

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris MAYASINDA GAP PROMOTORU ALTINDA DEVE KİMOZİNİ
EKSPRESYONU

Özgül GÜZEL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris MAYASINDA GAP PROMOTORU ALTINDA DEVE KİMOZİNİ
EKSPRESYONU

Özgül GÜZEL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pichia pastoris MAYASINDA *GAP* PROMOTORU ALTINDA DEVE KİMOZİNİ
EKSPRESYONU

Özgül GÜZEL
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından yüksek lisans tez projesi olarak FLY-2018-4244 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pichia pastoris Mayasında GAP PROMOTORU ALTINDA DEVE KİMOZİNİ
EKSPRESYONU

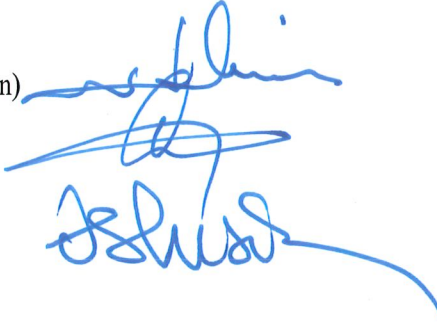
Özgül GÜZEL
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez ~~19/07/2019~~/2019... tarihinde jüri tarafından Oybirliği /~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK



ÖZET

Pichia pastoris MAYASINDA *GAP* PROMOTORU ALTINDA DEVE KİMOZİNİ EKSPRESYONU

Özgül GÜZEL

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Temmuz 2019; 70 sayfa

Kimozin rennin olarak adlandırılan bir aspartik proteazdır. Kimozin süt endüstrisinde peynir yapımında kullanılan başlıca enzimdir. Bu enzim memelilerin şirdeninden salgılanır ve sütü pıhtılaştırma özelliği bulunmaktadır. Günümüzde ticari kimozin dört farklı kaynaktan elde edilmektedir. Bunlar hayvansal, bitkisel, mikrobiyal ve rekombinant üretimle elde edilmektedir. Hayvansal kimozini geleneksel olarak süttten kesilmemiş buzağuların abomasumundan elde edilmektedir. Küçük yaşta buzağuların kesilmesi ve dünyada gittikçe artan talep karşısında bu endüstrinin yetersiz kalmasından dolayı, alternatif bitkisel, mikrobiyal ve rekombinant kaynağa yönelim artmıştır.

Pichia pastoris rekombinant protein üretiminde çoğunlukla tercih edilen bir ekspresyon sistemidir. Heterolog protein üretiminde *P. pastoris* mayası yüksek verim elde edilebilmektedir. *P. pastoris* birçok promotora sahip olmasına rağmen en sık kullanılan *AOX1* ve *GAP* promotorlarıdır. *GAP* promotoru; *P. pastoris* gliseraldehit -3 fosfat dehidrojenaz geninin ekspresyonundan sorumlu bölgedir ve yapısal bir promotordur

Bu araştırmada deve kimozin geni metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* mayasında *GAP* promotoru kontrolünde pGAPZαA üretim vektörü kullanılarak üretilmiştir. Elektroporasyon ile gen aktarımı yapılan *P. pastoris* X33 suşlarında bulunan vektör kopya sayısı Southern Blott analizi ile belirlenmiştir. Seçilen tek kopya suşu ile çalkalamalı erlen koşullarında uygun pH (3-7) ve sıcaklık (20-28°C) aralıkları faktöriyel deneme deseni ile 3 paralel ve 2 tekerrür ile belirlenmiştir. İstatik analizleri sonucunda optimum sıcaklığın 24 ve pH 'nın 3 olduğu belirlenmiştir.

Büyük ölçekli (5-L) kimozin üretimi pH 3.0 ve 24°C ' de gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonun üretim aşaması *GAP* promotorunun verimli olduğu hipoksik şartlarda 103 saat boyunca sürdürülmüştür. En yüksek enzim aktivitesine 56. saatte ulaşılmış ilerleyen saatlerde enzim aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Rekombinant kimozin aktivitesi yaklaşık olarak 20 IMCU/mL diğer bir ifade ile 2000 Soxhlet Ünit/mL bulunmuştur. Fermantasyon ortamında toplam 214.7 mg/L rekombinant protein olduğu tespit edilmiştir.

SDS-PAGE analizi sonucunda yaklaşık 42kDa büyüklüğünde bir bant olarak gözlenmiştir. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı 50°C, optimum pH'sı 3.0-4.0 arası olduğu belirlenmiştir. Enzim pH 3.0-6.5 arası ve 20-65°C arası stabilitesini 2 saat koruyabilmektedir. Fakat pH' nın 4 ve sıcaklığın ise 50°C üzerine çıkması ile enzim

aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca enzim 10 Mm Mg^{+2} ve Fe^{+2} varlığında aktivitesi sırası ile %129.58 ve % 72.5 artarken; Cu^{+2} , Zn^{+2} varlığında inhibe olmaktadır. Deve kimozi en yüksek aktiviteyi 20-40 Mm $CaCl_2$ arasında ulaşmışken, bu konsantrasyonun artması ile aktivitesi düşmektedir.

Üretilen rekombinant deve kimozi ile beyaz peynir üretimi gerçekleştirilmiş, üretim sonucunda ticari rekombinant sığır ile rekombinant deve kimozi verimleri kıyaslanmıştır. Ticari kimozi ile üretilen beyaz peynir verimi %14.8 iken; rekombinant kimozi verimi %15.45 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre rekombinant deve kimozinin ticari rennet kadar etkili bir enzim olduğu saptanmıştır. Rekombinant deve kimozin enziminin üretim şartlarının optimizasyonu ile verimin artırılması ve ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirildiği takdirde ticari olarak üretim potansiyeli bulunmaktadır.

ANAHTAR KELİMELEER: Deve kimozi, *GAP* promotor, *Pichia pastoris*, rekombinant enzim üretimi, peynir

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

ABSTRACT

PRODUCTION OF RECOMBINANT CAMEL CHYMOSIN ENZYME WITH GAP PROMOTOR IN *Pichia pastoris*

Özgül GÜZEL

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet INAN

July 2019; 70 pages

Chymosin is the major enzyme to used to make cheese in the dairy industry. This enzyme is secreted by abomasus of mammal and it has a milk clotting property. Nowadays commercial chymosin is acquired to four different sources. These are derived from animal, plant, microbial and recombinant production. Animal chymosin is acquired traditionally to abomasus of unweaned calf. Because of increasing demand in the world and slaughter to unweaned calf, alternative source of microbial, plant and recombinant were increased the tendency for this industry is fall shorted.

P. pastoris is commonly preferred that is an expression host for production of recombinant protein. This yield has high yield to production of heterologous protein. Despite *Pichia pastoris* has several promoters, the most extensively used promoters are *AOXI* and *GAP* promoter. *GAP* promoter is responsible for region of expression of 3-phosphate dehydrogenase gene and is a constructional promoter.

In this research; camel chymosin gene was expressed to *Pichia pastoris* which is a methylotrophic yeast, under the control of *GAP* promoter, using expression vector which is PGAPZ α A. *P. pastoris* X33 strains which are transferred gene by electroporation. Clone copy number was detected by Southern analysis. Chosen Single of copy strain with conditions of shaking flask, suitable pH (3-7) and temperature (20-28 °C) was determined by factorial experimental design with 3 parallel, 2 repeat. According to statistical analysis, optimum of temperature is 24 and pH is 3 was determined.

High production of fermentation (5 –L) was carried out pH 3 and 24°C. The stage of fermentation was maintained at *GAP* promoter which is efficient at hypoxic conditions through 103 hours. The highest enzyme activity was found approximately 20 IMCU/ mL in other word 2000 SoxhletUnit/mL in 56.hours. Produced recombinant enzyme is 214.7 mg/ L in stage of fermentation.

According to SDS-PAGE analysis, the molecular weight of the chymosin was found approximately 42 kDa. The optimum conditions of the enzyme were determined pH 3.0- 4.0 and temperature of 50°C. The enzyme is protected stability to 2 hours, pH 3-

6.5 and between 20°C - 65°C but increasing above of pH 4 and temperature of 50°C give rise decreasing of enzyme activity. The camel chymosin was activated by Fe²⁺ and Mg²⁺ ; respectively %129.58 and % 72.5 but inhibited by Cu²⁺, Zn²⁺. While this enzyme highest activity has between 20 Mm-40 Mm CaCl₂ concentration, activity is lost with increasing concentration of calcium.

The pickled cheese was produced to used of recombinant camel chymosin. Yield of commercial recombinant chymosin with rendement of recombinant rennet were compared. While commercial bovine chymosin has %14.8 yield, recombinant camel chymosin has % 15.45. According the results; recombinant camel chymosin determined effective rennet as a commercial chymosin. When optimization conditions of production of recombinant camel chymosin with increasing yield and scale-up works were carried out, camel chymosin which has potential for production of commercial.

KEYWORDS: Camel chymosin, Cheese, *GAP* promotor, *Pichia pastoris*, Recombinant enzyme production

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Assoc. Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

ÖNSÖZ

Bu süreç zarfında görüş ve fikirlerini esirgemeyen, tecrübeleriyle bana yol gösteren ve bu labaratuvarında araştırma fırsatı veren sevgili danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a çok ama çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın son aşamasında bana sunduğu imkanlar ve değerli görüşleri için sevgili hocam Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN' e çok teşekkür ederim. Çalışmamda yardımlarını eksik etmeyen, fikir ve önerileriyle yol gösteren Gürkan YILMAZ'a, tüm yardımlarından dolayı Arş. Gör. Fatma ERSÖZ'e, ayrıca sayın Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK'a, Uzm. Dr. Aysun ÖZÇELİK'e, Dr. Semiramis YILMAZ'a ve Merve AL'a çok teşekkür ederim.

Tüm bu süreçte her zaman yanımda olan, desteklerini hiç bırakmayan ve yardımlarını esirgemeyen canım ekip arkadaşlarım Şeyda GÜLLÜ'ye, Merve HADİMİOĞLU'na, Eroll BYTYQI'e, Şeyma ÇELEBİ DURAN'a, Raziye DEMİR' e ve Seda İÇEN'e çok teşekkür ederim.

Benden desteğini hiç esirgemeyen, beni bugünlere iyi birinsan olarak getirmeye çalışan canım annem Gülfer GÜZEL'e ve canım babam Aziz GÜZEL'e sonsuza kadar minnettar olacağım. En zor zamanlarımda yanımda olup, her düştüğümde elimden tutup kaldıran canım ablalarım; Gülay GÜZEL' e ve Özlem GÜZEL'e çok ama çok teşekkür ederim. Ve son olarak hayatımın hemen her anında yanımda olan can dostum Huriye ŞEKER' e bu teşekkürü borç bilirim.

