğuk 1 M sorbitol çözeltisi eklenmiştir. Temiz 1.5 mL hacimli mikro santrifüj tüplerine alınan karışım 1 saat 30°C'de inkübe edildikten sonra 100 µg/mL Zeosin ilaveli YPD plakalarına yayma ekim yapılmış ve transformasyon petripleri kolonların gelişimi için 2-3 gün süreyle 30°C'de inkübe edilmiştir.

Ligasyon işlemlerinde üretici firmanın önerdiği kullanım talimatları doğrultusunda plazmit ve ligasyonu yapılmak istenen DNA parçalarının molar oranları 1:3 veya 1:5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm ligasyon reaksiyonları 15-25 µL toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemlerinde Fermentas (Fermentas, MD, ABD) ve Roche (Roche, Almanya) ligasyon kitleri kullanılmıştır.

3.2.5. Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu yapılacak bakteriler 3-4 mL uygun antibiyotikli sıvı besiyerinde 37°C'de 18-20 saat geliştirilmiştir. Plazmit izolasyonu işlemlerinde QIAprep®Spin Miniprep Kiti (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. Plazmit izolasyonu üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elüsyon işlemleri 50 µL 10 mM Tris (pH 8.0) ile yapılmıştır. Plazmit izolasyonu esnasında santrifüj işlemleri >20,000 g hızda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Plazmit izolasyonlarının kalitesi ve doğruluğu restriksiyon endonükleazlar ile yapılan uygulamalar ile agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve daha sonra DNA miktarları belirlenmiştir.

3.2.6. PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılmasında MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. İşlemler üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elüsyon 10-20 µL 10 mM Tris (pH 8.0) ile yapılmıştır. İşlemler sırasında santrifüj için > 20,000 g hızda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı kullanılmıştır.

3.2.7. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu

DNA parçaları %1'lik düşük erime noktalı agaroz jelde (SeaKem, FMC Bioproducts, ME, ABD) yürütülmüş ve istenen bant jelden kesilmiştir. Jel özütleme işlemleri için MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. İşlemler üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemleri sırasında > 20,000 g hızda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı kullanılmıştır.

3.2.8. SDS-PAGE ve Western blot analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) Owl P8D8 (Thermo Scientific) cihazı ile %5 poliakrilamid yükleme jeli ve %7,5 poliakrilamid ayırma jeli olacak şekilde hazırlanarak yürütülmüştür.

Örnekler toplam hacim 25 µL olacak şekilde protein üretiminden alınan süpernatantların 1:3 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 Bromphenol Blue, %40 Glycerol, 100 mM DTT) ile karıştırılması ve ve 70°C'de 10 dakika denatüre edilmesi ile hazırlanmıştır. Ardından 20 µL'lik kısmı jele yüklenmiştir.

Elektrofrez işlemi, 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, %0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 150 V değerinde 60 dakika yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, IRDye Blue Protein Stain (Licor Odyssey) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, saf su ile 15 dakika yıkandıktan sonra LiCor (Odyssey) ile görüntülenmiştir.

Western Blot analizi ise NuPAGE® Bis-Tris Precast (Invitrojen) hazır jeller kullanılarak yapılmıştır. *Pichia pastoris* kültürlerinden hasat edilen süpernatantlar, SDS-PAGE analizinde olduğu gibi hazırlanmış, ardından 10 µL'lik kısmı jele yüklenmiştir. Elektrofrez işlemi, 1X NuPAGE® MES SDS Running Buffer (Invitrogen) içinde 200 V değerinde 20 dakika yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Jelde ayrımı yapılan proteinler, Owl HEP-1 ElectroBlotter (Thermo Scientific) ile 20 V değerinde 60 dakika süre ile PVDF membrana (Millipore) aktarılmış ve gece boyu kapatma tamponu (0.2xPBS+%0.5 Casein) içinde orbital çalkalayıcının üzerinde oda sıcaklığında bırakılmıştır.

Polihistidin etiketli proteinin tespit edilmesi için primer antikor olarak Penta-His Antibody(Mouse anti-(H)5, Qiagen), sekonder antikor olarak Goat-Anti Mouse IRDye800cw (Licor) Antibody kullanılmıştır. Antikorlarla hibridizasyonu tamamlanan membran Licor'da (Odyssey) 700 nm dalga boyunda taranmıştır.

3.2.9. DNA ve plazmit miktarlarının ölçülmesi

Elde edilen genomik DNA, PZR ürünlerinin ve plazmit izolatlarındaki DNA miktarı (konsantrasyonu) PicoGreen boya (Molecular Probes®, Invitrogen, CA, ABD) yardımıyla Qubit Fluorometer (Invitrogen, ABD) kullanılarak fluorometrik olarak ölçülmüştür. Standart kurve 0-100 ng/µL DNA dilüsyonları kullanılarak hazırlanmış ve DNA miktar tayini otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Standart ve örneklerin dilüsyonlarının hazırlanmasında 1xTE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) tampon çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.10. Southern blot analizi

Pichia pastoris transformasyonu sonrası seçilen koloniler YPD besiyerinde geliştirilerek genomik DNA izolasyonları yapılmış ve daha önceden belirlenen enzimlerle DNA izolatları kesilmiştir. Enzim ile muameleden sonra %0.8 agaroz jele

yüklenen örnekler yaklaşık 120 V değerinde 2 saat 1x TAE tamponu içinde yürütülmüştür. Elektroforez sonunda jel, 45 dakika denatürasyon çözeltisiyle (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ve ardından 30 dakika nötralizasyon çözeltisi (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA) ile orbital çalkalamalı üzerinde muamele edilmiştir. Naylon membran (20x20 cm Pozitively Charged Nylon Membran, Roche, ABD) 10xSSC Blotlama tamponuyla (3 M NaCl, 0.3 M Sodyum sitrat, 1mM EDTA) ıslatılmıştır. Membran jelin alt yüzü ile temas edecek şekilde yerleştirilmiş ve Southern Blot uygulamasına hazır hale getirilmiştir. Blotlama işlemleri yaklaşık olarak 3 saatte tamamlanarak hibridizasyon aşamasına geçilmiştir. Kağıt havlu üzerinde kurutulan membran, ultraviyole çapraz bağlayıcı (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) ile 3 kez 120 mJ UV ışını uygulanarak DNA molekülleri membran üzerine bağlanmıştır. Membran hibridizasyon tüpüne yerleştirilerek üzerine ön hibridizasyon çözeltisi (DIG Easy Hyb, Roche, Almanya) eklenerek 1 saat 41°C'de muamele edilmiş ve ardından DIG etiketli probu içeren hibridizasyon çözeltisi eklenerek aynı sıcaklıkta bir gece hibridizasyona bırakılmıştır.

Hibridizasyon sırasında spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak için hibridizasyon işleminin sonunda yıkama işlemleri gerçekleştirilir. Hibridizasyon tüpüne önce birinci yıkama çözeltisi (2xSSC+%0.1 SDS) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5'er dakika olmak üzere işlem iki kez tekrar edilmiştir. Ardından 68°C'de 15'er dakika olmak üzere 2 kez ikinci yıkama çözeltisi (0.5xSSC+%0.1 SDS) ile muamele edilmiştir. Daha sonra kapatma tamponunda (1xDIG Blocking Solution) 1 saat, 2 kez 5'er dakika yıkama tamponunda (0.1 M maleik asit pH 7.5, %0.3 (v/v) Tween 20), anti-DIG antikor çözeltisinde 1 saat, 4 kere 5'er dakika yıkama tamponunda ve 5 dakika dedeksiyon tamponunda (0.1 M Tris pH 9.5 ve 0.1 M NaCl) gerçekleştirilmiştir. Daha sonra membran şeffaf propilen zar içerisine yerleştirilerek üzerine birkaç damla CSPDR (alkali fosfataz substratı) çözeltisi damlatılmıştır. Dosyanın içindeki hava boşlukları çıkartılarak 10 dakika 37°C'de inkübe edilmiş ve karanlık odada X-ışını film kaseti içinde X-ışını filmiyle üst üste gelecek şekilde 20-60 dakika arasında bekletilmiştir. Süre sonunda elde edilen X-ışını filmi karanlık odada Kodak film geliştirme çözeltileriyle muamele edilerek geliştirilmiştir.

3.2.11. Rekombinant protein üretimi

Ksilanaz üretimi için seçilen klonlar 1 gece 30°C'de YPD sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Ardından başlangıç OD'si 0.1 olacak şekilde BMGY (%2 pepton, %1 yeast extract, %1.34 YNB, %4x10⁻⁵ biotin, 100mM pH 6 fosfat tamponu ve %1 gliserol) inoküle edilmiştir. İnkübasyonun 18-20. saatinde 12-15 OD'ye gelişmeleri sağlanan hücreler hasat edilerek (santrifüjlenerek), BMMY besiyerine (%2 pepton, %1 yeast extract, %1.34 YNB, %4x10⁻⁵ biotin, 100mM pH 6 fosfat tamponu ve %1 metanol) geçirilmiştir. Son metanol konsantrasyonu %1 olacak şekilde 24 saatlik aralıklarla indüksiyon (tetikleme) yapılmıştır.

