

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

**REKOMBİNANT KİMOZİN ÜRETİMİNDE GLİKOZİLASYONUN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Fatma ERSÖZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**2016**

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**REKOMBİNANT KİMOZİN ÜRETİMİNDE GLİKOZİLASYONUN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Fatma ERSÖZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
yüksek lisans tez projesi olarak FYL-2016-1544 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**2016**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

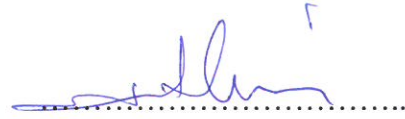
REKOMBİNANT KİMOZİN ÜRETİMİNDE GLİKOZİLASYONUN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma ERSÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 27/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)



Doç. Dr. İrfan TURHAN



Yrd. Doç. Dr. Yakup ULUSU



## ÖZET

### REKOMBİNANT KİMOZİN ÜRETİMİNDE GLİKOZİLASYONUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma ERSÖZ

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Temmuz, 2016 66 sayfa

Kimozin enzimi peynir üretim endüstrisinde en kompleks işlem olan sütün pıhtılaştırması amacıyla kullanılan bir aspartik proteazdır. Rennet ya da rennin olarak bilinen kimozin geviş getiren hayvanların dördüncü bölümünden (şirden) elde edilir. Kimozin, sütün yaklaşık %80'ini oluşturan kazein proteininin Phe105 ve Met106 arasında bulunan peptit bağını kırarak, stabil olmayan kazein misellerini oluşturur ve sütün pıhtı oluşturmalarını sağlar. Bu kimozin enzimi çeşitli bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Ancak bu enzimlerin pıhtılaştırma etkileri birbirinden farklı olduğu için ve hayvan kaynaklı kimozin üretiminin düşük olmasından dolayı son yıllarda rekombinant kimozin üretimi artmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi ile gerçekleştirilen kimozin üretiminde genel olarak sığır, bufalo, keçi, manda ve deve gibi gen kaynakları kullanılmaktadır. Hayvan, bitki ve mikrobiyal kaynaklı enzimlere göre avantajlarından dolayı bu çalışmada rekombinant tibet öküzü kimozin üretimi yapılmıştır.

Çalışmada Tibet öküzü (*Bos grunniens*) kimozin enzimi (glikozile ve glikozile olmayan formları) metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris*'te alkol oksidaz I (AOX1) promotörü kontrolü altında üretilmiştir. Kimozin enziminin glikozile (N-glikozilasyon) ve glikozile olmayan formları üretilerek glikozilasyonun rekombinant kimozin üretimine, enzimin aktivitesine ve stabilitesine etkisi araştırılmıştır. Küçük ölçekli erlenlerde yapılan 120 saatlik metanol beslemesi sonucunda glikozile ve glikozile olmayan kimozin üretiminde önemli farklılık gözlenmemiştir. Glikozile kimozin ve glikozile olmayan kimozin için enzim aktiviteleri sırasıyla 55 IMCU/ml ve 61 IMCU/ml olarak hesaplanmıştır. Fermentör ölçekli üretim (5L) gerçekleştirildiğinde ise glikozile ve glikozile olmayan kimozin için enzim aktiviteleri sırasıyla 214.3 IMCU/ml ve 257.14 IMCU/ml olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum çalışma şartları da pH 6 ve 40°C olarak tespit edilmiştir. Ticari maya ile rekombinant kimozin enzimleri verimi arasında önemli bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışma sonunda peynir endüstrisinde artan kimozin enzimi ihtiyacının karşılanması için enzimin rekombinant olarak üretimine *P. pastoris* ekspresyon sisteminin oldukça uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Glikozilasyon, Kimozin, Rekombinant DNA, *Pichia Pastoris*, Tibet öküzü

**JÜRİ:** Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Yrd. Doç. Dr. Yakup ULUSU

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF GLYCOSYLATION ON RECOMBINANT CHYMOSIN PRODUCTION

Fatma ERSÖZ

MSc Thesis in Food Engineering  
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İNAN  
July 2016, 66 pages

Chymosin, which is used to coagulate milk in the cheese industry, is an aspartic protease. It, generally known rennet or rennin, is isolated from fourth abosuman of ruminant. Chymosin is formed of casein mycellium by cleaved the Phe105-Met106 bond of casein protein, 80% of total milk protein and then milk is coagulated. The enzyme is derived from animal, plant ve microorganism sources. Because of these enzyme's coagulating properties are different from each other and the animal source chymosin production is low, recombinant chymosin is increased. Bovine, pig, buffalo, goat, cow and camel are generally used gene sources in the production of chymosin by recombinant DNA technologies. Because of these advantages, compared to animal, plant and microbial sources, recombinant YAK chymosin was produced in this study.

In the present study YAK chymosin enzymes (in glycosylated and nonglycosylated forms) were produced in metilotrofic yeast *Pichia pastoris* under the control of AOXI promoter. The effect of glycosylation on the recombinant chymosin production, enzyme activity and stability were investigated by production of glycosylated and nonglycosylated forms of chymosin enzyme. Glycosylated and nonglycosylated forms of chymosin enzyme's production significant difference is no observed in the shake flasks for 120 hours expression. Enzyme activities of glycosylated and nonglycosylated forms are 55 IMCU/ml ve 61 IMCU/ml, respectively. When chymosin enzymes were produced in 5 L bioreactor, enzyme activities of glycosylated and nonglycosylated forms are 214.3 IMCU/ml ve 257.14 IMCU/ml, respectively The optimum milk clotting activity was obtained at pH of 6 and temperature of 40°C. Low-scale cheese production done with the recombinant enzymes, against commercial chymosin as a control and yields compared between each other. Results showed that there is no important difference between the yield of cheese produced with recombinant and commercial chymosin. As a conclusion, this study carried out that *P. pastoris* is very suitable expression system for recombinant chymosin production to meet the needs in cheese industry.

**KEYWORDS:** Glycosylation, Chymosin, Recombinant DNA, *Pichia pastoris*, YAK

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Mehmet İNAN (Supervisor)  
Doç. Dr. İrfan TURHAN  
Yrd. Doç. Dr. Yakup ULUSU

## ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji, bünyesinde çok fazla konu ve bilinmezlikler barındıran bir alandır. Bu alanda birçok eksiklik var olup çözüme kavuşturulmak için beklemektedir. Bu sebeplerle bana böylesi yenilikçi ve sürekli gelişme gösteren bir alanda yüksek lisans yapma imkanı sağlayan, laboratuvar cihaz-ekipmanları ve projeleri açısından eksiksiz bir çalışma ortamı sunan, gerek bir hoca gerek bir baba olarak her zaman yanımızda olan Saygıdeğer Danışman Hocam Prof. Dr. Mehmet İNAN'a bizimle eşsiz tecrübelerini paylaştığı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli jüri üyelerim Sayın Doç. Dr. İrfan Turhan ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Yakup Ulusu hocalarımın tezimdeki yaptıkları düzeltmeler ve eleştirileri için çok teşekkür ederim.

Bu alanda çalışmaya başladığım ilk zamanlarda pipet tutmayı dahi bilmezken tüm çalışma sürecim boyunca karşılaştığım tüm sorunlara yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Dr. Fidan Erden Karaoğlan'a, Dr. Mert Karaoğlan'a, Semiramis Yılmaz'a, Gürkan Yılmaz'a, Uzm. Dr. Aysun Özçelik'e, benimle aynı zamanlarda Mehmet Hocamızın laboratuvar grubunda birlikte çalışma fırsatı bulduğum Özge Adıgüzel ve Sevda Kaçmaz'a çok teşekkür ederek kendileri ile aynı takımda yer aldığım için mutlu olduğumu belirtmek isterim.

Bu süreçte desteğini benden hiç esirgemeyen ve her zaman anlayış gösteren sevgili annem Rahime Canlı'ya, sevgili babam Osman Canlı'ya ve canım ablam Ayşe Canlı'ya binlerce kez teşekkür ederim..

Yine bu zor zamanlarımda biricik oğlum Nuri Cihanım ile büyük bir özen ve sabırla ilgilenen sevgili babam Nuri Ersöz ve sevgili annem Ayşe Ersöz' e de oğlumla fazlasıyla ilgilendikleri için bu tezi bitirmemde büyük katkılarının olduğunu belirterek kendilerine tekrar tekrar teşekkür ederim.

Projeye verdiği destekten dolayı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Lisans eğitimimin ilk günlerinden bu yana sürekli yanımda olarak bana hep sevgi ve destek veren, başaramadığım zaman benim umutsuzluklarımı alıp yerine kendi azmini ve sabrını yerleştiren, tez çalışmalarım sırasında gece-gündüz çalıştığım zamanlarda daha 18 aylık olmasına rağmen oğlum ile bir anne şevkati ile ilgilenen eşim Süleyman Ersöz'e teşekkür ederim. Sevgiler...

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1.GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1.Kimozin Nedir?.....	4
2.2.Kimozinin Yapısı .....	4
2.3.Kimozin Kaynakları .....	6
2.4.Glikozilasyon Nedir? .....	7
2.4.1.N-glikozilasyon nedir? .....	8
2.5.Rekombinant Kimozin .....	9
2.6.Rekombinant Kimozin Üretiminde Kullanılan Konukçu Organizma Sistemleri ...	9
2.7. <i>Pichia pastoris</i> Ekspresyon Sistemi.....	11
2.8. <i>Pichia pastoris</i> Mayasında Üretilen Rekombinant Kimozin .....	12
3.MATERYAL VE METOT .....	14
3.1.Materyal .....	14
3.1.1. Kimyasal malzemeler ve restriksiyon enzimleri .....	14
3.1.2. Tampon ve stok çözeltileri .....	14
3.1.3. Gen kaynağı ve mikroorganizmalar .....	14
3.1.4. Çalışmada kullanılan pPICZ $\alpha$ A plazmidi .....	15
3.1.5. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler .....	16
3.2.Metot.....	17
3.2.1. Liyofilize gelen plazmid DNA'nın açılması .....	17
3.2.2. Plazmidlerin <i>E.coli</i> 'ye aktarılması ve kontrolü.....	17
3.2.3. Tibet öküzü kimozin enzimi kodlayan glikozile ve glikozile olmayan prokimozin genlerinin ve pPICZ $\alpha$ A plazmidinin jelden kesilmesi, saflaştırılması ve ligasyona hazır hale getirilmesi .....	18
3.2.4. DNA ve plazmid konsantrasyonlarının belirlenmesi .....	18
3.2.5. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi .....	18
3.2.6. <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerinin kompetent hale getirilmesi.....	19
3.2.7. DNA parçalarının plazmide ligasyonu.....	19
3.2.8. Ligasyon sonrası plazmidin kompetent <i>E.coli</i> hücrelerine transformasyonu.....	20
3.2.9. Doğrulanmış pPICZ $\alpha$ A-YAK ve pPICZ $\alpha$ A-YAKN plazmidlerin lineer hale getirilmesi .....	20

3.2.10. Lineer hale getirilen pPICZ $\alpha$ A-YAK ve pPICZ $\alpha$ A-YAKN plazmidlerinin kompotent <i>P.pastoris</i> GS115 PDI hücrelerine transformasyonu .....	20
3.2.11. Erlenmayerde kimozin ekspresyonu .....	21
3.2.12. Süt pıhtılaştırma testi .....	21
3.2.13. SDS- PAGE analizi .....	21
3.2.14. Süpernatantların konsantre hale getirilmesi .....	22
3.2.15. Ölçek büyütme çalışması- fermentörde üretim .....	22
3.2.16. Enzimin optimum çalışma şartlarının belirlenmesi.....	25
3.2.16.1. Toplam protein tayini .....	25
3.2.16.2. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı şartlarının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.16.3. Enzimin optimum çalışma pH şartlarının ve pH stabilitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.17. Üretilen enzim süpernatantları ile peynir üretimi çalışmaları.....	26
3.2.17.1. Üretime alınacak sütün özelliklerinin belirlenmesi.....	26
3.2.17.2. Üretilen enzim süpernatantları ile peynir üretimi çalışmaları.....	26
4. BULGULAR .....	28
4.1.Glikozile (YAK) ve glikozile olmayan (YAKN) prokimozin genlerinin klonlama çalışmaları ve <i>P. pastoris</i> mayasına transformasyonu .....	28
4.1.1. PUC57 vektörü içerisinde gelen glikozile ve glikozile olmayan prokimozin genlerinin <i>E.coli</i> XL1-Blue kompotent hücrelerine transformasyonu .....	28
4.1.2. Glikozile olan ve olmayan prokimozin genlerinin, pPICZ $\alpha$ A plazmidlerinin lineer hale getirilmesi, jelden kesilmesi, ligasyonu ve doğrulanması .....	29
4.1.3. Prokimozin geni taşıyan ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ve doğrulanması .....	30
4.1.4. Doğrulanmış ekspresyon vektörlerinin <i>P. pastoris</i> mayasına transformasyonu .....	32
4.2. Transformantların Kimozin Ekspresyonu Çalışmaları.....	33
4.2.1. Erlenmayerde kimozin ekspresyonu .....	33
4.2.2. Süt pıhtılaştırma testi .....	33
4.2.3. SDS PAGE analizi .....	34
4.2.4. Seçilen kimozin klonlarının erlenmayerde üretilmesi ve süpernatantlarının konsantre hale getirilmesi.....	35
4.2.5. Fermentörde kimozin ekspresyonu .....	38
4.2.6. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi.....	43
4.3. Üretilen Rekombinant Kimozin ile Küçük Ölçekli Peynir Yapım Çalışmaları ..	46
4.3.1. Peynir üretilecek olan sütün özelliklerinin belirlenmesi .....	46
4.3.2. Üretilen kimozin enziminin peynir mayası kuvvetinin belirlenmesi .....	46
4.3.3. Rekombinant Kimozinler ile Peynir Üretim Çalışmaları.....	46
5. TARTIŞMA. ....	51
6. SONUÇ.....	55



7. KAYNAKLAR .....	57
8. EKLER.....	63
Ek-1. Kodon optimizasyonu yapılmış YAK kimoziñ geni sekansı .....	63
Ek-2. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları .....	64
Ek-3. pPICZ ve PPICZ $\alpha$ vektörlerinin şematik gösterimi .....	65
Ek-4. Toplam protein tayini standart grafiği.....	666
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

Bç	Baz çifti
Aa	Amino asit
Kbç	Kilo baz çifti
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
M	Mili
M	Molar
N	Nano (10 <sup>-9</sup> )
OD	Optik yoğunluk
S	Saniye
T <sub>m</sub>	Çözülme sıcaklığı
U	Ünite

### Kısaltmalar

AOX	Alkol Oksidaz
BMGY	Buffered Glycerol-Complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-Complex Medium
BSA	Bovine Serum Albumin
BSM	Basal Salt Medium
DIG	Digoksjenin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
IMCU	International Milk Clotting Unit
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi, Food And Drug Administration
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen, Generally Regarded As Safe
LB	Luria-Bertani Besiyeri
LiAc	Lityum Asetat
OD	Optical Density (Optik yoğunluk)
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofrez
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Jel Elektrofrez Tamponu, Tris Asetat EDTA
YNB	Maya Azot Bazı
YPD	Maya Pepton Dekstroz, Yeast Pepton Dextrose

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kimozin enziminin kazein proteinine etki mekanizması.....	4
Şekil 2.2. Kimozinin protein yapısı.....	4
Şekil 2.3. Manda, sığır, deve ve tıbet öküzü kimozin enziminin aminoasit sekanslarının birbirlerine göre benzerlik ağaçları (homology tree) homolojileri.....	7
Şekil 2.4. Endoplazmik retikulumda meydana gelen N-glikozilasyonun şematik gösterimi.....	8
Şekil 3.1. Tibet Öküzü kimozin enziminde meydana gelen N-glikozilasyon bölgeleri.....	15
Şekil 3.2. Klonlama ve ekspresyon vektörü olan pPICZαA vektörü haritası.....	16
Şekil 3.3. Gliserol ve metanol besleme fazları sırasında hücelere gönderilen gliserol ve metanolün zamana göre gönderiliş hızı ve miktarı.....	24
Şekil 3.4. Peynir üretimi akış şeması.....	27
Şekil 4.1. PUC57 vektörü içerisinde temin edilen YAK ve YAKN prokimozin enzim genleri.....	28
Şekil 4.2. XL1-Blue hücelere aktarılan pUC57YAK ve pUC57YAKN plazmidlerinin <i>EcoRI/XbaI</i> enzimleriyle kesilerek doğrulanmasının agaroz jel görüntüsü.....	29
Şekil 4.3. Ligasyon için istenen DNA bölgelerinin agaroz jelden alınması.....	30
Şekil 4.4. pPICZαA vektörüne klonlanmış glikozile ve glikozile olmayan kimozin genlerinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.5. Zeosinli LB Lenox besiyerlerinde gelişen hüceler ve kontrol grubu plaka resimleri.....	31
Şekil 4.6. <i>XhoI</i> ve <i>BglII</i> enzimleri ile kesim reaksiyonu kurulan plazmidlerin agaroz jel görüntüsü.....	31
Şekil 4.7. <i>P.pastoris</i> GS115 (PDI) mayasına transformasyon öncesi vektörlerin lineer hale getirilmesinde agaroz jel görüntüsü.....	32
Şekil 4.8. <i>P. pastoris</i> GS115 (PDI) suşuna transformasyon sonucu oluşan koloniler ve teke düşürme çizimi.....	33
Şekil 4.9. $CaCl_2$ ve yağsız süt tozu ile hazırlanan substrat ile gerçekleştirilen süt pıhtılaştırma testi.....	34
Şekil 4.10. Erlenmayerde 120 saatlik üretim sonucu klonların SDS PAGE jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.11. Erlenmayerde yapılan 120 saatlik kimozin ekspresyonu sonucu seçilen glikozile (YAK6) ve glikozile olmayan(YAKN1) kimozin klonlarının fermentasyon süresi boyunca enzim aktivitesi değişimleri.....	36
Şekil 4.12. Konsantre hale getirilen kimozin süpernatantların enzim aktiviteleri.....	37
Şekil 4.13. Ticari maya, 120. saat süpernatantlar ve konsantre süpernatantların SDS PAGE jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.14. Fermentörde kimozin ekspresyonu.....	38
Şekil 4.15. 90 saatlik ekspresyonu boyunca glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.16. 90 saatlik ekspresyonu boyunca glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin yaş hücre ağırlıklarının karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.17. 90 saatlik ekspresyonu boyunca glikozile ve glikozile olmayan	

kimozinlerin toplam protein miktarlarının karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.18. Glikozile kimozin YAK6 klonunun fermentör üretimi boyunca SDS PAGE görüntüsü.....	42
Şekil 4.19. Glikozile olmayan kimozin YAKN1 klonunun fermentör üretimi boyunca SDS PAGE görüntüsü.....	42
Şekil 4.20. Glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin sıcaklık stabilizasyonları grafiği.....	43
Şekil 4.21. Glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin optimum sıcaklıkları grafiği.....	44
Şekil 4.22. Glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin pH stabilizasyonu grafiği.....	45
Şekil 4.23. Glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin optimum pH grafiği.....	45
Şekil 4.24. Peynir mayaları ilavesinden sonra sütün inkübatörde mayalama işlemi.....	47
Şekil 4.25. Pıhtı kırma işleminden sonra cendere bezi yardımıyla peynir altı suyunun süzülmesi.....	47
Şekil 4.26. Süzme ve baskılama işlemi sonrası oluşan peynir pıhtısı ve kalıba alınması.....	48
Şekil 4.27. Kalıptan çıkartıldıktan sonra oluşan peynir.....	48
Şekil 4.28. Rekombinant kimozinler ile ticari peynir mayası ile yapılan peynirler.....	49

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı kimoziin enzimleinin C/P oranının karşılaştırılması.....	5
Çizelge 2.2. Farklı mikrobiyal konukçularda rekombinant kimoziin üretimi.....	10
Çizelge 3. 1. BSM tuzunun içeriği.....	23
Çizelge 3. 2. PTM1 tuzlarının bileşimi.....	23
Çizelge 3. 3. Gliserol besleme tablosu.....	23
Çizelge 3. 4. Metanol Besleme Tablosu.....	24
Çizelge 4.1. Erlenmayerde 120 saatlik ekspresyon sonucu klonların pıhtılaştırma süreleri ve enzim aktivite değerleri.....	34
Çizelge 4.2. 90 saatlik fermantasyon boyunca YAK6-PDI klonunda aktivite, yaş hücre ağırlığı ve toplam protein miktarları.....	39
Çizelge 4.3. 90 saatlik fermantasyon boyunca YAKN1-PDI klonunda aktivite, yaş hücre ağırlığı ve toplam protein miktarları.....	39
Çizelge 4.4. Peynir üretimine alınacak olan çiğ süt içeriği (%).....	46
Çizelge 4.5. Peynir yapım çalışmaları sonucunda ticari maya ile rekombinant üretilen kimoziinlerin karşılaştırılması.....	50

## 1. GİRİŞ

Peynir denilince ilk akla gelen terimler süt ve peynir mayası olmaktadır. Peynir mayası olmadan peynir ve yoğurt gibi fermente ürünler üretilmemektedir. Peynir kökenleri insanlık kadar eskiye dayanan bir yiyecek olup muhtemel çıkış yerinin Orta Asya, Orta Doğu ve Avrupa olduğu tahmin edilmektedir. M.Ö. 8. binyıl (koyunun evcilleştirildiği tarih) ile 9. binyıla kadar değişen tarih aralıklarında ilk peynir üretiminin yapıldığı düşünülmektedir. Peynirin ilk ortaya çıkış amacının kısa sürede bozulan sütün ömrü ve kullanım süresini uzatmak olduğu düşünülmektedir. Bu dönemlerde gıdalar uzun süre saklanabilmeleri amacıyla hayvanların deri, mide ya da içkembeleri kullanılmıştır. Bu şekilde midede depolanan sütün mide enzimleri aracılığıyla pıhtılaştırılarak lor halini almasıyla peynirin ilk oluşumu gözlemlenmiş olduğu düşünülmektedir (Anonim 2011).

Teknik olarak fermantasyon olarak ifade edilen mayalama işlemi mikrobiyolojik, biyolojik ve kimyasal olaylar kompleksidir. Bu kimyasal olaylar kompleksinde peynir endüstrisi giderek büyüyen bir sektör olup artan peynir ihtiyacını karşılamak adına sektörde sürekli yeni bir arayış mevcuttur ki bu arayış ancak yeni bir peynir mayası üretmekle kapatılabilir. Peynir üretiminin temel yapı taşlarından olan peynir mayası bilinen diğer adıyla rennin çok farklı yollarla elde edilmektedir. Geleneksel yöntemlerle peynir mayası genelde genç buzağı veya kuzuların dördüncü midelerinden izole edilmektedir. Ancak bu izole peynir mayalarında hem etik sorunlar hem de verim problemleri olabilmektedir. Rennin olarak bilinen peynir mayası kimozin ve pepsinden oluşmaktadır. Renninin yaklaşık olarak 75'ini kimozin, 25'ini pepsin enzimi oluşturmaktadır (Börklü Budak ve Afşar 2011). Rennin bileşenlerinden olan kimozin doğumdan sonraki ilk birkaç gün içinde midede maksimum düzeyde salgılanır daha sonraları yerini pepsine bırakarak miktarı azalır. İzole peynir mayalarında karşılaşılan en büyük etik problem de doğumdan sonraki ilk birkaç gün içinde midede maksimum düzeyde salgılanan kimozini maksimum verimlilikte elde edebilmek için birkaç günlük buzağuların katli söz konusu olmasıdır.

Yaklaşık %75'ini kimozinin oluşturduğu buzağı renneti peynir endüstrisinde süt pıhtılaştırıcı olarak bilinmektedir. Peynir yapım endüstrisinde en kompleks işlem olan sütün pıhtılaştırması amacıyla kullanılan kimozin enzimi bir aspartik proteazdır (EC 3.4.23.4) (Kumar vd 2010). Aktif bölgelerinde Asp-32 ve Asp-215 aspartik asit rezidüsü taşır (Vallejo vd 2008). Sütün yaklaşık %80'ini oluşturan kazein proteinin Phe105 ve Met106 arasında bulunan peptid bağı kırarak kazein taneciklerinin karasız bir hal almasını sağlar. Sonuç olarak k-kazein, kalsiyum parakazeinat ve kazeinomakropeptide dönüşmesiyle sütün pıhtılaşması sağlanır (Mohanty vd,1999). Kimozin bu enzimatik aktivite özelliğinden dolayı peynir endüstrisinde süt pıhtılaştırıcı olarak kullanılmaktadır (McMahon vd 1984). Bu tez peynir endüstrisinde mayalama işlemi için kullanılan kimozin enziminin doğal yollarla izolasyonuna alternatif olabilecek bir yöntem olan rekombinant olarak üretilmesi ve küçük ölçekli peynir üretimine elverişliliği testlerinden oluşmaktadır.

Peynir endüstrisinde kullanılan süt pıhtılaştırıcılar bitkisel, hayvansal kaynaklar, mikroorganizmalar ve rekombinant protein üretimi yoluyla olmak üzere 4 farklı kaynaktan elde edilmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen bu süt pıhtılaştırıcılar

farklı karakteristik özelliklere sahiptir. Bitkilerden elde edilen koagülanlar genelde belirli coğrafik bölgelerdeki özel peynirlerin üretimi için kullanılmaktadır. Buna örnek verilecek olursa enginar çiçeklerinden (*Cynara scolymus*), incir ağacı (*Ficus carica*) latekslerinden elde edilen koagülanlar Cezayirin kuzey ve güney bölgelerindeki özel bir peynir üretimi için kullanılmaktadır (Nouani vd 2009). Mikrobiyal kaynaklı süt pıhtılaştırıcılar *Bacillus subtilis* (Puhan 1969), *Myxococcus xanthus* (Poza vd 2004) ve *Bacillus licheniformis* (Ageitos vd 2007)'ten elde edilmektedir. Hayvansal kaynaklı koagülanlar ise genellikle yeni doğan buzağı, koyun ve keçilerin dördüncü midelerinden izole edilmektedir. Bu kaynaklar arasında buzağı kimoziyi çoğunlukla en etkin kullanılan enzimdir. Fakat bu geleneksel yöntemle çok fazla buzağı zarar görmekte olup etik sebeplerden dolayı peynircilik endüstrisi alternatif enzim kaynakları arayışına gitmektedir. Bu sebeple bizon, koyun ve keçinin rennin için iyi birer kaynak oldukları düşünülmektedir. Genç buzağı dışındaki rennin kaynaklarının çoğunda proteinazlar sütü koagüle edebilmektedir. Fakat sadece bir kısmı renninin yerini alabilecek kalitededir. Bu sebeple rekombinant kimoziyi üretimi üstün avantajlarından dolayı iyi bir alternatif olarak düşünülmektedir. Aynı zamanda rennine alternatif olarak bitkisel ve mikrobiyal kaynaklar mevcuttur. Ancak bu kaynaklar kazeini spesifik olmayan bölgelerden hidrolize etmekte, aşırı asit üretimine neden olmakta, istenmeyen aroma üretmekte, verimi düşürmekte ve iyi kalitede olmamaktadır (Jiang vd 2012). Tüm bu sebepler kimoziyi talebinin karşılanması için rekombinant kimoziyi üretimine olan talep artmıştır. Rekombinant kimoziyi üretimi ile sağlanan avantajlar, yüksek hacimlerde üretim yapılabilmesi, peynir mayası ihtiyacının buzağı kesmeden karşılanabilir olması, yüksek saflıkta enzim üretimi ve pepsin içermediği için kusursuz peynir üretimi, standart kalite yakalanması, şirden kullanımından kaynaklı peynir kusurlarının olmaması olarak sıralanabilir (Dervişoğlu vd 2007).