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

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Rekombinant DNA teknolojisi.....	3
2.2. Kimozin	3
2.2.1. Kimozin kaynakları	7
2.3. Metilotrofik mayalar ve üretim sistemleri.....	8
2.3.1. <i>Pichia pastoris</i> mayası ve üretim sistemi	9
2.3.2. <i>GAP</i> promotörü.....	13
2.4. <i>GAP</i> promotörü ile yapılan bazı çalışmalar	14
2.5. Peynir.....	16
2.6. Kimozin enzimi üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar.....	17
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Konukçu suşlar ve taşıyıcı plazmitler.....	22
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve restriksiyon enzimleri	22
3.1.3. Besiyerleri ve gelişim ortamları.....	22
3.2. Metot	22
3.2.1. Deve kimozin geni içeren pPICZ α ACM plazmidinin izolasyonu ve pGAPZ α A Vektörünün Doğrulanması	22
3.2.2. Agaroz jel elektroforezi	23
3.2.3. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu	23
3.2.4. pGAPZ α A vektörü ile prokimozin geninin ligasyonu ve <i>E. coli</i> ' ye transformasyonu	23
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	25

3.2.6. Plazmid izolasyonu	26
3.2.7. DNA ve plazmit konsantrasyonunun ölçülmesi	26
3.2.8. <i>P. pastoris</i> X33'e transformasyon	27
3.2.9. Genomik DNA izolasyonu	27
3.2.10. Gen kopya sayısının belirlenmesi (Southern Blot).....	27
3.2.11. Protein üretimi	29
3.2.12. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi.....	29
3.2.13. SDS-PAGE analizi.....	29
3.2.14. Kimozin aktivitesinin ölçülmesi	30
3.2.15. Toplam protein tayini	30
3.2.16. Optimum pH'nın enzim üretimine etkisi	30
3.2.17. Deve kimozin enziminin karakterizasyon	31
3.2.17.1. Enzimin optimum pH'sının tespit edilmesi	31
3.2.17.2. Enzimin pH stabilitesinin tespit edilmesi	31
3.2.17.3. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespit edilmesi.....	31
3.2.17.4. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespit edilmesi.....	31
3.2.17.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespit edilmesi	31
3.2.17.6. Farklı CaCl ₂ konsantrasyonunun enzim aktivitesi etkisinin incelenmesi ...	31
3.2.18. Deve kimozini geninin büyük ölçekde fermentörde ekspresyonu.....	32
3.2.18.1. Kesikli faz.....	32
3.2.18.2. Yarı-kesikli faz	33
3.2.19. Deve kimozini kullanılarak Beyaz Peynir yapımı	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. Deve kimozini Geni İçeren Plazmid pPICZαCM Vektörünün Doğrulanması ve pGAPZαA Vektörünün Doğrulanması	35
4.2. pGAPZαA vektörü ve prokimozin geninin ligasyonu ve <i>E. coli</i> ' ye transformasyonu	36
4.3. Protein Ekspresyonunda Kullanılan Plazmitlerin Oluşturulması.....	38
4.4. Plazmitlerinin Lineer Hale Getirilmesi ve <i>P. pastoris</i> 'e Transformasyonu.....	38
4.5. Gen kopya sayısının belirlenmesi(Southern Blott)	39
4.6. Engelli Erlenmayerde Deve Kimozin Üretimi	40
4.7. SDS-PAGE Analizi İle Deve Kimozini Üretiminin Belirlenmesi	41

4.8. Deve Kimozini Aktivitesi Sonuçları	42
4.9. Deve Kimozini Enziminin Karakterizasyonu.....	45
4.9.1. Enzimin optimum pH'sının tespiti.....	45
4.9.2. Enzimin pH stabilitesinin tespiti.....	45
4.9.3. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespiti	46
4.9.4. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespiti	47
4.9.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespiti.....	48
4.9.6. Farklı CaCl ₂ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi	48
4.10. Deve Kimozinin Büyük Ölçekte Fermentörde Üretimi	49
4.10.1. Fermantasyon Prosesinin Akış Şeması.....	49
4.10.2. Fermantasyon sonucu deve kimozinin enzim aktivitesi	51
4.10.3. Deve kimozinin büyük ölçekte üretiminin SDS-Page analizi	52
4.10.4. Rekombinant deve kimozini ile beyaz peynir yapımı	52
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇLAR	60
7. KAYNAKLAR	62
8. EKLER.....	66
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Pichia pastoris* mayasında *GAP* Promotoru Altında Deve Kimozini Ekspresyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

19/07/2019

ÖZGÜL GÜZEL

İmzası



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bç	: Baz çifti
dk	: Dakika
g	: Gram
xg	: Göreceli santrifüj kuvveti
μ	: Mikro (10^{-6})
kDa	: Kilo Dalton
l	: Litre
m	: Mili
ml	: Mililitre
M	: Molar
n	: Nano (10^{-9})
OD	: Optik yoğunluk
s	: Saniye
T_m	: Çözülme sıcaklığı
U	: Ünite
V	: Volt

Tezde ondalık yazım ayırıcı olarak nokta kullanılmıştır (ör: 21.02).

Kısaltmalar

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BSA	: Bovine serum albümin
BMGY	: Tamponlanmış kompleks gliserol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BYED	: Tamponlanmış kompleks etanol besiyeri
DNA	: Deoksiribonükleik asit

LB : Luria-Bertani besiyeri
LiAc : Lityum Asetat
PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi
PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS : Sodyum dodesil sülfat
TGS : Tris-Glisin-EDTA
TAE : Tris-asetat-EDTA
YNB : Maya azot kaynağı
YPD : Maya özütü pepton dekstroz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. a) Kimozin b) Kimozinin protein yapısı ve çeşitleri	4
Şekil 2.2. Kazein miseli yapısı	4
Şekil 2.3. Kimozin enziminin çalışma prensibi	5
Şekil 2.4. Sütte pıhtı oluşum mekanizması	5
Şekil 3.1. Ligasyon aşaması.....	25
Şekil 3.2. Çalışmada gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin genel hatları	32
Şekil 3.3. Peynir üretim prosesi	34
Şekil 4.1. a) pPICZαCM plazmidinin EcoRI ve XbaI ile kesimi b) pPICZαACM agoraz jel kesimi	35
Şekil 4.2. a) pGAPZαA vektörünün doğrulanması b) pGAPZαA agoraz jel kesimi	36
Şekil 4.3. Ligasyon analizi sonucu yapılan koloni PZR	37
Şekil 4.4. Plazmit DNA izolasyonu agoraz jel görüntüsü	37
Şekil 4.5. Ligasyon sonrası elde edilen yapısal GAP promotorlarıyla deve kimozin geninin gösterimi ve oluşturulan pGAPZαCMchy klonlama vektörü	38
Şekil 4.6. a) EcoIR ve XbaI enzimleri ile kesim reaksiyonu b) pGAPαACM klonunun, XmaJI enzimi ile lineer hale getirilmesi	39
Şekil 4.7. % 0.8' lik agoraz jelde görüntüleme.....	40
Şekil 4.8. Engelli erlendeki 20 °C' de; pH 3.0; 4.0; 5.0 ve 6.0 üretimindeki 48. saat, ve 72. Saat,96. Saat örneklerinin SDS-Page görüntüsü	41
Şekil 4.9. Engelli erlendeki 20° C; 24°C ve 28°C; pH 3.0; 4.0; 5.0 ve 6.0; 96. saat örneklerinin SDS-Page görüntüsü.....	41
Şekil 4.10. Engelli erlenmayerdeki üretim sonucu enzim aktivitesi tayini.....	43
Şekil 4.11. 20°C, 24 °C, 28°C; pH 3.0' e ait 48. saat, 72. saat ve 96. saat örneklerin pıhtı grafiği.....	43
Şekil 4.12. 20°C, 24 °C, 28°C; pH 4.0' e ait 48. saat, 72. saat ve 96. saat örneklerin pıhtı grafiği.....	44
Şekil 4.13. 20°C, 24 °C, 28°C; pH 5.0' e ait 48. saat, 72. saat ve 96. saat örneklerin pıhtı grafiği.....	44
Şekil 4.14. Enzimin optimum pH'sının tespit grafiği	45
Şekil 4.15. Enzimin pH stabilitesinin tespit grafiği	46
Şekil 4.16. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespit grafiği.....	47

Şekil 4.17. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespit grafiği.....	47
Şekil 4.18. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespit grafiği	48
Şekil 4.19. Farklı CaCl ₂ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi	49
Şekil 4.20. pGAPZαACM=18 klonunun hipoksik şartlar altında gerçekleştirilen fermentör prosesi akış şeması	50
Şekil 4.21. 24°C, pH 3' de <i>Pichia pastoris</i> X33 hostunda gerçekleştirilen deve kimozin üretimi	50
Şekil 4.22. Büyük ölçekte 24°C, pH 3' de <i>Pichia pastoris</i> X33 hostunda gerçekleştirilen deve kimozin üretimi, enzim aktivitesi tespit grafiği	51
Şekil 4.23. Büyük ölçekte 24°C, pH 3' de <i>Pichia pastoris</i> X33 hostunda gerçekleştirilen deve kimozin üretimi, WCW tespit grafiği	51
Şekil 4.24. <i>Pichia pastoris</i> mayasında büyük ölçekte 24°C, pH 3.0' de gerçekleştirilen deve kimozin protein üretiminin, SDS-PAGE tespit grafiği	52
Şekil 4.25. a) Sütün 65°C de 30dk pastörizasyonu b)Termometre ile sıcaklık kontrolü c) Kontrol örneği; 1. ve 2. Paralel örneklerinin pıhtı sürelerinin tayini	53
Şekil 4.26. a) Maya miktarı ve kuvvetinin hesaplanması ve enzimin süre ilave edilmesi b) Mayalama işlemi için 1 saat boyunca 30 derecede inkübasyona bırakılması ve pıhtı kırma işleminin yapılması c) Peynir altı suyunun yüzeye çıkarılması.....	53
Şekil 4.27. a) Peyniraltı suyunun uzaklaştırılmasından sonra, peynirin kalıba konulması ve kalıba alındıktan sonra 15 derecede, 18 saat boyunca inkübasyonu b) Kalıptan örneklerin çıkarılması ve tartım yapılması c) Sırası ile soldan sağa Kontrol peynir örneği; 1. Paralel peynir örneği ve 2. Paralel peynir örneği	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı kimoziin çeşitlerinin C/P değeri.....	7
Çizelge 2.2. <i>P. pastoris</i> promotörleri.....	12
Çizelge 3.1. DNA parçalarının restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu	24
Çizelge 3.2. Ligasyonda kullanılan reaksiyon içeriği.....	24
Çizelge 3.3. PZR ısı döngüsü programı için süre ve sıcaklık koşulları	26
Çizelge 3.4. PZR’de kullanılacak olan primerler.....	26
Çizelge 4.1. Enzim aktivite sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	42
Çizelge 4.2. Peynir yapımında kullanılacak kontrol ve 2 paralel örneğe ait sonuçlar....	54

1. GİRİŞ

Dünya’da gıda sektörü içerisinde süt ve süt ürünleri önemli bir yer kaplamaktadır. Bunlar içerisinde de, yüzlerce çeşidi ile peynircilik sektörü en ön sıralarda yer almaktadır. Peynir üretiminin olmazsa olmaz yapı taşları süt ve rennettir (Budak ve Afşar 2011). Farklı kaynaklardan elde edilip kullanıma hazır hale getirilen, kazeini pıhtılaştırıcı enzimlere kimozen veya rennin denilmektedir (Çakmakçı vd. 2017).

Kimozen memelilerin şirdeninden ekstrakte edilerek bulunmuştur. Kimozen pepsin ile oldukça yakın ilişkilidir ve yetişkin memelilerde fazlaca bulunur. Her iki proteaz da sinyal peptidinin kesilmesinden sonra proenzim olarak salgılanır (Kappeler vd. 2006). Rennetin yaklaşık olarak %90’ını kimozen (rennin) oluştururken, %10-25’ini pepsin enzimi oluşturmaktadır (Kumar vd. 2010).