3.2.12. Ksilanaz enzim aktivitesinin ölçülmesi

Ksilanaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesinde Hyun ve Zeikus (1985) tarafından kullanılan DNS yöntemi bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır.

Yöntemin esası, ksilanın parçalanması ile açığa çıkan indirgen şekerlerin ölçülmesine dayanmaktadır.

Reaksiyon karışımı, 100µL 1:10 oranında seyreltilmiş enzim çözeltisi ve 900 µL substrat çözeltisi (50mM pH 5 sodyum sitrat tamponunda hazırlanmış %1 breechwood ksilan) ile hazırlanmıştır. Karışım 50°C'de 30dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonunda 900µL DNS çözeltisi (%1 DNS, %30 sodyum potasyum tartarat tetrahidrat ve 400 mM NaOH) eklenerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır. Ardından 95°C'de 5 dak. inkübe edilerek renk gelişimi sağlanmış, 1 dak. buzda soğutulmuş ve spektrofotometrede 540nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri kaydedilmiştir. Okuma işlemi sırasında kör olarak 0. dakikada DNS solüsyonu eklenerek aktivitesi durdurulmuş olan aynı reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Ksilanaz enzim aktivitesi için 1 ünite, yukarıda belirtilen koşullar altında 1mL enzimin 1 dakikada açığa çıkardığı glikoz cinsinden ifadesi olarak tanımlanmıştır (Salleh vd 2006).

3.2.13. Rekombinant proteinin saflaştırılması

Protein (ksilanaz) hücre dışı ve polihistidin etiketli üretilmiştir. Hücreler 48 saat metanol indüksiyonu ardından 6000 g'de 5 dak. santrifüjlenerek çöktürülmüş ve elde edilen süpernatandan histidin etiketli proteinin purifikasyonu için HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific Pierce, IL, ABD) kullanılmıştır. Kitin talimatları doğrultusunda işlemler gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırma prensibine göre histidin etiketli proteinler, nikel kolona bağlanarak etiketsiz proteinlerden ayrılmaktadır. Kolona bağlanan proteinler, 100 mM PBS pH7.4 (phosphate-buffered saline) içinde farklı imidazol konsantrasyonlarında hazırlanan solüsyonlar ile muamele edilerek yıkanmış ve ardından elüsyon çözeltileri elde edilmiştir. Elüsyon çözeltilerinde bulunan imidazolün uzaklaştırılması için diyaliz membranı (Skin Dialysis Tubing, 3,5K MWCO, Thermo Scientific, IL, ABD) kullanılarak %5 gliserol içeren 100 mM PBS içinde, +4°C'de gece boyu diyaliz gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi, SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir.

3.2.14. Rekombinant proteinin karakterizasyonu

Rekombinant enzimin çalışma koşullarının belirlenmesi için optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH araştırılmıştır.

Öncelikle 50°C optimum sıcaklık olarak belirlenmiş, bunun için pH 3-7 aralığındaki enzim aktivitesi ölçülmüştür. İşlem farklı pH'lardaki sodyum sitrat çözeltisi ile yapılmıştır.

Belirlenen optimum pH'da farklı sıcaklıklarda (20-70°C) enzim reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve enzimin çalıştığı optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

Enzimin termal stabilitesinin ölçülmesi için, enzim farklı sıcaklık ve sürelerde inkübe edilmiş ve enzimin kalan aktivitesi ölçülmüştür.

4. BULGULAR

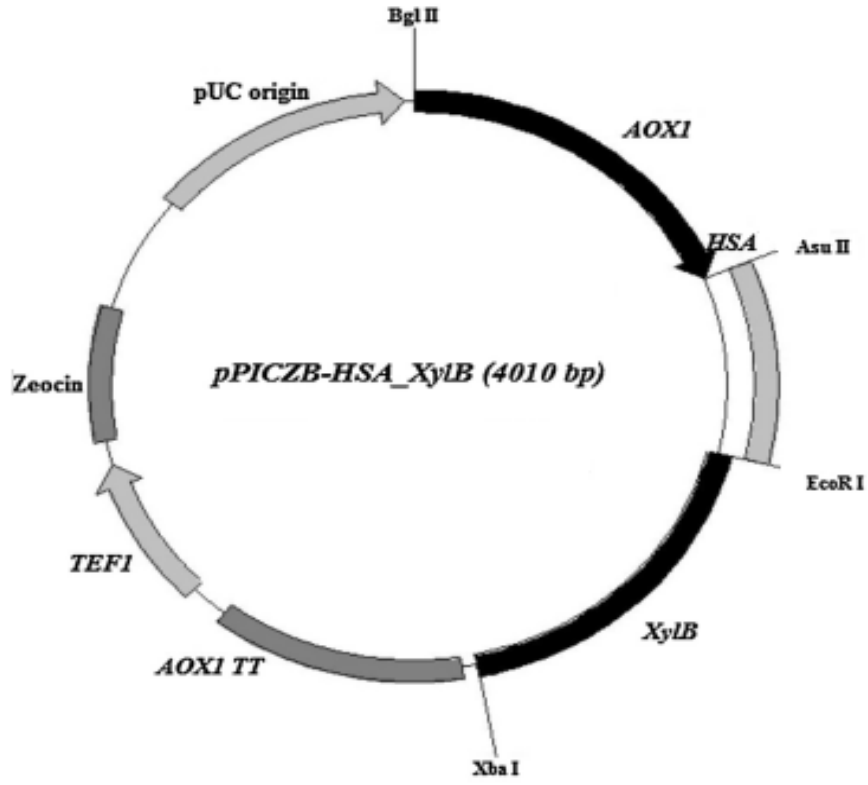
Klonlama vektörü içinde gelen ksilanaz geni, öncelikle komponent *E.coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmış ve transformant hücrelerin seçilimi 25 µg/ml amfisilin içeren LB Miller agarda yapılmıştır. Agarda büyüyen amfisilin dirençli kolonilerden seçilenler, amfisilinli LB Miller sıvı besiyerine inokule edilerek 37°C'de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Transformant *E. coli* hücrelerinden plazmit izolasyonu yapılırken Plasmid Miniprep Kit (Qiagen) kullanılmış, klonlamanın doğruluğu *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve jelde yürütüldüğünde 597 bp fragmentinin görülmesi genin varlığını göstermiştir.

4.1. Plazmitlerin Sinyal Peptitler İçin Hazırlanması

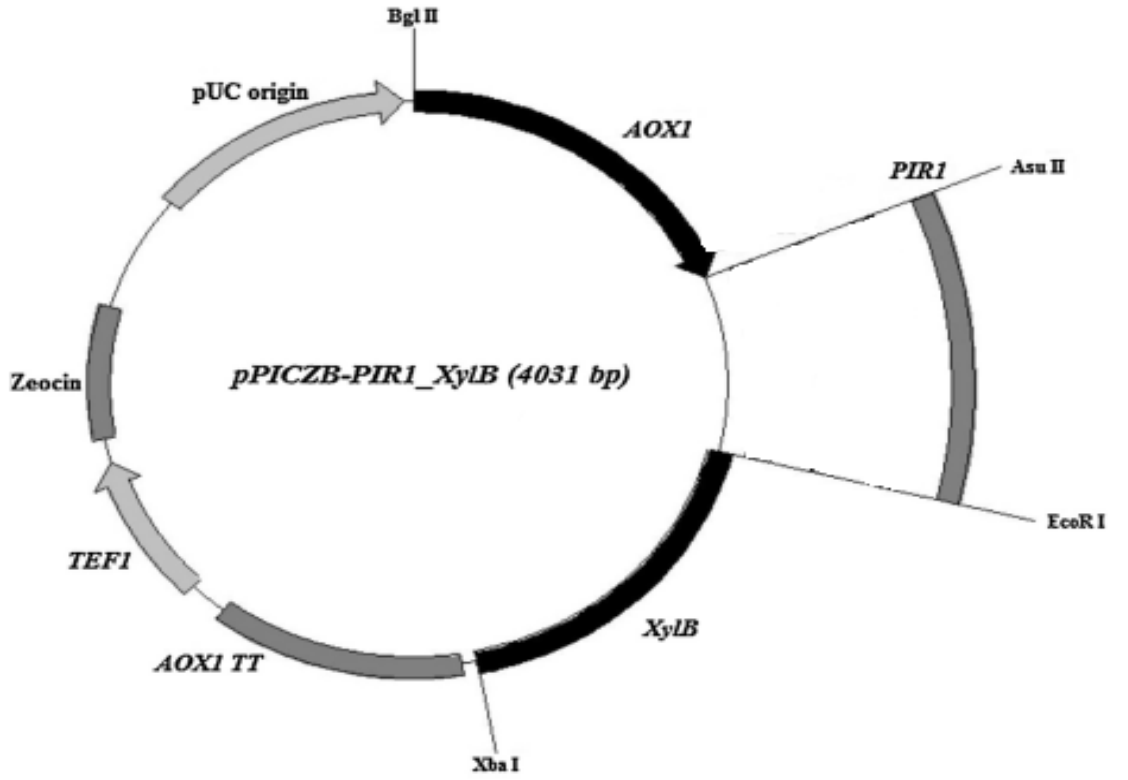
Bu çalışmada pPICZB ve pPICZαA plazmitleri kullanılmıştır. Sinyal peptitlerden HSA, PIR1 ve PHO1 *Asu II* ve *EcoR I* bağlanma bölgelerinden kesilerek pPICZB plazmitine klonlanmıştır. α-mating faktörü pPICZαA'de bulunduğundan herhangi bir işlem yapılmamıştır.