Rekombinant kimoziyi üretimi için *Escherichia coli* (Mohanty vd 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Goff vd 1984) , *Kluyveromyces lactis* (Van den Berg vd 1990), *Aspergillus niger* (Kappeler vd 2006) ve *Pichia pastoris* (Wang vd 2015) gibi çeşitli mikroorganizma üretim sistemleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda konukçu organizma olarak seçilen *Pichia pastoris*, ekspresyon sistemi heterolog proteinlerin üretimi için uygun bir konakçısıdır. *P. pastoris*, hem araştırma ölçeğinde hem de endüstriyel ölçekte, miligramdan grama ulaşan miktarlarda protein ekspresyonu sağlayan metilotrofik bir mayadır. *P. pastoris* konakçısının diğer ekspresyon sistemlerine göre sahip olduğu avantajlar rekombinant proteininin yüksek oranda üretilmesi (Richter vd 2006), hızlı büyüme (Cregg vd 2009) glikozilasyon ve katlanma gibi post traslasyonel modifikasyonlara uyum (Cereghino vd 2002), ekstraselüler proteinin etkili üretimi (Peng vd 2004) , basit moleküler manipülasyonlara olanak sağlama (Cregg vd 2000) ve minimal besiyeri ortamında yüksek biyokütle üretiminin sağlanması (Hong vd 2002) olarak sıralanabilir. Ayrıca *P. pastoris*, disülfid bağ oluşturabilme ve glikozilasyon gibi protein modifikasyonlarını gerçekleştirebilmektedir. Bahsedilen modifikasyonlardan glikozilasyon, proteinlere şeker gruplarının eklenmesi olarak tanımlanabilir.

Proteinlere şeker gruplarının eklenmesi olarak bilinen glikozilasyon, posttranslasyonel bir modifikasyondur. Glikozilasyon, hücredeki protein-ligan etkileşimleri ve çeşitli biyolojik prosesler için önemlidir. Bu posttranslasyonel

modifikasyonlar N-, O- ve C-bağlanması ve fosfoglikozilasyon gibi çeşitli şekillerde oluşabilir. Glikozilasyon, protein sentezi sırasında (endoplazmik retikulumda) veya protein sentezlendikten sonra (golgi aygıtına transferi sırasında) meydana gelir (Yavuz, 2001). Sentezlenen proteine glikozilasyon ile eklenen glikanların görevi proteinlerin tanınması ve katlanmasını kolaylaştırmak olarak sıralanabilir. Glikozilasyon mekanizmasındaki değişiklikler son üründe fonksiyon ve miktar açısından farklılıklar meydana getirebilmektedir (Aypak vd 2010).

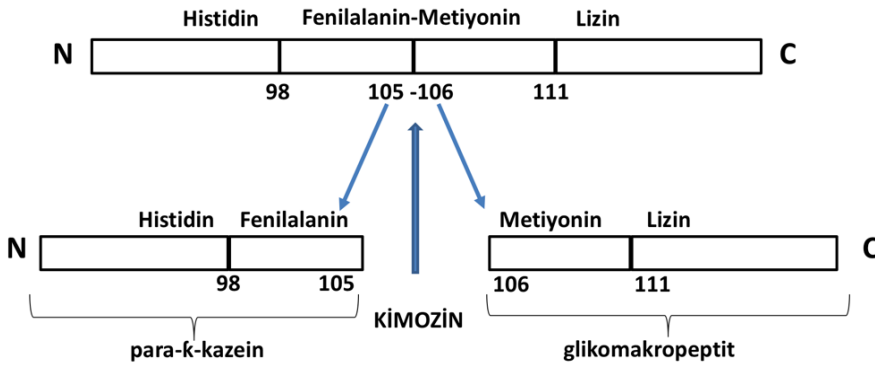
Bu tez çalışmasında Tibet öküzü kimozi enzimini, *P. pastoris* konukçu organizmasında hücre dışında *Saccharomyces cerevisiae* “ $\alpha$ -mating” faktörü ( $\alpha$ -MF) kullanılarak üretilmiştir. Enzimi kodlayan DNA fragmenti ilk olarak pPICZ $\alpha$ A plazmidine klonlanarak, glikozile kimozi (pPICZ $\alpha$ A-YAK) ve glikozile olmayan kimozi (pPICZ $\alpha$ A-YAKN) ekspresyon kasetleri oluşturulmuştur. Oluşturulan bu ekspresyon kasetleri daha sonra *P. pastoris* GS115 (PDI) suşuna tranforme edilerek kimozi üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim önce 250 ml lik erlenlerde gerçekleştirilmiş aktivite ve SDS PAGE analizleri sonucunda pozitif olan klonlar seçilerek üretime fermentörde devam edilmiştir. Üretim sonucunda kısmi karakterizasyonu yapılan kimozi enzimleri ile küçük ölçekte peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Ticari maya kontrol olarak kullanılmış ve karşılaştırma yapılarak verim özellikleri incelenmiştir.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Kimozin Nedir?

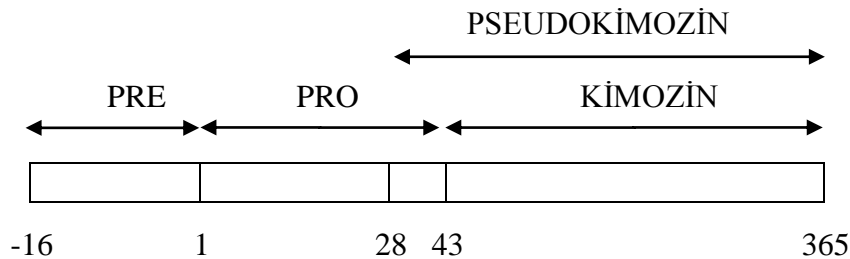
Kimoziin enzimi peynir yapım endüstrisinde en kompleks işlem olan sütün pıhtılaştırması amacıyla kullanılan, yeni doğan buzağı ve kuzu gibi canlıların dördüncü midelerinde salgılanan bir aspartik proteaz (EC 3.4.23.4) çeşididir. Bu gastrik proteaz, prokimoziinin inaktif öncüsü olarak salgılanır ve prosekansının asidik şartlarda otokatalitik olarak kesilmesiyle aktif kimoziin formunu alır (Kumar vd 2010). Aktif bölgelerinde Asp-32 ve Asp-215 aspartik asit residüsü taşır. Sütün yaklaşık %80ini oluşturan kazein proteininin Phe105 ve Met106 arasında bulunan peptid bağı kırarak kazein taneciklerinin karasız bir hal almasını sağlar. Sonuç olarak k-kazein, kalsiyumparakazeinat ve kazeinomakropeptite dönüşmesi ile sütün pıhtılaştırması sağlanır (Vallejo vd 2008). Bu enzimatik aktivite özelliğinden dolayı peynir endüstrisinde süt pıhtılaştırıcı olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. Kimozin enziminin kazein proteinine etki mekanizması

### 2.2. Kimozinin Yapısı

Sığır rennetinin başlıca bileşeni olan kimoziin buzağı midesine önce preprokimoziin olarak salgılanır ve daha sonra 16 aminoasitlik öncü sekansı uzaklaştırılır ve 365 amino asit, 40.8 kDa büyüklüğündeki prokimoziin oluşturulur. Daha sonra da midenin asidik şartlarında 323 amino asit ve 35.6 kDa büyüklüğünde aktif kimoziin oluşmaktadır. Pro sekansı proteinin doğru katlanması ve aktivasyon bölgelerinin kontrolü için önemli olup proteinin ifadesi düzenlenmesinde rol almaktadır (Foltmann vd 1977, Attallah vd 2007).



Şekil 2.2. Kimozinin protein yapısı (Mohanty vd 1999)

Kimozinin fizikokimyasal özellikleri incelendiğinde 23-49 kDa arası değişen moleküler büyüklüğe sahip olup farklı kimozin kaynakları için farklı büyüklükler söz konusudur. Manda kimozininin büyüklüğünü 23 kDa (Rao 1984), 35.6 kDa (Mohanty vd 2003) ve ~36 kDa (Malak vd 1996) olarak bulunmuştur. Optimum çalışma pH değeri incelendiğinde 4.6-6.4 pH aralığında çalışabilir olsa da en iyi aktivite gösterdiği pH değeri 5,8 olarak bulunmuştur (Fox, 1969). Yine sıcaklık karakterizasyonu incelendiğinde 2-55°C arasında çalışabildiği fakat en iyi 30-50°C aralığı olduğu bulunmuştur (Kumar vd 2006).

Süt endüstrisinde rennin enzimi iki özellik kullanılarak karakterize edilmektedir. Bu özellikler süt pıhtılaştırma aktivitesi (C) ve genel proteolitik aktivitedir (P). Sütü pıhtılaştırma aktivitesi (C) (International Dairy Federation, 2007) tanımlanan standart bir metoda göre sütteki kazeinin Phe105-Met106 bağına veya kapa kazein yanındaki bağı kırarak sütü pıhtılaştırması olarak tanımlanmıştır. İkinci özellik olan genel proteolitik aktivite ise kazeindeki herhangi bir bağı kırması olarak tanımlanmıştır (Kappeler vd 2006). Bu iki özelliğin oranı C/P süt pıhtılaştırıcı enzimin kalite özelliğini yansıtmaktadır. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin genel proteolitik aktiviteye oranının yüksek olması rennin açısından istenen bir özellik olup bu bağlamda kimozin, bilinen diğer pıhtılaştırıcı enzimlere kıyasla üstün özelliklere sahiptir. İyi kalitede protein üretebilmek için rennin düşük proteolitik aktiviteye sahip olması, k-kazeindeki Phe105–Met106 bağına spesifik olması ve peynir altı suyunda kolay denatüre olması gerekmektedir. Aksi takdirde peynir üretimi esnasında aşırı proteolitik aktivite verim kaybına ve üründe zayıf aromaya sebep olur (Fox ve McSweeney 1997).

Çizelge 2.1. Farklı kimozin enzimlerinin C/P oranının karşılaştırılması (Kappeler vd 2006)

Enzim Kaynağı	Süt pıhtılaştırma Aktivitesi (c)	Genel Proteolitik Aktivite (p)	Süt pıhtılaştırma aktivitesi / proteolitik aktivite (c/p)
Rekombinant deve kimozini	170	25	7
Domuz kimozini	25	12	2.1
Sığır kimozini	100	100	1
<i>Mucor pusillus</i> proteazı	33	147	0.22
<i>Mucor miehei</i> proteazı	19	149	0.13
Sığır pepsini A	124	2731	0.05

Bansal vd (2009) çedar peyniri üzerine yaptıkları çalışmada deve ve sığır kimozinini araştırmışlardır. Her iki koagülant ile yapılan peynir arasında pH ve peynir kompozisyonu arasında belirgin bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Deve kimozini ile yapılan peynirin proteolizi sığır kimozini ile yapılan peynire göre oldukça düşüktür. Peynirlerin peptit profilleri arasında farklılıklar mevcuttur ancak izolösin, histidin ve lizin dışındaki amino asitlerin seviyeleri birbirine yakındır. Deve kimozini ile yapılan

peynirin sülfür oranı daha düşüktür ve daha az acılık vermektedir fakat sığır kimosini ile yapılan peynirde tekstür daha kolay bozunmakta olduğunu belirtmişlerdir.

### 2.3. Kimozin Kaynakları

Dünyada gıda sektörü içinde süt önemli bir yere sahiptir. Süt ve ürünleri sektörünün de büyük bir kısmını peynir ve peynir çeşitleri oluşturmaktadır. Peynir endüstrisinde kullanılan süt pıhtılaştırıcılar bitkisel, hayvansal, mikrobiyal ve rekombinant protein üretimi yoluyla olmak üzere 4 farklı kaynaktan elde edilmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen bu süt pıhtılaştırıcılar farklı karakteristik özelliklere sahiptir. Peynir üretiminde kullanılan bu süt pıhtılaştırıcılar rennin veya rennet olarak bilinmektedir. Rennetin de yaklaşık %75'lik kısmını kimozin enzimi oluşturmaktadır. Farklı elde edilme yöntemleri bulunan kimozin enzimi genelde genç buzağı veya kuzuların dördüncü midelerinden izole edilmektedir. Kimozin doğumdan sonraki ilk birkaç gün içinde midede maksimum düzeyde salgılanır ve sonraları yerini pepsine bırakarak miktarı azalmaktadır. Bu sebeple kimozin eldesi için daha birkaç günlük buzağılar kesilmektedir. Bu şekilde izole kimozin kaynakları dışında farklı kimozin kaynakları da mevcuttur. Mikrobiyal kaynaklı süt pıhtılaştırıcılar *Bacillus subtilis* (Puhan 1969), *Myxococcus xanthus* (Poza vd 2004) ve *Bacillus licheniformis* (Ageitos vd 2007) olarak sınıflandırılabilir.

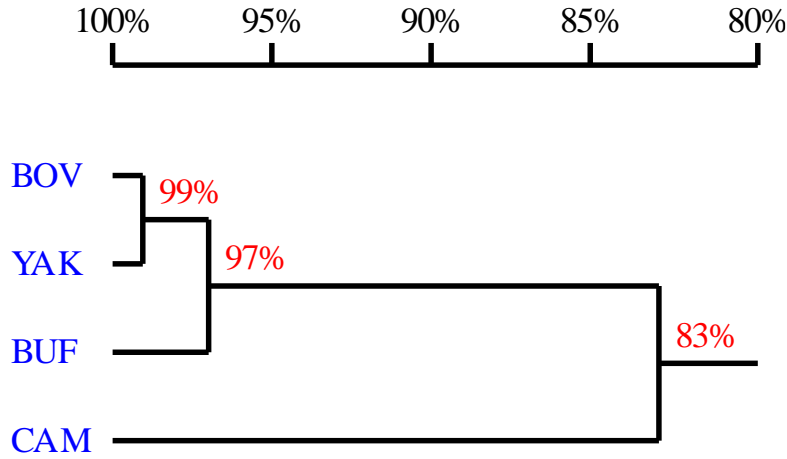
Bitkisel koagülantlar ise genellikle belirli coğrafik bölgelerdeki özel peynirlerin üretimi için kullanılmaktadır. Buna örnek verilecek olursa enginar çiçeklerinden (*Cynara scolymus*), incir ağacı (*Ficus carica*) latekslerinden elde edilen koagülantlar Cezayirin kuzey ve güney bölgelerindeki özel bir peynir üretimi için kullanılmaktadır (Nouani vd 2009).

Hayvansal kaynaklı koagülantlar ise genellikle yeni doğan buzağı, koyun ve keçilerin dördüncü midelerinden izole edilmektedir. Bu kaynaklar arasında buzağı kimosini çoğunlukla en etkin kullanılan enzimdir. Fakat bu geleneksel yöntemle çok fazla buzağı zarar görmekte olup etik sebeplerden dolayı peynircilik endüstrisi alternatif enzim kaynakları arayışına gitmektedir.

Genç buzağı dışındaki rennin kaynaklarının çoğunda proteinazlar sütü koagüle edebilmektedir fakat sadece bir kısmı renninin yerini alabilecek kalitededir. Aynı zamanda rennine alternatif olarak bitkisel ve mikrobiyal kaynaklar mevcuttur. Ancak bu kaynaklar kazeini spesifik olmayan bölgelerden hidrolize etmekte, aşırı asit üretimine neden olmakta, istenmeyen aroma üretmekte, verimi düşürmekte ve iyi kalitede olmamaktadır (Jiang vd 2012). Tüm bu sebepler talebi rekombinant kimozin üretimine yönlendirmiştir.

Rekombinant kimozin üretiminde gen kaynağı olarak manda, deve, sığır gibi farklı gen kaynakları kullanılmış olup çalışmamızda tibet öküzünün seçilme sebebi sığır kimosini ile olan yakınlığıdır. Şekil 2.3 te görüldüğü gibi tibet öküzü kimozin enzimi aminoasit dizisi ile sığır kimosini aminoasit dizisi karşılaştırıldığında sadece 230. ve 302. aminoasitlerin birbirinden farklı olduğu görülmekte ve homolojilerine bakıldığında birbiri ile %99 benzerlik gösterdiği görülmektedir.

BOV	MRCLVLLAVFALSÇGARITRIPILRKRSLRKALKRGLLEDFLQOQYGS SKYSYSGFGEVASVPLTNYLLSOYFGKIYGTPEQEFVLEDTGSSDFV	100
BUF	.....MABITRIPILRKRSLRKALKRGLLEDFLQOQYGS SKYSYSGFGEVASVPLTNYLLSOYFGKIYGTPEQEFVLEDTGSSDFV	85
CAM	MRCLVLLAVFALSÇGARITRIPILRKRSLRKALKRGLLEDFLQOQYGS SKYSYSGFGEVASVPLTNYLLSOYFGKIYGTPEQEFVLEDTGSSDFV	100
YAK	MRCLVLLAVFALSÇGARITRIPILRKRSLRKALKRGLLEDFLQOQYGS SKYSYSGFGEVASVPLTNYLLSOYFGKIYGTPEQEFVLEDTGSSDFV	100
Consensmrclvllavfalsqgaeitriplykgrkslrkalkrhqllledflgkqyqgisskysygfgevasvpltnyldsqyfgkiylgtpeqefvlefdtgssdfv		
BOV	ESTYCKSNCKNHREFDRKSSTFQNLGKPLSIYGTGSMGCLGYETVTVSNIVDIQCTVGLSTQPGVFTYEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNM	200
BUF	ESTYCKSNCKNHREFDRKSSTFQNLGKPLSIYGTGSMGCLGYETVTVSNIVDIQCTVGLSTQPGVFTYEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNM	185
CAM	ESTYCKSNCKNHREFDRKSSTFQNLGKPLSIYGTGSMGCLGYETVTVSNIVDIQCTVGLSTQPGVFTYEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNM	200
YAK	ESTYCKSNCKNHREFDRKSSTFQNLGKPLSIYGTGSMGCLGYETVTVSNIVDIQCTVGLSTQPGVFTYEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNM	200
Consenspsycksnacknhqrfdrksstfqnlgkplsihygtgsmgclgyetvtsnivdiqctvglstqpgvftyaefdgilgmaypslaseysipvfdnm		
BOV	MNRHLVARDLFSVYMDRNGQGSMLTLGATIPSYITGSLHWVFTVQCYWQFTVDSVITISGVVACGGCQAILDTGTSVIFGSSDIINIQQAIGATQ	300
BUF	MNRHLVARDLFSVYMDRNGQGSMLTLGATIPSYITGSLHWVFTVQCYWQFTVDSVITISGVVACGGCQAILDTGTSVIFGSSDIINIQQAIGATQ	285
CAM	MNRHLVARDLFSVYMDRNGQGSMLTLGATIPSYITGSLHWVFTVQCYWQFTVDSVITISGVVACGGCQAILDTGTSVIFGSSDIINIQQAIGATQ	300
YAK	MNRHLVARDLFSVYMDRNGQGSMLTLGATIPSYITGSLHWVFTVQCYWQFTVDSVITISGVVACGGCQAILDTGTSVIFGSSDIINIQQAIGATQ	300
Consensmnrhlvardslfsvymdrngqgsmltlgatipsyitgslhwvftvqcywqftvdsvitisgvvacggcqailldtgtsvifgssdiiniquaigatq		
BOV	YGEFFDIDCDNISMPVTVEINGRKYPLPSAYTSQDQGFCTSGFCSENFSQWILGDVFIREYYSVDFRANLVGLAKA	380
BUF	YGEFFDIDCDNISMPVTVEINGRKYPLPSAYTSQDQGFCTSGFCSENFSQWILGDVFIREYYSVDFRANLVGLAKA	365
CAM	YGEFFDIDCDNISMPVTVEINGRKYPLPSAYTSQDQGFCTSGFCSENFSQWILGDVFIREYYSVDFRANLVGLAKA	380
YAK	YGEFFDIDCDNISMPVTVEINGRKYPLPSAYTSQDQGFCTSGFCSENFSQWILGDVFIREYYSVDFRANLVGLAKA	380
Consensygeffdidcdnlsmptvveingrkyplpsaytsqdqgfctsgfcsenhsqkwilgdvfireyysvfdranlvglaka		



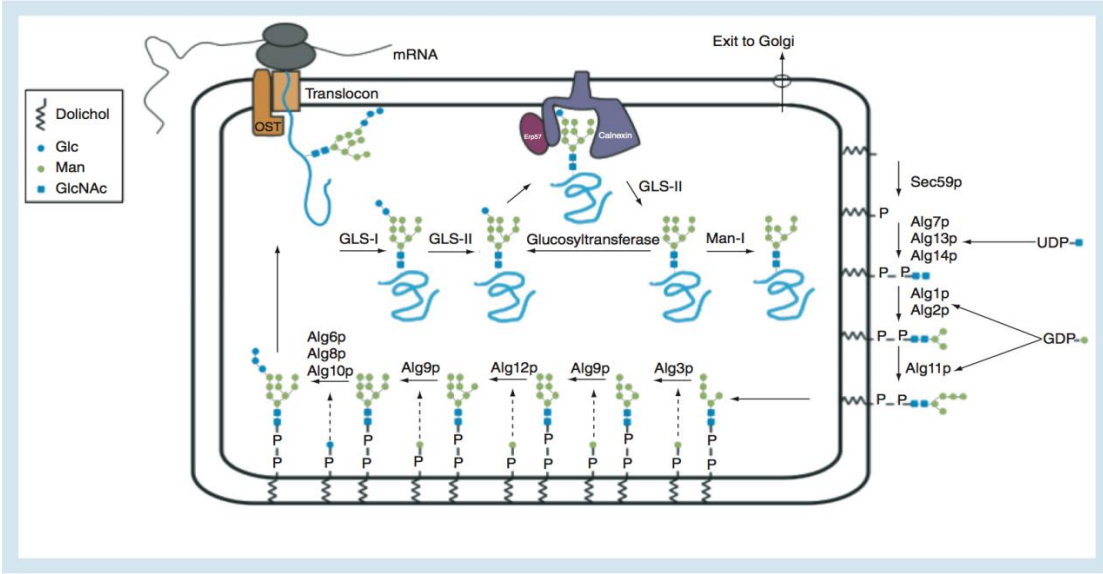
Şekil 2.3. Manda, sığır, deve ve tibet öküzü kimozin enziminin aminoasit sekanslarının birbirlerine göre benzerlik ağaçları (homology tree) homolojileri. BOV: sığır kimozi, BUF: manda kimozi, CAM: deve kimozi ve YAK: Tibet öküzü kimozi

#### 2.4. Glikozilasyon Nedir?

Proteinlere şeker gruplarının eklenmesi olarak bilinen glikozilasyon, posttranslasyonel bir modifikasyondur. Glikozilasyon, hücredeki protein-ligan etkileşimleri ve çeşitli biyolojik prosesler için önemlidir. Bu posttranslasyonel modifikasyonlar N-, O- ve C-bağlanması ve fosfoglikozilasyon gibi çeşitli şekillerde oluşabilir. Proteinlerin sentezlendikten sonra meydana gelen en önemli değişimi olarak bilinen glikozilasyon, endoplazmik retikulumda protein sentezi sırasında veya protein sentezlendikten sonra golgi aygıtına transferi sırasında meydana gelir (Yavuz 2001). Glikozilasyon sonucu proteinlere eklenen glikanlar immünolojik cevabın modifikasyonu, proteinlerin tanınması, hedeflenmesi ve proteinlerin katlanması gibi önemli rollere sahiptirler. Glikozilasyon mekanizmasındaki değişiklikler, glikozilasyonda kullanılan substrat moleküller ve oluşan ürünlerde yapı, fonksiyon ve miktar açısından meydana gelen değişiklikler çeşitli hastalıkların oluşum ve gelişimlerinde etkili olabilmektedir (Aypak vd 2010).

### 2.4.1. N-glikozilasyon nedir?

N-glikozilasyon, ökaryotik canlılarda endoplazmik retikulumda gerçekleşmekte olup, aminoasit diziliminde N-X-S/T şeklinde asparajin aminoasidinden sonra herhangi bir aminoasit sonra da serin veya treonin aminoasidi geliyorsa bu dizimdeki asparajinin aminoasidine oligosakkaridin kovalent bağla bağlanması olarak tanımlanabilir (González vd 2012).



Şekil 2.4. Endoplazmik retikulumda meydana gelen N-glikozilasyonun şematik gösterimi Glc: Glukoz; GlcNAc: N-asetil glukoz amin; Man: Mannoz; OST: Oligosakkaril transferaz kompleksi; P: fosfat; UDP: Uridin difosfat olarak yapılmıştır (Laukens vd 2015)

N-glikozilasyonun ilk basamağı dolichol bağlı 14 monosakkaritten meydana gelen oligosakkarit oluşumudur. Endoplazmik retikulumun membranına 2 tane N-asetil glukozamin ve 5 mannozün bağlanmasıyla oluşan dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> endoplazmik retikulum lumenine tutunur. Burada 4 tane mannoz ünitesi ile 3 glukoz bağlanarak boyutu artar ve artık bu yapı dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> halini alarak lipid bağlı oligosakkarit (LLO) olarak adlandırılır. Daha sonra bu dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> yapısı, yeni oluşan proteinin aminoasit diziliminde N-X-S/T sıralamasına sahip olan asparajin aminoasit bölgesine oligosakkaril transferaz kompleksi (OST) ile taşınır. Transferden sonra glukozidazlar (GLS-1 ve GLS-2) aracılığıyla glikanın glukoz üniteleri uzaklaştırılır. Glukoz bölgeleri uzaklaştırılan bu glikan, "ER folding factor" olarak bilinen Calnexin bölgesine gelir ve proteinin düzgün katlanma yapıp yapmadığı kontrol edilir. Doğru katlanmayan N-glikana, glukozil transferaz aracılığıyla tekrardan glukoz üniteleri eklenir ve tekrar katlanması kontrol edilir. Düzgün katlanma yapıldıktan sonra mannozidaz enzimi ile α 1,2 bağlı bir tane mannoz ünitesi uzaklaştırılır ve glikoprotein endoplazmik retikulumdan çıkar böylece glikozilasyon gerçekleştirilmiş olur (Laukens vd 2015).

## 2.5. Rekombinant Kimozin

Çeşitli kaynaklardan elde edilen kimoziin enzimleri ile yapılan peynirlerde acı tat oluşumu ve izole kimoziin enzimi elde etmek için çok fazla sayıda buzağı katledilmektedir bahsedilen sebeplerden dolayı rekombinant kimoziin üretimi önem kazanmıştır. Rekombinant kimoziin üretimi için bizon, koyun, keçi ve tavşanın iyi birer gen kaynağı oldukları düşünülmektedir. Geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde keçi (Vega-Hernandez vd 2004) ve deve (Kappeler vd 2006) kimoziini rekombinant olarak üretilmiştir. %97 lik aminoasit sekans uyumuna rağmen Bufalo kimoziini, *B. taurus* (Mohanty vd 2003) kimoziininden daha stabil olduğu sonucuna varılmıştır.