Bu aspartik proteazda Asp-32 ve Asp-215 olmak üzere iki aktif bölge bulunmaktadır (Vallejo vd. 2008). Bu enzimin çalışma prensibi κ -kazeinin Phe105-Met106 arasındaki peptid bağlarına etki ederek sütte çözünmeyen para-kazein molekülleri üretmek için koagüle olmasını sağlamaktadır (Lu vd. 2016).

Son zamanlarda peynir üretimi için endüstri dört farklı rennet kaynağı tercih etmektedir. Bu kimozen kaynaklarının başlıcaları hayvansal, bitkisel, mikrobiyel ve rekombinant rennetlerdir (Jiang vd. 2012). Hayvansal rennetlerin talebi karşılayamaması, bitkisel rennet kaynaklarının sadece belirli bir coğrafi bölgede yetişmesi, mikrobiyel rennetlerin son ürün yani peynirde oluşturduğu istenmeyen tat ve kokudan dolayı sınırlı kalmıştır (Mohanty vd. 1999).

Moleküler biyolojide yaşanan gelişmeler ışığında, heterolog protein üretiminde rekombinant DNA teknolojisi kullanımı gün geçtikçe artmaya başlamıştır. Böylece diğer kimozen kaynaklarının kullanımı ile ortaya çıkabilecek olumsuzluklar elimine edilmiş olmaktadır. Mayalar heterolog protein üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun için en çok protein üretiminde iki mayadan yararlanılmaktadır. Bu temel iki maya: *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris*’dir (Demain vd. 2009).

Son yıllarda özellikle *P. pastoris* mayası ile protein üretimine dair oldukça çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu üretim sistemin bazı avantajları, bu mayaya olan talebin gün geçtikçe artmasına neden olmaktadır. Bu mayanın yaygın bir şekilde konukçu olarak kullanılma sebepleri: *S. cerevisiae* ile benzerliği ve *P. pastoris*’te genetik manipülasyonların kolaylığı, *P. pastoris*’in yüksek seviyelerde hücre içi ve hücre dışı protein üretimi, birçok ökaryotik posttranslasyonel modifikasyonda yeteneği: glikozilasyon, disülfid bağları, proteolitik süreçler ve mevcut ticari kitlerinin bulunmasıdır (Cereghino ve Cregg 2000).

P. pastoris birçok promotora sahip olmasına rağmen en sık kullanılan *AOX1* ve *GAP* promotorlarıdır. *AOX1* indüklenebilen promoturu iken, *GAP* yapısal promotordur (Karaoğlan vd. 2015). Toksik proteinlerin üretimi için yapısal yerine, indüklenebilen promotorlar tercih edilmektedir (Ahmad vd.2014). İndüklenebilen promotora örnek olarak; *AOX1*, *DAS*, *PEX8*, *ICL1* ve *FLD1* verilebilir fakat *PEX8* ve *ICL1* düşük üretim seviyesi gösterdiklerinden dolayı yaygın kullanılmamaktadır (Vogl ve Glieder 2013).

Bu promotorlara alternatif olarak Alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotoru son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır (Karaoğlan vd. 2016).

GAP promotoru; *P. pastoris* gliseraldehit -3 fosfat dehidrojenaz geninin (*GAP*) ekspresyonu kontrol eden DNA bölgesidir. Bu promotorun kullanım avantajları; metanol indüklenmesine ihtiyaç duymaması ya da herhangi bir karbon kaynağına ihtiyaç duyduğu için kültür değişiminin gerekmemesi, yüksek ölçekli protein üretimi için daha uygun ve kolay olmasıdır (Li vd. 2007). *GAP* glikoliz için anahtar bir enzimdir. *GAP* promotoru yaklaşık 500 bç uzunluğundadır. *pGAP* bakteri, maya, böcek ve memeli organizmalardan heterolog protein üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabilir (Waterham vd. 1997).

GAP sistemi; metanol indüklemeli sistemlerde indüksiyon başlamadan önce repressör karbon kaynağının (glikoz gibi) uzaklaştırmak için gerekli olan yıkama işlemine gerek duymamaktadır. Böylece metanol depolamasındaki tehlikelerden korunmuş olmaktadır. Ayrıca bu durum büyük ölçekli heterolog protein üretiminde; metanol depolanma maliyetini de düşüren etkili bir yöntemdir (Zhang vd. 2009).

Bu yüksek lisans tezinde deve kimozi enzimi *GAP* (500 bç) yapısal promotoru altında, *P. pastoris* mayası X33 suşunda üretilmiştir. Transformasyon sonucunda elde edilen klonların kimozi gen kopya sayısı belirlenerek, öncelikle engelli erlende daha sonra da büyük ölçekte fermentörde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzimlerin aktivite tayinleri yapılmış ve enzim aktivitesinin belirli özelliklere (pH, sıcaklık, iyon etkisi, CaCl₂ konsantrasyonu) göre karakterizasyonu yapılmıştır. Böylece rekombinant deve kimozinin optimum çalışma şartları tayin edilmiştir. Büyük ölçek fermantasyonda üretim sonucu üretilen heterolog protein, beyaz peynir yapımında kullanılmıştır. Böylece enzimin ürüne uygulanabilirliği üzerine de çalışılmış olmuştur.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Rekombinant DNA teknolojisi

Proteinler, bütün yaşayan formlar tarafından kendi doğal metabolizmalarında üretilen makromoleküllerdir. Bazı enzimler biyokatalizör gibi enzim olarak hizmet ederek reaksiyonların hızını artırırlar. Proteinler hücre içinde haberleşmede, yanıt vermede önemli bir rol oynarlar. Bu maddeler protein ve genetik mühendisliği yardımı ile ticari olarak endüstride üretilmektedir.

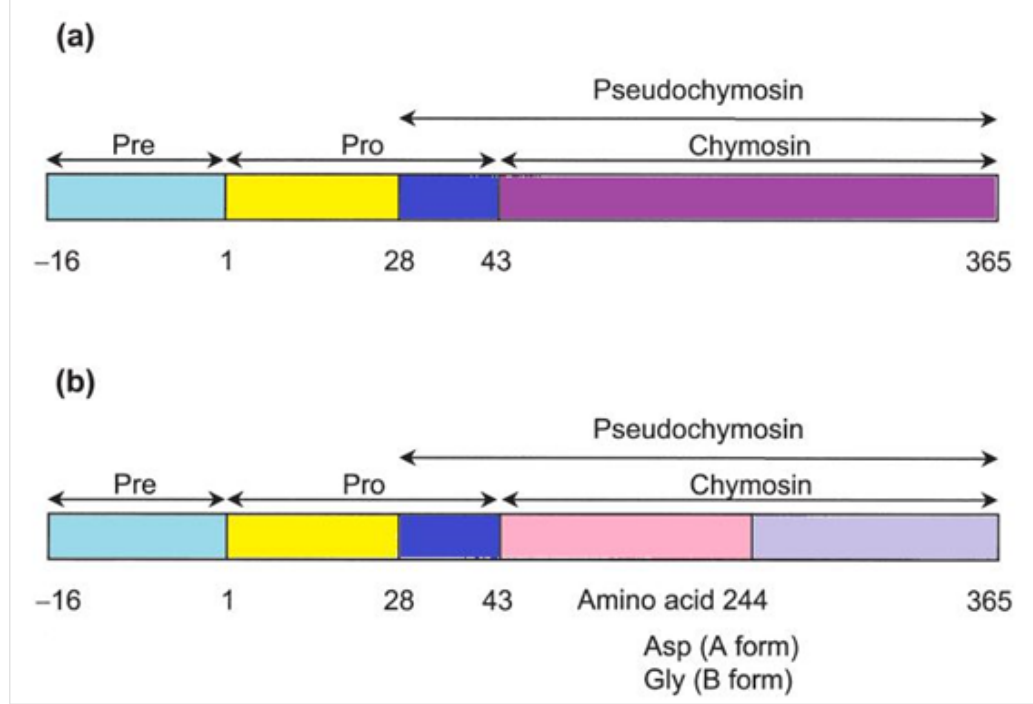
Endüstriyel enzimlerin yarısından fazlası maya, küf ve bakterilerden üretilmektedir. Bu üretimin; maya, küf ve bakteri tarafından %30'u; hayvanlardan %8'i; bitkilerden ise %4'ü sağlanmaktadır. Enzim endüstrisi 1980'lerde atağa geçmiştir. 1970'lerde çoğu enzim bitkisel ve hayvansal kaynaklardan geleneksel bir şekilde üretilmiştir. Fakat son yıllarda yüksek maliyet, düşük seviyede enzim üretimi beklentileri karşılayamamıştır. 1990'larda ise mikrobiyel enzimler ön plana çıkmıştır. Kimozin FDA'nın 1990'da insan tüketimi için onayladığı ilk genetik mühendisliği ürünüdür. 1993'lere geldiği zaman ise endüstriyel enzimlerin %50'den fazlası rekombinant prosesler sayesinde pazarlanmıştır.

Günümüzde; rekombinant DNA teknolojisi yardımı ile enzimler ve prosesler kullanıcının gereklerine uygun bir şekilde üretilmektedir. Rekombinant protein üretimindeki ilk aşama; istenilen DNA elde edildikten sonra, seçilen üretim sisteminde bu proteinin çoğaltılmasıdır. Bunun için çok geniş oranda üretim sistemi bulunmaktadır. Proteinler; bakteri, maya, küf, memeli hücre kültüründe ya da bitki, böcek, transgenik bitki ve hayvanlarda üretilmektedir. Rekombinant protein üretimi için doğru ekspresyon sistemi seçiminde; protein kalitesi, fonksiyonları, üretim hızı gibi faktörler de etkilenmektedir (Demain vd. 2009).

2.2. Kimozin

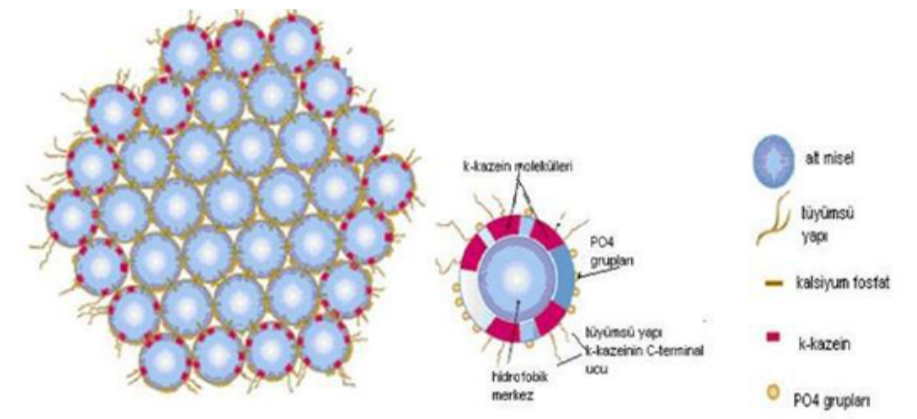
Kimozin, pepsin ile oldukça yakın ilişkilidir ve yetişkin memelilerde fazlaca bulunur. Her iki proteaz da sinyal peptidin kesilmesinden sonra proenzim olarak salgılanır (Kappeler vd. 2006). Rennetin yaklaşık olarak %90'ını kimozin, %10-25'ini pepsin enzimi oluşturmaktadır (Kumar vd. 2010).