4.2. Ksilanaz Geninin Farklı Sinyal Peptit İçeren Plazmitlere Klonlanması

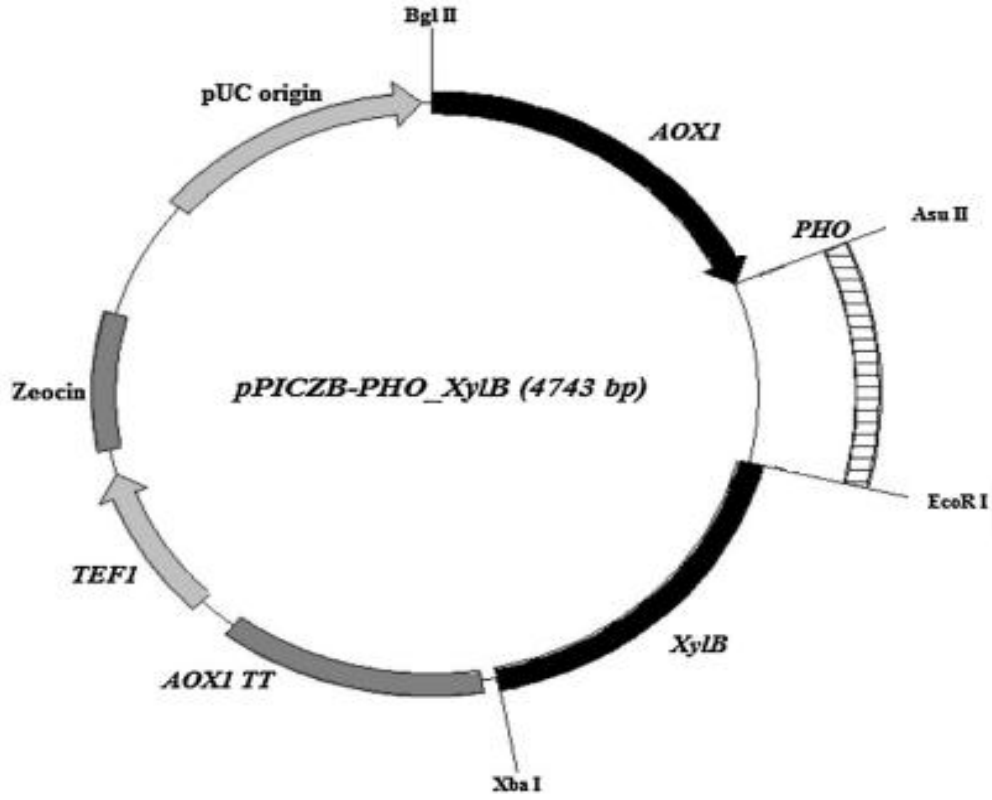
pPICZB HSA, pPICZB PIR1, PICZB PHO1, pPICZαA ve pUC57_KSI *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş, jelle yüklenmiş, jelden kesim ve jel purifikasyonu yapılmıştır. Ayrıca vektörlere defosforilasyon işlemi uygulanmıştır. Konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. *SacI* enzimi ile doğrusal hale getirilmiş ve ROCHE Ligation Kit ile ligasyon işlemi yapılmıştır. Ligasyon karışımı *E.coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmış ve transformant hücrelerin ekimi 25 µg/ml zeosin içeren LB Lennox agara yapılmıştır. Zeosin dirençli koloniler seçilerek zeosinli LB Lennox sıvı besiyerine inokule edilmiş, 37°C'de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Plasmid Miniprep Kit (Qiagen) ile plazmit izolasyonu yapılmış, klonlamanın doğruluğu *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kontrol edilmiştir. Sonuçta oluşan plazmitler Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir.



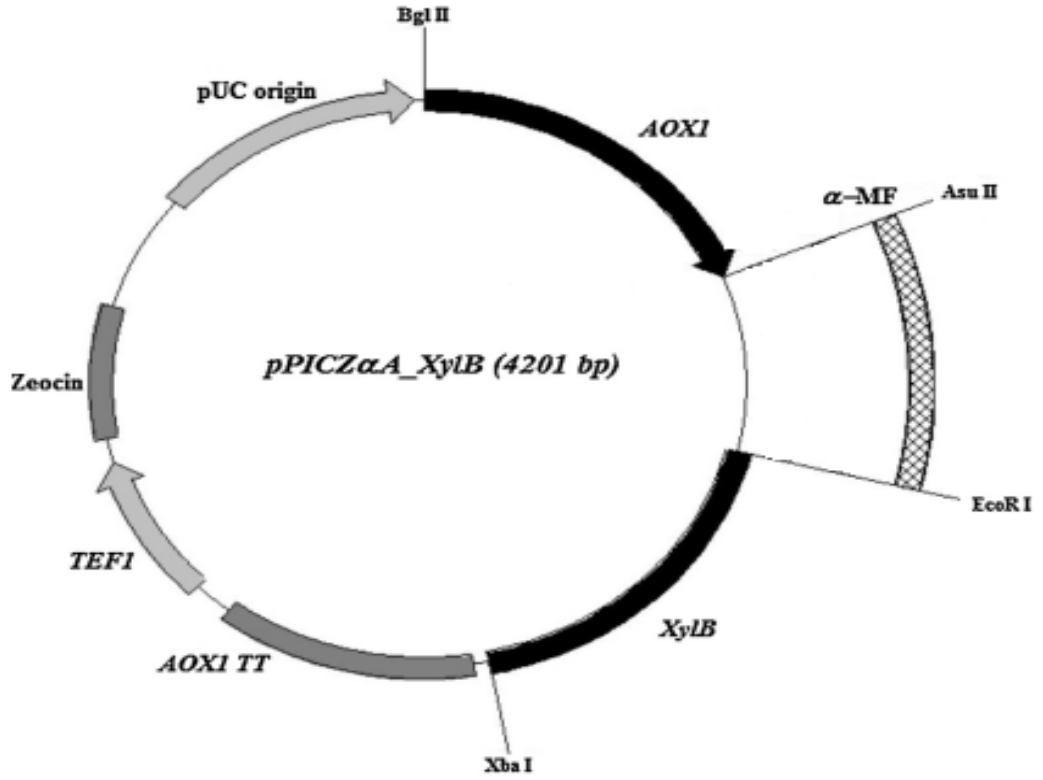
Şekil 4.1. HSA sekresyon sinyaline bağlı ksilanaz geninin gösterimi