## 2.6. Rekombinant Kimozin Üretiminde Kullanılan Konukçu Organizma Sistemleri

FDA tarafından onaylanarak 1990 yılında gıda üretiminde kullanılan ilk rekombinant protein kimoziindir. Enzimin rekombinant üretimi ilk olarak *E.coli* K-12 konukçusunda gerçekleştirilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler ile buzağı kimoziin geni fermantasyon ile üretimine imkan veren bir mikroorganizmaya klonlanmıştır. Son zamanlarda deve kimoziin geni *Aspergillus niger* mikroorganizmasına klonlanmış ve fermantasyon ile üretimi gerçekleştirilmiştir (Kappeler vd 2006). *E. coli*, genetik yapısının iyi tanımlanmış olması, hızlı büyüme, gelişme ve uygun birçok vektöre sahip olmasından dolayı rekombinant protein üretiminde geniş kullanıma sahip olan iyi bir konakçı olarak bilinmektedir (Jana ve Deb 2005).

Rekombinant buzağı kimoziin üretimi için *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* mayaları, *Aspergillus niger* var *awamori*, *Trichoderma reesei* ipliksi mantarları kullanılmaktadır (Harkki vd 1989). Rekombinant sığır kimoziini üretimi için *Escherichia coli* (Mohanty vd 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Goff vd 1984) ve *Kluyveromyces lactis* (Van den Berg vd 1990) gibi çeşitli mikroorganizma üretim sistemleri kullanılmıştır.

Kappeler vd (2006) tarafından deve kimoziini *Aspergillus niger* mikroorganizmasında üretilmiştir. Deve kimoziininin sığır kimoziininden farklı karakteristik özellikler gösterdiğini belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre deve kimoziini sığır kimoziinine göre %70 daha yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi göstermektedir ve deve kimoziininin süt pıhtılaştırma aktivitesinin (C) genel proteolitik aktiviteye oranı (P) 7 kat daha yüksektir. Deve kimoziininin sığır kimoziinine göre daha termostabil olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Çizelge 2.2. Farklı mikrobiyal konukçularda rekombinant kimoziin üretimi (Kumar vd 2010)

Kimoziin Kaynağı	Kimoziin Formu	Plazmid	Promotor	Konukçu Organizma	Kaynak
Buzağı	pro	pCR301	LacUV5	<i>Escherichia coli</i>	Nishimori vd 1982
Buzağı	pro	pCT66,67,70	Triptofan	<i>Escherichia coli</i>	Emtage vd 1983
Buzağı	pro	P501	Triptofan	<i>Escherichia coli</i>	Nishimori vd 1984
Buzağı	kimoziin	pGK2231	Serin Hidroksimetil Transferaz	<i>Escherichia coli</i>	Genex 1985
Buzağı	pro	pTaAc	Tac	<i>Escherichia coli</i>	Zhang vd 1991
Kuzu	met-pro	pKP1500	-	<i>Escherichia coli</i>	Rogelj vd 2001
Keçi	pro	pET43.la(+)	T7	<i>Escherichia coli</i>	Kumar vd 2007
Sığır	pro	pKM636, pKM 1361	SpeA	<i>Proteus mirabilis</i>	Klessen vd 1989
Sığır	pro	pSM316	Nötral proteaz	<i>Bacillus Subtilis</i>	Parente vd 1991
Keçi	pro	pQSec1	pGK	<i>Kluyveromyes lactis</i>	Vega-Hernandez vd 2004
Keçi	pro	pQFlag1	ADH2	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	Vega-Hernandez vd 2004
Bufalo	prepro, pro, kimoziin	pGAPZαA	pGAP	<i>Pichia pastoris</i>	Vallejo vd 2008
Sığır	pro	pPICZαA	-	<i>Pichia pastoris</i>	Zhang vd 2009
Buzağı	kimoziin	-	glaA	<i>Aspergillus oryzae</i>	Tsuchiya vd 1993
Sığır	kimoziin	-	pdA&pepB	<i>Aspergillus awamori</i>	Cardoza vd 2003
Deve	pro	pGAMpR	glaA	<i>Aspergillus niger</i>	Kappeler vd 2006

Sığır sütündeki pıhtılaştırma aktivitesi açısından karşılaştırıldığında sığır kimozinindeki C/P oranı kuzu, domuz, kedi ve foktan daha yüksektir (Foltmann 1970). Sığır ve deve kimozi yaklaşık %85lik sekans uyumuna rağmen sığır kimozi deve kimozinine göre oldukça düşük süt pıhtılaştırıcı etki göstermektedir (Kappeler vd 2006, Jensen vd 2013). Sonuç olarak peynir endüstrisinde sığır kimozi yerine deve kimozi kullanıldığında daha az pıhtılaştırıcı maddeye (koagülant) ihtiyaç duyulmakta, daha az acılık oluşmakta ve aynı zamanda daha sert bir yapı oluşmaktadır (Bansal vd 2009, Børsting vd 2012). Ayrıca deve kimozinin sığır kimozinine göre daha yüksek verimle peynir üretimi sağladığı bildirilmiştir. Deve ve sığır kimozi arasındaki farklılıklar ve peynir yapımı üzerine olan etkileri her iki tip kimozinin yapısındaki farklılıklardan kaynaklandığı bilinmektedir (Jensen vd 2013). Bahsedilen sebeplerden dolayı sığır sütü substrat olarak seçildiği zaman deve orijinli (*Camelus dromedarius*) kimozinin %70 daha yüksek pıhtılaştırma aktivitesi (C) ve %20 genel proteolitik aktiviteye (P) sahiptir (Kappeler vd 2006).

Sığır kimozi üretiminde *E.coli* ekspresyon sistemi kullanıldığı zaman inklüzyon cisimcikleri inaktif enzim formundadır ve aktif enzim elde edebilmek için proteinlerin katlanmasını gerektiren kompleks prosesler gerektirmektedir (Emtage vd 1983). Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak üretilen aktif ekstraselüler kimozi hücre dışına düşük salınım oranında üretilmiştir (Smith vd 1985). Bahsedilen bu sebeplerden dolayı çalışmamızda *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak rekombinant kimozi üretimi hedeflenmiştir.

## 2.7. *Pichia pastoris* Ekspresyon Sistemi

*Pichia pastoris* ekspresyon sistemi heterolog proteinlerin üretimi için uygun bir konakçısıdır. *P. pastoris*, hem araştırma ölçeğinde hem de endüstriyel ölçekte, miligramdan grama ulaşan miktarlarda protein ekspresyonu sağlayan metilotrofik bir mayadır. *P. pastoris* konakçısının diğer ekspresyon sistemlerine göre sahip olduğu avantajlar rekombinant proteininin yüksek oranda üretilmesi (Richter vd 2006), hızlı büyüme (Cregg vd 2009) glikozilasyon ve katlanma gibi post traslasyonel modifikasyonlara uyum (Cereghino vd 2002), ekstraselüler proteinin etkili üretimi (Peng vd 2004), basit moleküler manipülasyonlara olanak sağlama (Cregg vd 2000) ve minimal besiyeri ortamında yüksek biyokütle üretiminin sağlanması (Hong vd 2002) olarak sıralanabilir. *P.pastoris* ekspresyon sisteminin başarılı olmasının iki ana sebebi vardır; birincisi metanol ile indüklenebilen alkol oksidaz geni sayesinde yabancı proteinlerin üretilmesinin kolay olması (Cregg vd 1988), ikincisi ise yüksek yoğunluklu hücre üretimi esnasında etanol ve asetik asit üretimi olmamasıdır (Cereghino vd 2002). *P.pastoris*, kompleks büyüme ortamları ve kültür şartları gerektirmez ve az miktarda besiyeri kullanarak yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşabilir (Macauley-Patrick vd 2005). *P. pastoris* çok az endojen protein üretir, bu özelliği saflaştırma basamaklarında büyük kolaylık sağlamış olur (Cregg vd 2000). Ayrıca *P.pastoris* patojen ve toksik değildir, memeli hücrelerinde tümöre sebep olan nükleik asitleri içermemektedir, laboratuvar çalışmalarında uzun bir süredir de güvenle kullanılmaktadır (Ciofalo vd 2006). Buffalo (Vallejo vd 2008) veya *Mucor pusillus* (Beldarraı'n vd 2000) kimozi gibi bazı koagulantlar da *P. pastoris* mikroorganizmasında etkin olarak üretilmiştir.



Yapılan bir başka çalışmada ökaryotik proteinlerin ekspresyonu amacıyla metilotrofik maya olan *P. pastoris* mayasının uygun bir canlı olduğu bildirilmiştir. *P. pastoris*, ökaryotik ekspresyonda birçok avantaja sahiptir, genetik manipulasyonu *S. cerevisiae* ile benzerdir. Bir diğer avantajı ise düşük maliyette oldukça yüksek hücre verimine ulaşabilmektedir (Ahn vd 2007, Skoko vd 2003). *P. pastoris* ekspresyon sistemi farklı rekombinant proteinlerin (*A. awamori* glukoamilaz, *Aspergillus oryzae* tannaz, *Rhizopus oryzae* lipaz, *E. coli* L-galactozidaz, insan granülosit-koloni stimüle edici faktör(GCSF) ve insan euzonofil perosidaz üretimi için başarıyla kullanılmaktadır (Saeedinia vd 2008; Ciaccio vd 2006). Çoğu zaman vektör *Pichia* genomuna entegre edilmiş ve alkol oksidaz promotörü (pAOXI) kullanılmıştır. Mekanizmada glukoz karbon kaynağı olarak kullandığında pGAP ve metanol ile indüklendiğinde pAOXI etkin çalışmaktadır (Ahn vd 2007).

Aynı zamanda *P. pastoris*, heterolog proteinlerin besiyeri ortamına salınımında iyi bir konakçısıdır. *P.pastoriste* hücre dışı endojen proteinlerin üretimi gerçekleştiği için istenilen proteinin bu mayada üretilmesi rekombinant proteinin pürifikasyonu için başlangıç olabilir. Ayrıca *P.pastoris*, yabancı proteinlerin büyük ölçekli üretimlerine de elverişlidir (Cregg vd 2000). Metilotrofik maya olan *Pichia pastoris*, aktif heterolog proteinlerin üretimi açısından etkili bir ekspresyon sistemine sahiptir (Cereghino vd 2000). Son zamanlarda bu mikroorganizmada farklı orjinli birçok protein klonlanarak üretilmiştir. Buffalo, keçi kimozi ve *Mucor rennini* gibi farklı kaynaklardan elde edilen süt pıhtılaştırıcı enzimler *P.pastoris* sisteminde etkin olarak üretilen enzimlerden bazılarıdır. Bu enzimlerin çoğu AOXI promotörü kontrolünde üretilmektedir. Bu promotörün tercih edilme sebebi ise glukoz, gliserol ve sonrasında metanol gibi belirli karbon kaynaklarının varlığında iyi çalışarak ekspresyonu kuvvetlendirmesidir. Bu karakteristik özellikler metanol beslemesiyle istenilen proteinin *P.pastoris* mikroorganizmasında yüksek miktarlarda etkin olarak üretilbildiğini göstermektedir (Cereghino vd 2002, Macauley-Patrick vd 2005).

## 2.8. *Pichia pastoris* Mayasında Üretilen Rekombinant Kimozin

*P. pastoris* mayasında aktif kimozi, Vallejo vd (2008) tarafından üretilmiştir. Manda buzağısının (*Bubalus arnee bubalis*) abomasumundan preprokimozi, prokimozi ve kimozi dizileri elde edilmiş ve *P. pastoris*’te hücre dışı üretimleri gerçekleştirilmiştir. Yalnızca prokimozi dizisinin aktarıldığı rekombinant *P. pastoris* klonu, süpernatanta aktif kimozi salgılayabilmiştir. Daha sonraki çalışmalarında Vallejo vd (2012) *P. pastoris*’te keçi ve manda geninden; *Aspergillus niger*’de ise sığır ve deve geninden kimozi ekspresyonu yapmışlardır. Rekombinant keçi kimozinin diğer üç rekombinant kimoziye göre en iyi proteolitik aktivite, en geniş pH aralığı (2-9) ve en düşük glikosilasyon derecesine sahip olduğu gösterilmiştir.

Jiang vd (2012) yaptıkları çalışmada *P.pastoris* mayasında sığır prokimozinini gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz promotörünün kontrolünde indükleme gerektirmeden rekombinant olarak engelli erlenmayerde yüksek seviyelerde üretmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılmıştır. Son olarak %24,2 verimle saf enzim olarak elde edilmiştir. Enzim 25-50°C sıcaklıklarda aktif olmakla birlikte optimum çalışma sıcaklığı 37°C olarak belirlenmiştir. Fakat yapılan bazı

çalışmalarda *P.pastoris* 'te üretilen heterolog proteinlerin sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Macauley-Patrick vd 2005, Cereghino vd 2000).

Yapılan bir başka çalışmada ise kodon optimizasyonu yapılmış sığıra ait prokimozin B geninin alkol oksidaz 1 promotörü (*AOX1*) kontrolünde *P. pastoris* GS115 suşunda ekspresyonu gerçekleştirilmiştir (Nosedá vd 2013). Biyoreaktörde optimize edilen şartlarda gerçekleştirilen üretim sonunda biyokütle seviyesi 240 g/L kuru hücre ağırlığına ulaşmış ve süt koagülasyon aktivitesi 96 IMCU/mL olarak tespit edilmiştir. Bu enzim aktivitesi 120 saatlik metanol indüksiyonundan sonra 53 mg/L rekombinant sığır kimozi üretime denk gelmektedir.

Moynihan vd (2013) sığır kimozi ile deve kimozinin sütü pıhtılaştırma aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Her iki kimozi 2 seviyede (0.05 IMCU/ml ve 0.037 IMCU/ml) aktivite ile kullanılmıştır ve her seviye için pıhtılaştırma derecesine bakılmıştır. Her iki seviye açısından incelendiğinde peynir kompozisyonu çok farklı olmamıştır. Sığır kimozi ile yapılan peynirdeki proteoliz deve kimozi ile yapılan peynirden daha yüksek olmuştur. 84 günlük olgunlaştırmadan sonra deve kimozinin koagülant olarak kullanıldığı peynirin diğerine göre daha sert yapıda olduğu bulunmuştur.

Wang vd (2015) tarafından yapılan bir çalışmaya göre *P. pastoris* mayasında deve kimozinini rekombinant olarak üretilmiştir. 72 saatlik metanol beslemesi sonunda besleme durdurulmuş ve laboratuvar şartlarında 37 mg/L rekombinant enzim elde edilmiştir. pH 5 ve 45-50°C sıcaklık süt pıhtılaştırma aktivitesi için enzimin optimum çalışma şartları olarak belirlenmiştir. Rekombinant enzim pH 2.5 – 6.5 değerleri arasında 20°C de 8 saat aktifliğini korumuştur. Pilot ölçekli üretimlerinde (5 L reaktör) 300 mg/L ürün elde edilmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kimyasal malzemeler ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal malzemeler moleküler biyoloji saflıkta olup Sigma-Aldrich Co. (MO, ABD), Difco (Fransa), Merck (Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Restriksiyon enzimleri Thermo Fisher Scientific (MA, ABD) firmasından temin edilmiştir. Ticari kimozen enzimi (600 IMCU/ml) Mayasan (Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Tampon ve stok çözeltileri

Tüm tamponlar ve stok çözeltileri saf su ile hazırlanmış, 121°C'de 15-20 dakika otoklavlanarak ya da 0.22 µm filtreden geçirilerek (Corning, MA, ABD) sterilize edilmiş, kullanım zamanına kadar +4°C ya da oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

##### 3.1.3. Gen kaynağı ve mikroorganizmalar

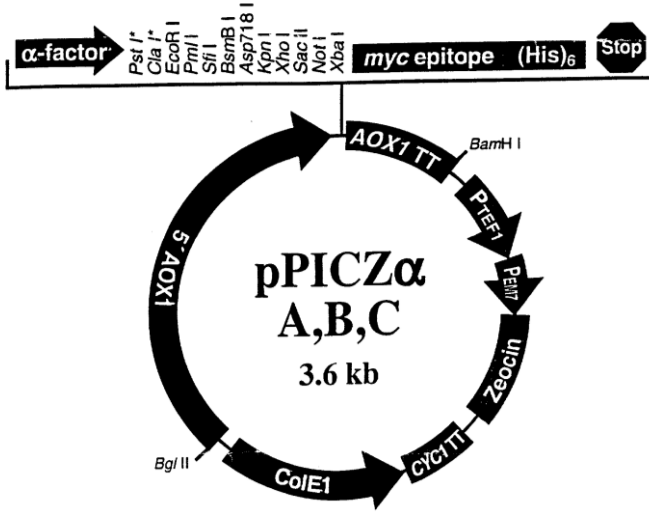
Kodon optimizasyonu yapılan Tibet öküzü (*Bos grunniens*) kimozen geni (GenBank No: JX839990.1) pUC57 vektörüne klonlanmış bir şekilde (pUC57-YAK ve PUC57-YAKN) liofilize olarak GenScript, USA firmasından temin edilmiştir.

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda distile su içinde çözdürülen pUC57-YAK ve PUC57-YAKN plazmitlerinin *E. coli* XLI-Blue hücrelerine transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kolonilerin kontrolleri yapıldıktan sonra hazırlanan kültürler -80 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan *E. coli* XLI-Blue suşu plazmidlerin çoğaltılması ve saklanması amacıyla kullanılmış olup Stratagene, CA, ABD'den temin edilmiştir, *P. pastoris* GS115 (PDI) suşu (Inan vd 2005) protein ekspresyonu için konukçu olarak kullanılmıştır.

Tüm mikroorganizmalar %50 gliserol içeren uygun besiyeri içinde -80°C'de muhafaza edilmişlerdir. Çalışmada kullanılacak olan suşlar ana stoktan agar plakalara tek koloni düşecek şekilde çizim yapılarak uygun sıcaklık ve süre boyunca (*P. pastoris* 30°C'de 3 gün *E. coli* 37°C'de 1 gün) inkübatörlerde bekletilerek geliştirilmiş ve kullanım sonucu +4°C'de muhafaza edilmişlerdir.





Şekil 3.2. Klonlama ve ekspresyon vektörü olan pPICZαA vektörü haritası (İnvitrogen)

### 3.1.5. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler

*P. pastoris* suşlarının genel gelişiminde; YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz), BMGY (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 13.4 g/L YNB,  $4 \times 10^{-5}$  g/L biotin, %10 gliserol ve 0.1 M fosfat tamponu pH 6.0) ve BMMY (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 13.4 g/L YNB,  $4 \times 10^{-5}$  g/L biotin, %10 metanol ve 0.1 M sodyum sitrat tamponu pH 3.0) besiyerleri kullanılmıştır. *E. coli* hücrelerinin gelişiminde LB miller (%0.5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %1 NaCl) ve/veya LB Lennox besiyeri (%1 pepton, %0.5 maya ekstrakt ve %0.5 NaCl) kullanılmıştır. Kullanılan sıvı ve katı besiyerlerine kullanılan plazmidin üzerindeki direnç genine göre seçimlerini sağlamak amacıyla uygun antibiyotik ilaveleri yapılmıştır.

Zeosin (İnvivogen, CA, ABD) ve amfisilin (Roche, Almanya) antibiyotiklerinin stok solüsyonları 100 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmış ve 0.22µm filtreden (Corning, MA, AB) geçirilerek sterilize edilmiş ve 1ml alikotlanarak kullanıma kadar -20°C de muhafaza edilmiştir. Antibiyotikli besiyeri hazırlamak için besiyeri otoklavda 121°C de 15 dk steril edildikten sonra 55°C ye soğutulmuş, üzerine buz üzerinde çözdürülmüş olan antibiyotiklerden *E. coli* suşları için 25 µg/mL zeosin veya 100-150 µg/mL amfisilin, *P. pastoris* suşları için ise 100 µg/mL zeosin olacak şekilde ilave edilmiştir.

Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri ve bunların tampon çözeltileri Fermentas (MD, ABD) firmasından temin edilmiştir. Enzimler kullanılırken üretici firmanın talimatları uygulanmıştır.

### 3.2. Metot

Çalışmada yararlanılan moleküler teknikler, Sambrook ve Russel (2001)'a ve kit protokollerine göre gerçekleştirilmiştir. Gen ve protein taramalarında Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Network Servisi (Bethesda, MD, ABD; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) kullanılmıştır.

#### 3.2.1. Liyofilize gelen plazmid DNA'nın açılması

Liyofilize gelen plazmid DNA (GenScript, USA), üretici firmanın talimatlarına uygun olarak 20 µl TE tamponu içinde çözdürülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

#### 3.2.2. Plazmidlerin *E.coli*'ye aktarılması ve kontrolü

Liyofilize olarak PUC57 vektörü içinde gelen plazmid kimozin DNA'ları PUC57-YAK; glikozile kimozin ve PUC57-YAKN; glikozile olmayan kimozin olarak isimlendirilmiştir.

Buz üzerinde çözülen 100 µl kompotent *E. coli* (XL1-Blue) hücrelerine TE içinde çözdürülmüş olan liyofilize PUC57-YAK ve PUC57-YAKN plazmidlerinden 0.5 µl eklenmiştir. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra 42°C'de 60 saniye süre ile ısı şokuna uğratan hücreler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek soğutulmuş, 200 µl LB Miller sıvı besiyeri eklenerek 37°C çalkalamalı inkübatörde 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Transfer edilen plazmide uygun antibiyotik içeren (100 µg/ml amfisilin) LB Miller plakalara ekimi yapılan transformant hücreler 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerin uygun miktarda amfisilin içeren sıvı LB Miller besiyerine ekimi yapılmış, 37°C'de gece boyu geliştirilmiştir. Daha sonra "QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Almanya)" kullanılarak protokol doğrultusunda plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Plazmidlerin izolasyonları yapıldıktan sonra doğrulaması restriksiyon analizi ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, elimizdeki pUC57-YAK ve PUC57-YAKN plazmidlerinin gen haritasına bakılarak elde etmek istediğimiz kimozin genini başından ve sonundan olmak üzere 2 noktadan kesen enzimler belirlenmiştir. Plazmidlerin konsantrasyonları ölçüldükten sonra 1 µg plazmide 1 U enzim olacak şekilde, 10X enzim tamponu ve NFW eklenerek toplam 20 µl içinde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. 37°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra kesilmiş plazmidler ile kontrol olarak kesilmemiş plazmidlerin değerlendirilmesi agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır.

Agaroz (SeaChem, Lonza, ME, ABD), % 1 olacak şekilde 1X TAE tamponunda (Tris/asetat/EDTA, 40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA) mikrodalgada ısıtılarak çözdürülmesi ile hazırlanan jele, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra %2 olacak şekilde etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml, Invitrogen, CA, ABD) eklenmiştir. Jel kasetine dökülen jel katılaştıktan sonra, 6X yükleme boyası ile karıştırılan örnekler kuyucuklara yüklenmiş, 1X TAE tamponu içerisinde 100 V akımda 30 dakika yürütülmüştür. Jelde boyutlarına göre farklı hızda ilerleyen DNA parçaları elektrik akımı etkisiyle birbirlerinden ayrılmış ve DNA'ya bağlanan etidyum bromürün UV

ışınları altında ışınma yapması sayesinde UV jel görüntüleme kutusunda (Vilber Lourmat EBox-VX2, Fransa) görüntülenmiştir. Görüntüleme sonrasında DNAMAN DNA restriksiyon analiz programında belirlenen enzimlerin kesim bölgeleri kontrol edilmiştir. Doğrulanmış *E.coli* XL1-Blue içindeki plazmidler %50 gliserol stoğu yapılarak - 80°C sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir.

### **3.2.3. Tibet öküzü kimozi enzim kodlayan glikozile ve glikozile olmayan prokimozi genlerinin ve pPICZ $\alpha$ A plazmidinin jelden kesilmesi, saflaştırılması ve ligasyona hazır hale getirilmesi**

PUC57-YAK ve PUC57-YAKN vektörlerini içeren *E.coli* XLI-Blue kompotent hücreleri besiyerinde bir gece geliştirilmiş ve plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra konsantrasyonları ölçülmüştür. EcorI ve XbaI enzimleri ile 1 µg plazmidde 1 U enzim olacak şekilde, 10X enzim tamponu ve NFW eklenerek toplam 20 µl içinde reaksiyon karışımı hazırlanmış ve 30 dakikalık kesim reaksiyonu kurulmuş süre sonunda da %1 lik agaroz jel elektroforezine GeneRuler 1kb DNA Ladder markeri ile yüklenmiştir. 1X TAE tamponu içerisinde 100 V akımda 30 dakika yürütülmüştür. Daha sonra jelde beklenen bant büyüklüğündeki parça White/UV Transilluminator, UVP, cihazı kullanılarak 365nm dalga boyu kullanılarak jelden kesilmiş, alınan DNA parçalarına (YAK ve YAKN) “MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Almanya)” kullanılarak üretici talimatları doğrultusunda jel pürifikasyonu yapılmıştır. Jel pürifikasyonunda jelin bağlanma tamponunda çözdürülmesi ve spin kolona yüklenip santrifüjlenmesi ile silika membrana bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra membrana 10µl elüsyon tamponu (10mM Tris-Cl, pH 8.5) eklenmiş ve santrifüj edilerek elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi 17.900xg hızında 1 dakika süresince Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Klonlama yapılacak olan *E.coli* XLI-Blue hücreleri içerisindeki pPICZ $\alpha$ A vektörüne de kit protokolüne göre plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmidin kontrolü için EcorI ve XbaI enzimleri kullanılarak 30 dakikalık kesim reaksiyonu kurulmuştur. Süre sonunda agaroz jele yüklenmiş 1XTAE tamponunda 30 dakika yürütülerek jelden istenilen parça kesilmiş ve jel pürifikasyonu yapılmıştır. Bu şekilde ligasyon için kullanılacak olan DNA parçaları ve plazmid lineer hale getirilmiştir.

### **3.2.4. DNA ve plazmid konsantrasyonlarının belirlenmesi**

Ligasyon için lineer hale getirilmiş ekspresyon vektörünün ve kimozi enzimini kodlayan genlerin konsantrasyon ölçümleri “Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, CA, ABD)” kullanılarak üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Protokolde belirtilen oranlarda toplam 200 µl içinde hazırlanan Qubit dsDNA BR Assay tamponu/boya/örnek karışımının okumaları yapılmış ve standartlara karşı konsantrasyon hesaplamaları Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, CA, ABD) cihazında yapılmıştır.

### **3.2.5. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi**

Sıvı besiyerinde geliştirilen kültürlerin hücre yoğunluklarının ölçülmesi spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Kültürlere gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra

LibraS50 (Biochrom, İngiltere) spektrofotometre cihazında 600 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek hücre yoğunlukları belirlenmiş ifade birimi olarak optik yoğunluk(OD<sub>600nm</sub>) terimi kullanılmıştır.