Kimozin hücre içinde pre-pro-kimozin olarak sentezlenmektedir. Bu protein formu 365aa içermektedir. Protein sentezi esnasında ilk 16 aa'lık sinyal sekans kısmı endoplazmik retikulumda (ER) uzaklaştırılır. Bu şekilde prokimozin formu üretilmiş olur (Vallejo vd. 2008). İkinci formu olan prokimozinin molekül ağırlığı 40.8 kDa'dır. Prokimozin midede asidik koşullarda otokatalitik aktivite ile N-terminal bölgesindeki 42 aa uzaklaştırılmasıyla aktif formuna (35.6 kDa, 323 aa) dönüşmektedir (Attallah 2007).

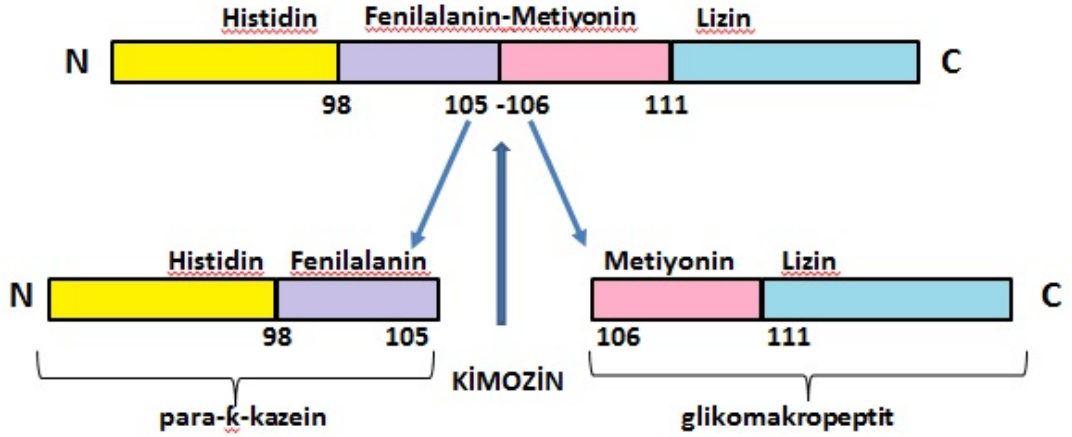


Şekil 2.1. a) Kimozin b) Kimozinin protein yapısı ve çeşitleri (Mohanty vd. 1999)

Bu proetazlarda iki esansiyel aspartik asit kısmı bulundurulur. Bunlar Asp12 ve Asp 215 olmak üzere iki aktif bölgedir. Bu üç boyutlu konformasyonlarındaki aktif bölge, k-kazein proteinini Phe105- Met106 arasındaki peptid bağlarını parçalayabilmektedir (Vallejo vd. 2008). Böylece genelde negatif bir şekilde yüklenmiş C-terminus bölgesinin salınımla sütün pıhtılaşmasına yol açmaktadır (Jensen vd. 2012).



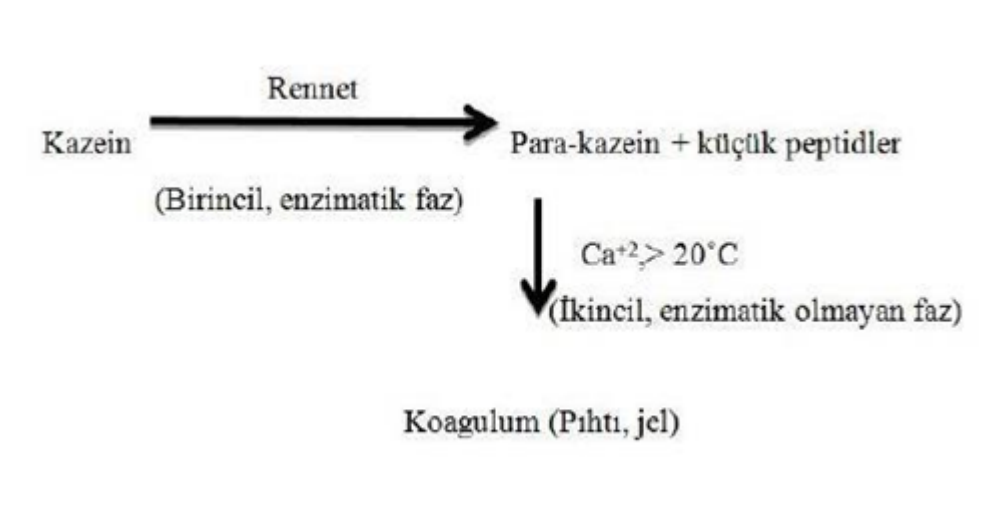
Şekil 2.2. Kazein miseli yapısı (Gümüş 2015)



Şekil 2.3. Kimozin enziminin çalışma prensibi

Kimozinin; A ve B formu olarak iki türü bulunmaktadır. Bu iki yapının arasındaki tek fark; tek bir aminoasitin yer değiştirmesi veya yerine geçmesinden kaynaklanmaktadır. Bu aminoasit yapısı Asp/Gly yapısıdır. Kimozin A'nın degrede olması ile kimozin C formu oluşmaktadır (Bansal vd. 2009).

Rennet süt içindeki proteinlerle iki şekilde tepkimeye girer. Bunlar enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerdir. Bu tepkimelerin sonucunda sütte pıhtı oluşmaktadır. Enzimatik aşamada; sıcaklığın ve kalsiyum iyonlarının etkisi ile süt jel haline gelmektedir (Neelakantan vd. 1999).



Şekil 2.4. Sütte pıhtı oluşum mekanizması (Fox vd. 2000)

Kimozin aktivitesi sistem içindeki kalsiyumun eklenmesine bağlıdır. Kalsiyum iyonları varlığında, kalsiyum kazeinat fraksiyonları, çözünmeyen para-kazein formlarını etkileyerek pıhtı oluşumu meydana gelmektedir (Vallejo vd. 2008). Koagülasyon iki

aşamada gerçekleşmektedir. Çözünmeyen parakazein molekülleri ve çözünen TCA glikomakropeptidleri oluşmaktadır. Sütün içinde bulunan kazein miselleri ve fosfat kümeleri, hidrofobik bölgeler sırayla yüzeye çıkar (Kappeler vd. 2006). Çökelenin ya da Ca^{+2} iyonları tarafından parakazeinin oluşması için sıcaklığın 20 dereceden büyük olması gerekmektedir (Mohanty vd. 1999).

Rennet enzimin çalışma prensibi sütü koagüle etmek yanı sıra özellikle düşük-orta çeşitlikte pişmiş çoğu peynirin olgunlaşma sırasında proteolize katkı sağlamaktadır (Bansal vd. 2009). Bu proteazlar, farklı türlerde peynir üretiminde süt pıhtısı oluşturmak için geleneksel üretimlerde yaygın bir şekilde kullanılır. Bunlar arasında peynir yapım endüstrisinde kimozen en etkili enzimdir. Diğer aspartik proteazlar da endüstride kullanılmasına rağmen; sütte kazeinde spesifik olmayan bölünmelere sebep olabilirler (Wang vd. 2015). Acı hidrofobik peptitler istenmeyen proteolitik aktivite göstererek farklı bir forma dönüşmektedir Bu da peynir yapımı prosesinde protein içeriğinin kaybına, sütte acı bir tada ve maya miktarının önemli ölçüde azalmasına sebep olmaktadır (Kappeler vd. 2006).

Kimozen; yasal olarak kabul edilen ve ticareti yapılabilen, genellikle güvenli olarak (GRAS) kabul edilen bir enzimdir (Teuber 1990). Günümüzde endüstride rennet enzimi iki özelliğe göre karakterize edilmektedir. Birincisi Uluslararası Süt Pıhtılaştırma Birimi (IMCU) 'nde ifade edilen süt pıhtılaştırma aktivitesidir ve C harfi ile gösterilir. Uluslararası günlük fedarasyonu tarafından belirlenen bir standart method yardımı ile hesaplanır. Bu metoda göre k-kazeinin hemen yanındaki bağları ya da Phe 105- Met106 arasındaki spesifik bağları kırarak sütü pıhtılaştırma yeteneği ölçülür. İkincisi ise genel proteolitik aktivite (P) olarak adlandırılmakta ve kazeindeki herhangi bir bağı kırabilme yeteneğidir. İki özellik arasındaki C/P oranı sütün pıhtılaşma enziminin belirleyen gerekli bir kalite özelliğidir. Rennet enzimi için bu değer yüksek olması istenir ve bu bakımdan kimozenin diğer tüm bilinen rennetler arasında üstünlük sağlar (Jensen vd. 2013).

Deve kimozenin pre-pro- kimozen formu ise 381 aa oluşmakta ve yaklaşık olarak 42.083 kDa büyüklüğündedir. Protein sentezi esnasında 16aa kısım uzaklaştırılarak pro-kimozen formu oluşur. Pro-kimozen 365 aa oluşmakta ve 40.4 kDa büyüklüğündedir. Mature deve kimozenini ise 323 aa ve 35.6 kDa büyüklüğündedir. Günümüzde sığır, yak, koyun vb. kimozen kaynaklarının yanısıra deve kimozenine olan ilgi gittikçe artmaktadır. Bunun başlıca sebeplerinden biri düşük proteolitik aktiviteye sahip olmasıdır. Başlıca kullanılan mikrobiyel kimozenlerin kullanılması ile peynirde istenmeyen tat ve koku oluşmaktadır.

Bunun sebebi son üründe meydana gelen sülfür bileşikleridir. Fakat deve kimozenin kullanımı ile bunun önüne geçildiği için deve kimozenine olan talep artmıştır. Ayrıca yapılan birçok araştırmada deve kimozenin C/P değerinin en çok kullanılan sığır kimozenine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özellikle deve kimozenin termostabilitesinin diğer kimozen kaynaklarına göre oldukça yüksektir. Deve kimozenini yüksek sıcaklıklarda stabilitesini koruyabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı peynir endüstrisinde kullanılan çoğu proses için dayanıklı bir kimozen kaynağı olduğunu göstermektedir. Sığır, yak, keçi vb. kimozen kaynakları gibi deve kimozenini de düşük pH' larda aktivite kazanırken, pH' nın yükselmesi ile aktivitesini kaybetmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı kimoziin çeşitlerinin C/P değerleri (Kappeler vd. 2006)

Rennet	Süt pıhtılaştırma aktivitesi (sığıır sütü kullanılarak) (% sığıır kimoziini)	Genel proteolitik aktivite (% sığıır kimoziini)	C/P değeri
Deve kimoziini	170	25 ^a	7
Domuz kimoziini	25	12	2.1
Sığıır kimoziini	100	100	1
<i>M. pusillus</i> proteaz	33	147	0.22
<i>M. miehei</i> proteaz	19	149	0.13
Sığıır pepsin A	124	2731	0.05

2.2.1. Kimoziin kaynakları

Peynir üretiminde çok eski zamanlardan bu yana biyoteknoloji alanında enzimlere başvurulmaktadır. İlk peynir üretimlerinde kullanılan kimoziin sadece geviş getiren hayvanların dördüncü midelerinden elde edilmekteydi (Jensen vd. 2013). Çoğunlukla süt hayvanlarının buzağısının midelerinin dördüncü bölümünden ekstrakte edilmektedir (Luo vd. 2016).