Şekil 4.2. PIR sekresyon sinyaline bağlı ksilanaz geninin gösterimi



Şekil 4.3. PHO sekresyon sinyaline bağlı ksilanaz geninin gösterimi



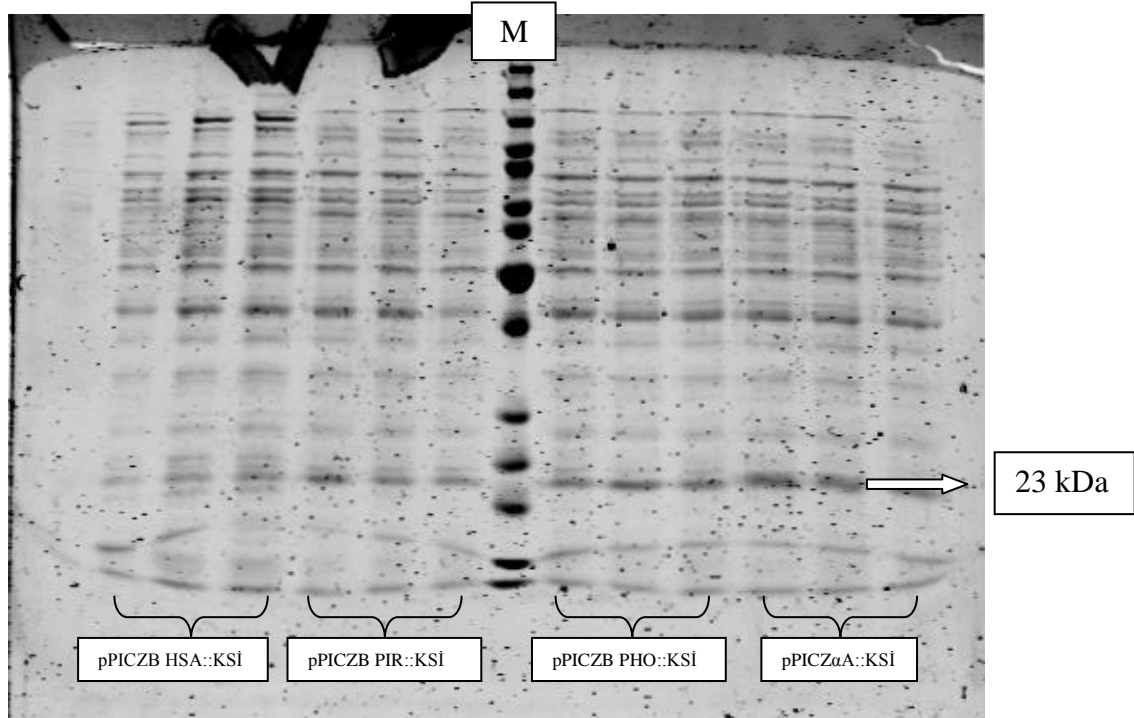
Şekil 4.4. α-mating faktörü sekresyon sinyaline bağlı ksilanaz geninin gösterimi

4.3. Ekspresyon Vektörlerinin *Pichia pastoris* KM71H Transformasyonu

Vektörler *SacI* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirildikten ve pürifikasyondan sonra, Lityum Asetat transformasyon metodu (Wu ve Letchwoth, 2004) kullanılarak *Pichia pastoris* KM71H suşuna aktarılmıştır. Transformasyon işlemi 1.5 kV volt da Electroporator (Eppendorf) ile gerçekleştirilmiştir. Transformant hücreler 75 µg/ml zeosin içeren YPD plakalarına ekilerek zeosin-dirençli hücrelerin seçilimi gerçekleştirilmiş, plakalar 28°C'de 2-4 gün koloniler oluşana kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra single koloni elde etmek için YPD agara çizim yapılmış, alınan koloniler sıvı YPD besiyerine inoküle edilmiştir. 18-24 saat 28°C'de 250 rpm de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. YPD sıvı besiyerinde geliştirilmiş *Pichia pastoris* KM71H genomik DNA'sı Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Epicentre, Madison, WI, ABD) ile izole edilmiş ve transformant hücrelerde genin varlığı PZR ile 3'AOX/5'AOX primerleri kullanılarak doğrulanmıştır.

4.4. Protein Üretimi

Ksilanaz üretimi için seçilen klonlar 1 gece 30°C'de YPD sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Ardından başlangıç OD'si 0.1 olacak şekilde BMGY (%2 pepton, %1 yeast extract, %1.34 YNB, % 4×10^{-5} biotin, 100mM pH 6 fosfat tamponu ve %1 gliserol) inoküle edilmiştir. İnkübasyonun 18-20. saatinde 12-15 OD'ye gelişmeleri sağlanan hücreler hasat edilerek (santrifüjlenerek), BMMY besiyerine (%2 pepton, %1 yeast extract, %1.34 YNB, % 4×10^{-5} biotin, 100mM pH 6 fosfat tamponu ve %1 metanol) geçirilmiştir. Son metanol konsantrasyonu %1 olacak şekilde 24 saatlik aralıklarla indüksiyon (tetikleme) yapılmıştır. Protein üretimi SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir.

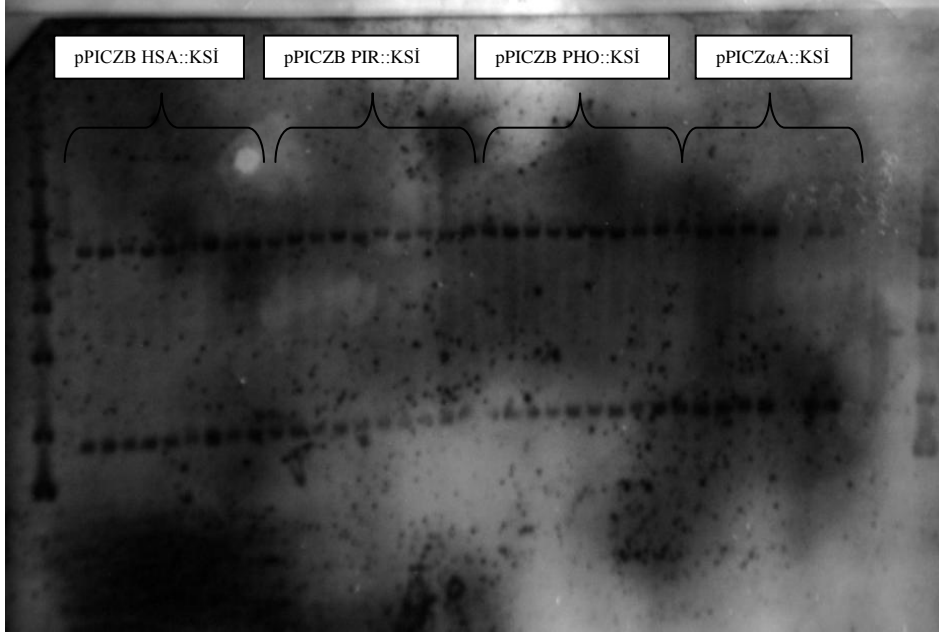


Şekil 4.5. Ksilanaz geni içeren örneklerin SDS-PAGE analizi

4.5. Gen Kopya Sayısının Belirlenmesi (Southern Blot)

Pichia pastoris transformasyonu sonrası her sinyal peptidi içeren kolonilerden 10'ar tane seçilmiş, koloniler YPD besiyerinde geliştirilerek genomik DNA izolasyonları yapılmış ve *Bgl II* enzimi ile DNA izolatları kesilmiştir. Enzim ile muameleden sonra %0.8 agaroz jele yüklenen örnekler yaklaşık 120 V değerinde 2 saat 1x TAE tamponu içinde yürütülmüştür. Elektroforez sonunda jel, 45 dakika denatürasyon çözeltisiyle (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ve ardından 30 dakika nötralizasyon çözeltisi (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA) ile orbital çalkalamalı üzerinde muamele edilmiştir. Naylon membran (20x20 cm Pozitively Charged Nylon Membran, Roche, ABD) 10xSSC Blotlama tamponuyla (3 M NaCl, 0.3 M Sodyum sitrat, 1mM EDTA) ıslatılmıştır. Membran jelin alt yüzü ile temas edecek şekilde yerleştirilmiş ve Southern Blot uygulamasına hazır hale getirilmiştir. Blotlama işlemleri yaklaşık olarak 3 saatte tamamlanarak hibridizasyon aşamasına geçilmiştir. Kağıt havlu üzerinde kurutulan membran, ultraviyole çapraz bağlayıcı (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) ile 3 kez 120 mJ UV ışını uygulanarak DNA molekülleri membran üzerine bağlanmıştır. Membran hibridizasyon tüpüne yerleştirilerek üzerine ön hibridizasyon çözeltisi (DIG Easy Hyb, Roche, Almanya) eklenerek 1 saat 41°C'de muamele edilmiş ve ardından DIG etiketli probu içeren hibridizasyon çözeltisi eklenerek aynı sıcaklıkta bir gece hibridizasyona bırakılmıştır.

Hibridizasyon sırasında spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak için hibridizasyon işleminin sonunda yıkama işlemleri gerçekleştirilir. Hibridizasyon tüpüne önce birinci yıkama çözeltisi (2xSSC+%0.1 SDS) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5'er dakika olmak üzere işlem iki kez tekrar edilmiştir. Ardından 68°C'de 15'er dakika olmak üzere 2 kez ikinci yıkama çözeltisi (0.5xSSC+%0.1 SDS) ile muamele edilmiştir. Daha sonra kapatma tamponunda (1xDIG Blocking Solution) 1 saat, 2 kez 5'er dakika yıkama tamponunda (0.1 M maleik asit pH 7.5, %0.3 (v/v) Tween 20), antikor çözeltisinde 1 saat, 4 kez 5'er dakika yıkama tamponunda ve 5 dakika dedeksiyon tamponunda (0.1 M Tris pH 9.5 ve 0.1 M NaCl) gerçekleştirilmiştir. Daha sonra membran şeffaf propilen zar içerisine yerleştirilerek üzerine birkaç damla CSPDR (alkali fosfataz substratı) çözeltisi damlatılmıştır. Dossyanın içindeki hava boşlukları çıkartılarak 10 dakika 37°C'de inkübe edilmiş ve karanlık odada X-ışını film kaseti içinde X-ışını filmiyle üst üste gelecek şekilde 20-60 dakika arasında bekletilmiştir. Süre sonunda elde edilen X-ışını filmi karanlık odada Kodak film geliştirme çözeltileriyle muamele edilerek geliştirilmiştir.