### 3.2.6. *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerinin kompotent hale getirilmesi

*E. coli* hücreleri CaCl<sub>2</sub> yöntemi ile kompotent hale getirilmiştir. LB Miller plakada tek koloni düşecek şekilde geliştirilen *E. coli* XLI-Blue suşu, 3 ml LB Miller sıvı besiyerine tek koloniden ekimi yapılarak gece boyu 37°C çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Ertesi gün gelişen kültürün optik yoğunluğu ölçülerek 50 ml LB Miller sıvı besiyerine başlangıç OD<sub>600nm</sub> değeri 0.01 olacak şekilde ekilmiş ve OD<sub>600nm</sub> değeri 0.3 olana kadar (yaklaşık 3 saat) 37°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Kültür beklenen OD<sub>600nm</sub> değerine ulaştığında 3000xg'de 4°C'de 5 dakika süre ile santrifüjlenerek hücreler hasat edilmiştir. İşlemler bu aşamadan sonra buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre peleti 5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi içinde süspanse edilmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Bir önceki şartlarda santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücre peleti 1.5 ml %15 gliserol içeren 0.1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi içinde resüspanse edilmiş ve 100 µl'lik hacimler halinde daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

*P. pastoris* GS115 (PDI) suşu hücreleri Lityum Asetat (LiAc) Yöntemine (Wu ve Letchworth 2004) göre kompotent hale getirilmişlerdir. Kompotent yapılmak istenen *P. pastoris* GS115 (PDI) suşu, donmuş kültürden ya da +4°C'de saklanan agar plakasındaki tek kolonilerden test tüpü içerisindeki 3 ml YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 250 rpm, 30°C çalkalamalı inkübatörde gece boyu geliştirilmiştir. Ertesi gün, gece boyu gelişen kültürden başlangıç OD<sub>600nm</sub> değeri 0.1 olacak şekilde 250 ml hacimli erlenmayer içerisinde 80 ml YPD sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. OD<sub>600nm</sub> değeri 1.3-1.5 olana kadar 250 rpm, 30°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Hücreler yeterli gelişme gösterdikten sonra +4°C'de 3000 g hızında 5 dakika süre ile santrifüjlenerek hasat edilmiş, süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti, 8 ml lityum asetat karışımı (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,4) içinde süspanse edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 4°C'de 3000xg hızında 5 dakika santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücreler 1.5 ml buz soğukluğundaki 1 M sorbitol içinde süspanse edilmiş ve 2 ml hacimli santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 4°C'de 3000xg hızında 5 dakika santrifüjlenerek hasat edilen hücreler 3 kez 1.5 ml soğuk 1 M sorbitol ile yıkanmış, daha sonra son konsantrasyon 10<sup>10</sup> hücre/mL olacak şekilde buz soğukluğundaki maya resüspanسیون tamponu (1 M sorbitol, %20 gliserol) içinde süspanse edilmiş, 80 µl'lik hacimler halindedaha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.2.7. DNA parçalarının plazmide ligasyonu

Yapışkan uçlu DNA parçalarının vektörlere ligasyon işlemleri "Rapid DNA Dephosphate and Ligation Kit (Roche, Almanya)" ile üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonunda 1:3 vektör: insert oranı (molar:molar) kullanılmıştır. Vektörün kendi kendine kapanmasını önlemek amacıyla vektöre defosforilasyon işlemi uygulanmıştır.



Defosforilasyon işlemi için “FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase” kiti kullanılarak protokole göre toplam 20 µl içerisinde 1µg vektör, 1X alkalın fosfataz tamponu ile 1U alkalın fosfataz ile karıştırılarak 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmış, takiben 75°C’de 2 dakika bekletilerek fosfataz inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Karışım ile ligasyon işlemine devam edilmiştir.

Ligasyon işlemi için toplam 10 µl içerisinde 50 ng vektör DNA’sı için hesaplanan miktarlarda insert DNA karıştırılmış, 1X T4 DNA ligasyon tamponu varlığında 5U T4 DNA ligaz eklenmiştir. 22°C sıcaklıkta 5 dakika inkübasyon sonrası ligasyon karışımının 1/10’u ile kompetent bakteri hücrelerine transformasyon işlemine devam edilmiş, karışımın kalan miktarı -20°C’de saklanmıştır. Ligasyon işlemi aynı şartlarda vektörün kendi üzerine kapanmasını kontrol etmek amacıyla sadece pPICZαA vektörüne de yapılmış olup kontrol olarak kullanılmıştır.

### 3.2.8. Ligasyon sonrası plazmidin kompetent *E.coli* hücrelerine transformasyonu

Buz üzerinde çözdürülen 100 µl kompetent *E. coli* (XL1-Blue) hücrelerine 5 µl ligasyon karışımı eklenmiş ve 30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra 42°C’de 60 saniye boyunca ısı şokuna maruz bırakılan hücreler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek soğutulmuş, süre sonunda 200 µl LB lenox sıvı besiyeri eklenerek 37°C çalkalamalı inkübatörde 60 dakika inkübe edilmiştir. Transfer edilen plazmidde uygun antibiyotik içeren (25µg/ml zeosin) LB lenox plakalara ekimi yapılan transformant hücreler 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerden 3’er tane seçilerek 3 ml sıvı LB lenox (25µg/ml zeosin) besiyerinde 37°C’de gece boyu geliştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonucunda daha önce bahsedilen şekilde plazmid izolasyonu yapılmış konsantrasyonları ölçülmüş ve XhoI ve BglII enzimleri ile restriksiyon analizi yöntemleri ile kontrolleri yapılmıştır. Agaroz jele yükleme sonucunda restriksiyon analizi ile doğrulanan plazmidlerden -80°C’ye gliserol stoğu yapılmıştır.

### 3.2.9. Doğrulanmış pPICZαA-YAK ve pPICZαA-YAKN plazmidlerin lineer hale getirilmesi

Doğrulanmış plazmidlerin kompetent *P. pastoris* PDI hücrelerine aktarılması amacıyla protein ekspresyonunda promotör olarak kullanılacak olan AOX1 promotörünü içinden kesen SacI enzimi kullanılmıştır. Üretici talimatları doğrultusunda hazırlanan reaksiyon karışımı ile 1 saatlik kesim sonucunda lineer hale getirilen plazmidlerin kontrolü amacıyla % 1’lik agaroz jelde yürütülmüştür. DNA parçaları doğrulandıktan sonra transformasyon edilmek üzere konsantrasyonları ölçülmüştür.

### 3.2.10. Lineer hale getirilen pPICZαA-YAK ve pPICZαA-YAKN plazmidlerinin kompetent *P.pastoris* GS115 PDI hücrelerine transformasyonu

Doğrulanmış plazmidlerin kompetent *P. pastoris* PDI hücrelerine transferleri elektroporasyon yöntemi ile yapılmıştır. Buz üzerinde bekletilerek çözdürülen 80 µl kompetent *P. pastoris* PDI hücrelerine 3-5 µg lineer DNA eklenmiş, pipetleterek karıştırılmış ve buz soğukluğundaki 2 mm elektroporasyon küvetine aktarılmıştır. Küvetler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek elektroporasyon cihazında 5 ms süre ile 1500 V elektrik akımına tabi tutulmuştur. Hemen ardından buz soğukluğundaki 1ml 1

M sorbitol eklenmiş ve 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. 30°C'de 1-2 saat inkübe edilen hücreler zeosin antibiyotiği içeren YPD agar besiyeri plakalarına 100, 200 µl olacak şekilde yayılmış, koloniler oluşana kadar( yaklaşık 3 gün) 30°C sıcaklıktaki inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.2.11. Erlenmayerde kimozin ekspresyonu

*P. pastoris*'e transformasyon sonrası plakalarda gelişen koloniler daha sonra teke düşürülmek amacıyla YPD agar besiyerine ekilmiş yine 3 günlük inkübasyondan sonra, tek tek düşen koloniler 3ml YPD besiyerine ekilerek *P.pastoris* PDI suşunda glikozile (YAK) ve glikozile olmayan (YAKN) kimozin klonları ile erlenmayerde kimozin ekspresyonu başlatılmıştır. Kimozin ekspresyon için ekspresyon kasetini taşıyan glikozile (YAK) ve glikozile olmayan (YAKN) kimozin klonları ile ekspresyon kasetini taşımayan *P. pastoris* hücreleri (negatif kontrol) 3 ml'lik YPD sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. YPD sıvı besiyerinde 28°C sıcaklıkta OD<sub>600nm</sub> değeri 6-8 olana kadar gelişen hücreler, besiyerinin son OD<sub>600nm</sub>'si 0.1 olacak şekilde BMGY ( pH:6 )'ye inoküle edilerek 18-20 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. 30°C'de BMGY besiyerinde çoğalan hücrelerin OD<sub>600nm</sub> değeri yaklaşık 10 iken +4°C, 3000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek hasat edilmiş ve supernatantlar atılmıştır. Hücre peletlerinin üzerine aynı hacimde BMMY ( pH:3 ) eklenip, süspansiyon edildikten sonra protein ekspresyonu için 28°C'de çalkalamalı inkübatöre koyulmuş ve protein ekspresyonu 120 saat boyunca sürdürülmüştür. Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*'in protein ekspresyonu AOX promotörü kontrolünde gerçekleştiği için ekspresyon boyunca her 12 saatte bir besiyerinin son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde % 100 metanol eklenmiştir. 120 saat sonunda hücreler hasat edilmiş ve süt pıhtılaştırma testleri yapılmıştır.

### 3.2.12. Süt pıhtılaştırma testi

Süt pıhtılaştırma testi için substrat olarak % 26 (w/v) yağsız süt tozunun, 40 mM'lık CaCl<sub>2</sub> pH (6.5) çözeltisinin içinde çözündürülmesiyle elde edilen solüsyon kullanılmıştır. Süt pıhtı testi ham süpernatantlar ile 37°C'de gerçekleştirilmiştir. 1 ml süt solüsyonuna 20 µL süpernatant eklenmiş ve süt solüsyonunda ne kadar sürede(s) pıhtı oluştuğu gözlenmiştir.

Üretilen rekombinant Tibet Öküzü kimozinlerinin süt pıhtılaştırma gücü ticari sığır kimozi ( 600 IMCU/ml) (Mayasan, Türkiye) standart alınarak hesaplanmıştır. Buna göre standart sığır kimozi seri olarak seyreltilmiş ve enzimin substratta gösterdiği kararlı pıhtılaşmanın başladığı dilüsyon oranı baz alınarak üretilen rekombinant tibet öküzü kimozinlerinin pıhtı süreleri belirlenmiştir.

### 3.2.13. SDS- PAGE analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE), OWL P8D8 (Thermo Scientific, IL, ABD) cihazında gradient jel (%5 poliakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli, 0.8 mm) hazırlanarak uygulanmıştır. Protein üretimi için geliştirilen hücrelerden ayrılan süpernatantlar, toplam 50 µl olacak şekilde 3:1 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 Bromphenol

Blue, %40 gliserol, 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. 25'er µl'eri hazırlanan jellere yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, jelin, 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, %0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 150 V akımda yaklaşık 60 dakika yürütülmesi ile tamamlanmıştır. Daha sonra jeller, IRDye Blue Protein Stain (Li-Cor, NE, ABD) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, boyası giderilene kadar metanol-asetik asit solüsyonunda yıkandıktan sonra Odyssey görüntüleme sistemi (Li-Cor, NE; ABD) ile görüntülenmiştir. Protein standardı olarak PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır.

### 3.2.14. Süpernatantların konsantre hale getirilmesi

Süt pıhtılaştırma testi ve SDS PAGE analizi sonucunda glikozile ve glikozile olmayan kimozin üretiminin en iyi olduğu düşünülen klonlar seçilmiş ve 30 kDa hızlı ultrafiltrasyon(Pierce Concentrator; Thermo Scientific) kolonları ile konsantre hale getirilerek yapılan analizler (Süt Pıhtılaştırma Testi, SDS PAGE ve Toplam Protein Tayini) tekrarlanmış ve konsantrasyon oranı ile karşılaştırılmıştır.

### 3.2.15. Ölçek büyütme çalışması- fermentörde üretim

Fermentörde kimozin ekspresyonu için besiyeri ve fermentasyon koşulları *Pichia* Fermentation Process Guidelines'a uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için kimozin üretiminin en iyi olduğu düşünülen transformantlar 10 ml YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 28°C de 225 rpm çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Ardından OD<sub>600nm</sub> değeri 5 ile 9 arasındayken 100 mL BMGY'ye inokule edilerek geliştirilmeye devam edilmiştir. BMGY besiyerinde fermentasyon için uygun OD<sub>600nm</sub> değerine ulaştığında (yaklaşık 10 OD) hücreler inokulum kültürü olarak kullanılmıştır.

Fermentasyon kesikli (batch), gliserol besleme (fed batch) ve indüksiyon fazları olarak üç aşamalı yarı kesikli sistemle gerçekleştirilmiştir. İlk aşama olan kesikli faz, % 4 gliserol içeren 2L BSM temel tuz besiyerinde (Çizelge 3.1.) gerçekleştirilmiş ve yaklaşık olarak 18 saat sürdürülmüştür. Çözünmüş oksijen düzeyi takip edilerek ortamdaki gliserolün varlığı izlenmiştir. Aynı şekilde çözünmüş oksijen miktarındaki ani yükseliş ile ortamdaki gliserolün tükendiği tespit edilip kesikli faz sona erdirilmiştir. Bu aşamada sıcaklık 30°C, pH 5 olarak sabit tutulmuştur. Kesikli gliserol aşamasının ardından gliserol besleme fazı başlatılmıştır. Bu aşamada % 40 gliserol kullanılarak besleme 16.5 mL/L.sa akış hızı ile başlatılmış ve 2 saat boyunca sabit akışta sonraki 3 saat boyunca lineer azaltılarak toplam 5 saatte sonlandırılmıştır (Çizelge 3. 3. ). Gliserol beslemesinin ilk ve son saatlerinde hücrelerin indükleyici karbon kaynağı olan metanole alışabilmeleri için 2 mL/L saf metanol eklenmiştir. Ortamdaki karbon kaynaklarının hücreler tarafından tamamen kullanılması ile çözünmüş oksijen miktarında ani yükseliş gözlenmiş ve fermentasyonun 3. aşaması olan indüksiyon fazına geçilmiştir. İndüksiyon fazı 90 saat sürdürülmüş, bu fazda besleme kaynağı olarak 12 mL/L PTM1 tuzu içeren metanol kullanılmıştır (Çizelge 3.2.). Besleme hızı 1.5 mL/L.sa'den 12 mL/L.sa düzeyine kadar kademeli olarak yükseltilmiştir (Çizelge 3. 4.). Rekombinant proteinin üretildiği metanol besleme fazı, 12mL/L sabit akış hızına kadar kademeli artırılarak 90 saat sürdürülmüştür. Kesikli ve gliserol besleme fazları boyunca sıcaklık 30°C, pH değeri 5, karıştırma hızı 900 rpm ve hava beslemesi 2 vvm olacak şekilde sabit tutulmuş, indüksiyon fazında ise pH değeri 3.15 ve sıcaklık 28°C olarak değiştirilmiştir.

Çözünmüş oksijen miktarı ise % 25'te sabit tutulmak üzere gerektiğinde saf oksijen eklenerek kontrol edilmiştir.

Metanol besleme fazı 90 saat boyunca sürdürülmüş, belirli aralıklarla fermentörden alınan örneklerin yaş hücre ağırlığı ölçülmüş, süt pıhtılaştırma testi ile enzim aktiviteleri belirlenmiş ve Bradford metodu ile toplam protein miktarı belirlenmiştir. Örneklerin toplam protein miktarlarını belirlemek amacıyla “Bovine serum albümin” kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuştur. Paralel olarak ölçülen standart serisinden elde edilen absorban değerleri ile çizilen standart grafiği ekler (Ek-4) kısmında verilmiştir.

Çizelge 3. 1. BSM tuzunun içeriği

Bileşen Adı	Miktarı
Fosforik asit(%85lik)	26.7ml
Kalsiyum Sülfat	0.93 g
Potasyum Sülfat	18.2 g
Magnezyum Sülfat-7H <sub>2</sub> O	14.9 g
Potasyum Hidroksit	4.13 g
Gliserol	40 g
Su	1 L'ye tamamlanacak

Çizelge 3. 2. PTM1 tuzlarının bileşimi

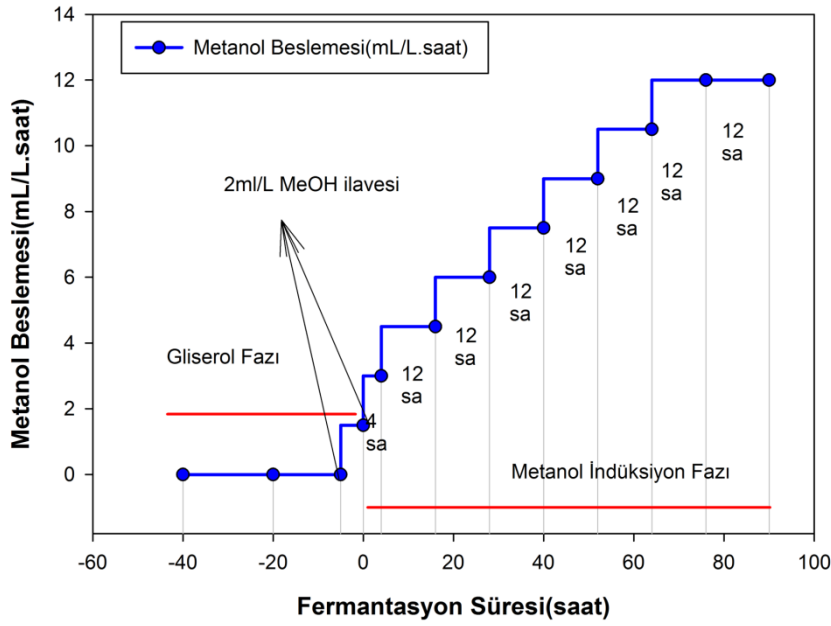
Bileşen Adı	Miktarı
Bakır Sülfat- 5H <sub>2</sub> O	6g
Sodyum İyodit	0.08 g
Manganaz Sülfat- H <sub>2</sub> O	3g
Sodyum Molibdat-2 H <sub>2</sub> O	0.2g
Borik Asit	0.02 g
Kobalt Klorit	0.5g
Çinko Klorit	20g
Demir Sülfat-7 H <sub>2</sub> O	65 g
Biotin	0.2g
Sülfürük Asit	5ml
Su	1Lye tamamlanacak

Çizelge 3. 3. Gliserol besleme tablosu

Süre(dk)	Gliserol Besleme Hızı(rpm)	Akış (mL/L.sa)
0	1.1	16.5
30	0.9	13.5
60	0.7	10.5
90	0.6	9.0
120	0.4	6.0
150	0.2	3
165	0.1	1.5
180	0	0

Çizelge 3. 4. Metanol Besleme Tablosu

Metanol Besleme Saat Akışı	Metanol Besleme Hızı (rpm)	Akış (mL/L.sa)
0	0.2	3.0
4	0.2	3.0
12	0.3	4.5
24	0.4	6.0
36	0.5	7.5
48	0.6	9.0
48-90	0.7-0.9	10.5-12



Şekil 3.3. Gliserol ve metanol besleme fazları sırasında hücrelere gönderilen gliserol ve metanolün zamana göre gönderiliş hızı ve miktarı

Metanol ile kesikli besleme aşamasında belirli saat aralıklarında alınan örneklerin yaş hücre ağırlığı ölçülmüş, toplam protein miktarı tayin edilmiş ve süt pıhtılaşma testi yapılmıştır. Alınan sonuçlar doğrultusunda aktivite artmaya devam ettiği halde % 40'lara kadar saf oksijen takviyesi yapılmasına rağmen DO oksijen düzeyi kontrol edilemediği için fermantasyon metanol beslemesi 90. saatinde iken sonlandırılmıştır. Hücreler +4°C 3000 g'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant sonraki analizlere kadar +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

### **3.2.16. Enzimin optimum çalışma şartlarının belirlenmesi**

#### **3.2.16.1. Toplam protein tayini**

Toplam protein tayini Coomassie plus™ (Bradford) Assay kit (ABD) ile üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Protein miktarını hesaplayabilmek için albümin standardı (BSA) tampon çözelti (0.9 salin 0.05 sodyum azit) ile protokole uygun olarak (Thermo Scientific) seyreltilmiştir (0 µg/ml, 25µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml). Ardından hazırlanan dilüsyonlar reaksiyon ayırıcı ile 1:30 oranında karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri okutulmuştur. Paralel olarak ölçülen standart serisinden elde edilen absorbans değerleri ile çizilen standart grafiğinden, bilinmeyen örneğin protein miktarı hesaplanmıştır.

#### **3.2.16.2. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı şartlarının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi**

Enzimin stabil kalabildiği sıcaklıkları belirlemek için, süpernatant 1 saat boyunca 20-70°C arasındaki sıcaklıklara tabi tutulmuştur. Ardından bu süpernatantlar ile 40mM CaCl<sub>2</sub> ile hazırlanan süt solüsyonu substratı ile 37°C sıcaklıkta süt pıhtılaşma testi gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlara göre enzimin stabil kalabildiği sıcaklık aralığı belirlenmiştir.

Enzimin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi için +4°C'den alınan süpernatantlar ile 40mM CaCl<sub>2</sub> ile hazırlanan süt solüsyonu substratı ile süt pıhtılaşma testi 20-70°C'ler arasında uygulanmıştır. Elde edilen pıhtılaşma sürelerine göre enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiştir.

#### **3.2.16.3. Enzimin optimum çalışma pH şartlarının ve pH stabilitesinin belirlenmesi**

Enzimin optimum çalışma pH'ını belirlemek için 50 mM sodyum sitrat (pH 2.0-3.5), 50 mM sodyum asetat (pH 4.0-5.5), 50 mM potasyum fosfat (pH 6-7.5) ve 50 mM Tris-HCl (pH 8.0-9.0) tamponları hazırlanmış ve yağsız süt tozu bu tamponlar içinde %26 g/ml oranında çözdürülmüştür. Süpernatantlar 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 3.85) kullanılarak 2.5 ve 10 kat olacak şekilde seyreltilmiştir. Seri olarak seyreltilmiş süpernatantlar ile 96 well plate'de 37°C'de süt pıhtılaşma testi uygulanmıştır. Pıhtılaşmanın gözlemlendiği en yüksek dilüsyon değeri yüzde yüz kabul edilmiştir. Farklı pH'lardaki bağlı aktiviteler de referans aktivite değerine göre belirlenmiştir.

Enzimin pH stabilitesini test edebilmek amacıyla süpernatant farklı pH'lardaki tamponlarla (10 mM sodyum asetat buffer, pH 2.0-5.5; 10 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6.0-7.5; 10 mM Tris-HCl, pH8.0-9.0) enzim muamele edilmiştir. Hazırlanan süpernatantlar 8 saat boyunca 37 °C'de bırakılmıştır. Ardından enzime süt pıhtılaşma test uygulanmış ve enzimin pH stabilitesi aralığı belirlenmiştir.

### 3.2.17. Üretilen enzim süpernatantları ile peynir üretimi çalışmaları

#### 3.2.17.1. Üretime alınacak sütün özelliklerinin belirlenmesi

Peynir üretimine alınacak süt Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesine bağlı inek çiftliğinden elde edilmiş olup Funke Gerber-Lactostar Süt anali cihazı (Lactostar 83510, Berlin, Almanya) ile süt bileşenleri % olarak ölçülmüştür.

#### 3.2.17.2. Üretilen enzim süpernatantları ile peynir üretimi çalışmaları

Enzim süpernatantlarının her ikisinin (YAK ve YAKN) de öncelikle maya kuvveti belirlenmiştir. Maya kuvveti belirlenirken 30°C sıcaklığa ısıtılmış olan erlenmayer içerisindeki 20 ml süte 1 ml enzim süpernatantları ilave edilmiş ve duvarda görülen ilk pıhtı saniyesi tespit edilmiştir. Daha sonra maya kuvveti, denklem 3.1. kullanılarak hesaplanmıştır.

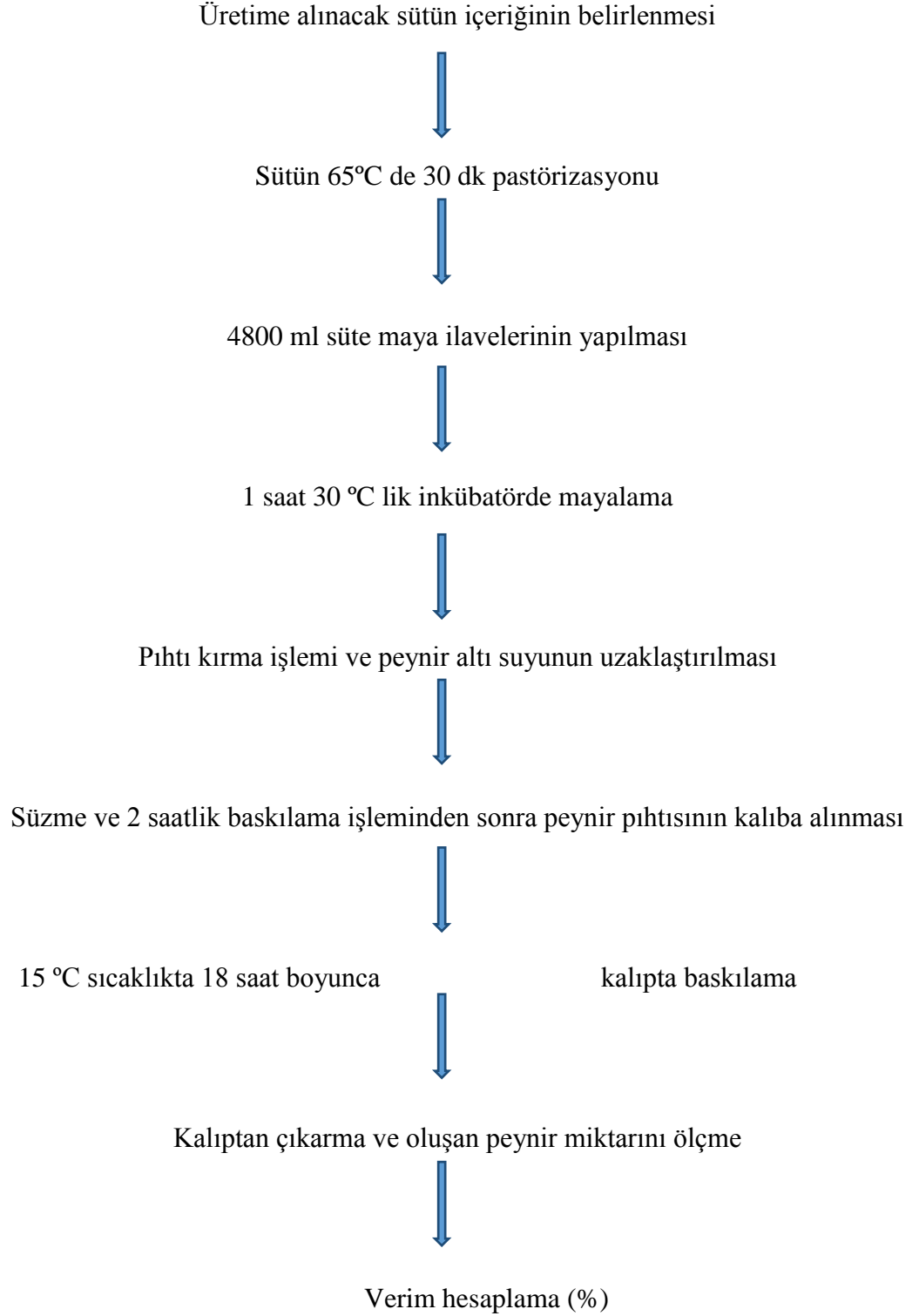
$$M.K = \frac{2400 * \text{süt miktarı}}{\text{maya miktarı} * \text{ilk pıhtının örüldüğü an}} \quad (3.1)$$

Hesaplamalar sonucu maya kuvveti belirlenen glikozile ve glikozile olmayan kimozen süpernatantlarından 5 litre süte peynir yapımı için ne kadar maya koyulması gerektiği, denklem 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Maya Miktarı} = \frac{2400 * \text{süt miktarı}}{\text{maya kuvveti} * \text{pıhtılaşma süresi}} \quad (3.2)$$

Üretilen kimozen enzimlerinin etkinliğini ölçmek amacıyla bileşen içeriği belirlenen 5 litre süt 65°C sıcaklıkta 30 dakika pastörize edilmiştir. Pastörizasyondan sonra maya kuvvetlerine göre 5 litre sütü 1 saatte mayalayacak miktarda YAK6, YAKN1 süpernatantları ve ticari mayadan ilave edilmiştir. 1 saat 32°C sıcaklıkta mayalanması için bekletilmiştir. 1 saat sonunda pıhtı kırma işlemi yapılmış ve cendere bezine alınarak 5 kg'lık baskı ile 2 saat boyunca süzülmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda cendere bezinin altına geçen peynir altı suyu miktarı ölçülmüştür. 2 saatlik süre sonunda oluşan peynir pıhtıları peynir kalıbına alınarak 16°C sıcaklıkta 16 saat boyunca kalıp içinde baskılama işlemi yapılmıştır. Daha sonra oluşan peynir tartılarak kaç litre süttten ne kadar peynir yapıldığı ölçülerek verim hesabı yapılmıştır.