Günümüzde ticari kimoziin dört farklı kaynaktan elde edilmektedir. Bunlar hayvansal, bitkisel, mikrobiyel ve rekombinant olarak üretimle elde edilmektedir (Jiang vd. 2013). Peynir endüstrisinde bu kaynakların hepsine hemen hemen yer verilmektedir. Peynir üretimindeki en önemli sorun ise bu kombinlerin dünya çapındaki talebi karşılayamıyor olmasıdır. Bu talep sıkıntı ciddi sorunlara yol açmaktadır ve sebebi dana hayvansal kimoziin üretimindeki küçülmelerdir. Bu yüzden alternatif bitkisel, mikrobiyel ve rekombinat kaynağa yönelim artmıştır (Attalah 2007; Vallejo vd. 2008).

Hayvansal kaynaklı kimoziinler: inek, sığıır, deve ve domuz kimoziin geni süttten kesilmemiş hayvanların dördüncü midesinden elde edilmekte ve geleneksel olarak peynir endüstrisinde süt pıhtılaştırılmasında kullanılmaktadır. Keçi, koyun ve tavşan gibi hayvanlarda iyi bir kimoziin kaynağı olmasına rağmen ticari açıdan geniş bir şekilde araştırılmamıştır (Attalah 2007). Hayvansal kimoziinler; peynire iyi bir tat ve tekstür verdiği için peynir endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünya çapında yaklaşık 20 yıldır; her yıl %4 oranında (bu da yaklaşık olarak 13,533 milyon ton) rennete olan talebin artması buzağı renneti kaynaklarını önemli ölçüde azaltmıştır (Neelakantan vd. 1999). Hayvansal kimoziin kaynakları dünya talebini karşılayamadığı ve hayvanlarda var olan riskli enfeksiyona sebebiyet verebilecek mikroorganizmaların varlığından dolayı alternatif kaynaklara yönelim artmaktadır (Vallejo vd. 2008).

Bitkisel kaynaklı rennet özellikle belirli bir coğrafi bölgelerde yetişen artichoke gibi bitkilerden üretilmektedir. Diğer kısıtlayıcı özelliği ise spesifik peynir üretimlerinde kullanılıyor olmasıdır. Bitkisel koagülant kullanılarak üretilen peynirler belirli bir coğrafi alana özgüdür. Örneğin bu peynirlerin üretiminde artichoke çiçekleri (*Cynara scolymus*), incir ağacı (*Ficus carica*) bitkileri kullanılmaktadır (Jiang vd. 2013; Vallejo vd. 2008).

Mikrobiyal rennet buzağı kimozinin yerini almaya başlamıştır. Dünyada peynir üretiminin yarısından çoğunda kimozin kaynağı olarak tercih edilmektedir. Bakteri ve mantarlar mikrobiyal olarak potansiyel rennet kaynaklarıdır. Günümüzde endüstride mikrobiyal rennetler; özellikle *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* ve *Irpex lacteus* gibi mantarlardan üretilmektedir. Bu tip rennetler düşük seviyede de olsa proteaz içermektedir. Mikrobiyal rennetlerin yarattığı problemler ise, peyniraltı suyundaki protein ve yağ kaybı, pıhtıdaki sertliğin yarattığı zorluklara örnek verilebilir. Sonuç olarak mikrobiyal rennetler peynir üretiminde verim düşüklüğüne peynirde istenmeyen koku ve acı tata sebep olabilmektedirler (Mohantty vd. 1999; Vallejo vd. 2008).

Diğer yaygın bir şekilde kullanılan rennet ise rekombinant kimozindir (Luo vd. 2016). Rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan organizmalar: *Saccharomyces cerevisia* ya da *Kluyveromyces lactis* gibi mayalar ve *Trichoderma reesei* ya da *Aspergillus oryzae* gibi funguslar rekombinant kimozin üretiminde kullanılmıştır (Vallejo vd.2008). Maya model sistemlerinde rekombinant rennin üretimi; kültür ortamının litre başına 30-40 mg olabilirken, bazılarında ise 3.3g enzim üretildiği görülmüştür (Neelakantan vd. 1999). *P. pastoris* özellikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için mükemmel özelliklere sahip bir mayadır (Zeveda vd. 2018).

2.3. Metilotrofik mayalar ve üretim sistemleri

Büyük proteinler genellikle ökaryotik hücrelerde üretilirken; küçük proteinler prokaryotik sistemlerde üretilir. Mayalar; tek hücreli ökaryotik fungal organizmalardır. Bu organizmalar sıklıkla rekombinant protein üretiminde kullanılmaktadır

Metilotrofik mayalar rekombinant protein üretiminde host kullanımında oldukça ilgi çekici olmuşlardır. Bunun en önemli sebeplerinden biri genlerin ekspresyonunda; en güçlü maya promotörler tarafından kontrol edilmesidir. Bu mayalar; 130 g/l hücre ağırlığına kadar büyüebilmektedirler. Bilinen dört metilotrofik maya; *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis*'dir. Bunların ortak yanı da yaygın metabolik yolu kullanmalarıdır. Böylece karbon kaynağı olarak sadece metanolü kullanırlar.

En ucuz, kolay ve hızlı protein üretimi *E.coli*'de gerçekleştirilir. Bu bakteri; çok büyük proteinleri üretmez. Ayrıca posttranslasyonel modifikasyonlar gerektiren üretimlerde bu host sistemi kullanılamaz. Bunun için protein ekspresyonunda en çok iki mayadan yararlanılmaktadır. Bu temel iki maya; *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris*'dir. Mayalar, yüksek miktarda heterolog protein üretimini düşük maliyete sentezleyebilen host sistemleridir. Aynı zamanda 50 kDa'dan büyük proteinleri üretebilirler, sinyal sekanslarını uzaklaştırabilirler ve glikolizasyonu gerçekleştirebilirler.

Maya ekspresyon sisteminin en büyük avantajları: düşük maliyet, yüksek hücre yoğunluğu, yüksek üretim, besiyeri içinde hızlı büyüme, memeli hücrelerine benzer ürün prosesleri, devamlılık, izotopik etiketle etiketlen proteinlerin üretimi için uygun olması gibi önemli avantajları bulunmaktadır. Maya ekspresyon sisteminin genetiği iyi karakterize edilmiştir. Özellikle bu ekspresyon sistemi; memeli hücreleri ya da böceklerle çalışmaktan daha kolay ve ucuz bir sistemdir. Fermantasyon prosesleri için kolayca adapte olabilmektedir (Demain vd. 2009)

2.3.1. *Pichia pastoris* mayası ve üretim sistemi

Bu maya ilk kez 1919'da Guilliermond tarafından tanımlanmıştır. Onun tanımına göre morfolojik olarak oval, küresel, tek ya da çiftler halindedir. *Pichia pastoris* anaerobik, fakültatif ve metilotrofik bir maya olup metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen bir mayadır (Zepeda vd. 2018).

E.coli; heterolog protein üretimi için yaygın bir şekilde kullanılan ilk hostlardan biridir. Bu hostun avantajları; hızlı büyüme, hızlı üretim kabiliyeti, kültürün kolaylığı ve yüksek oranda üretimin olmasıdır. Birçok ticari enzimin üretilmesinde kullanılmıştır. Bu sistem glikolize olmayan proteinlerin üretimi için mükemmel bir sistemdir. Aynı zamanda *E. coli* genetiği çoğu mikroorganizmaya göre daha iyi anlaşılabilir. Son zamanlardaki *E. coli*'deki transkripsiyonun temel mantığının anlaşılması, translasyon ve protein katlanmasının anlaşılması ile bu bakteriyi diğer karmaşık ökaryotik sistemlerden daha değerli yapmıştır. *E. coli* genomu hızlı ve kolay bir şekilde modifiye edilebilmektedir. Promotor kontrolü zor değildir. Aynı zamanda plazmid kopya sayısı kolay bir şekilde değiştirilebilir (Demain vd. 2009).

Bu sistemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle yüksek hücre yoğunluğunda; asetat birikimi toksik etki oluşturmaktadır. Fakat bu durum oksijen seviyesini kontrol edilmesi ile aşılabilmektedir (Petsch vd. 2000). *E.coli* sisteminin geliştirebilmek için; ekspresyonu düzeltmek için farklı promotorlar ve host strainleri kullanımı, sıcaklığın düşürülmesi, protein sentez hızının düşürülmesi, geliştirilen besiyerinin değişimi, protein fragmentinin ekspresyonu, laboratuvar ortamında denatürasyon ve proteinin yeniden katlanması gibi önlemler alınmalıdır (Demain vd. 2009).

Yabancı kodlama sekansının inserti için çoğunlukla *E. coli* kullanılmaktadır. Bu yüzden *Pichia*'nın bütün üretim vektörleri *E. coli/P. pastoris* shuttle vektörleri olarak dizayn edilmektedir (Li vd. 2007). *Hispidalin benincasa* Hispida çekirdeklerinden izole edilen bir antimikrobiyeldir. Büyük ölçüde üretim için; ilk kez başarılı bir şekilde *E. coli* ve *Pichia pastoris* mayasında üretimi gerçekleştirilmiştir. Fakat rekombinant hispidalin *E. coli* hücreleri testler sonucunda antimikrobiyel aktivite göstermemişken; *P. pastoris* 'de üretilen rekombinant hispidalin antimikrobiyeli aktivite göstermiştir (Meng vd.2019).

Geçmişte yaygın bir şekilde kullanılan ilk ökaryotik ekspresyon sistemi ise *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Bunun başlıca sebebi ise genetiği üzerine geçmişte yeterli çalışma ve bilginin bulunmamasıdır. Fakat bu üretim sistemi büyük ölçekli üretimler için her zaman uygun değildir. Bunun sebepleri ise; üretim esnasında plazmid kayıpları, aşırı glikolizasyon ve düşük protein verimidir (Meagher vd. 2000).

Bu sebeplerden dolayı *Pichia* üretim sistemine yönelim artmıştır. *P. pastoris*'in birçok avantajlarının yanı sıra modern biyolojide iyi karakterize edilmiş üretim sistemlerinden biri olan *S. cerevisiae* ile benzerliği de host sisteminin başarısını arttırmıştır (Cregg vd. 2007). *P. pastoris* rekombinant protein üretiminde başarılı ve geniş bir şekilde kullanım alanına sahiptir. *P. pastoris* üretim sistemi diğer ökaryotik ve prokaryotik sistemlere göre birçok avantajı bulunmaktadır (Li vd. 2007). Heterolog protein üretiminde *P. pastoris* mayası yüksek başarı göstermektedir. Bu yüzden de çokça tercih edilmekte ve birçok faktörü bulunmaktadır. Bunlar;

1. Mayaya uygulanan genetik moleküler manüplasyonlarının kolaylığı ve modern biyolojide iyi karakterize edilmiş üretim sistemlerinden biri olan *Saccharomyces cerevisiae* ile benzerliği (Noseda vd. 2013).

2. Çeşitli postranlasyonel modifikasyonlara sahip olmasıdır. Bunlara; polipeptid katlanması, glikolizasyon, metilasyon, açilleme (asilasyon) örnek verilebilir.