Şekil 4.6. Ksilanaz geni içeren örneklerin kopya sayısını gösteren X-Ray filmi

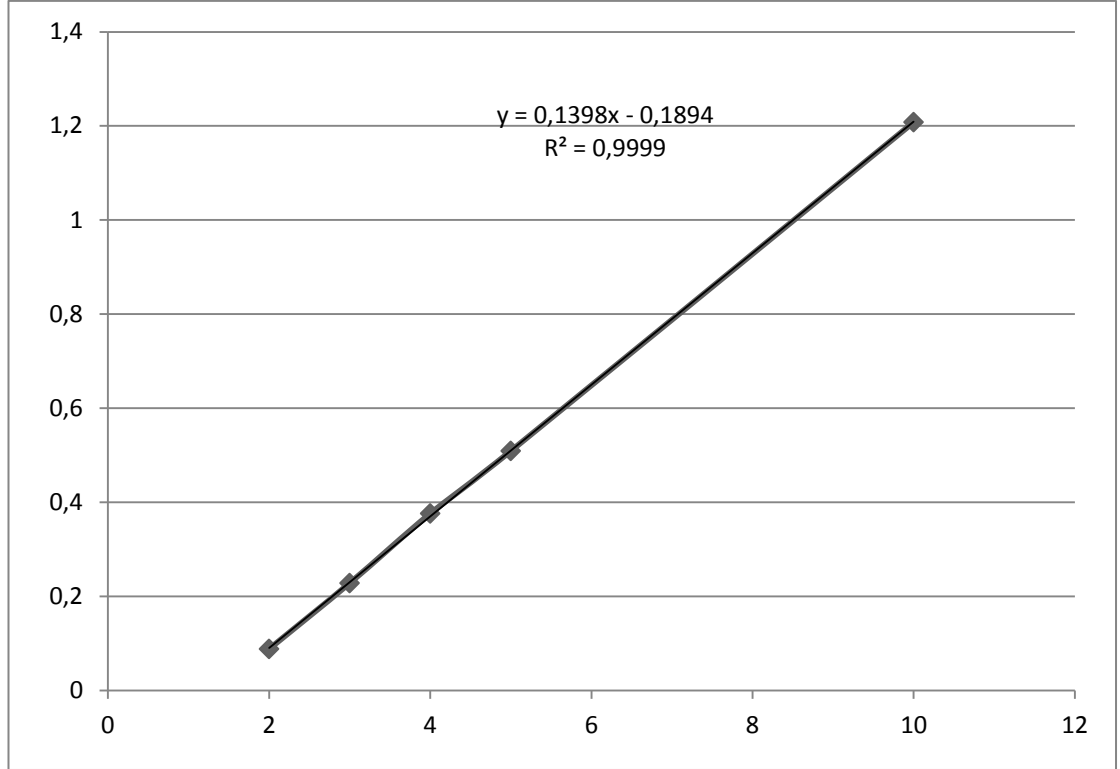
Farklı sinyal peptitleri içeren kolonilerden 10'ar tane seçilmiştir ve yükleme sırası şeklin üstünde gösterilmiştir. Alınan sonuçta örneklerin birer kopya olduğu belirlenmiştir.

4.6. Ksilanaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

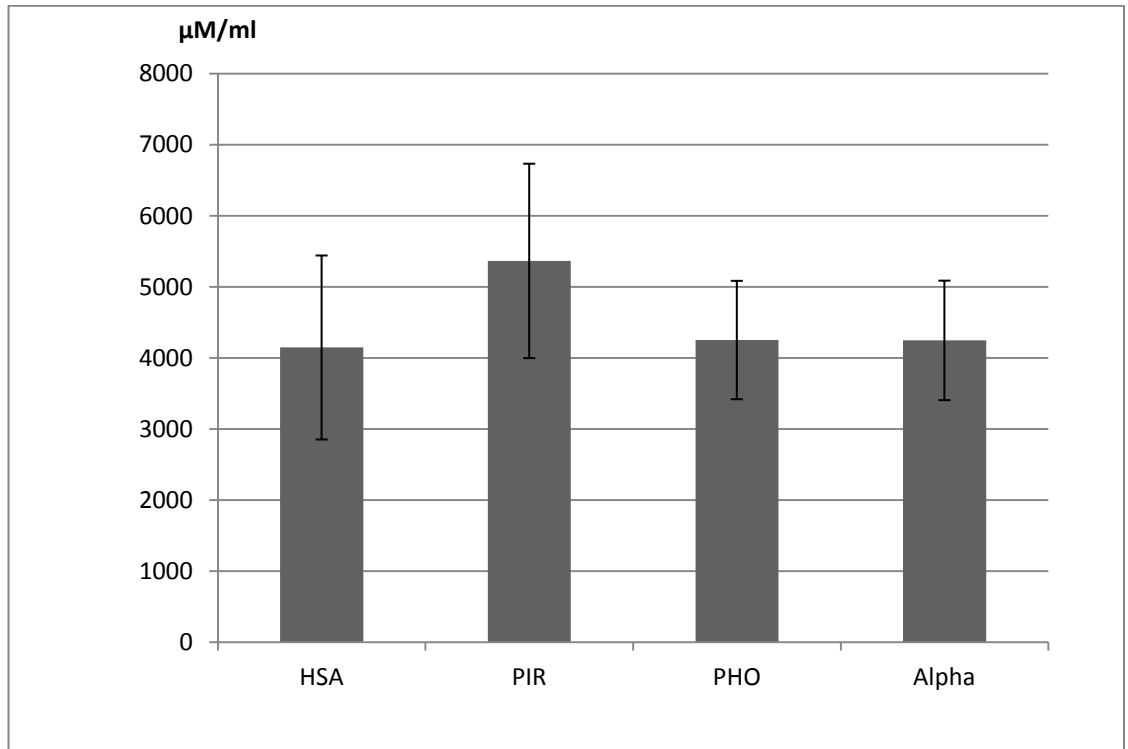
Ksilanaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesinde Hyun ve Zeikus (1985) tarafından kullanılan DNS yöntemi bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Yöntemin esası, ksilanın parçalanması ile açığa çıkan indirgen şekerlerin ölçülmesine dayanmaktadır.

Reaksiyon karışımı, 100µL 1:10 oranında seyreltilmiş enzim çözeltisi ve 900 µL substrat çözeltisi (50mM pH 5 sodyum sitrat tamponunda hazırlanmış %1 bşeechwood ksilan) ile hazırlanmıştır. Karışım 50°C'de 30dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonunda 900µL DNS çözeltisi (%1 DNS, %30 sodyum potasyum tartarat tetrahidrat ve 400 mM NaOH) eklenerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır. Ardından 95°C'de 5 dak. inkübe edilerek renk gelişimi sağlanmış, 1 dak. buzda soğutulmuş ve spektrofotometrede 540nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri kaydedilmiştir. Okuma işlemi sırasında kör olarak 0. dakikada DNS solüsyonu eklenerek aktivitesi durdurulmuş olan aynı reaksiyon karışımı kullanılmıştır.

Standart olarak 100mM glikoz çözeltisi kullanılmış ve kurve çizimi yapılmıştır. Üretim hesaplanırken bu kurveden yararlanılmıştır. Kurve Şekil 4.7'de ve bu kurveden yararlanılarak çizilen üretim grafiği de Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. DNS analizi için glikoz kalibrasyon eğrisi



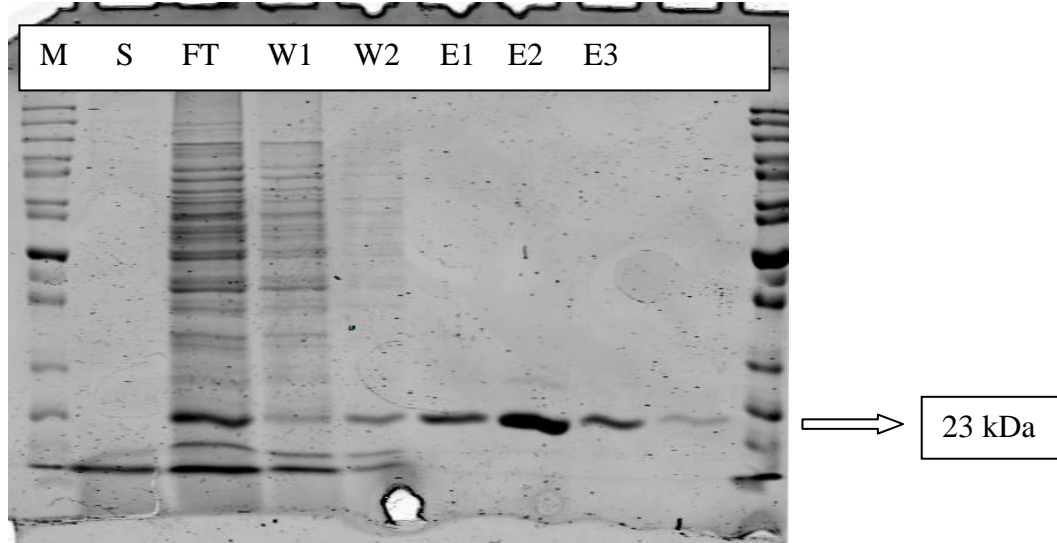
Şekil 4.8. Standart glikoz kurvesi kullanılarak çizilen ksilanaz üretim miktarları

Çıkan sonuçlarda herbir sinyal peptidi içeren suşlarda üretim vardır ve birbirine yakındır. Ancak PIR sinyal peptidini içeren örneklerde üretimin diğerlerine göre yüksek olduğu görülmüştür.