Peynir yapımı genel prosedürü incelendiğinde peynire işlenecek süte CaCl<sub>2</sub> ve starter kültür ilavesi yapılmaktadır. Ancak çalışmamızda sadece üretilen rekobinant kimozen enzimlerinin etkinliği incelenmek istendiği için CaCl<sub>2</sub> ile starter kültür ilavesi yapılmamıştır.



Şekil 3.4. Peynir üretimi akış şeması

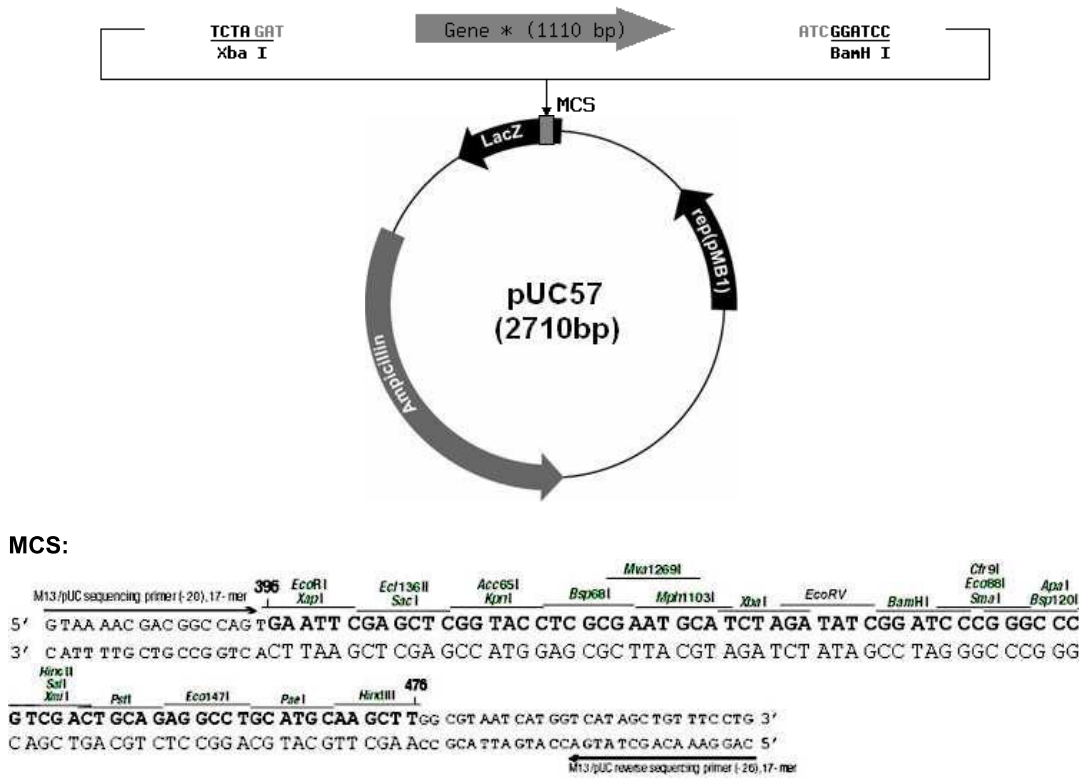


#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Glikozile (YAK) ve glikozile olmayan (YAKN) prokimozin genlerinin klonlama çalışmaları ve *P. pastoris* mayasına transformasyonu

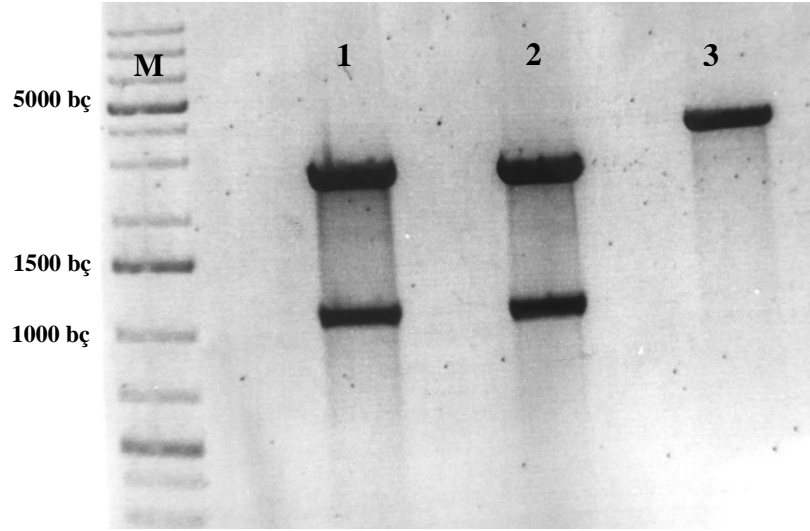
##### 4.1.1. PUC57 vektörü içerisinde gelen glikozile ve glikozile olmayan prokimozin genlerinin *E.coli* XL1-Blue kompotent hücrelerine transformasyonu

Tibet öküzü (*Bos grunniens*) kimozin enzimi geni (GenBank No: JX839990.1) (1110 bç), GenScript (ABD) tarafından pUC57 klonlama vektörü içerisinde (pUC57-YAK, ve PUC57-YAKN) temin edilmiştir.



Şekil 4.1. PUC57 vektörü içerisinde temin edilen YAK (glikozile kimozin) ve YAKN (glikozile olmayan) prokimozin enzim genleri

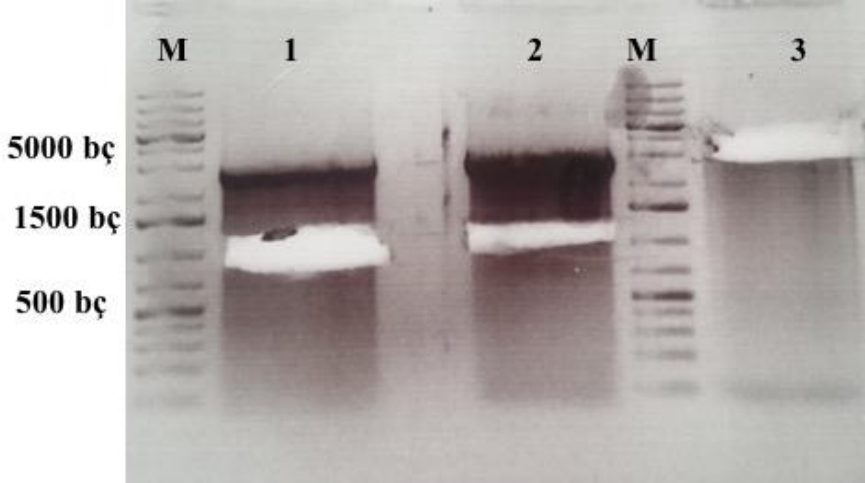
Liyofilize olarak gelen plazmidid çoğaltılmak üzere metot kısmında bahsedildiği gibi *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır. LB Miller katı besiyerinde geliştirilen kolonilerden 3 tane seçilmiş, sıvı besiyerinde geliştirilerek plazmid izolasyonları yapılmıştır. Doğrulamak amacıyla *EcoRI/XbaI* enzimleri ile restriksiyon analizi yapılmıştır. Agaroz jelde 2710 ve 1110 bç fragmentlerinin görülmesi beklenmiş ve doğrulanan glikozile ve glikozile olmayan tibet öküzü kimozin transformantlarından donmuş kültür hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonra glikozile Tibet öküzü kimozinini YAK; glikozile olmayan Tibet öküzü kimozinini YAKN olarak adlandırılmıştır. Kimozin genlerinin klonlanacağı pPICZaA plazmidinin *EcoRI/XbaI* enzimleri ile kesilmesi sonucu beklenen uzunluk 3600 baz çiftidir.



Şekil 4.2. XL1-Blue hücrelerine aktarılan pUC57YAK ve pUC57YAKN plazmidlerinin *EcoRI/XbaI* enzimleriyle kesilerek doğrulanmasının agaroz jel görüntüsü. Beklenen bç uzunlukları 2710, 1110. M Sütunu: GeneRuler™ 1kb Plus . DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 1. Sütün: Restriksiyon enzimleriyle kesilen pUC57-YAK (glikozile kimozi) plazmidini 2 Sütün: Restriksiyon enzimleriyle kesilen pUC57-YAKN (glikozile olmayan kimozi) plazmidini 3. Sütün: Restriksiyon enzimleriyle kesilen pPICZ $\alpha$ A plazmidini (beklenen fragment büyüklüğü 3600 bç.).

#### 4.1.2. Glikozile olan ve olmayan prokimozi genlerinin, pPICZ $\alpha$ A plazmidlerinin lineer hale getirilmesi, jelden kesilmesi, ligasyonu ve doğrulanması

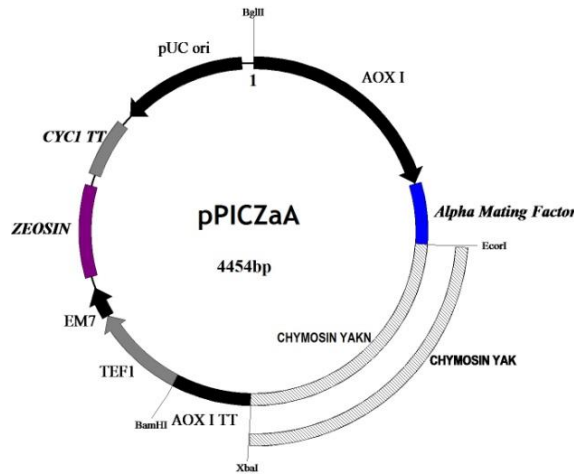
Doğrulaması yapılan pUC57 vektörlerinden glikozile ve glikozile olmayan prokimozi genlerini alabilmek amacıyla yine *EcoRI/XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 1110 bç olarak beklenen kimozi genleri jelden kesilerek alınmış ve jel pürifikasyonu yapılmıştır. Aynı işlemler ekspresyon vektörü olarak kullanacağımız pPICZ $\alpha$ A plazmidine de yapılmıştır.



Şekil 4.3. Ligasyon için istenen DNA bölgelerinin agaroz jelden alınması M: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA,(ABD) 1. Sütun: Restriksiyon enzimleriyle kesilen pUC57YAK(glikozile kimozin) plazmidinden 1110 bç uzunluğundaki YAK kimozin geninin jelden kesilmesi 2. Sütun: Enzimlerle kesilen pUC57YAKN(glikozile olmayan kimozin) plazmidinden 1110 bç uzunluğundaki YAKN kimozin geninin jelden kesilmesi 3. Sütun: Enzimlerle kesilen pPICZ $\alpha$ A vektörünün jelden kesilmesi

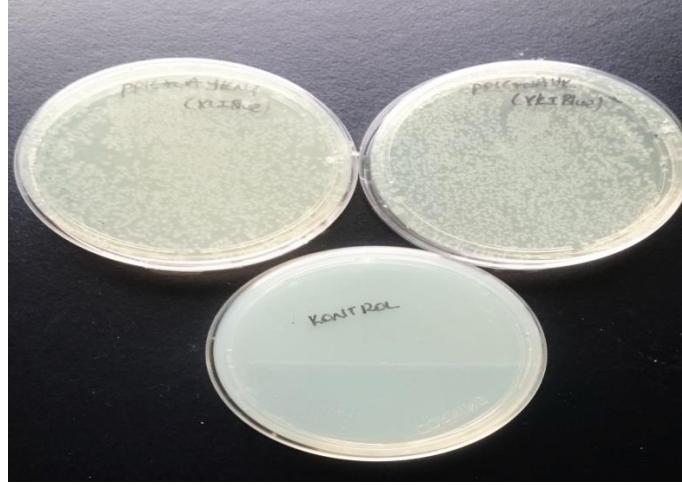
#### 4.1.3. Prokimozin geni taşıyan ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ve doğrulanması

Prokimozin geni taşıyan ekspresyon vektörlerinin oluşturulması amacıyla lineer hale getirilen pPICZ $\alpha$ A plazmidi ve YAK, YAKN kimozin genlerine 1:3 vektör:insert oranı (molar:molar) kullanılarak ligasyon gerçekleştirilmiştir. Ligasyon sırasında pPICZ $\alpha$ A plazmidinin kendi üzerine kapanmasını önlemek amacıyla defosforilasyon yapılmıştır.



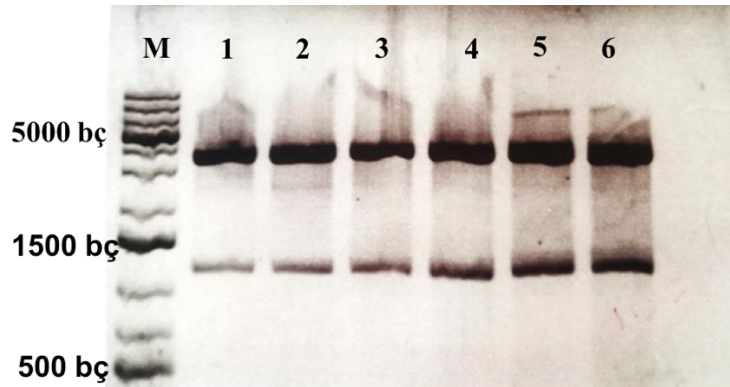
Şekil 4.4. pPICZ $\alpha$ A vektörüne klonlanmış glikozile ve glikozile olmayan kimozin genlerinin şematik gösterimi

Ligasyon sonrası *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılan ekspresyon vektörleri, pPICZ $\alpha$ A vektörünün seçilim direnç geni olan zeosinli LB Lenox besiyerinde 37°C sıcaklıkta bir gece geliştirilmişlerdir. Kontrol olarak da ligasyon, ortama insert DNA koyulmadan yapılmış ve vektörün kendi üzerinde kapanıp kapanmadığını test edilmiştir.



Şekil 4.5. Zeosinli LB Lenox besiyerlerinde gelişen hücreler ve kontrol grubu plaka resimleri

Zeosinli LB Lenox besiyerlerinde gelişen hücrelerden 3'er tane alınmış, sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Gece boyu inkübasyon sonrasında plazmid izolasyonu yapılmış ve hedeflenen genin vektöre girip girmediğini kontrol etmek amacıyla XhoI ve BglII enzimleri ile kesim reaksiyonu kurulmuştur.



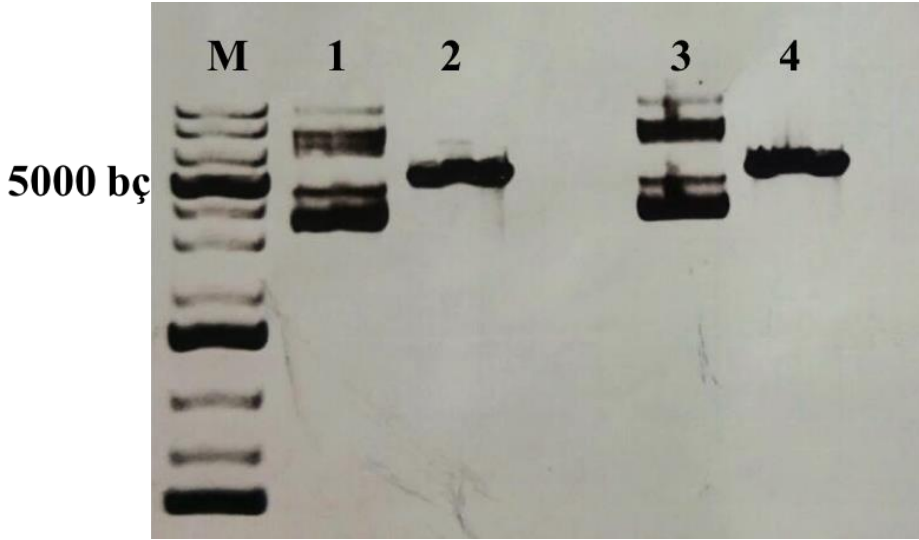
Şekil 4.6. XhoI ve BglII enzimleri ile kesim reaksiyonu kurulan plazmidlerin agaroz jel görüntüsü M: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD). 1-3 arası sütunlar: glikozile kimozin ekspresyon kasetleri, 4-6 arası sütunlar: glikozile olmayan kimozin ekspresyon kasetleri.

Kesim reaksiyonu sonucunda 1183 ve 3450 bç olmak üzere iki bant beklenmekte olup, doğrulanmış klonlardan glikozile kimozin için 1. klona; glikozile

olmayan kimozi için 6. klon -80°C stok yapılmış ve bu klonlarla devam edilmiştir. Bu ekspresyon kasetleri pPICZ $\alpha$ A-YAK ve pPICZ $\alpha$ A-YAKN olarak isimlendirilmiştir.

#### 4.1.4. Doğrulanmış ekspresyon vektörlerinin *P. pastoris* mayasına transformasyonu

Doğrulanmış pPICZ $\alpha$ A-YAK ve pPICZ $\alpha$ A-YAKN ekspresyon kasetlerinin 2-5  $\mu$ g'ı *SacI* enzimi ile lineer hale getirilmiştir. Aşağıdaki jel görüntüsünde de görüldüğü gibi beklenen bç uzunlukları 4600 baz çiftidir.



Şekil 4.7. *P.pastoris* GS115 (PDI) mayasına transformasyon öncesi vektörlerin lineer hale getirilmesinde agaroz jel görüntüsü M: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD). 1: *SacI* enzimi ile kesilmeyen pPICZ $\alpha$ A-YAK kontrolü, 2: pPICZ $\alpha$ A-YAK plazmitinin *SacI* enzimi ile kesimi 3: *SacI* enzimi ile kesilmeyen pPICZ $\alpha$ A-YAKN kontrolü 4: pPICZ $\alpha$ A-YAKN plazmitinin *SacI* enzimi ile kesim kontrolü jel görüntüsü

Lineer hale geldikleri *SacI* enzimi ile kontrol edilen pPICZ $\alpha$ A-YAK ve pPICZ $\alpha$ A-YAKN plazmitlerin kompetent *P. pastoris* GS115 (PDI) suşuna transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Transformant hücreler 100  $\mu$ g/mL ve 500  $\mu$ g/mL zeosin içeren YPD agar plakalara ekilmiştir. Plakalar 3 gün boyunca 30 °C'de gelişmeye bırakılmış ve oluşan kolonilerden seçim yapılmıştır. Glikozile kimozi için 100  $\mu$ g/mL zeosin içeren plakalardan 3 adet, 500  $\mu$ g/mL zeosin içeren plakalardan 5 adet koloni seçilmiş isimlendirmeleri YAK1, YAK2, YAK3, YAK4, YAK5, YAK6, YAK7, YAK8 olarak yapılmıştır. Aynı şekilde, glikozile olmayan kimozi için 100  $\mu$ g/mL zeosin içeren plakalardan 3 adet, 500  $\mu$ g/mL zeosin içeren plakalardan 5 adet koloni seçilmiş isimlendirmeleri YAKN1, YAKN2, YAKN3, YAKN4, YAKN5, YAKN6, YAKN7, YAKN8 olarak yapılmıştır. Seçilen koloniler teke düşürmek amacıyla YPD agar plakalara çizilmiş 3 gün boyunca 30°C'de gelişmeye bırakılmışlardır. Daha sonra bu kolonilerden YPD sıvı besiyerine ekilerek gelişmeleri sağlanmış ve -80°C stok yapılmıştır.



Şekil 4.8. *P. pastoris* GS115 (PDI) suşuna transformasyon sonucu oluşan koloniler ve teke düşürme çizimi

## 4.2. Transformantların Kimozin Ekspresyonu Çalışmaları

### 4.2.1. Erlenmayerde kimozin ekspresyonu

Bölüm 4.1.5. te isimlendirilmesi yapılan transformantlar önce YPD ve BMGY besiyerlerinde geliştirildikten sonra erlenmayerde pH:3 de BMMY besiyerinde 120 saatlik protein ekspresyonları gerçekleştirilmiştir. Ekspresyonları *P.pastoris* AOXI promotörü kontrolünde yapıldığı için indüklenme süresi boyunca her 12 saatte toplam metanol %1 olacak şekilde saf metanol ilavesi yapılmıştır. 120 saatlik indüksiyon fazında her 24 saatte örnek alınarak süt pıhtılaştırma testi ve SDS PAGE analizi yapılmıştır.

### 4.2.2. Süt pıhtılaştırma testi

Teste tabi tutulan tüm örneklerde süt solüsyonunun pıhtılaştığı zaman(s) gözlemlenmiş, test her bir örnek için 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Testte pozitif kontrol olarak ticari maya kullanılmış, negatif kontrol olarak ise kimozin geni aktarılmayan boş *P.pastoris* GS115 PDI suşu kullanılmıştır. Klonlardan elde edilen süt pıhtı süreleri ile kullandığımız kimozin standardı referans alınarak enzim aktiviteleri IMCU/ml olarak hesaplanmıştır. YAK1, YAK2, YAK7 ve YAK8 klonları ile YAKN2, YAKN3, YAKN4, YAKN6 klonları diğer klonlara göre çok geç pıhtılaştırma gösterdiği için YAK6 ve YAKN1 klonları ile çalışmalara devam edilmiştir. Oluşturulan klonların erlenmayerde üretimleri sonucu süt pıhtılaştırma süreleri ve IMCU/ml ifadesinden aktivite değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.



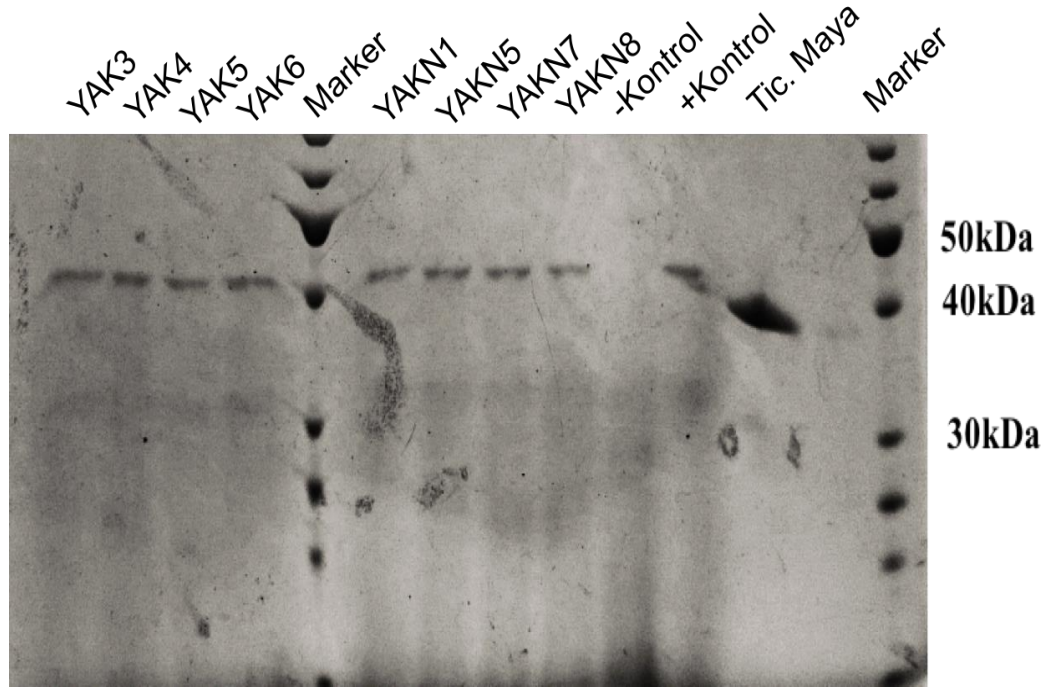
Şekil 4.9.  $\text{CaCl}_2$  ve yağsız süt tozu ile hazırlanan substrat ile gerçekleştirilen süt pıhtılaştırma testi

Çizelge 4.1. Erlenmayerde 120 saatlik ekspresyon sonucu klonların pıhtılaştırma süreleri ve enzim aktivite değerleri

Klon İsmi	Pıhtı Süresi (s)	Enzim Aktivitesi (IMCU/mL)
YAK3	67	53,71
YAK4	68	52,90
YAK5	66	54,54
YAK6	64	56,25
YAKN1	59	61
YAKN5	72	50
YAKN7	72	50
YAKN8	67	53,73
Kontrol	0	0
Ticari Maya	6	600

#### 4.2.3. SDS PAGE analizi

120 saatlik kimoziin ekspresyonu sonrasında diğeri klonlara göre aktivitesi daha iyi olduğu sonucuna ulaşılan glikozile kimoziin klonları (YAK3, YAK4, YAK5, YAK6) ile glikozile olmayan kimoziin klonlarına (YAKN1, YAKN5, YAKN7, YAKN8) SDS PAGE analizi yapılmış kontrol olarak ticari maya kullanılmıştır.