3. Hücre içi bölgeleri hedefleyerek hücre dışına protein salgılamasıdır (Li vd. 2007).

4. Ekspresyon sistem kitinin ticari olarak varlığı söylenebilir (Noseda vd. 2013).

5. Hızlı büyüme hızı sayesinde yüksek hücre ağırlığına ulaşmasıdır. Ürettiği proteinin çoğu rekombinant proteindir. Endotoksin ve bakteriyofaj kontaminasyonlarını elemine etmektedir (Li vd. 2007).

6. Aynı zamanda *P. pastoris*'den; protein pürifikasyonu basittir. Bu yüzden maya tarafından besiyere salgılanılan ve çözünebilir proteinler; direk olarak santrifüj yoluyla pürifikasyonu yapılmaktadır. Örnekler konsantre edilebilir ve saflaştırılabilir. Bunun için kullanılan yöntemler ultrafiltrasyon, çöktürme ya da elüsyon (yıkama) kromatografidir (Li vd. 2007).

P. pastoris 'de yabancı bir genin üretimi üç aşamadan oluşmaktadır. Birincisi; istenilen genin üretim vektörüne konulması, ikincisi üretim vektörünün *P. pastoris* genomu ile bütünleşmesi ve son olarak da üretilen yabancı genin seçimidir (Cregg vd. 2007). *P. pastoris* 'de yabancı bir genin üretimi üç aşamadan oluşmaktadır. Birincisi; istenilen genin ekspresyon vektörüne konulması, ikincisi klonlama vektörünün *P. pastoris* genomu ile bütünleşmesi ve son olarak da üretilen yabancı genin seçimidir (Cregg vd. 2007).

P. pastoris metilotrofik bir mayadır ve rekombinant protein üretimi için başarılı bir host olarak kullanılmaktadır. Geçen son yıllarda *PAOX1* promotörünün düzenlenmesiyle; heterolog protein üretim sistemleri ve fermentör prosesleri geliştirilmiştir (Karaoğlan vd. 2016).

Pichia üretiminin başarılı olmasının temel iki sebebi bulunmaktadır. Birincisi *AOX1* geni sayesinde, güçlü metanol indüklemsi sağlayan bir promotora dolayısıyla ekspresyon genine sahip olmasıdır. İkincisi *Pichia*'nın fermantasyondan ziyade solunum esnasında yüksek hücre yoğunluğu prosesleri esnasında etanol ve asetik asit

üretiminden kaçınılmaktadır. Buna ek olarak *Pichia* memelilerde bulunan kanser ya da virüs nükleik asitleri içermez (Nosedo vd. 2013).

P. pastoris'te *AOXI* promotörü altında protein üretimi üç aşamadan oluşmaktadır. Bunların ilki gliserol kesikli faz, ikincisi gliserol yarı kesikli faz ve sonuncusu metanol indüklemeye fazıdır. Metanol indüklemesi *AOXI* promotörü altında olur ve rekombinant protein sentezi yapılır (Parashar ve Satyanarayana 2016). Bu aşamaları detaylı bir şekilde anlatmak gerekirse;

1.aşama: Fermente edilmeyen karbon kaynakları kullanılır ve bu kaynaklar azalınca kadar hücreler büyümeye devam ederler. Bu aşamada kullanılan karbon kaynağı glikoz veya gliseroldür.

2.aşama: Bu aşama gliserol yarı kesikli fazdır. Besleme için ile gliserol ilave edilir. Amaç hücre büyüme sınırlandırılarak biokütle optimize etmektir. 1-10 ölçek büyütme yapılmaktadır.

3.aşama: İlgili gen için indüklemeye yapılır. Eğer kullanılan promotör *AOXI* ise fermantasyon kültürüne metanol ilave edilir. Üretim hacmi 10 kat artırılarak hücrenin büyüme hızı, metabolik hızı ve salgılanılan protein üretimi optimize edilmektedir.

Mayadan protein üretimi fermantasyonunda çok aşama kullanılarak büyük oranda artırılması amaçlanmaktadır. Fermantasyonu birçok faktör etkilemektedir. Bunlar üretilen maya, besiyerinin içeriği, vektör tipi ve besin olarak kullanılmayan faktörler olan; kültür pH, karıştırma hızı, çözünmeyen oksijen, metanol indüklemesi ve fermantasyon stratejileridir. *P. pastoris* geniş bir asidik pH' ta (3.3-7.0) gelişim göstermektedir. Mayanın bu özelliği pH ayarlanacağı zaman; kültür besiyerine salgılanan proteinin degradesyonu minimize edilmesine yardımcı olmaktadır.

P. pastoris üretim kasetinde; promotör sekansı (sıklıkla *AOXI* promotörü), replikasyon orijini, terminal transkripsiyonel sekansı, poli A kuyruğu sekansı ve tekli ya da çoklu klonlama bölgesi bulunmaktadır (Li vd.2007). *P. pastoris*, mevcut ve güçlü promotörler varlığında, hücre içinde ve dışında yüksek miktarda g/l seviyesinde rekombinant protein üretimi yapabilir (Ahmad vd. 2014).

P. pastoris birçok promotöre sahip olmasına rağmen en sık kullanılan *AOXI* ve *GAP* promotörleridir. *AOXI* indüklenebilen bir promotörü iken, *GAP* yapısal promotördür (Karaoğlu vd. 2015). Toksik proteinlerin üretimi için yapısal yerine, indüklenebilen promotörler tercih edilmektedir. Protein ekspresyonundan önce biriken biyokütle üretim fazından ayrılır. Bu nedenle, hücreler, büyüme fazında rekombinant proteinin birikmesi ile strese girmez. Hedef protein oluşmadan önce proteinlerin birlikte üretimi sağlayabilir. Ayrıca bu kurucu promotör, prosesin yönetimini kolaylaştırabilir. Bu promotör seleksiyon markerını ekspres etmek için kullanılabilir. Metabolit akışını kontrol etmek için kullanılabilir (Ahmad vd.2014).

İndüklenebilen promotörlere örnek olarak; *AOXI*, *DAS*, *PEX8*, *ICLI* ve *FLDI* verilebilir fakat *PEX8* ve *ICLI* düşük üretim seviyesi gösterdiklerinden dolayı yaygın kullanılmamaktadır (Vogl ve Glieder 2013). Bu promotörlere alternatif olarak Alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotörü da kullanılabilir. *ADH3* yalnızca etanol

kullanmaktadır. Minimal etanol besiyerinde gelişme gösterebilmektedir. Bu *ADH3* geni etanol metabolizmasında rol oynamamaktadır (Karaoğlan vd. 2016).

Çizelge 2.2. *P. pastoris* promotorları (Vogl ve Glieder 2013; Özçelik vd. 2019)

Gen adı	Gen ürünü	Regülasyonu	Ekspresyon seviyesi
<i>AOX1</i>	Alkol oksidaz 1	Metanol indüksiyonu	Güçlü
<i>ADH3</i>	Alkol dehidrogenaz	Etanol İndüksiyonu	Güçlü
<i>GAP</i>	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	Yapısal	Güçlü
<i>DAS</i>	Dihidroksiaseton sentaz	Metanol indüksiyonu	Güçlü
<i>FLD1</i>	Formaldehit dehidrogenaz	Metanol ve metilamin indüksiyonu	Güçlü
<i>ICL1</i>	İsositrat liyaz	Etanol	
<i>PET9</i>	İç mitokondiyal membranda ADP/ATP taşıyıcı	Yapısal	%10-1700 (P _{GAP})
<i>PEX8</i>	Peroksizomal matriks proteini	Metanol/ oleat indüksiyonu	Zayıf
<i>TEF1</i>	Translasyon uzama faktörü 1	Yapısal	Güçlü
<i>YPT1</i>	GTPaz	Yapısal	Zayıf

FLD1 promotoru ise *P. pastoris FLD1* geninden gelmektedir. Bu promotor; ya metanol gibi bir karbon kaynağı (amonyum sülfat ile nitrojen kaynağı olarak) ya da metilamin gibi nitrojen kaynağı ile (glikoz ile) indüklenebilir. Fakat besiyerindeki glikoz ve amonyum sülfat ile baskılanır. Bu yüzden bu promotor ile yüksek seviyede protein üretiminde; metilamin ile indüklenme esnekliğine ve pahalı olmayan nitrojen kaynaklarına sahiptir.

PEX8 ve *YPT1* promotorları ile üretim seviyeleri yönetilmek istenildiği zaman kullanılan oldukça yararlı promotorlardır. *PEX8* geni peroksimom biyogenesis için gerekli olan, peroksimol matriks proteini kodlar. Metanolde *PEX8* promotorunun üretim seviyesi, *FLD1* ve *AOX1* promotorlarından önemli ölçüde düşüktür. *YPT1* geni, sekresyondaki GTPase içereni kodlar (Li vd. 2007). Bütün *Pichia* üretim strainleri NRRL-Y 11430 (northern regional research laboratories, peoria, IL) tarafından sağlanmaktadır.

Klasik ve moleküler genetik teknikler *Pichia* için geliştirilmesine rağmen; moleküler genetik manipülasyonlar için birkaç seçici marker tanımlanmıştır. *HIS4* genindeki çoğu mutasyon; transformasyonda *HIS4* geni içeren üretim vektörlerinin

seçilimini sağlamaktadır. Biyosentetik markerlar; *HIS4*, *ARG4 ADE1* ve *URA3* tür. İlaç direnç markerları ise; *kanR* geni ve *Sh ble* geni, zeosin ise G418 direnç sağlar.

P. pastoris sferoplast füzyonu ya da tüm hücrelerin elektroprosyonu gibi yöntemle ya da DNA' nın lityum klorid gibi kimyasallar ile çöktürülmesi ile transforme edilebilir. Bunların arasında en basit ve hızlı yöntem olarak elektroporasyon kullanılmaktadır. Fakat yüksek sayıda transforme olmuş kopya sayısı isteniyorsa, istenilen genin entegre olması için sferoplast füzyonu tavsiye edilir. Vektörün toplam kopya sayısını belirlemek için, toplam genomik DNA ilk önce izole edilir ve Southern analizi ile de kopya sayısı belirlenir (Li vd. 2007).

2.3.2. *GAP* promotörü

GAP glikoliz için anahtar bir enzimdir. Bu enzimin promotörü; güçlü yapısal bir promotördür. İlk olarak 1997 yılında izole edilmiştir. Bu geni kodlayan proteinin moleküler ağırlığı yaklaşık 35,4 kDa (333 aminoasit) bulunmuştur. *GAP* promotörü yaklaşık 500 bp uzunluğundadır. *pGAP* bakteri, maya, böcek ve memeli organizmalardan heterolog protein üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabilir.

P. pastoris genomu sadece bir tane *GAP* genine sahipken; *S. cerevisiae* ise üç tane gene sahiptir. *GAP* geninin sekansına bakılacak olunursa beklendiği gibi; protein databaselerinde ökaryotik ve prokaryotik *GAPDHs* gen sekansının oldukça benzer olduğu görülmüştür. En yüksek benzerlik; *S. cerevisiae* *TDH1*, *TDH3* ve *TDH2* 'i genlerinde bulunmaktadır (Waterham vd. 1997).

GAP promotörü; *P. pastoris* gliseraldehit -3fosfat dehidrojenaz geninin ekspresyonundan sorumlu DNA bölgesidir (*GAP*). Bu promotörün kullanım avantajları; metanol indüklenmesine ihtiyaç duymaması ya da tek bir karbon kaynağına ihtiyaç duyduğu için kültür değişiminin gerekmemesi ve protein üretimi için daha uygun ve kolay olmasıdır.