4.7. Ksilanaz Enziminin His-TAG Kolon ile Saflaştırılması

Protein (ksilanaz) hücre dışı ve polihistidin etiketli üretilmiştir. Hücreler 48 saat metanol indüksiyonu ardından 6000 g'de 5 dak. santrifüjlenerek çöktürülmüş ve elde edilen süpernatandan histidin etiketli proteinin purifikasyonu için HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific Pierce, IL, ABD) kullanılmıştır. Kitin talimatları doğrultusunda işlemler gerçekleştirilmiştir.

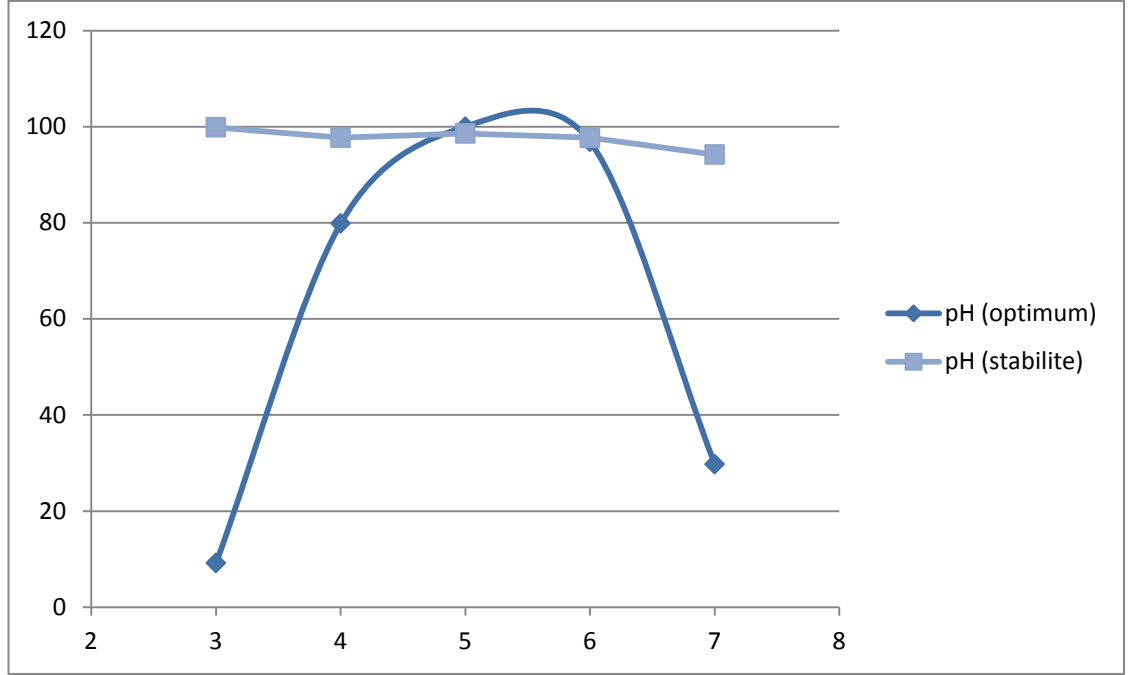
Saflaştırma prensibine göre histidin etiketli proteinler, nikel kolona bağlanarak etiketsiz proteinlerden ayrılmaktadır. Kolona bağlanan proteinler, 100 mM PBS pH7.4 (phosphate-buffered saline) içinde 100, 200, 300mM imidazol konsantrasyonlarında hazırlanan solüsyonlar ile muamele edilerek yıkanmış ve ardından elüsyon çözeltileri elde edilmiştir. Elüsyon çözeltisinde bulunan imidazolün uzaklaştırılması için diyaliz membranı (Skin Dialysis Tubing, 3,5K MWCO, Thermo Scientific, IL, ABD) kullanılarak %5 gliserol içeren 100 mM PBS içinde, +4°C'de gece boyu diyaliz gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi, SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir. En fazla üretim PIR sinyal peptidini içeren örnekte görüldüğünden saflaştırma bu örnekte yapılmıştır.



Şekil 4.9. Saflaştırma işlemi sonucu elde edilen SDS-PAGE görüntüsü

4.8. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH Değerinin Etkisi

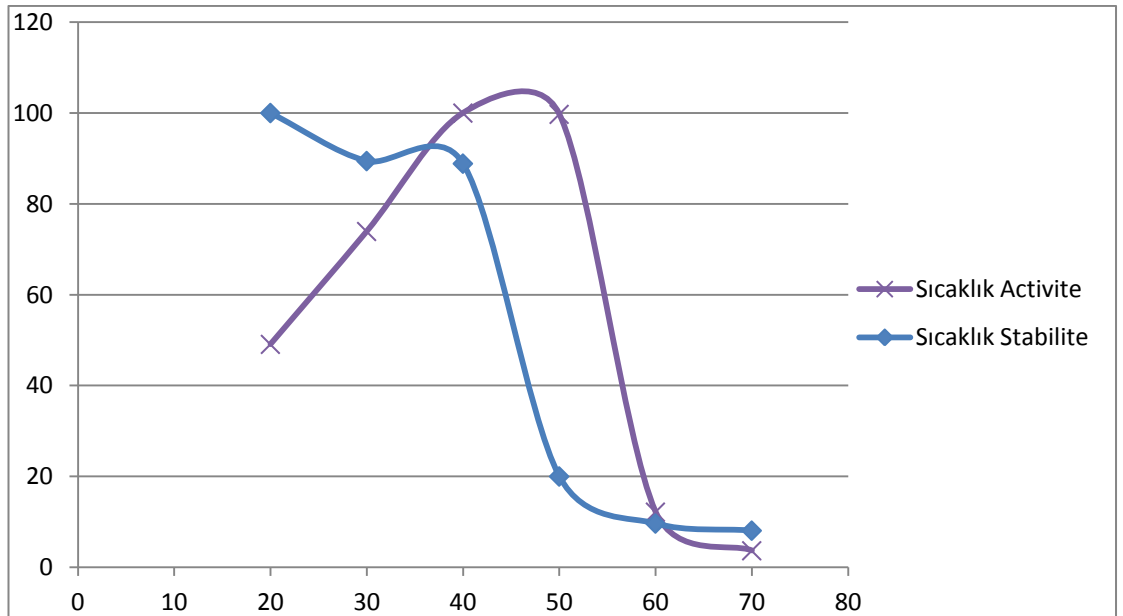
Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için optimum sıcaklık olarak 50°C seçilmiştir. Daha sonra 3-7 arası pH'larda 50mM sodyum sitrat tamponu hazırlanmış ve aktivite grafiği çizilmiştir. Grafik Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Optimum pH grafiği

4.9. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklık Değerinin Etkisi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için optimum pH 5 olarak belirlenmiş ve 20-70°C arası sıcaklıklardaki aktivite ölçülüp, aktivite grafiği çizilmiştir. Grafik Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Optimum sıcaklık grafiği

5. TARTIŞMA

Pichia pastoris rekombinant protein üretiminde kullanılan bir mayadır. Bu çalışmada ksilanaz enziminin hücre dışı üretiminde kullanılmıştır. *Pichia pastoris*'te protein üretiminde görev yapan birçok sinyal sekans vardır ve rekombinant protein üretiminde bu sinyal sekanslar başarıyla kullanılmaktadır.

Bu çalışma *Pichia pastoris*'teki farklı sinyal sekansları hücre dışı ksilanaz üretimindeki etkilerinin karşılaştırılması için dizayn edilmiştir. Kullanılan sinyal sekanslar HSA, PIR1, PHO1 ve α -eşleşme(mating) faktörüdür. Bunlardan α -eşleşme (mating) faktörü ve HSA *Saccoromyces cerevisiae*'ya aitken, PIR1 ve PHO1 sinyal peptitleri *Pichia pastoris*'e aittir. PIR1 ve α -eşleşme faktörü pre ve pro bölgelerin ikisini birden içerirken, PHO1 ve HSA yalnızca pre bölge içerir.