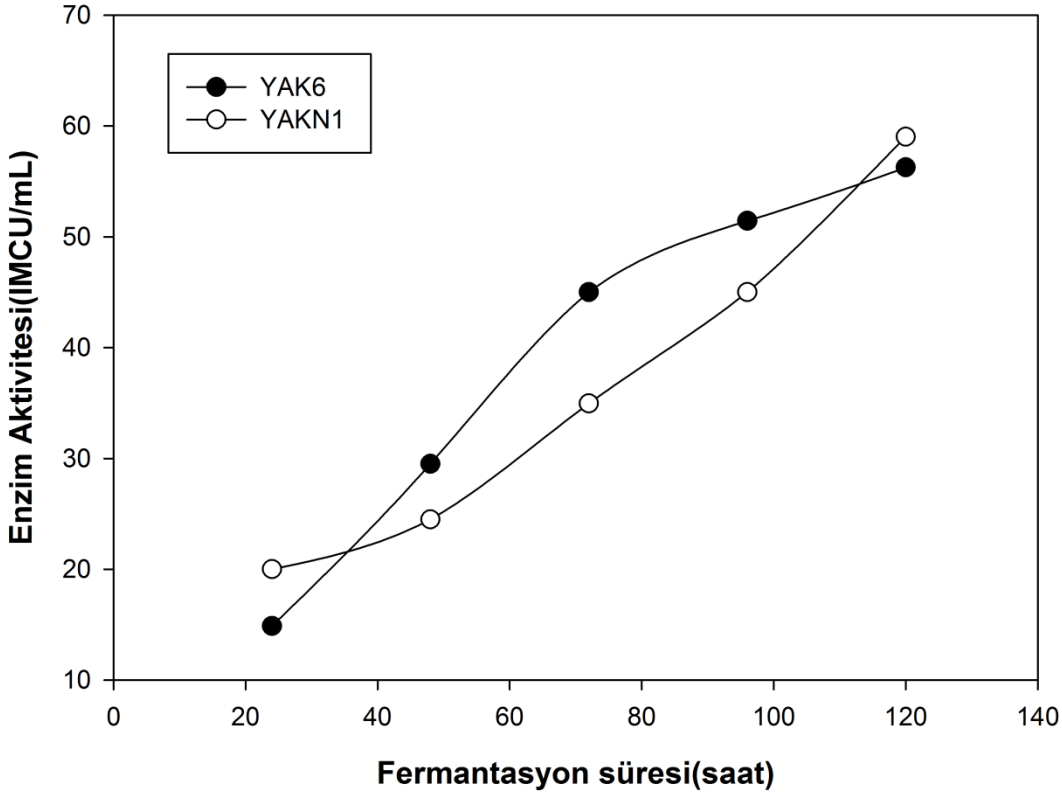


Şekil 4.10. Erlenmayerde 120 saatlik üretim sonucu klonların SDS PAGE jel görüntüsü. 1-4 sütunları sırasıyla YAK(glikozile kimoziin), 5-8 sütunları sırasıyla YAKN (glikozile olmayan kimoziin) klonlarıdır. M: Page Ruler Unstained Protein Ladder –K: Boş PDI suşunun 120. Saat görüntüsü +K: Daha önceki çalışmalarda elde edilen kimoziin ürettiği bilinen başka bir PDI kimoziin klonu, T: ticari maya

#### 4.2.4. Seçilen kimoziin klonlarının erlenmayerde üretilmesi ve süpernatantlarının konsantre hale getirilmesi

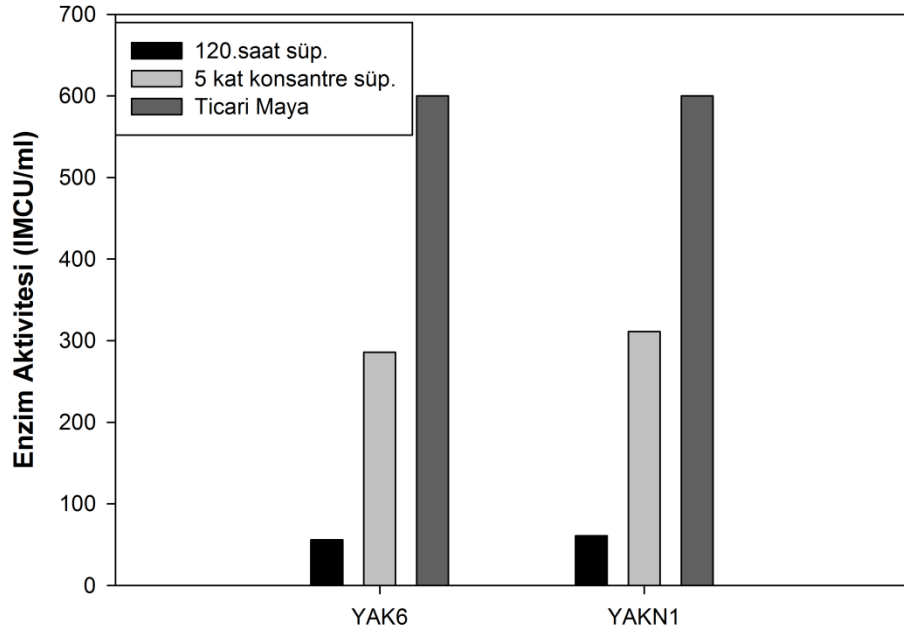
Erlenmayerde kimoziin ekspresyonu sonucu yapılan aktivite testi ve SDS PAGE analizi sonrası glikozile kimoziin klonlarından YAK6, glikozile olmayan kimoziin klonlarından YAKN1 klonları en iyi kimoziin üretici klonlar olarak seçilmiş ve erlenmayerde BMMY pH:3 ortamında üretilerek enzim aktivitelerinin zamanla değişimlerine bakılmıştır (Şekil 4.11).



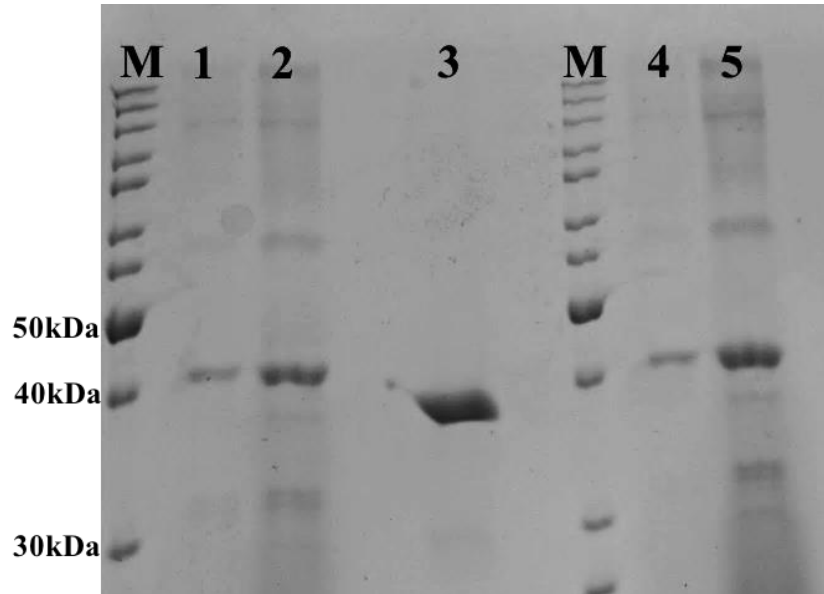


Şekil 4.11. Erlenmayerde yapılan 120 saatlik kimozin ekspresyonu sonucu seçilen glikozile (YAK6) ve glikozile olmayan(YAKN1) kimozin klonlarının fermentasyon süresi boyunca enzim aktivitesi değişimleri

Seçilen bu iki klonun 120. saat süpernatantları hızlı filtrasyon sistemleri ile 30 kDa'luk kolonlardan geçirilerek 5 kat konsantre hale getirilmiştir. Konsantre hale getirilen süpernatantlara süt pıhtılaştırma testi ve SDS PAGE analizi uygulanmıştır. Süt pıhtılaştırma testinde YAK6 klonunun konsantre etmeden önceki süpernatant kimozin aktivitesi 56 IMCU/ml olarak bulunmuşken 5 kat konsantre edildikten sonraki aktivitesi 286 IMCU/ml olarak bulunmuşken bu değerler YAKN1 klonu için de sırasıyla 61 IMCU/ml ve 311 IMCU/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. Konsantre hale getirilen kimozin süpernatantlarının enzim aktiviteleri



Şekil 4.13. Ticari maya, 120. saat süpernatantlar ve konsantre süpernatantların SDS PAGE jel görüntüsü

M: Page Ruler Unstained Protein Ladder, 1: YAK6 glikozile kimozi erlenmayerde üretim 120. Saat süpernatantı, 2: Konsantre hale getirilmiş YAK6 kimozi süpernatantı, 3: Ticari maya, 4: YAKN1 glikozile olmayan kimozi erlenmayerde üretim 120. Saat süpernatantı , 5: Konsantre hale getirilmiş YAKN1 kimozi süpernatantı

Yapılan enzim aktivite testi sonuçları doğrultusunda ve SDS PAGE Analizi ile en iyi kimoziin enzimi üreticileri olduğunu düşünđümüz glikozile kimoziin için YAK6 klonu, glikozile olmayan kimoziin içinse YAKN1 klonları seçilmiş bu klonlar ile fermentör ölçekli üretim yapılmaya karar verilmiştir.

#### 4.2.5. Fermentörde kimoziin ekspresyonu

Seçilen glikozile kimoziin (YAK6) ve glikozile olmayn kimoziin (YAKN1) klonlarının ekspresyonu 5 L hacimli fermentörde sıcaklık ve pH koşulları daha önceden erlenmayer üretimlerinde belirlenen optimum koşullarda ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar kesikli gliiserol ve kesikli beslemeli gliiserol fazlarında 28°C; pH:5 olarak, metanol besleme fazında ise 28°C; pH:3.15 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Fermentörde kimoziin ekspresyonu

Fermentörde kimoziin ekspresyonu sonucunda glikozile ve glikozile olmayan kimoziin ekspresyonu sonucunda elde edilen veriler 4.2. ve 4.3. numaralı çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 4.2. 90 saatlik fermantasyon boyunca YAK6-PDI klonunda aktivite, yaş hücre ağırlığı ve toplam protein miktarları

Fermantasyon Süresi(Saat)	WCW-Yaş Hücre Ağırlığı (g/L)	Toplam Protein Miktarı (mg/L)	Aktivite (IMCU/mL)
0	155.4	42	28.4
7	159.3	68	36.14
11	163.9	86	44.33
20	182.9	127	51.9
32	226.8	128	59.21
42	267	162	66.91
54	315.15	189	91.37
67	360	200	128.57
81	450	210	163.63
90	520	238	214.29
<b>Ticari Maya</b>	-	291	600

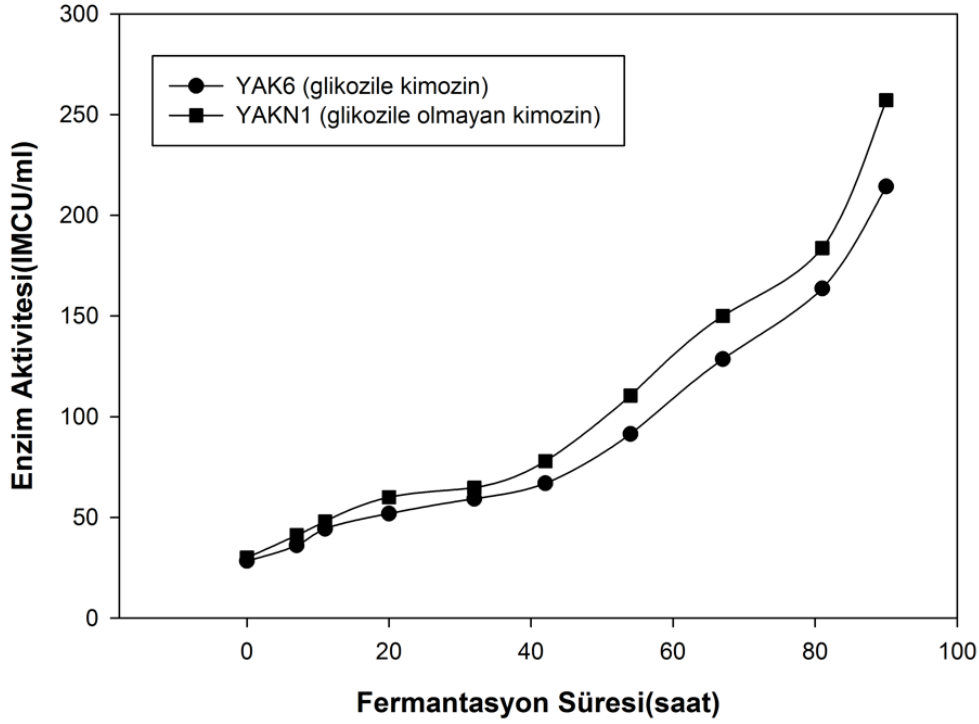
Çizelge 4.3. 90 saatlik fermantasyon boyunca YAKN1-PDI klonunda Aktivite, Yaş hücre ağırlığı ve toplam protein miktarları

Fermantasyon Süresi(Saat)	WCW-Yaş Hücre Ağırlığı (g/L)	Toplam Protein Miktarı (mg/L)	Aktivite (IMCU/mL)
0	130.85	57	30
7,5	138.41	60	41.18
11	147.05	82	48
20	202.5	112	54
32	235.8	130	61
42	283.8	173	77.92
54	375	176	110.43
67	440	216	150
81	500	242	183.7
90	560	303	257.15
<b>Ticari Maya</b>	-	304	600

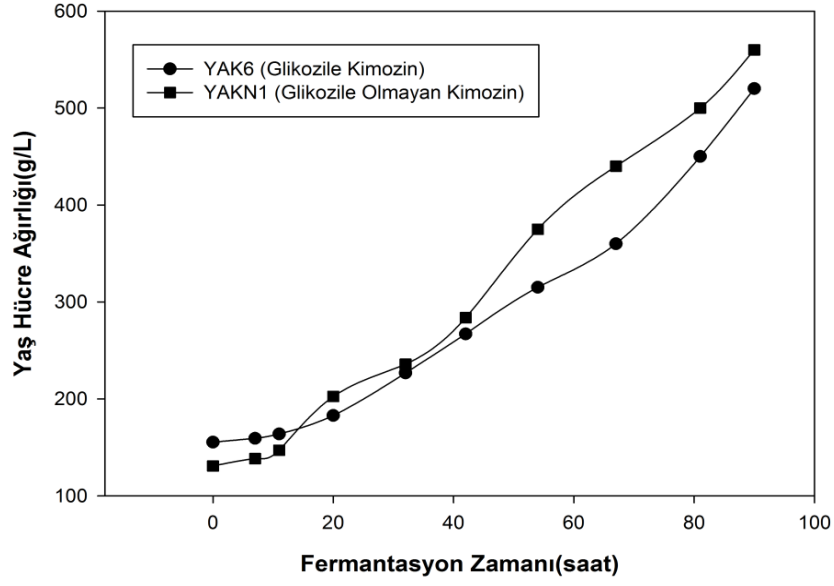
Glikozile kimoziin (YAK6-PDI) ve Glikozile olmayan kimoziin (YAKN1-PDI) klonlarının fermentörde 90 saatlik metanol beslemesi sonucu enzim aktivitesi, yaş hücre ağırlığı ve toplam protein miktarları değerleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

Glikozile kimoziin YAK6 klonu metanol besleme fazına 155.4 g/L yaş hücre ağırlığında başlarken 90. saat sonunda 520 g/L yaş hücre ağırlığına ulaşmıştır. Glikozile olmayan kimoziin YAKN1 klonu için bu değerler sırasıyla 130.85 g/L ve 560 g/L olarak

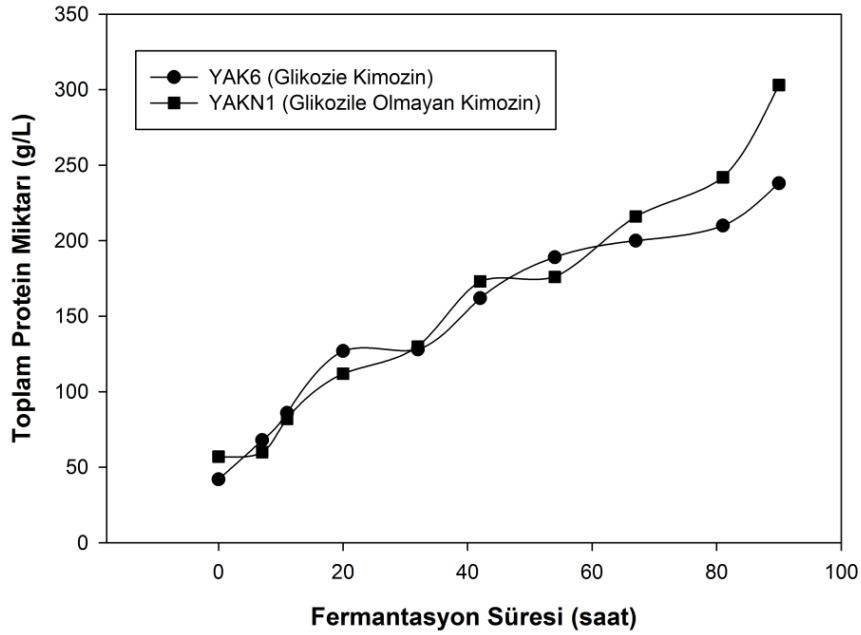
ölçülmüştür. Toplam protein miktarları da YAK6 glikozile kimozin için metanol besleme fazı başlangıcında 42 mg/L iken 90. saat sonunda 238 mg/L olmuş; bu değerler YAKN1 glikozile olmayan kimozin için sırasıyla 57 mg/L ve 303mg/L olarak ölçülmüştür. Kimozin enzim aktiviteleri de 90 saatlik metanol beslemesi sonunda YAK6 glikozile kimozin klonu için 214.29 IMCU/mL aktivitede 0.9 U/mg spesifik aktivite olarak, YAKN1 glikozile olmayan kimozin klonu için 257.15 IMCU/mL aktivitede 0.85 U/mg spesifik aktivitede bulunmuştur.



Şekil 4.15. 90 saatlik ekspresyonu boyunca glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması



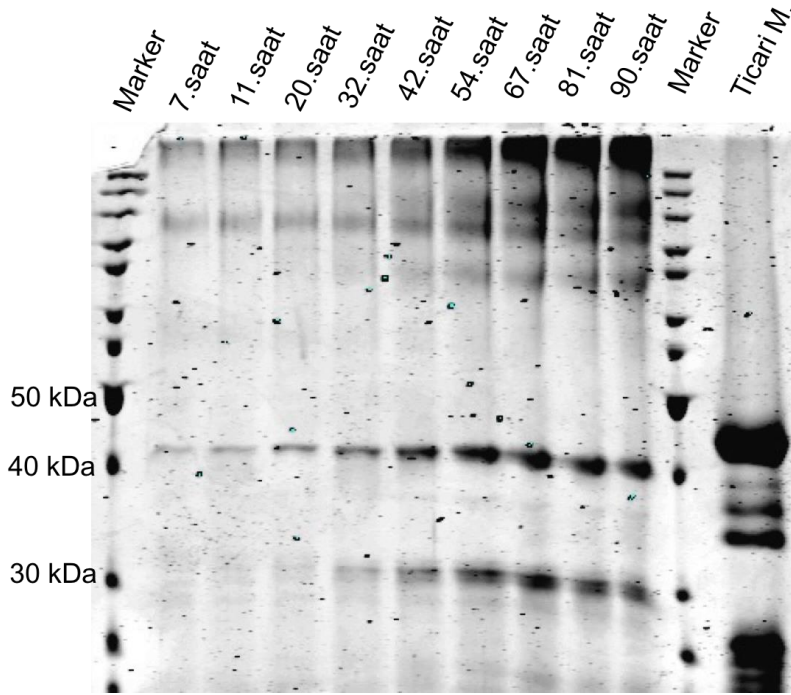
Şekil 4.16. 90 saatlik ekspresyonu boyunca glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin yaş hücre ağırlıklarının karşılaştırılması



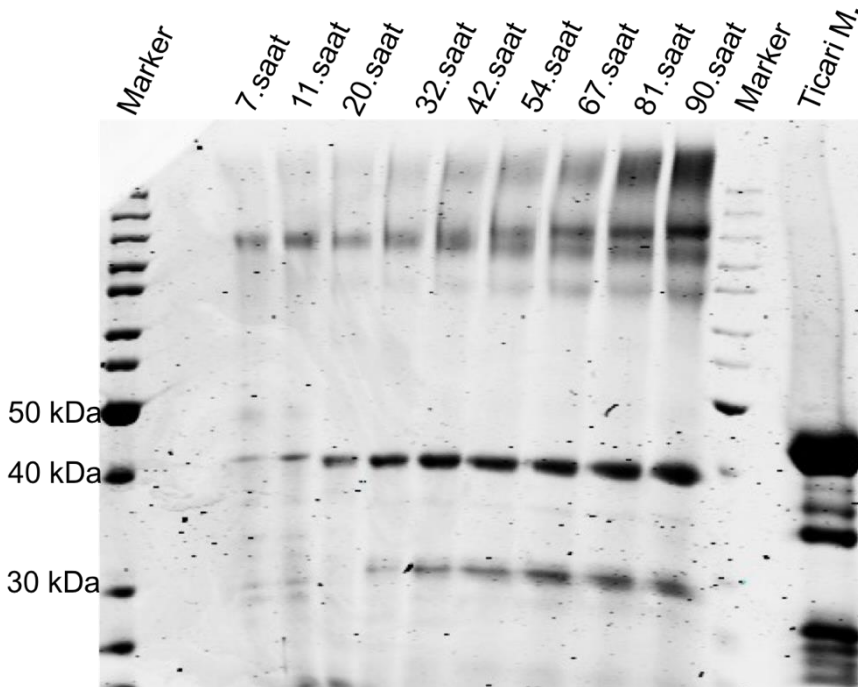
Şekil 4.17. 90 saatlik ekspresyonu boyunca glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin toplam protein miktarlarının karşılaştırılması

Grafik verileri incelendiğinde birbirlerine yakın değerlerde yaş hücre ağırlıklarına (glikozile kimozin 520 g/L; glikozile olmayan kimozin 560 g/L) sahip oldukları halde toplam protein miktarları incelendiğinde glikozile olmayan kimozinin toplam proteini glikozile kimozine göre %10 oranında daha fazladır. Bu değerler de enzim aktivitesi ile orantılıdır ki glikozile kimozinin enzim aktivitesi 214.29 IMCU/mL iken glikozile olmayan kimozinin enzim aktivitesi 257.15 IMCU/mL olarak bulunmuştur. Ancak

spesifik aktiviteleri karşılaştırıldığında glikozile kimozinin spesifik aktivitesi 0.9 iken glikozile olmayan kimozinin spesifik aktivitesi 0.85 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.18. Glikozile kimozin YAK6 klonunun fermentör üretimi boyunca SDS PAGE görüntüsü M: page ruler unstained protein ladder

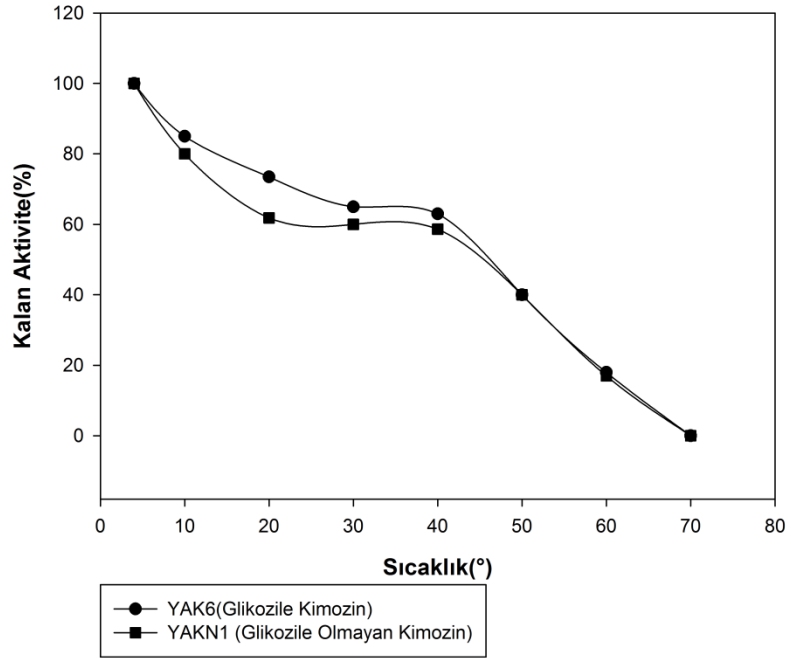


Şekil 4.19. Glikozile olmayan kimozin YAKN1 klonunun fermentör üretimi boyunca SDS PAGE görüntüsü. (M: page ruler unstained protein ladder)

Metanol beslemesi sırasında farklı saatlerde alınan süpernatant örnekleri, SDS-PAGE analizi için uygun olarak hazırlanıp -20 °C'de saklanmıştır. Fermantasyon işlemi bittiğinde bütün örnekler SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. Her iki jelde yaklaşık 42 kDa büyüklüğünde kimoziin protein bandı görülmüş ve protein bandının yoğunluğu her iki jelde de fermantasyon süresiyle orantılı olarak artmıştır. Kontrol olarak kullanılan ticari mayanın da 40 kDa hizasında yoğun bir şekilde bant vermiş olması da sonuçlarımızı doğrular niteliktedir.