Eğer kültür tek bir karbon kaynağı ile sınırlı ise, NMR çalışmaları için etiketlenmiş proteinlerin ekspres edilebilmesi için *GAP* promotörü uygun bir seçenektir. *GAP* promotörü yapısal olarak üretildiği için; her proteinin üretimi için doğru bir seçenek olmayabilir. Bu duruma toksik proteinlerin üretimi örnek gösterilebilir (Li vd. 2007).

GAP sistemi; metanol indüklemeli sistemlerde olduğu gibi metanol olmayan karbon kaynaklarını uzaklaştırmak için yıkama işlemine gerek duymaz. Böylece metanol depolamasındaki tehlikelerden ve maliyetinden korunmuş olunur. Bu durum büyük ölçekli heterolog protein üretiminde maliyeti düşüren etkili bir yöntemdir (Zhang vd. 2009).

GAP geni ve promotörü ilk kez *GAP* kontrol üretim vektörü; pHIL-A1 vektöründeki *pAOX1* yerine, *pGAP* yerleştirilerek pHWO10 vektörü olarak dizayn edilmiştir. Oluşan pHWO10 vektörü replikasyon orijini, ampisilin direnç geni (*E. coli* pbr322 vektöründen gelen), *P. pastoris* *HIS4* geni ve *AOX1* transkripsiyon sekansını; pGAP 'dan ayıran *EcoIR* bölgesinden oluşmaktadır. Bu bölge yabancı genin vektöre girebilmesi için bulunmaktadır.

pHWO10 vektörü genomik *HIS4* ya da *pGAP* loci integrasyonu için uygun bir vektördür. Daha sonra bu vektör *Pichia*'ya entegre edildikten sonra beta-lactamase; *pGAP* altında ekspres edilmiştir. Glikoz altında beslenen bu hücrelerin; yaygın bir şekilde başvurulmuş *AOXI* promotorundan daha yüksek hücre yoğunluğuna sahip olduğu görülmüştür. *pGAP* vektörü; pHWO10 başarılı bir üretim vektörüdür. Bakteriden *amp*, *bla*, *lacZ*; mayadan *AOXI* ve *PER6*, bitkiden *Gmdh*, böcekten *luciferase* geni ve memelilerden *PAF1*, *CPTI* ve *CPTII* genimi başarılı bir şekilde üretebilmiştir (Waterham vd.1997).

pGAPZ yapısal üretim vektörleri; hücre dışı ve salgılanmış üretim vektörleri içerir. Hücre içi üretim vektörleri; *pGAPZ A*, *pGAPZ B*, *pGAPZ C* iken hücre dışı üretim vektörleri *pGAPZalfaA*, *pGAPZalfaB* ve *pGAPZalfaC* 'dir. Bu vektörler sadece elektroporasyon transformasyon yöntemine uygundur. Spheroplasts transformasyon yöntemine uygun dizayn edilmemiştir. Çünkü bu vektörler sadece zoesin direnç geni taşırlar. Bu tür engellerin önüne geçebilmek için her iki transformasyon tipine de uygun olan *pGAP9K* vektörü tasarlanmıştır. Bu vektör *his4* içeren *Pichia* *pPIC9K* vektöründeki *pAOXI* yerine; *pGAP* yerleştirilmesi ile dizayn edilmiştir (Zhang vd. 2004).

2.4. *GAP* promotoru ile yapılan bazı çalışmalar

Birçok heterolog protein *GAP* promotoru altında, *Pichia* mayasında g/L seviyesinde üretilmiştir. Örneğin; rekombinant insan chitinase proteini, *GAP* promotoru altında *P. pastoris* 'de 200-400 mg/L seviyesinde üretilmiştir (Godrick vd. 2001).

Pichia'da promotor çalışmalarında ise; bakteriyel laktamaz geni yapısal promotor olan *GAP* altında üretilmiştir. *pGAP* altında glikozda büyüyen bakteriyel laktamaz hücrelerin sayısının; metanol indüklenebilir *AOXI* altında gelişen hücrelerden 2 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Waterham vd. 1997).

S-Adenosyl-L-methionine (SAM) sentez 2 geni *GAP* promotoru tarafından düzenlenerek *P. pastoris* GS115 suşuna transforme edilmiştir. Böylece rekombinant olarak ile yüksek seviyede SAM proteini elde edilmiştir. Optimizasyon sonucu yapılan ve 3 gün süren fermentasyon sonucunda rekombinant SAM hücrelerinin ağırlığı 2.49 g/L bulunmuştur (Yu vd. 2003).

Delroisse vd. (2005) yaptığı çalışmaya göre heterolog protein üretiminde *pGAP* promotoru; *pAOXI*' den daha etkili bir sistemdir. Bu çalışmada sentetik *Tribolium castaneum carboxylesterase* (TCE) geni; *P. pastoris pGAP* ve *pAOXI* üretim vektörleri ile mayada üretilmiştir. Bunun sonucunda engelli erlen üretiminde *pGAP*; *pAOXI* 'den 2 kat daha fazla protein ürettiği bulunmuştur (Delroisse vd.2005).

Genellikle yalnızca karbon kaynağı olarak *pGAP*' da glikoz ya da gliserol kullanılmasına rağmen, glikoz sadece enegleli erlen üretim kültüründe kullanılır. Yabancı bir genin büyük ölçekli olarak fermentörde üretiminde ise gliserol kullanılmaktadır. Diğer yapısal promotorlardan birisi olan *pTEF1* promotoru; *pGAP* promoturu ile kıyaslanmıştır. Her iki promotor altında bakteriyel lipaz *pTEF1* geni üretilmiştir. Bu gen yüksek glikoz konsantrasyonunda *pGAP* üretim sistemine benzer oranda ya da daha fazla seviyede rekombinant protein üretmiştir (Ahn vd. 2007).

Diğer bir çalışmada ise memeli peptid taşıyıcılardan hPEPT1 ve rPEPT2' i *pGAP* altında *Pichia*'da üretilmiştir. Bunun sonucunda hPEPT1 ve rPEPT2 proteinin *GAP* promotörü altındaki üretimi; *AOX1* promotörü altında yapılan üretimden 5 kat daha fazladır (Doring vd. 1998).

Fakat bazı yapılan çalışma sonuçlarına göre ise yüksek miktarda ürün üretiminde *GAP* promotörü yerine *AOX1* kullanımı tavsiye edilmektedir. Örneğin; bakteriyel b-glucuronidase (GUS) geninin; *AOX1* promotörü altındaki üretiminin (metanol besleme), *GAP* promotörü (glukoz) altındakinden 8 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Sears vd. 1998).

Yapılan diğer bir çalışmada *Pichia pastoris* mayasında *PADH3* promotörü altında *Aspergillus niger* ksilanaz geni (*XylB*) rekombinant olarak üretilmiştir. *Pichia pastoris* mayasında *PAOX1* ve *PGAP*, *PADH3* promotörleri altında gerçekleştirilen üretim sonuçları kıyaslanmıştır. *Aspergillus niger* ksilanaz geni (*XylB*) bu üç promotör altında shaker ve 5 litrelik fermentörde üretilmiştir. Fermantasyon sonucunda rekombinant protein miktarı en yüksek *PADH3* promotörü altında olurken, en düşük *GAP* promotörü altında gerçekleştirilmiştir. *ADH3* 'ün WCW(yaş hücre ağırlığı) değerleri; *GAP* promotörü ile benzer olmasına rağmen, protein üretimi *GAP*' da daha düşük oranda bulunmuştur(Karaoğlan vd. 2016).

Heterolog protein olan *Trichoderma reesei cellobiohydrolase Cel7A* ' nin *Pichia* 'da *AOX1* ve *GAP* promotörleri altında üretimi yapılmıştır. *Cel7A* geninin *AOX1* promotörü ile üretiminin daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Fakat üretilen enzimlerinin bir kısmının doğru bir şekilde katlanmadığı görülmüştür (Boer vd. 2000).

GAP promotörü altında *HBsAg* geninin *Pichia* ' da üretimi yapılacaktır. Bu yapısal üretim sistemi için; izole edilmiş çoklu kopyalar mevcuttur. Bunlardan dörtlü kopyaya sahip klon mayaya transforme edilmiştir. Üretim sonucunda gen dozajı ve *HBsAg* geni seviyesi arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür. Sonuç olarak dört kopya içeren klonların, tek bir kopya içeren klonlara göre daha fazla protein ürettiği görülmüştür (Vassileva vd. 2001).

Hohenblum vd. (2014)' nin yaptığı çalışmaya göre ise farklı bir sonuç bulunmuştur. Bu yapılan çalışmada insan *trypsinogen* geninin farklı kopya sayılarını içeren klonlar, *pGAP* altında *Pichia* ' da üretilmiştir. Yapısal promotör ile gerçekleştirilen üretim sonucunda; protein seviyesinin kopya sayısı ile ilgisinin olmadığı bulunmuştur (Hohenblum vd. 2004). Diğer bir çalışmada ise *AOX1* ve *GAP* promotörleri altında farklı gen kopya sayıları ile gerçekleştirilen üretim sonuçları kıyaslanmıştır. Kopya sayısının artırılmasının *GAP* promotöründe üretim seviyesinde herhangi bir etkisi olmadığını; indüklenebilir *AOX1* promotöründe ise üretim seviyesini azalttığı gözlenmiştir (Zhang vd. 2009).

İnan vd. (2007) yaptığı çalışmaya göre ise bunun iki temel sebebi bulunmaktadır. Gen kopya sayısının artması salgılanan doymuş proteini göstermektedir. Bu yüzden klonlar içindeki salgılanmış kopyanın azalması; çoklu kopyaya sahip genlerde saklanmaktadır. Fakat daha fazla veri gösteriyor ki; daha fazla gen kopyası; daha fazla ürüne sahip olmak demektir (İnan vd. 2007). Örneğin Clare vd. (1991)

tetanus toxin fragment C protein kopya sayısını arttırarak protein üretim seviyesini 6 kat arttırmışlardır (Clare vd. 1991).

S. cerevisiae' nin alfa-MF (matinfg faktör) faktörünün; *pGAP* üretim sistemi için hala uygun olup olmadığı tartışılmaktadır. Bunun için yapılan bir çalışmada insan *angiotatin* genini; alfa-mf sekresyon sinyali kullanılarak *P. pastoris* mayasında üretilmiştir. Üretim sonucunda 176 mg/l rekombinant protein salgılanmıştır (Zhang vd. 2007).

Olezdka vd. (2003) *PGAP* ekspresyon sisteminde a- mf kullanılarak rekombinant *Aqalysin I* sentezlenmiştir. Fakat doğal sinyal sekansına göre; *PGAP* a-mf ekspresyon sisteminde daha düşük protein salgılanmıştır. Bunun sebepleri arasında; membran ilişkileri, transkripsiyon üzerindeki a-mf sinyal sekansının etilkisi ya da *Aqalysin I* protein sekresyonu sebebiyet vermiş olabilmektedir (Olezdka vd. 2003).

Yapılan diğer bir çalışmada *GAP* promotörü altında *P. pastoris*'de sabit bir fermantasyon prosesi ile yüksek miktarda rekombinant insan *chitinase (rh-chitinase)* proteini üretilmiştir. Enzimin sabit olarak üretiminin devamı *P. pastoris GAP* promotörü altında; gliserol ya da glikozu karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Böylece fermantasyon sonucunda yaklaşık olarak 300 mg/l protein üretilmiştir (Goodrick vd. 2001).