Entegre olan genin kopya numarası heterolog proteinin ekspresyon seviyesini belirler. Bu nedenle kopya numarası önemlidir. Bu çalışmada yapılan Southern Blot analizinde örneklerin tek kopya olduğu belirlenmiştir.

48 saatlik gelişim periyodu sonunda kolonilerin optik yoğunlukları benzerdir. Erlenlerde geliştirilen kolonilerin salgı verimleri α -eşleşme(mating) faktörü 170 U/mL, HSA 123 U/mL, PHO1 139 U/mL ve PIR1 250 U/mL olarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi HSA, α -eşleşme(mating) faktörü ve PHO1 sekresyon sinyallerini içeren koloniler arasında belirgin bir fark yoktur. Ancak PIR1 sinyal peptidini içeren kolonilerde görülen verim diğerlerinden yüksektir. Aynı türe ait sinyal peptitlerin bile amino asit bileşimleri ve uzunlukları arasında çeşitlilik vardır. Bu nedenle protein üretiminde sinyal peptidin etkisi önceden tahmin edilemez. PHO1 ve PIR1 *Pichia pastoris*'e ait sinyal peptitler olmasına rağmen ksilanaz üretimindeki verimleri farklıdır. Bu da sinyal peptitlerin kaynağının ksilanaz üretiminde önemli olmadığını gösterir. PHO1, α -eşleşme(mating) faktörü, HSA sinyal peptidini içeren kolonilerin ksilanaz üretim seviyelerinin benzer olması bunu destekler. Ayrıca sinyal peptitlerin protein üretimindeki etkisi üretmek istenen proteine göre de farklılık gösterebilir.

Rekombinant enzim AOX1 promotörü altında ve sonunda 6 histidin kuyruğu ile üretilmiştir. Bu nedenle His-Tag purifikasyonu yapılmıştır. SDS-PAGE analizi yapılarak 23 kDa olan ksilanaz enzimi doğrulanmıştır. *Pichia pastoris* doğada çok fazla hücre dışı protein salgılamamasına rağmen farklı proteinler (kirlilikler) gözlenmiştir. Bu da uzayan fermentasyon koşullarındaki oksijen yetersizliğinden veya ürün birikiminden kaynaklanmış olabilir. Ancak bu kirlilikler ksilanaz aktivitesini ya da stabilitesini etkilememiştir ve kontamine proteinler tek basamaklı purifikasyonla uzaklaştırılmıştır.

Ksilanaz aktivitesinde optimum pH 5-6 ve optimum sıcaklık 40-50°C olarak belirlenmiştir. Ksilanaz enziminin pH stabilitesi geniş aralıklarda olurken, sıcaklık stabilitesi 50°C'nin altında en yüksekken, 50°C'nin üstünde etkisini kaybetmektedir.

6. SONUÇ

1-Bu çalışmada ksilanaz üretimi HSA, PIR1, PHO1 ve α -eşleşme (mating) faktörü sekresyon sinyalleri kullanılarak yapılmış ve verimler karşılaştırılmıştır.

2-Sekresyon sinyallerinin etkinliği ön çalışma olarak denenen EGFP proteininde ve ksilanaz enziminde farklılık göstermektedir.

3-EGFP de α -mating sekresyon sinyali fazla üretim gösterirken, ksilanaz enziminde PIR sekresyon sinyalinde üretimi fazla olmakla birlikte, her bir sekresyon sinyalinde yaklaşık üretim olduğu görülmüştür.

4-48. saat sonunda alınan süpernatantlarda belirlenen ksilanaz miktarı; α -mating faktör sekresyon sinyalinde 170 u/mL, HSA sekresyon sinyalinde 123 u/mL, PHO sekresyon sinyalinde 139 u/mL, PIR sekresyon sinyalinde 250 u/mL olarak belirlenmiştir.

5-Sekresyon sinyallerinin etkinliği proteine göre değiştiğinden üretilecek olan proteinde hepsinin denenmesi gerekmektedir.

6-Optimum pH olarak pH 5 ve optimum sıcaklık 40-50°C olarak belirlenmiştir.

7-Ksilanaz enziminin sonundaki polihistidin kuyruğu uzaklaştırıldığında fırıncılık ürünlerinde ve hayvan yemlerinde kullanılması uygundur.

7. KAYNAKLAR

- BARRERA, M., CERVANTES, M., SAUER, W.C., ARAÍZA, A.B., TORRENTERA, N. and CERVANTES, M. 2004. Ileal amino acid digestibility and performance of growing pigs fed diets supplemented with xylanase. *J Anim Sci* 82, 1997–2003.
- BEDFORD, M.R. and CLASSEN, H.L. 1992. The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick, In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ, editors. *Xylans and xylanases*. Elsevier; p. 361–70.
- BEG, Q.K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L. and HOONDAL, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 326–38.
- BIELY, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol*, 3, 286–90.
- BRAKE, A.J., 1984. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4642–4646.
- CASTILLO, L., MARTÍNEZ, A.I. and GARCERA, A. 2003. Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan. *Yeast*, 20: 973–983.
- CEREGHINO, J.L. and CREGG J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:45-66.
- CREGG, J.M., MADDEN, K.R., BARRINGER, K.J., THILL, G.P. and STILLMAN C. A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 9:1316–1323.
- COLLINS, T., GERDAY, C. and FELLAR, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3-23.
- COUGHLAN, M.P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Intercept Ltd. Newcastle upon Tyne, 3, 39-109.
- COWAN, W.O. 1996. *Animal Feed. Industrial Enzymology*. Second edition. McMillan Press Ltd. pp. 69, London. Ed. by T. Godfrey ve S. West.
- DALY, R. and HEARN, M.T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18, 119–138.
- DE GROOT, P.W., RAM, A.F. and KLIS, F.M. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol*, 42: 657–675.
- DENG, P., LI, D., CAO, Y., LU, W. and WANG C. 2006. Cloning of a gene encoding an acidophilic endo-1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:1096–1102.
- DİLER, A. 2007. Probiyotik+Enzim Kombinasyonunun Esmer Irkı Buzağılarda Yemden Yararlanma ve Büyüme Performansı Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- FUJITA, Y., KATAHİRA, S., UEDA, M., TANAKA, A., OKADA, H., MORİKAWA, Y., FUKUDA, H. and KONDO, A. 2002. Construction of whole-cell biocatalyst

- for xylan degradation through cell-surface xylanase display in *Saccharomyces cerevisia*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17, 189-195.
- FUJITA, Y., ITO, J., UEDA, M., FUKUDA, H. and KONDO, A. 2004. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environ Microb* 70: 1207–1212.
- GILBERT, H.J. and HAZLEWOOD, G.P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, 139:187-194.
- GÜÇLÜ, B.K. ve KARA, K. 2009. Ruminant Beslenme Alternatif Yem Katkı Maddelerinin Kullanımı, Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 6 (1) 65-75.
- HARNPICHARNCHAI, P., SORNLAKE, W., TANG, K., EURWILAICHITR, L. and TANAPONGPIPAT, S. 2010. Cell-surface phytase on *Pichia Pastoris* cell wall offers great potential as a feed supplement. *FEMS Microbiol Lett* 302, 8-14.
- HUANG, J., WANG, G. and XIAO, L. 2006. Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*, *Biosource Technology* 97, 802-808.
- INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2001. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*, *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(4) 337-341.
- INAN, M. 2010. *Pichia pastoris* PIR1 secretion signal peptide for recombinant protein expression and *Pichia pastoris* PIR1 and PIR2 anchor domain peptides for recombinant surface display, US Patent 7,741,075.
- INAN, M., ARYASOMAYAJULA, D., SİNHA, J. and MEAGHER, M.M. 2006, Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng* 93: 771–778.
- INAN, M., FANDERS, S.A. and ZHANG W. 2007. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). In *Pichia* Protocols, 2nd edn, Cregg JM (ed.). Humana: Totowa, NJ; 65–75.
- JACOBS, P.P., RYCKAERT, S., GEYSENS, S., DE VUSSER, K., CALLEWAERT, N. and CONTRERAS, R. 2008. *Pichia* surface display: display of proteins on the surface of glycoengineered *Pichia pastoris* strains. *Biotechnol Lett* 30:2173–2181.
- JIANG, Z.B. and SONG, H.T. 2007. Gupta N et al Cell surface display of functionally active lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 56:35–39.
- JUNGO, C., MARİSON I., and STOCKAR. 2007. U.V. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut+ strain in transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 130, 236-246.
- KAPTEYN, J.C., VAN DEN ENDE, H. and KLİS, F.M. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* 1426: 373-383.
- KHASA, Y.P. CONRAD, S. SENGUL, M., PLAUTZ, S. MEAGHER, M.M. and INAN M. 2011. Isolation of *Pichia pastoris* PIR genes and their utilization for cell surface display and recombinant protein secretion. *Yeast*, 20:213-226
- KÖKSAL, G. 1998. İki fazlı sistemde süspende ve tutuklanmış mikroorganizmalarla ksilanaz üretimi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara.