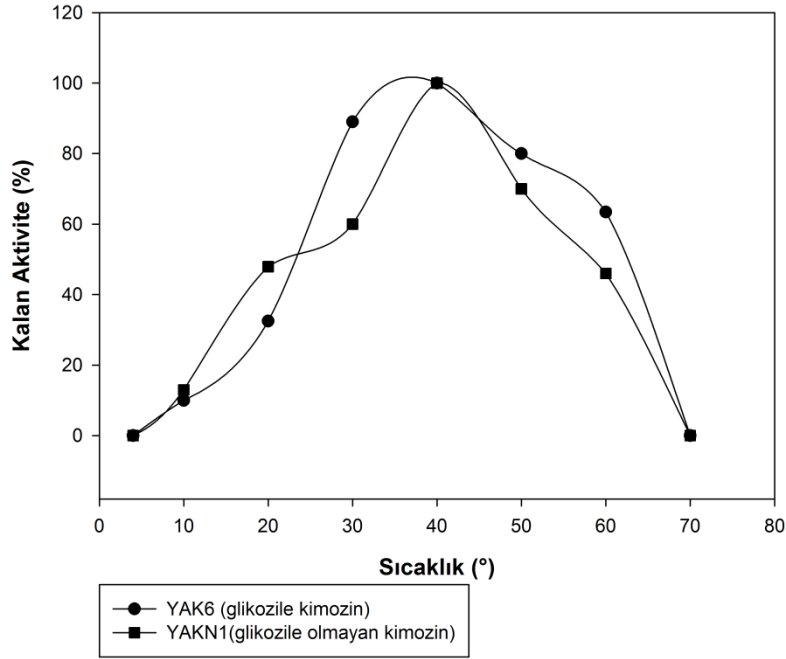
#### 4.2.6. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi

90 saatlik kimoziin ekspresyonundan sonra süpernatantlara enzimin sıcaklık ve pH karakterizasyonları yapılmıştır. Enzimin belirli sıcaklık (20-70°C) ve pH (4-7) aralıklarında stabil kalabildiği değerler ile optimum çalışma değerleri belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Glikozile ve glikozile olmayan kimoziinlerin sıcaklık stabilizasyonları grafiği

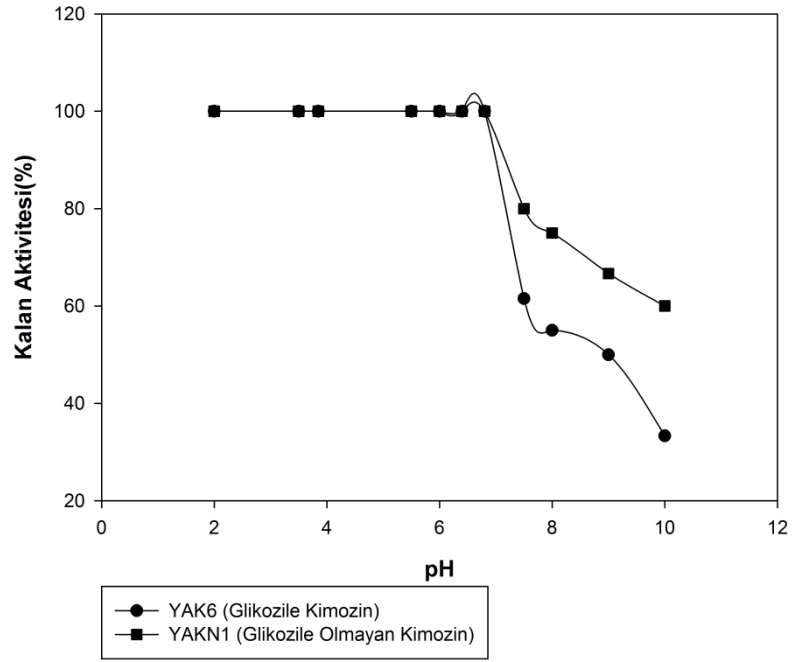




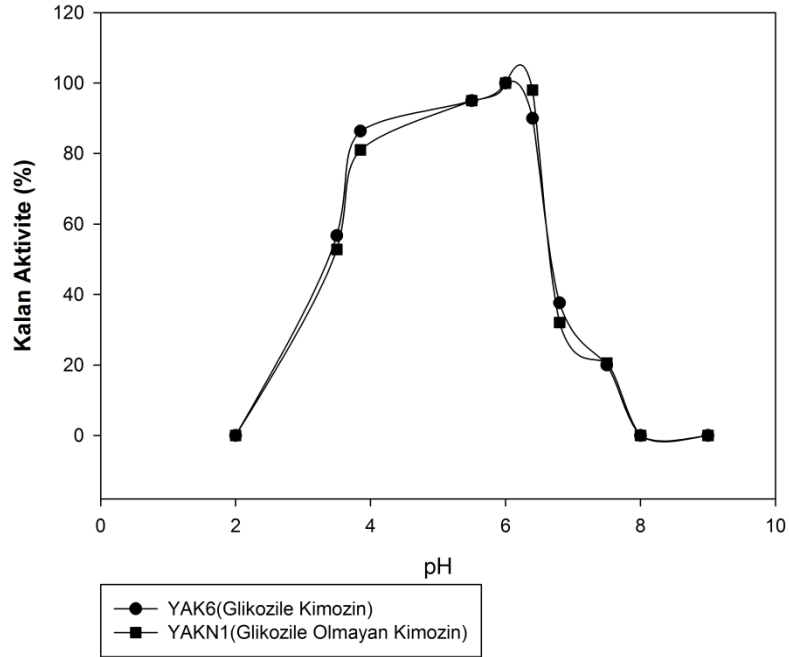
Şekil 4.21. Glikozile ve glikozile olmayan kimozinlerin optimum sıcaklıkları grafiği

Yapılan sıcaklık stabilizasyonu testi sonuçlarına göre rekombinant Tibet öküzü glikozile kimozin (YAK6) enzimi için optimum çalışma sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur ve enzim 4°C'de maksimum (%100) dayanıklılık gösterirken, bu değer 40°C'de %63 olmuş ve 70°C'de sıfıra düşmüştür.

Glikozile olmayan kimozin (YAKN1) için yapılan sıcaklık stabilizasyonu testi sonuçlarına göre ise optimum çalışma sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur ve enzim 4°C'de maksimum (%100) dayanıklılık gösterirken, bu değer 40°C'de %60 olmuş ve 70°C'de sıfıra düşmüştür.



Şekil 4.22. Glikozile ve glikozile olmayan kimoziinlerin pH stabilizasyonu grafiği



Şekil 4.23. Glikozile ve glikozile olmayan kimoziinlerin optimum pH grafiği

YAK6 glikozile kimoziin enziminin aktivite gösterdiği substrat pH değerleri şu şekilde bulunmuştur: pH 6'da bağıl aktivite %100 (optimum) iken, pH 9 ve pH 2'de 0'dır. pH dayanıklılığı testinin sonuçlarına göre ise, enzim pH 8'e kadar %100 stabil kalmış pH 10 da ise %38'lere düşmüştür.

YAKN1 glikozile olmayan kimozen enziminin aktivite gösterdiği substrat pH değerleri ise şu şekilde bulunmuştur: pH 6'da bağıl aktivite %100 (optimum) iken, pH 9 ve 2'de sıfırdır. pH dayanıklılığı testinin sonuçlarına göre ise, enzim pH 8'e kadar %100 stabil kalmış pH 10 da ise %60'lara düşmüştür.

### 4.3. Üretilen Rekombinant Kimozen ile Peynir Yapım Çalışmaları

#### 4.3.1. Peynir üretilecek olan sütün özelliklerinin belirlenmesi

Üretime alınacak sütün pH değeri 6.8 olarak ölçülmüştür. Sütün bileşimi ise Lactostar Süt anali cihazı ile ölçülerek % olarak değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.4. Peynir üretimine alınacak olan çiğ süt içeriği (%)

Bileşen Adı	Miktarı(%)
Yağ	3.68
Yağsız K.M.	8.23
Protein	3.09
Laktöz	4.50
Yoğunluk	1.0273
D. Noktası	0.498

#### 4.3.2. Üretilen kimozen enziminin peynir mayası kuvvetinin belirlenmesi

Üretilen rekombinant kimozen enziminin maya kuvvetinin belirlenebilmesi için maya kuvvet tayini yapılmıştır. Metotta 30°C' ye ısıtılmış süte maya kuvvetini belirleyebilmek amacıyla süt pıhtılaştırma testi yapılmış, erlenmayer duvarında ilk pıhtı görüldüğü zaman kaydedilerek maya kuvvetleri metotta verilen formül yardımıyla hesaplanmıştır. Kontrol olarak kullandığımız ticari mayanın maya kuvveti 1/1600 olarak tespit edilmişken rekombinant üretilen glikozile kimozenin (YAK6) maya kuvveti 1/570; glikozile olmayan kimozen (YAKN1) klonunun maya kuvveti 1/685 olarak bulunmuştur.

#### 4.3.3. Rekombinant Kimozenler ile Küçük Ölçekli Peynir Üretim Çalışmaları

Maya kuvvetleri hesaplanan rekombinant kimozenler ile ticari maya olarak kullandığımız mayadan 4800 ml sütü 1 saat içinde pıhtılaştıracak maya miktarları metotta verilen formül yardımıyla hesaplanmış ve ticari maya için 8 ml, glikozile kimozen(YAK6) için 22.4 ml, glikozile olmayan kimozen için 18.66 ml maya 4800 ml süte eklenmiştir. 1 saat 32°C de mayalama işleminden sonra pıhtı kırılmış ve cendere bezine aktarılmıştır. 2 saatlik süzme işlemi sonunda alta geçen peyni altı suyunun miktarları hesaplanmış ve ticari mayada 3600 ml, glikozile kimozeninde (YAK6) 3670 ml, glikozile olmayan kimozeninde (YAKN1) ise 3650 ml olarak bulunmuştur.



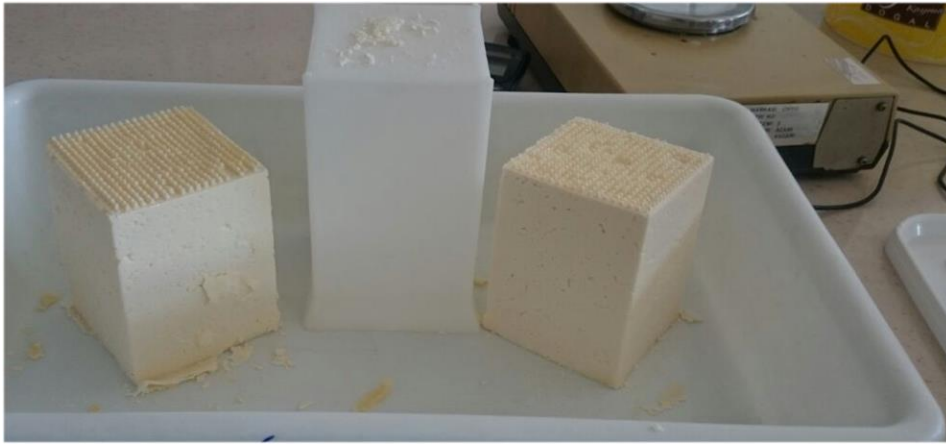
Şekil 4.24. Peynir mayaları ilavesinden sonra sütün inkübatörde mayalama işlemi



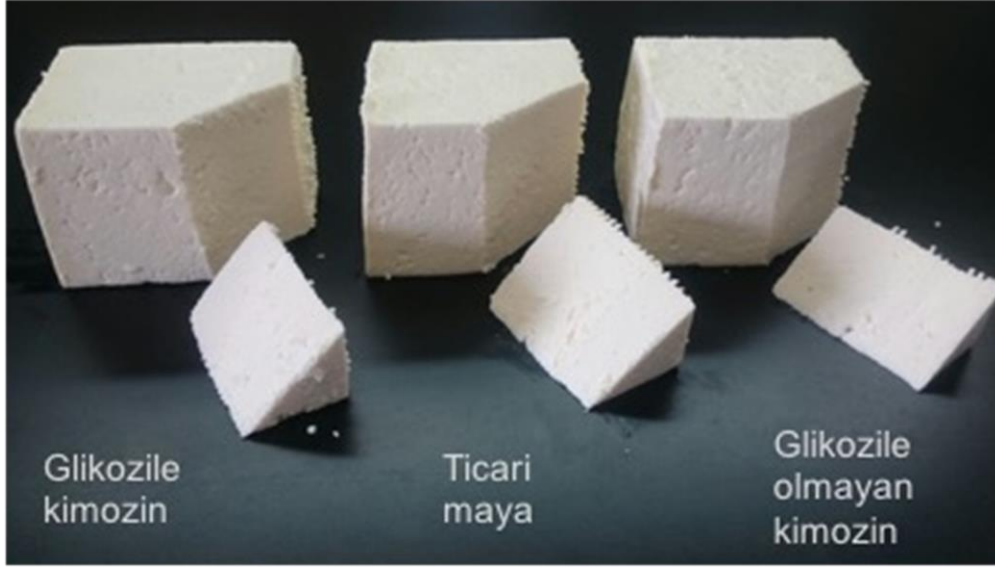
Şekil 4.25. Pıhtı kırma işleminden sonra cendere bezi yardımıyla peynir altı suyunun süzülmesi



Şekil 4.26. Süzme ve baskılama işlemi sonrası oluşan peynir pıhtısı ve kalıba alınması



Şekil 4.27. Kalıptan çıkartıldıktan sonra oluşan peynir



Şekil 4.28. Rekombinant kimoziinler ile ticari peynir mayası ile yapılan peynirler

Kalıba alınan peynirlere 15°C de 16 saat 5 kg'lık ağırlıkla baskılama yapıldıktan sonra oluşan peynir miktarı tartılmış ve verimlilikleri % olarak hesaplanmıştır. Başlangıç hacmi 4800 ml olan süttten ticari maya kullanılarak yapılan peynirde 600.5 gr peynir, Glikozile kimoziin enzim süpernatantı kullanılarak yapılan peynirde 576 gr, glikozile olmayan kimoziin enzim süpernatantı kullanılarak yapılan peynirde 614.2 gr peynir elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre verim hesaplaması yapılmış ve ticari maya verimi %12.5 olarak bulunmuşken glikozile kimoziinde %12 olarak glikozile olmayan kimoziinde %12.8 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Peynir yapım çalışmaları sonucunda ticari maya ile rekombinant üretilen kimozinlerin karşılaştırılması

<b>Örnek</b>	<b>Enzim Aktivitesi (IMCU/ml)</b>	<b>Maya Kuvveti</b>	<b>Peynir İşlenen Süt Miktarı (ml)</b>	<b>Süte Koyulan Maya Miktarı (ml)</b>	<b>Peynir Altı Suyu Miktarı (ml)</b>	<b>Oluşan Peynir (kg)</b>	<b>Verim (%)</b>
<b>Ticari Maya</b>	600	1/1600	4800	8	3600	600.5	12.5
<b>Glikozile Kimozin(YAK6)</b>	214.3	1/570	4800	22.4	3670	576.2	12
<b>Glikozile olmayan Kimozin (YAKN1)</b>	257.14	1/685	4800	18.66	3650	614.2	12.8

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma, Tibet Öküzü (*Bos Grunniens*) prokimozin enzimini kodlayan glikozile ve glikozile olmayan genleri kullanılarak *P. pastoris* rekombinant konukçu organizmasında aktif kimozin salgılanması, bu aktif kimozinin karakterizasyonunun yapılması ve rekombinant kimozin enzimi üretiminde N-Glikozilasyonun etkisinin araştırılmasını kapsamaktadır. Çalışmada Tibet öküzü kimozin genleri *P. pastoris* metilotrofik mayasında *Saccharomyces cerevisia*  $\alpha$ -mating sekresyon sinyali kullanılarak AOXI promotörü altında hücre dışına rekombinant aktif kimozin üretimi gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda çalışmanın ikinci yönü de rekombinant kimozin üretimine ilaveten N-glikozilasyonun rekombinant tibet öküzü kimozin enzimi üretimine, aktivitesine ve verimliliğine etkisini incelemektedir.

Kimozin geni 1110 bç uzunluğunda olup kodladığı kimozin enzimi (323 amino asit, 35.6 kDa) mide mukoza hücreleri tarafından prokimozin (365 amino asit, 40.8kDa) olarak sentezlenir. Daha sonra bu molekül midedeki asidik pH şartlarında aktif kimozine dönüşmekte ve proteinin ifadesi düzenlenmektedir (Attallah vd 2007). Daha önceki yapılan çalışmalarda kimozinin sadece prokimozin formunda hücre dışına aktif kimozin olarak salgılanabildiği bilinmektedir (Vallejo vd 2008). Çalışmamızda da bu sebeple Tibet öküzü kimozin enziminin prokimozin formu ile gerçekleştirilmiştir.

Bugüne kadar keçi, deve, manda, bovin, kimozinlerinin rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiş olup çalışmamızda kullanılan Tibet öküzü (YAK) kimozini üretimine dair herhangi bir literatür çalışmasına rastlanılmamıştır. Yine aynı şekilde rekombinant kimozin üretimi için *Escherichia coli* (Mohanty vd 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Goff vd 1984), *Kluyveromyces lactis* (Van den Berg vd 1990), *Aspergillus niger* (Kappeler vd 2006) ve *Pichia pastoris* (Wang vd 2015) gibi çeşitli mikroorganizma üretim sistemleri kullanılmış fakat *P. pastoris* GS115 (PDI) suşunda gerçekleşen herhangi bir rekombinant Tibet öküzü (YAK) kimozin üretimi görülmemiştir. Ayrıca bu çalışmada kimozin enzimi üretiminde aminoasit dizisinde meydana gelen glikozilasyon bölgelerinin kaldırılarak glikozile olmayan tibet öküzü kimozin aminoasit dizisi elde edilmiş ve glikozile olmayan kimozinin de *P. pastoris* GS115 (PDI) suşunda ekspresyonu yapılmıştır. Böylelikle glikozile olan ve olmayan kimozin enzimlerinin aynı şartlarda üretimleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan üretim ve testler sonucunda rekombinant kimozin üretiminde meydana gelen glikozilasyonun enzim üretimi ve aktivitesine etkisinin araştırılmış olması da bu çalışmanın özgünlüğünü oluşturmaktadır.

Rekombinant Tibet öküzü kimozini üretilmesi amacıyla glikozile (YAK) ve glikozile olmayan (YAKN1) kimozin genleri *Saccharomyces cerevisia*  $\alpha$ -mating sekresyon sinyali kullanılarak hücre dışında aktif kimozin olarak üretilmiştir. Prokimozin olarak sentezlenen enzim mide asidik şartlarındaki gibi pH:3 BMMY besiyerinde üretilerek aktif kimozine dönüşmekte ve bu şekilde gen ifadesi de düzenlenmiş olmaktadır. Bu sonucu da Vallejo vd. (2008) çalışması destekler niteliktedir. Vallejo vd (2008), yaptıkları çalışmada Bufalo preprokimozin, prokimozin ve kimozin DNA sekanslarının *P. pastoris* konukçusunda üretimlerini gerçekleştirilmiştir ancak sadece prokimozin sekansını içeren klonların kültür süpernatantına aktif kimozin salgılayabildikleri sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışma da



tezimizi destekler nitelikte olup sebebinin izole kimozinlerde de olduğu gibi kimozinin mide asidik şartlarda (pH:3) aktifleşerek etkinliğini sağlayabildiği bu yüzden de asit proteaz olarak tanımlandığı (Akın 1996) düşünülmektedir. Ayrıca Emtage vd (1983) yaptıkları çalışmada *E.coli* konukçusunda kimozin üretimini prokimozin formunda gerçekleştirmişlerdir.

*E. coli*, *S. cerevisiae*, *K. lactis* ve *A. niger* gibi çok sayıda rekombinant protein üretim konukçusu olmasına rağmen *P. pastoris* metilotrofik mayasında rekombinant birçok proteinin üretiminin gerçekleşmiş olmasının sebebi ise *P. pastoris* konukçusunun postraslasyonel modifikasyonlara elverişli olması ve fermentör ortamında verimli sonuçlar elde edilmesidir.

Çalışmamızın klon seçimi amacıyla gerçekleştirilen erlenmayer üretimleri sırasında seçilen klonlardan glikozile kimozin için YAK6 ve glikozile olmayan kimozin için YAKN1 klonlarının 120 saatlik erlenmayer üretimi sonucunda enzimatik aktiviteleri sırasıyla 56 IMCU/mL ve 61 IMCU/mL olarak bulunmuş ve 30 kDa luk hızlı konsantrasyon kolonları ile süpernatantlar 5 kat konsantre edilmiştir. Konsantrasyon sonucunda enzimatik aktiviteleri sırasıyla 286 IMCU/ml ve 311 IMCU/ml olarak bulunmuştur. Yani 5 kat konsantre edilen süpernatantlarda ortalama 5 kat enzim aktivite verimi artışı gözlemlenmiştir. Nosedá vd (2013) tarafından sığır kimozinini üretimi üzerine fermentör ölçekli yapılan çalışmada 120 saatlik induksiyon sonucu hücre kültür süpernatantındaki aktivite 96 IMCU/ml olarak bulunmuşken aynı süpernatant önce 0.22µm lik filtrelerden geçirilmiş sonra 3 ve 30 kDa hızlı filtrasyon yapılmış ve son aktivitesi 384 IMCU/ml olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda gerçekleştirilen 5 kat konsantrasyonda ortalama 5 kat verim artışı gözlemlenmişken (Şekil 4.12.); Nosedá vd. (2013) çalışmasında da verim artışı ortalama 4 kat düzeyinde gerçekleşmiştir.

Nosedá vd (2013), yaptıkları çalışmada kodon optimizasyonu yapılmış sığira ait prokimozin B geninin alkol oksidaz 1 promotörü (AOX1) kontrolünde *P. pastoris* GS115 suşunda ekspresyonu gerçekleştirilmişlerdir. Biyoreaktörde optimize edilen şartlarda gerçekleştirilen üretim sonunda biyokütle seviyesi 240 g/L kuru hücre ağırlığına ulaşmış ve süt pıhtılaştırma aktivitesi 96 IMCU/mL olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda 90 saatlik fermentör üretiminde glikozile kimozin için 214.3 IMCU/mL olarak, glikozile olmayan kimozin için 257.14 IMCU/mL aktifliğindeki rekombinant kimozin üretimi gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2. ve 4.3.). Üretimler sonucunda glikozile olan kimozin ile glikozile olmayan kimozin enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında glikozilasyon bölgelerinin uzaklaştırılmasıyla enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik olmadığı sonucuna varılmıştır.

Wang vd (2015) tarafından yapılan diğer bir çalışmaya göre *P. pastoris* mayasında deve kimozinini laboratuvar şartlarında 37mg/L olarak üretilmiştir. 144 saatlik metanol beslemesi sonucunda 270 g/L yaş hücre ağırlığına ulaşmışlardır. Bu çalışmada ise 90 saatlik metanol beslemesi sonucu yaş hücre ağırlığı glikozile kimozin için 520 g/L; glikozile olmayan kimozin için ise 560 g/L olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2. ve 4.3.). Diğer çalışmaya göre neredeyse arada iki kat fark bulunmasının nedeni

fermantasyon şartlarının iyi optimize edildiğine ve *P. pastoris* hücrelerinin adaptasyonunun iyi olduğuna yorumlanabilir.

Bradford protein assay kit protokolüne göre hazırlanan farklı konsantrasyonlarda Bovine Serum Albumin (BSA) standardına göre yapılan toplam protein hesaplamalarında 90 saatlik fermentasyon sonucunda toplam protein miktarları glikozile kimozi için 238 mg/L ve glikozile olmayan kimozi için 302 mg/L olarak bulunmuştur. Wang vd (2015) ise yaptıkları çalışmada rekombinant deve kimozi için 144 saatlik fermentasyon sonucunda 5 litrelik reaktörde 300 mg/L ürün elde etmişlerdir. Çalışmamızda fermentasyon süresinin diğer çalışmadakine göre daha kısa olmasına rağmen yaklaşık aynı miktarda toplam protein üretilmesini fermentasyon verimliliğimizin daha iyi olmasıyla ilişkilendirebiliriz. Bu çıkarım üretim sonucu ulaşılan yaş hücre ağırlıkları karşılaştırıldığında da desteklenmektedir. Deve kimozi için çalışmada 270g/L yaş hücre ağırlığına ulaşılmışken çalışmamızda glikozile ve glikozile olmayan kimozi için yaş hücre ağırlıkları 520 ve 560 g/L olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2 ve 4.3.).

Şekil 4.18. ve 4.19' da görüldüğü gibi fermentör üretimleri sonucunda SDS PAGE analizinde yaklaşık 42 kDa ve 30 kDa büyüklüğünde kimozi bantları görülmekte olup hem glikozile hem glikozile olmayan kimozi için durum değişmemektedir. Kumar vd (2006) yaptıkları çalışmada oğlak kimozi için mono Q kolonu ile saflaştırma sonucu tek bant olarak 36 kDa büyüklüğünde kimozi bantı bulmuşlardır. Attalah vd (2007) çalışmalarında farklı kaynaklardan izole edilen kimozi enziminin protein büyüklüğünü incelemişlerdir. Buffalo ve inek kimozi için 40kDa büyüklüğünde; domuz ve deve kimozi için de sırasıyla 43 kDa ve 30 kDa büyüklükte bulmuşlardır. Fermentasyon sonucu üretilen kimozi incelenildiğinde Kappeler vd. (2006) deve kimozi için büyüklüğünü tek bant olarak 40 kDa büyüklüğünde bulmuşlardır, Vallejo vd (2008) yaptıkları çalışmada bovin kimozi için 2 bant olarak 36 ve 40 kDa moleküler büyüklükte bulmuşlardır. Beldarrain vd (2000) yaptıkları çalışmada *Mucor pusillus* türevli kimozi için büyüklüğünü 44 kDa olarak bulmuşlardır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde kimozi için moleküler büyüklüğünün 25-50 kDa arasında değişmekte olduğu sonucuna varılmıştır, iki veya tek bant olarak belirginleşmesi ve büyüklüğünün farklı olma sebebi de kimozi kaynaklarının birbirine özgü karakteristik özelliklerine bağlanmaktadır.

Glikozile kimozi için optimum pH şartlarını belirlemeye yönelik çalışmalar incelendiğinde Wang vd,(2015) yaptıkları çalışmada deve kimozi için optimum çalışma pH değerini 5 olarak belirlemişlerdir. Deve kimozi üzerine yapılmış diğer çalışmalar incelendiğinde Kappeler vd, (2006) optimum pH'sını 6 bulmuşken Nosedo vd (2013) bu değeri 5.5 bulmuşlardır. Rogelj vd (2001) yaptıkları çalışmada inek kimozi için optimum pH değerini 6.5 olarak, kuzu ve buzağı kimozi için optimum pH değerini 6.8 olarak bulmuşlardır. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında mikroorganizma türevli kimozi için optimum pH değerleri *Rhizomucor miehei* için 6.8 (Rogelj vd 2001), *Penicillium oxalicum* için pH 5 (Hashem 2000) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda ise Tibet öküzü kimozi enziminin hem glikozile hem glikozile olmayan formu için optimum çalışma pH değerini 6.4 olarak bulunmuştur (Şekil 4.22 ve 4.23). Aynı enzim için bu kadar değişen optimum pH aralıkları da enzim kaynağının farklı olması olarak yorumlanabilir.

Enzimin çalışması için gerekli şartlar incelendiğinde diğer önemli bir faktörün de sıcaklık olduğu bilinmektedir. Kimozin enzimi için yapılan çalışmalar incelendiğinde optimum sıcaklık değeri deve kimozi için Wang vd (2015) tarafından 45-55°C olarak bulunmuştur. Yine Elegamy vd (2000) tarafından yapılan çalışmalara göre optimum sıcaklık deve kimozi için 50°C olarak; bufalo kimozi için 45°C olarak bulunmuştur. Oğlak kimozi için Kumar vd. (2000) optimum çalışma sıcaklığını 65°C olarak bulmuşken Moschopoulou vd. (2006) bu değeri 46°C olarak bulmuştur. Buzağı kimozi için Rogelj vd. (2001) optimum çalışma sıcaklığını 40°C olarak bulmuştur. Vallejo vd. (2008) ise yaptıkları çalışmada bovine kimozi için optimum çalışma sıcaklığını 37°C olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ise tibet öküzü kimozi enziminin hem glikozile hem glikozile olmayan formu için optimum çalışma sıcaklık değeri 40°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.20 ve 4.21). Aynı enzim için bu kadar değişen optimum sıcaklık aralıkları da enzim kaynağının farklı olması olarak yorumlanabilir.

Üretilen rekombinant kimozi ile peynir yapım çalışmaları gerçekleştirilmiş olup İstanbul Ticaret Odası Eğitim Semineri (2005) verileri incelendiğinde 120 kg inek sütünden 20 kg beyaz peynir elde edilmiştir. Harun Kesenkaşın doktora tezi incelendiğinde (Ege Üniversitesi) farklı tiplerde beyaz peynir üretiminde yaklaşık %12 kurumadeli süttten yaptığı randımanları %15-17 arasında bulmuştur. Üçüncü (2004) yaptığı çalışmada randımanı %14-15 civarında bulmuştur.

Çalışmamızda kontrol olarak kullanılan ticari mayada verim %12,5 olarak bulunmuşken glikozile kimozi %12 olarak glikozile olmayan kimozi ise %12,8 olarak bulunmuştur bulunmuştur. Üretimler arasında verim olarak farklılık olma sebepleri de süttün kurumadde ve yağ gibi peynir verimini etkileyen faktörlerin oranlarının birbirinden farklı olmasından, süttün elde edilmiş mevsiminin farklı olmasından ve üretim şartlarının değişkenliğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ

Bu çalışma Tibet öküzü kimozen enzimi geninin rekombinant klonlama teknikleri kullanılarak *P.pastoris* konukçusunda ekspresyonu ve glikozilasyonun rekombinant kimozen üretimine etkisini kapsamaktadır. Tibet öküzü prokimozen genini taşıyan rekombinant vektör oluşturulmuş, *P. pastoris* mayasında AOX1 promotörü altında  $\alpha$ -MF sinyal sekansı ile hücre dışında üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın iki temel amacı vardır. İlki kimozen enzimini rekombinant olarak üretmek ikincisi enzim üretimine, aktivitesine glikozilasyonun etkisini incelemektir. Enzimin rekombinant olarak üretilmesi amacıyla Tibet öküzü kimozen enzimini kodlayan genler (glikozile ve glikozile olmayan formları) klonlama teknikleri ile *P. pastoris* mayasına klonlanmıştır. Klonlama sonucunda üretimlerin en iyi olduğu klonları bulabilmek amacıyla erlenmeyerde klon tarama üretimleri gerçekleştirilmiş ardından seçilen klonlar ile fermentör ölçekli üretim devam ettirilmiştir. Fermentasyon sonucu elde edilen süpernatanın kısmi karakterizasyonu (sıcaklık ve pH karakterizasyonu) yapılmıştır. Süpernatanın SDS-PAGE analizinde hem glikozile hem glikozile olmayan kimozen enzime ait protein bantları 40 kDa büyüklüğünde olarak bulunmuştur. Fermentasyon koşullarında gerçekleştirilen 90 saatlik kimozen ekspresyonu sonucunda ulaşılan protein miktarı glikozile kimozen için 238 mg/L iken glikozile olmayan kimozen için 303mg/L. Fermentörde üretilen rekombinant kimozenin aktivitesi ekspresyon süresi boyunca artmıştır. 90 saat boyunca yapılan rekombinant Tibet öküzü kimozenini üretimi sonunda, enzimin sütü pıhtılaştırma gücü glikozile kimozen için 214 IMCU/ml iken glikozile olmayan kimozen için 257 IMCU/ml olarak hesaplanmıştır. Glikozilasyonun rekombinant kimozen üretimine etkisine bakıldığında glikozilasyon bölgelerinin uzaklaştırılması enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik olmadığı sonucuna varılmıştır.

Rekombinant Tibet öküzü kimozeninin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 40°C optimum pH 6.4'tür. Maksimum (%100) stabil kalabildiği sıcaklık 4°C iken 70°C'de stabilitesini tamamen kaybetmiştir. pH 2-7.5 arasında stabil kalmış, pH 9.0' da stabilitesi tamamen kaybetmiştir.

Fermentör üretimleri sonucunda kimozen süpernatantları ile küçük ölçekli peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim verimleri, maya kuvveti bilinen ticari bir maya ile karşılaştırılmış ve ticari mayanın verimi %12.5 iken glikozile kimozenin verimi %12, glikozile olmayan kimozenin verimi %12.8 olarak bulunmuştur.

Çalışma sonucunda kimozen enziminin üretiminde glikozilasyonun önemli oranda etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak bu çalışmada üretilen enzim saflaştırılmadan hücre süpernatantı olarak kullanılmış ve peynir yapım çalışmalarında sadece verim açısından incelenmiştir. Bu çalışmanın devamı niteliğinde yapılabilecek olan çalışmalarda hücre süpernatantları saflaştırılarak enzim daha etkin hale getirilebilir. İlaveten de peynir yapım çalışmaları sadece verim incelemesi aşamasında bırakılmayarak üretilen peynirin karakteristik özellikleri ve depolama süreci de test edilerek izole kimozen enzimleri ile üretilen rekombinant kimozen enzimleri arası farklılıklar incelenebilir.

Bu tez çalışmasının bilim dünyasına yaptığı katkı ise Tibet öküzü kimozin enziminin rekombinant olarak üretilmesinin yanında glikozilasyonun etkisinin araştırılması da çalışmanın diğer bir özgünlüğünü oluşturmaktadır.

Türkiye açısından katkılarına bakılacak olursa bilimsel olarak oldukça eksik kaldığımız rekombinant DNA teknolojisi alanındaki tekniklere katkısı olacağı düşünülmektedir. Endüstriyel boyutta katkılarına bakılacak olursa üretilen kimozin enzimi yapılabilecek olan daha ileriki projelerin de desteğiyle yerli bir kimozin enzimi kaynağı elde edilebileceği ve ülkemizin bu bağlamda dışa bağımlılığının azaltılabileceği düşünülmektedir.

**7. KAYNAKLAR**

- AGEITOS, J.M., VALLEJO, J.A., SESTELO, A.B.F., POZA, M., VILLA, T.G. 2007. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain. USC13. J Appl Microbiol, 103, 2205–2213.
- AHN, J., HONG, J., LEE, H., PARK, M., LEE, E., KIM, C. 2007. Translation elongation factor 1-alpha gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter *Appl Microbiol Biotechnol*, 74(3),601-8.
- AKIN, N. 1996. Peynir yapımında kullanılan süt pıhtılaştırıcı enzimler ve bunların bazı özellikleri. GIDA. 21(6):435-442.
- ANONİM.2011.<http://www.biokimkimya.com/content.asp?id=14&v=c&d=p&pid=1085&l=tr>
- ATTALLAH, A.G 2007. Characters of chymosin gene isolated from different animal sources at molecular level. J. Appl. Sci. Res. 3, 904–907.
- AYPAK, S., UYSAL, H., 2010. Glikoproteinlerin Yapısı ve Fonksiyonları. F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.,24, 107 – 114.
- BANSAL, N., DRAKE, M. A., PIRAİNO, P., BROE, M. L., HARBOE, M., FOX, P. F. 2009. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for cheddar cheese. International Dairy Journal, 19, 510-517.
- BELDARRAİN, A., ACOSTA, N., MONTESINOS, R., MATA, M., CREMATA, J. 2000. Characterization of Mucor Pusillus rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. Biotechnol Appl Biochem, 31,77–84.
- BÖRKLÜ BUDAK, T. ve AFŞAR, H. 2011. Rennin aktivitesinin tayini için yeni bir metot geliştirilmesi. Sigma, 29. 35-42.
- CARDOZA, RE, GUTIERREZ, S, ORTEGA, N, COLINA, A, CASQUEIRO, J, MARTÍN, JF. 2003. Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. Biotechnol Bioeng 83: 249–259.
- CEREGHİNO, G.P.L., CEREGHİNO, J.L., ILGEN, C., CREGG,J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr. Opin. Biotechnol., 13, 329–332.
- CREGG, J.M., MADDEN, K.R. 1988. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. J. Ind. Microbiol., 29, 33–41.

- CREGG, J.M., CEREGHINO, J.L., SHI J., HIGGINS, D.R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 16,23–52.
- CREGG, J.M., TOLSTORUKOV, I., KUSARI, A., SUNGA, J., MADDEN, K., CHAPPELL, T. 2009. Expression in the yeast *Pichia Pastoris*. *Methods Enzymol.*, 463,169–189.
- CIOFALO, V., BARTON, N., KREPS, J., COATS, I., SHANAHAN, D. 2006. Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. *Regul Toxicol Pharm*, 45,1–8.
- EMTAGE, J.S., ANGAL, S., DOEL, M.T., HARRIS, T.J., JENKINS, B., LILLEY, G., LOWE, P.A. 1983. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3671–3675.
- FOLTMANN, B. 1970. *Methods Enzymol.* 19, 421–436.
- FOX, P.F., MCSWEENEY, P.L.H., 1997. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. Law, B.A. (Ed.), *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, second ed. Blackie Academic and Professional, London, UK, 1–49.
- HARKKI,A., UUSITALO, J., BAILEY, M., PENTILÄ,M., KNOWLES, J.K.C. 1989. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology*,7, 596–603.
- HONG, F., MEINANDER, N.Q., JONSSON, L.J. 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, 79, 438–449.
- DERVİŞOĞLU, M., AYDEMİR, O. VE YAZICI, F., 2007. Peynir yapımında kullanılan pıhtılaştırıcı enzimler ve kazein fraksiyonları üzerine etkileri. *Gıda*, 32(5), 241-249.
- GOFF, C.G., MOIR, D.T., KOHNO, T., GRAVIUS, T.C., SMITH, R.A., YAMASAKI, E., TAUNTON-RIGBY, A., 1984. Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 27, 35–46.
- GONZÁLEZ, M, BRITO, N, GONZÁLEZ, C. 2012. High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the secretory proteins coded by eight fungal genomes. *BMC Microbiol.* 12, 213.
- INAN, M. ARYASOMAYAJULA, D. SINHA, J. 2005. Enhancement of Protein Secretion in *Pichia pastoris* by Overexpression of Protein Disulfide Isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 93. no. 4.

- KAPPELER, S. R., VAN DEN BRÏNK, H. J., RAHBK-NIELSEN, H., FARAH, Z., PUHAN, Z., HANSEN, E. B. & OHANSEN, E. 2006. Biochem. Biophys. Res. Commun., 342, 647–654.
- KESENKAŞ, H. 2005. Beyaz peynir üretiminde bazı mayaların starter kültür olarak kullanım olanaklarının araştırılması. Doktora tezi. Ege Üniversitesi. İZMİR. 187 s.
- KUMAR, A., SHARMA, J., ASHOK KUMAR MOHANTY, GROVER S., VIRENDER KUMAR BATISH 2006. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 145,108–113.
- KUMAR, A., GROVER, S., SHARMA, J., BATISH, V.K. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. Crit. Rev. Biotechnol., 30, 243–258.
- LAUKENS, B., VISSCHER, C.D., CALLEWAERT, N. 2015. Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now?. *Future Microbiol.* 10(1), 21–34
- MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B., HARVEY, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249–270.
- MCCMAHON, D.J., BROWN, R.J., ERNSTROM, C.A. 1984. Enzymic coagulation of milk casein micelles: a review. *J Dairy Sci*, 67, 745–748.
- MOHANTY, A.K., MUKHOPADHYAY, U.K., GROVER, S., BATISH, V.K. 1999. Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.*, 17, 205–217.
- MOHANTY, A.K., MUKHOPADHYAY, U.K., KAUSHIK, J.K., GROVER, S., BATISH V.K., 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Dairy Res.*, 70, 37–43
- MOYNIHAN, A.C., GOVINDASAMY-LUCEY, S., JAEGGI, J.J., JOHNSON, M.E., LUCEY, J.A., MCSWEENEY, P.L.H. 2013. Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J Dairy Sci.*, 97, 85–96.
- MOSCHOPOULOU, EE., KANDARAKIS, IG., ALICHANIDIS, E., ANIFANTAKIS, EM. 2006. Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *J Dairy Res* 73: 49–57.
- NISHIMORI K., KAWAGUCHI Y., HIDAKA M., UOZUMI T., BEPPU T. 1982. Expression of cloned calf prochymosin gene sequence in *Escherichia coli*. *Gene* 19: 337–344.



- NISHIMORI, K., SHIMIZU, N., KAWAGUCHI, Y., HIDAKA, M., UOZUMI, T., BEPPU, T. 1984. Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryp- tophan promoter. *Gene* 29: 41–49.
- NOSEDA, D.G., RECUPERO, M.N., BLASCO, M., ORTÍZ, G.E. 2013. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter. [Protein Expression and Purification](#), 92, 235–244
- NOUANI, A., DAKO, E., MORSLI, A., BELHAMICHE, N., BELBRAOUE, S., BELLAL, M.M., DADÏE, A. 2009. Characterization of the purified coagulant extracted derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J Food Technol.*, 7,20–29.
- JENSEN, J. L., MOLGAARD, A., POULSEN, J. C. N., HARBOE, M. K., SIMONSEN, J. B., LORENTZEN, A. M., 2013. Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 69, 901-913.
- JIANG, X.-P., YIN, M.-L., CHEN, P., YANG, Q., 2012. Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 2087–2093.
- PARENTE, D, DE FERRA F, GALLI, G., GRANDI, G., 1991. Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 61: 243–249.
- POZA M., PRIETO-ALCEDO M., SIEIRO C., VILLA T.G. 2004. Cloning and expression of clt genes encoding milk-clotting proteases from *Myxococcus xanthus* 422. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70,6337–6341.
- PUHAN, Z. 1969. Protease composition of a rennet substitute from *Bacillus subtilis* and properties of its component proteases. *J Dairy Sci.*, 52,1372–1378.
- RICHTER, S., NIEVELER, J., SCHULZE, H., BACHMANN, T.T., SCHMID, R.D. 2006. High yield production of a mutant *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* and its purification. *Biotechnol. Bioeng.*, 93, 1017–1022.
- ROGELJ, I., PERKO, B., FRANCKY, A., PENCA, V., PUNGERCAR, J., 2001. Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *J Dairy Sci* 84: 1020–1026.
- SAEEDÏNIA, A., SHAMSARA, M., BAHRAMI, A., ZEÏNODDINI, M., NASEERIKHALILI, M.A., MOHAMMADI R. 2008. Heterologous expression of human granulocyte-colony stimulating factor in *Pichia Pastoris*. *Biotechnol J.* 7(3),569-73.

- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. 2001. Molecular Cloning. 2344 s.
- SKOKO, N., ARGAMANTE, B., GRUJICIC, N.K., TISMINETZKY, S.G., GLISIN V., LJUBIJANKIC, G. 2003. Expression and characterization of human interferon-beta1 in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. Biotechnol Appl Biochem., 38(Pt 3),257-65.
- SMITH, R.A., DUNCAN, M.J., MOIR, D.T. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. Science, 229, 1219–1224.
- TSUCHIYA, K., GOMI, K., KITAMOTO, K., KUMAGAI, C., TAMURA, G., 1993. Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Appl Microbiol Biotechnol 40: 327–332.
- WANG, N., WANG, K.Y., LI, G.Q., GUO, W.F., LIU, D.H. 2015. Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia Pastoris*. Protein Expression and Purification, 111, 75–81.
- WU, S. and LETCHWORTH, G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. Biotechniques. 36(1):152-4.
- VAN DEN BERG, J.A., VAN DER LAKEN, K.J., VAN Ooyen, A.J., RENNIERS, T.C., RIETVELD, K., SCHAAP, A., BRAKE, A.J., BISHOP, R.J., SCHULTZ, K., MOYER, D. 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. Biotechnology (NY), 8,135–139.
- VALLEJO J.A., AGEITOS, J.M., POZA, M., VILLA, T.G. 2008. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. J Agric Food Chem., 56,10606–10610.
- VALLEJO, J.A., AGEITOS, J.M., POZA, M., VILLA, T.G. 2012. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. J. Dairy Sci. 95:609–613
- VEGA-HERNANDEZ, M. C., GOMEZ-COELLO, A., VILLAR, J., CLAVERIE-MARTIN, F. 2004. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *J. Biotechnol*, 114, 69–79.
- ÜÇÜNCÜ, M. 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi (Cilt 1). Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova/İzmir.
- YAVUZ, Ö. 2001. Glikoproteinler ve Biyomedikal önemi. T Klin Tıp Bilimleri, 21,517-522.
- ZHANG, Y, WEI Z., LIU,N, YANG, K. 1991. Expression of calf prochymosin gene in *Escherichia coli*. Chin J Biotechnol 7: 169–175.

ZHANG, L., JIANG, Y, ZHANG, J, YANG, Z. 2009. Recombinant expression of bovine chymosin in *Pichia pastoris*. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 25: 1160–1165.

## 8. EKLER

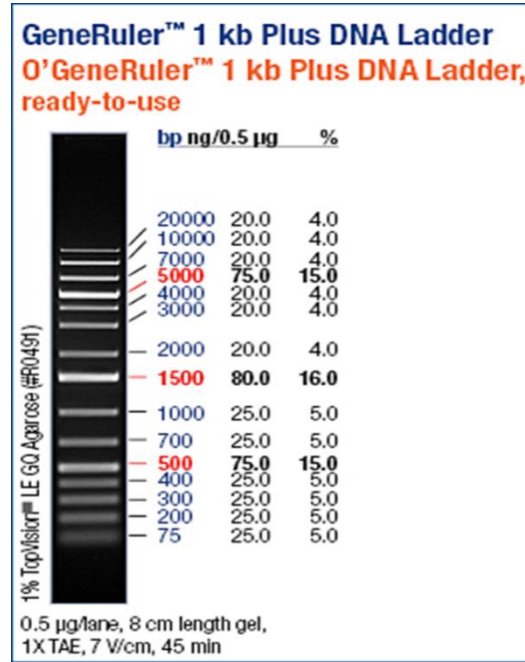
## Ek-1. Kodon optimizasyonu yapılmış YAK kimozin geni sekansı

```

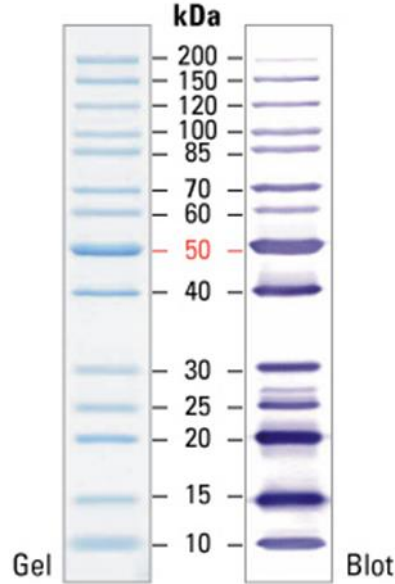
1 .....GAATTCGCAGAAATCACC
1 ATGAGGTGTCFCGTGGTGTACTTGTGTCTTCGCTCTCCAGGGCGCTGAGATCACC
19 AGAATCCCATTTGTATAAGGGTAAATCACTTAGAAAGGCATTGAAGGAGCACGGTTTGTG
61 AGGATCCCTCTGTACAAGGCAAGTCTCTGAGGAAGCGCTGAAGGAGCATGGGCTTCG
79 GAAGACTTTTGCAGAAGCAACAGTATGGTATTCTTCCAATACTCTGGTTTGGAGAA
121 GAGGACTTCTGCAGAACAGCAGTATGGCATCAGCAGCAAGTACTCCGGCTTCGGGGAG
139 GTTGCATCCGTCATGACAACTACCTTGACTCTCAATATTCGGTAAAATCTACTTG
181 GTGGCCAGCGTGCCCTGACCAACTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACCTC
199 GGTACCCACCTCAGGAGTTTACAGTCTTTTCGACACCGGTTCAAGTGATTTTGGGTT
241 GGGACCCCGCCAGGAGTTCACCGTGTCTTGACACTGGCTCCTGACTTCTGGGTA
259 CCTTCTATCTATTGTAAGTCCAACGCTTGCAAGAACCATCAAAGATTCGATCCAAGAAAG
301 CCCCTATCTACTGCAAGAGCAATGCTGCAAAAACCACCAGCGCTTCGACCCGAGAAAG
319 TCTTCCACCTTCCAGAACTTGGGAAAACCTCTTCAATCACTATGGTACTGGAAGTATG
361 TCGTCCACCTTCCAGAACCCTGGGCAAGCCCTGTCTATCCACTACGGGACAGGCAGCATG
379 CAAGGTATCTTGGGATACGACACTGTACAGTTTCAAATATTGTGATATCCAACAGACT
421 CAGGGCATCTGGGCTATGACACCGTCACTGTCTCCAACATGTGGACATCCAGCAGACA
439 GTCGGTTGTCTACACAAGAACCAGGAGACGTTTTTACTTACGCCGAGTTCGATGGTATT
481 GTAGCCCTGAGCACCCAGGAGCCCGGGACGTCTTCACTATGCCGAATTGACGGGATC
499 TTGGGAATGGCATATCCATCTCTGCTTCCGAATACTCAATCCCTGTTTTCGATAACATG
541 CTGGGATGGCCCTACCCCTCGCTCGCTCAGAGTACTCGATACCCGTGTTGACAACATG
559 ATGAACAGACATTTGGTTGCTCAAGACCTTTTCTGTCTATATGGATAGAAACGGTCAG
601 ATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCGGTTTACATGGACAGGAATGGCCAG
619 GAGTCCATGTTGACTCTTGGAGCCATTGACCCATCACTATACTGGTAGTTGCACTGG
661 GAGAGCATGCTCAGCTGGGGCCATCGACCCGTCTTACACAGGGTCCCTGCACCTGG
679 GTCCTGTTACAGTCCAACAGTACTGGCAATCACTGTTGATCCGTCACATTTGGTGGAA
721 GTGCCGTGACAGTGCAGCAGTACTGGCAGTCACTGTGGACAGTGCACCATCGGCGGT
739 GTTGTGCTGCTGTGAAGGTGGATGCCAAGCAATCTTGGACACCGGTACTTCAAACCT
781 GTGGTTGTGGCCTGTGAGGTGGCTGTCAGGCCATCTGGACACGGGCACCTCCAAGCTG
799 GTTGGACCATCAAGTATATTTGAACATCCAACAGGCTATTGGTCCACTCAAACCAG
841 GTCGGGCCAGCAGCGACATCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACACAGAACCAG
859 TACGATGAATTTGATATCGACTGTGATACTTGCTTACATGCCTACAGTCGTTTTCGAG
901 TACGATGAGTTTACATCGACTGCACAACCTGAGCTACATGCCACTGTGGTCTTTGAG
919 ATTAATGGAAAGATGTATCCACTTACACCTAGTCTTACACCTCTCAAGACCAGGTTTTT
961 ATCAATGGCAAAATGTACCCTGACCCCTCCGCTATACCAGCCAGGACAGGCTTC
979 TGCACCTCCGGATCCAATCAGAGAATCATAGTCAGAAATGGATTTTGGGAGATGTTTTT
1021 TGTACCAGTGGCTTCCAGAGTGAATATCCAGAAATGGATCCTGGGGATGTTTTT
1039 ATCAGAGAATACTACTCAGTTTTTGCAGAGCTAATAATCTTGTGGTCTTGCTAAAGCC
1081 ATCCGAGAGTATTACAGGCTTTGACAGGGCCAACACCTCGTGGGGCTGGCCAAAGCC
1099 ATCTAATCTAGA
1141 ATCTGA

```

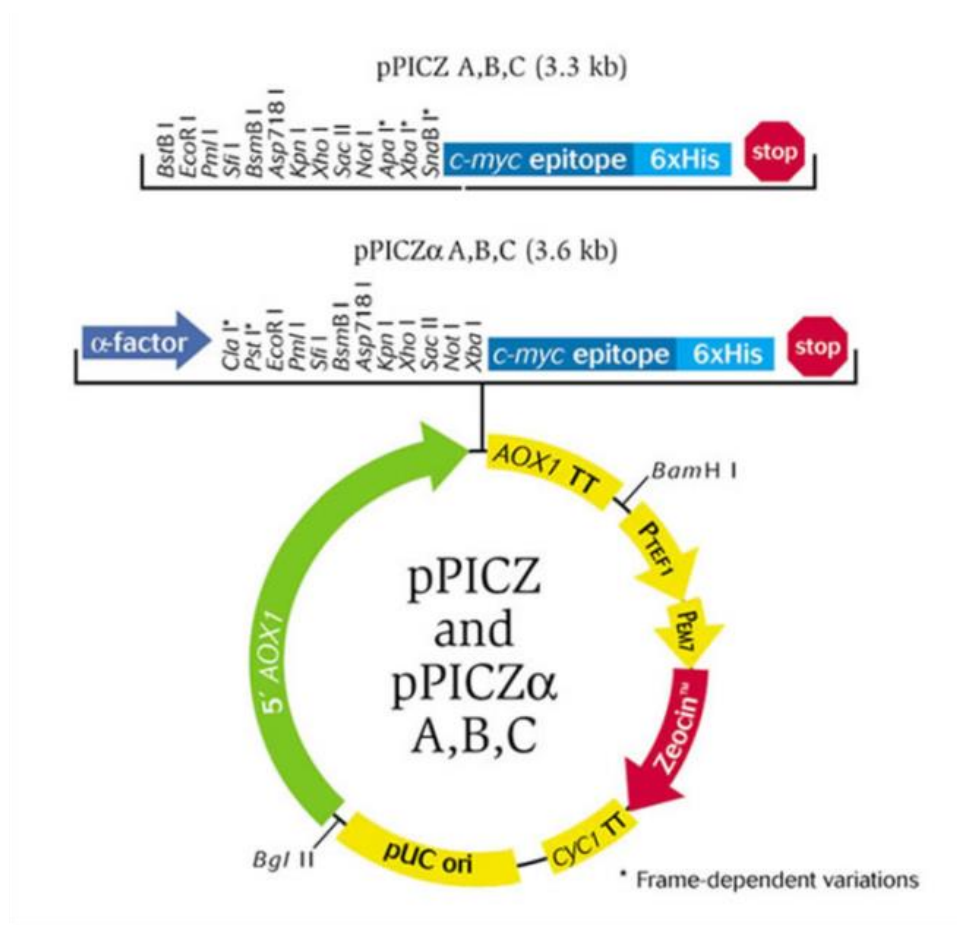
Ek-2. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları



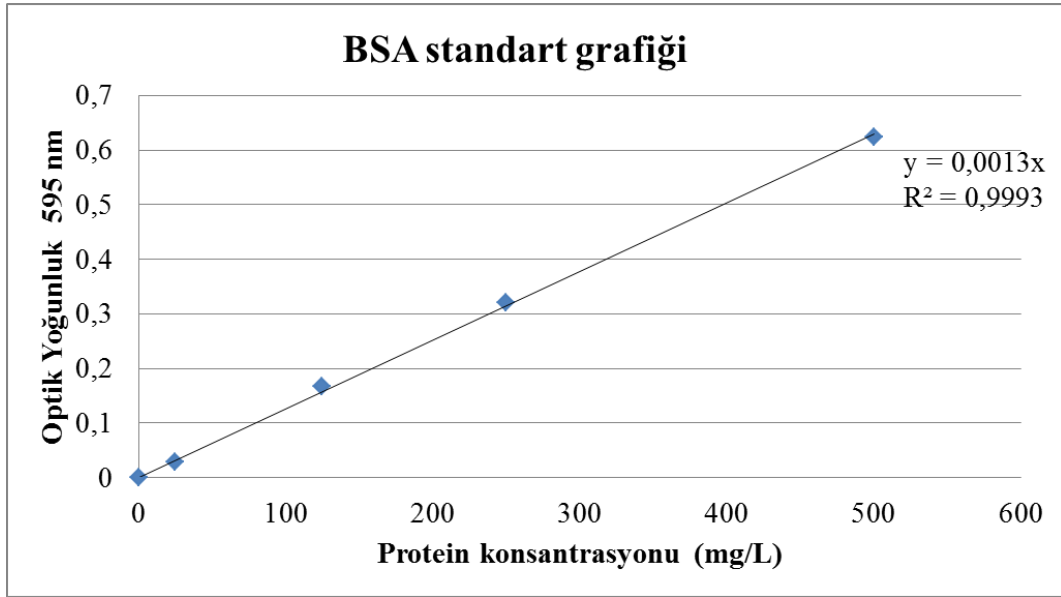
Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: O'GeneRuler™ 100 bç Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



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

Ek-3. pPICZ ve pPICZ $\alpha$  vektörlerinin şematik gösterimi

Ek-4. Toplam protein tayini standart grafiği



Toplam protein tayini için farklı konsantrasyonlardaki BSA standardının 595 nm absorbans değerleri ile çizilmiş standart grafiği.

## ÖZGEÇMİŞ



Fatma Ersöz 1991 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Antalya’da tamamladı. 2008 senesinde kazandığı Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden 2012 senesinde Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. 2014 yılının Şubatı ayında Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı, Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Halen aynı kurumda çalışmaya devam etmektedir. Evli ve 1 çocuk annesidir.