- KURJAN, J. and HERSKOWITZ, I. 1982. Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell* 30,933–943.
- LI D., DENG P., CAO, Y., LU, W. and WANG, C. 2006. Cloning of a gene encoding an acidophilic endo- β -1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*, *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1096-1102.
- LIU, W.H., CHENG, Y.F. and YANG, C.H. 2005. Cloning and expression of *Terrebifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 541-546.
- LIU, M.Q. and LIU, G.F. 2008. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Protein Expression and Purification* 57101–107.
- MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L and MCNEIL, B. 2005, Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270.
- MCALLISTER, T.A., HRISTOV, A.N., BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M. and CHENG K.J. 2001. Enzymes in Ruminant Diets. Bedford MR, Partridge GG. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. UK, Bowman CABI Publishing, pp. 273-298.
- MERGLER, M., WOLF, K. and ZIMMERMANN, M. 2004. Development of a bisphenol A-adsorbing yeast by surface display of the *Kluyveromyces* yellow enzyme on *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 418–421.
- MRSA, V., SEIDL, T. and GENTZSCH, M. 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1145–1154.
- ÖZCAN, B.D. ve ÖZCAN, N. 2001. *Bacillus subtilis* RSKK243'e Ait Bifonksiyonel Ksilanaz Geninin *E. coli* ve *B. Subtilis*'te Klonlanması ve Enzim Karakterizasyonu. *Turk J Vet Anim Sci* 25 881-885.
- PAL KHASA, Y., INAN, M., MEAGHER, M.M., PLAUTZ, S., SENGUL, M. and CONRAD, S. 2011. Isolation of *Pichia pastoris* PIR genes and their utilization for cell surface display and recombinant protein secretion, DOI: 10.1002/yea.1832, *Yeast* 28:213-216.
- SUBRAMANIYAN, S. and PREMA, P. 2002. Bio/Technology of microbial xylanases, enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol*, 22, 33–64.
- SUTTON, J.D., PHIPPE, R.H., BEEVER, D.E., HUMPHRIES, D.J., HATNELL, G.F., VICINI, J.L. and HARD, D.L. 2003. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in holstein-fresian cows, *J Dairy Sci*, 86(2), 546-556.
- THACKER, P.A. and BAAS, T.C. 1996. Effect of gastric pH on the activity of exogenous pentosanase and the effect of pentosanase supplementation of the diet on the performance of growing-finishing pigs, *Anim Feed Sci Technol* 63, 187–200.
- VAN DER VAART, J.M., CARO, L.H.P., CHAPMAN, J.W., KLIS, F.M. and VERRIPS, C.T. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177:3104–10.

- VOGET, S., Steele, H.L. and Streit, W.R. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. *J. Biotechnology* 126:26-36.
- WANG, Q, LI L., CHEN M., QI Q. and WANG P.G. 2008, Construction of a Novel *Pichia Pastoris* Cell-Surface Display System Based on the Cell Wall Protein *Pir1*. *Curr Microbiol* 56:352-357.
- WATARI, J., TAKATA, Y., OGAWA, M., SAHARA, H., KOSHINO, M., ONNELA, M.L., AIRAKSINEN, U., JAATINEN, R., PENTTILA, M. and KERANEN, S. 1994. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1* *Yeast* 10:211–25.
- WONG, K.K.Y., Tan, L.U.L. and SADDLER. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiological Reviews*, Vol. 52, No. 3; 305-317.
- WU, Y.B., RAVIDRAN, V., THOMAS, D.G., BIRTLES, M.J. and HENDRICKS WH. 2004. Influence of method of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology of broilers, *Brit. Poultry Sci.* 45, 385–94.
- WU, S. and LETCHWORTH G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques* 36: 152–154.
- YANG W.Z., BEAUCHEMIN K.A. and RODE L.M. 1999. Effect of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 82(2), 391-403.
- YANG, W.Z., BEAUCHEMIN K.A. and RODE L.M. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets, *J Dairy Sci*, 83 (11), 2512-2520

8. EKLER**Ek 8.1. Çalışma Süresince PZR Denemelerinde Kullanılan Primerler**

Primer Adı	Sekans (5'→3')	T_m (°C)
5'AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	59
3'AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC	59

EK 8.2. Ksilanaz Geninin Sekansı

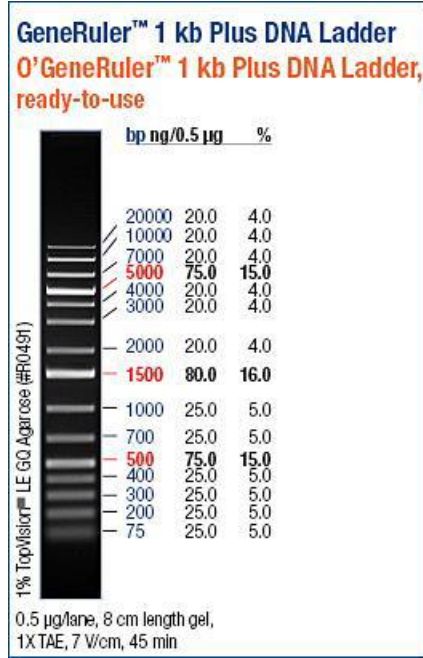
GAATTC

TCTACCCCTAGTTCTACTGGTGAAAACAACGGATTCTATTACTCATTCTGGA
CCGATGGTGGTGGAGATGTTACCTACACAAACGGAGATGCTGGTTCATACA
CAGTTGAATGGAGTAACGTTGAAATTTTGTGGTGGAAAGGGTTGGAACCC
AGGAAGTGCCCAAGACATTACTTATTCTGGTACATTCACCCCTTCCGGTAAT
GGATACTTGTCAGTTTATGGATGGACTACAGATCCACTTATTGAATACTATA
TCGTCGAGAGTTACGGTGACTATAACCCTGGATCTGGTGGAACTTACAAAG
GTACTGTTACATCTGATGGATCCGTCTACGACATCTACACCGCCACTAGAAC
AAACGCTGCCTCCATCCAAGGTACCGCAACTTTTACACAATATTGGTCAGTT
AGACAGAATAAGAGAGTTGGTGGAACTGTCACCACTTCTAACCATTTC AAT
GCATGGGCTAAATTGGGTATGAACCTTGGAACCCACAATTACCAGATCGTT
GCTACTGAGGGTTACCAAAGTTCAGGTTTCCAGTTCCATTACCGTTCAACAT
CATCACCACCATCACTAA

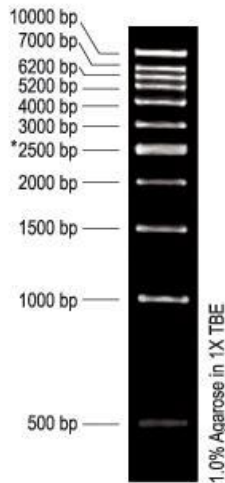
TCTAGA

Ek 8.3. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları

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

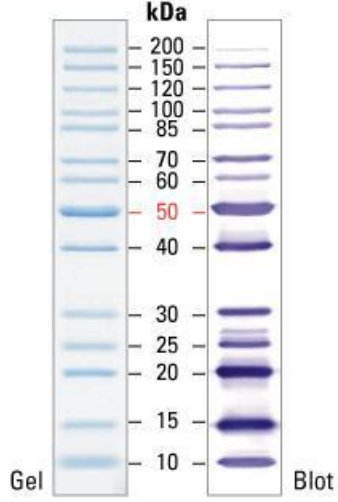


Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: 1 kb DNA ladder (Vivantis, CA, ABD)

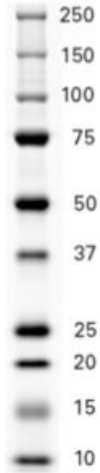


Ek 8.3. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları (Devamı)

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

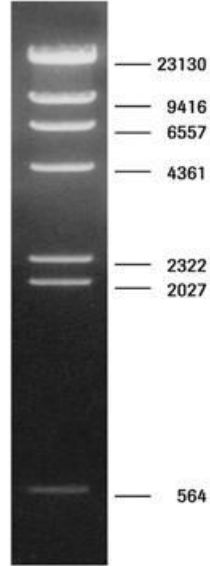


Western blot analizinde kullanılan protein standardı: Odyssey Protein Molecular Weight Marker (Li-Cor, NE, ABD)



Ek 8.3. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları (Devamı)

Southern blot analizinde kullanılan DNA standardı: DNA Molecular Weight Marker II DIG-labeled (Roche, Almanya)



ÖZGEÇMİŞ



Hilal YILDIZ KURAL 1987 yılında Uşak ilinde doğdu. İlk ve orta eğitimini Sakarya'da, lise eğitimini İzmir'de tamamladı. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2011 yılında mezun oldu. Eylül 2011 tarihinde Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı kurumda eğitimini sürdürmektedir.