Diğer bir çalışmada ise *PGAP* altında üretim seviyesini arttırmak için; yabancı proteinin üretiminde *AOXI* ve *GAP* promotör kombinesi kullanılmıştır. Bu çalışmada insan granulocyte-macrophage koloni-stimulating factor (*hGM-CSF*) geni; maya hostu olan GS115'e transforme edilmiştir. Bu çalışma sonucunda yapısal üretim vektörü ile hem yapısal hem de indüklenebilir üretim sistemi olan bir vektör oluşturulmuştur. Rekombiant protein *hGM-CSF*'i; yapısal- indüklenebilir üretim sistemi, yapısal üretim kasedinden 2 kat daha fazla ürettiği gözlenmiştir (Wu vd. 2003).

2.5. Peynir

Dünya'da gıda sektörü içerisinde süt ve süt ürünleri önemli bir yer kaplamaktadır. Bunlar içerisinde de, binden fazla çeşidi ile peynircilik sektörü ön sıralarda yer almaktadır. Peynir üretiminde kullanılan en önemli bileşenler süt ve peynir mayasıdır (rennin, kimozen).

Beyaz peynir yumuşak bir tekstürde, tuzlu ve ekşimsi tada sahip, salamura olgunlaştırılan ve en çok tercih edilen peynir çeşitlerinden biridir (Hayaloğlu ve ark. 2002).

Rennetin süte ilave edildiği zaman, süt içerisinde bulunan kazein proteinleri enzimatik açıdan kararsız bir hal alır. Reaksiyon sonucunda k-kazein iki bölüme parçalanır. Bu parçalar, kalsiyumparakazeinat ve kazeinomakropeptid (CMP) olarak adlandırılmaktadır. Gerçekleşen bu reaksiyon peynir üretiminin temel yapı taşı oluşturur. Peynir endüstrisinin önemli parametrelerinden biri de peynir mayası kuvvetinin (aktivitesinin) belirlenmesidir. Çünkü; ne kadar miktar mayanın ne kadar miktar sütü çöktürebileceğinin bilinmesi, ekonomik açıdan göz ardı edilemeyecek kadar

hayati bir parametredir. Günümüzde kullanılan standart maya kuvveti tayin yönteminde, görselliğe dayalı hala bazı zayıf ve önemli noktalar bulunmaktadır.

Peynir yapım aşamasında kullanılan maddeler; pıhtılaştırma başlatıcılar (starterler) ve doğal mayalar (rennin) olmak üzere iki parametredir. Pıhtılaştırma başlatıcılar (starterler), mikrobiyal yolla elde edilen pıhtılaştırıcılardır. Doğal mayalar (rennin) ise, henüz süt çağında olan buzağuların şirdeninden özel bir teknik ile elde edilmektedir. Şirden mayası, rennet veya rennin olarak isimlendirilmektedir (Budak ve Afşar 2011).

Bir mayanın kuvveti, bir birim (1 ml ya da 1 g) peynir mayasının sabit şartlarda (35°C' de 40 dakikada) pıhtılaştırabileceği rekonstitüe sütün hacmine (ml ya da g) oranı ile ifade edilir ve birimsizdir (g/g ya da mL/mL) (TSE 1996).

Peynir yapımında en önemli parametrelerden biri de randıman yani verimdir. Beyaz peynirin randımanı, üretimde kullanılan sütün alındığı kaynağa bağlı olarak değişmektedir. Koyun sütünden elde edilen taze beyaz peynirin verimi 26–28 kg/100 kg iken, inek ve keçi sütünden elde edilen peynirin verimi ise 15-16 kg/100 kg olarak saptanmıştır (Çelik ve Uysal 2009).

2.6. Kimozi enzim üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar

Genç ve yetişkin üç yakın dördüncü midelerinden prekimozi, prokimozi ve kimozi genleri izole edilerek, pPICZalfaA vektörü ile *P. pastoris* X33 hostunda üretimi yapılmıştır. Heterolog protein üretiminde en yüksek aktiviteyi prokimozi geni içeren maya (14.55 Soxhlet UNIT/mL) göstermiştir. Genç yakların dördüncü midesinden elde edilen bu genin varlığı, yetişkinlerdekinden 11.45 kat daha fazladır. Bu sonuçlara göre genç yak kimozi süt komponentlerini parçalamada önemli bir rol oynamaktadır. Heterolog kimozi proteini aktivasyona ihtiyaç duymadan, kültür süpernatantına salgılandığı için rennetin saflaştırılması için hücrelerin liziz edilmesine gerek duyulmamıştır. Bu durum; ürün üretimindeki basamakların ve zaman kaybının azalmasına en önemlisi de maliyetin düşmesine sebep olmaktadır (Luo vd. 2016).

Yapılan diğer bir çalışmada deve ve sığır kimozi genleri üretilmiştir. Bu çalışmanın asıl amacı; üretilen rennet kaynaklarının aktivitelerini, yapılarını, termal stabiliteilerini ve glikolizasyon modellerini araştırmaktır. Bunun için; enzimlerin farklı varyasyonları, hidrofobik interaksiyon kromatografisi ile izole edilmiştir. Ve bu varyasyon sebeplerinin enzimlerin glikolizasyonunda, N- terminal sekansları ve enzim aktiviteleri kaynaklı olduğu gözlenmiştir. Kalorimetre yoluyla sıcaklık farklılıklarının izlenmesi sonucu deve kimozinin termal stabilitesi sığır kimozinine göre oldukça yüksektir. Sığır kimozinin C/P oranı sığır sütüne karşı; kuzu, domuz, kedi ve foka göre daha yüksektir. Fakat bu çalışmada üretilen deve kimozinin C/P oranı sığır kimozininden yedi kat daha fazladır. En son olarak sığır kimozi; deve kimozinine göre çok düşük süt pıhtılaştırma aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Jensen vd. 2012).

Deve (*Camelus dromedarius*) kimozi ve *Bos taurus* kimozi geni *Aspergillus niger* hostunda üretilmiştir. Çalışmada sığır ve deve kimozinin karakteristik özellikleri incelenmiştir. Yapılan SDS- Page analizine göre deve kimozi geninin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 40 kDa olarak; sığır kimozi ise 35.6 kDa olarak bulunmuştur.

Fermentasyon üretimi 35 derecede, pH 5.5 maltoz beslemesi ile gerçekleştirilmiştir. Deve kimozi, sığır kimozi göre 7 kat daha fazla genel proteolitik aktivite göstermektedir. Termostabilitesini belirlemek için; örnekler 5- 65 derece aralığındaki sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. En yüksek proteolitik aktiviteyi deve 55 derecede gösterirken; sığır 52.5 derecede göstermektedir. Özellikle tipik peynir yapımı şartlarında (pH 6.6, 0–2 Mm CaCl₂), deve kimozi aktivitesi sığırinkine göre %80 daha yüksek bulunmuştur. Deve kimozi pH 2.0-3.8 arasında daha stabildir. Peynirde pıhtı oluşumunu arttırmak için; kalsiyum konsantrasyonunun artırılması deve kimozi aktivitesini azaltmaktadır (Kappeler vd. 2006).

Bu çalışmada buffalo, inek, deve ve domuz gibi dört farklı hayvan dokusundan, kimozi genleri izole edilmiştir. Bu farklı kimozi gen kaynakları SDS-PAGE’de görüntülenmiştir. SDS sonuçlarına göre ise; buffalonun ve ineğin molekül ağırlığı, 40 kDa, devenin 43 kDa; domuzun ise 30 kDa bulunmuştur. İnek ve buffalo rennetinde iki öne çıkan bant gözlenirken; deve ve domuzda sadece bir bant gözüküştür. Sığır kimozi 365aa, deve kimozi 381aa ve domuz ise 380aa içermektedir. Sığır, inek kimozi oldukça birbirlerine benzer özellikler gösterirken, deve ve domuz kimozinin oldukça farklı olduğu görülmüştür (Attallah 2007).

Yapılan diğer bir çalışmada deve calf renneti (CCR) ile buffalo calf rennetinin (BCR) moleküler ve immünojenik yapısı kıyaslanmıştır. SDS-PAGE analizine göre her iki kimozi de iki büyük bant gözüküştür. Bunlar deve için; 52 kDa ve 39 kDa iken buffalo için 50 kDa ve 35 kDa’dır. Bu çalışmaya göre deve kimozi, buffalo kimozi göre daha termostabil bulunmuştur. Optimum sıcaklıkları ise deve ve buffalo için sırasıyla; 50 ve 45 derece bulunmuştur. Her iki rennetin de süt pıhtılaştırma aktivitesi pH düşmesiyle birlikte artış göstermiştir. Deve renneti; pH 5.8-7.0 arasında aktivite göstermektedir. Fakat pH yükseldikçe aktivite düşmektedir. Özellikle pH 5.8-6.0 arasında büyük bir artış olmaktadır. Sütün içine NaCl eklenmesi, her iki rennet için de aktivitenin azalmasına sebebiyet vermektedir. Rennetlerin asetonla muamele edilmesinde ise, buffalo aktivitesi tamamen kaybolurken, deve kimozi aktivitesi etkilenmemektedir (Elagamy vd. 2000).

Birçok firma rennet üretiminde *E. coli* ile çalışmalar yapmıştır. Bunun en önemli sebeplerinden biri ise FDA tarafından *E. coli* K12 GRAS statüsünde kabul edilmesidir (Falamm 1991). Birçok çalışmada *E. coli* ve mayadan türetilen kimozi kullanılarak çeşitli peynirler yapılmıştır. Rekombinant kimozi üretiminde host olarak *Aspergillus niger*, *K. lactic* ve *E. coli* kullanılmış ve başarı ile sonuçlanmıştır. Başlıca peynir üreticileri; ticari peynirlerin (ambo, gouda, emmentale, cheddar, gruyere, edam, tilsiter, crasiote ve grana tipleri) rekombinant kimozi ile üretimi sonuçlarının, diğer geleneksel peynir üretimi sonuçları ile kıyaslandığında peynir kalitesinde önemli bir farklılığın bulunmadığını kaydetmişlerdir (Mohanty vd. 1999; Brusgard 1993).

Bu çalışmada sığır prokimozinin B’ nin aktivasyonu araştırılmıştır. Prokimozi farklı pH değerlerinde deneylere tabi tutulmaktadır. Özellikle pH 2.5 altında deney gerçekleştirildiği zaman, süt pıhtılaştırma aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Kimozinin optimum proteolitik aktivitesi pH 3.0 aralığında gerçekleşmektedir. Bu sonuca göre düşük pH’ ların zimojeni aktif forma dönüştürdüğü gözlenmiştir. Süt pıhtılaştırma aktivitesi ile proteolitik aktivitenin paralel meydana geldiği görülmüştür (Pedersen vd. 1979).

Diğer bir çalışmada ise deve prokimozin geni (1172 bp), *AOX1* promotörü altında, *P. pastoris* GS115 suşunda üretilmiştir. Engelli erlen üretiminde her 24 saatte %1'lik metanol eklemiştir. Fermantasyon sonucunda yaklaşık olarak 37 mg/L rekombinant protein üretilmiştir. Yapılan SDS- PAGE analizi sonucunda ise 42 kDa ve 45 kDa büyüklüğünde iki bant gözlenmiştir. Fakat süpernatantın N-glikosidaz (PNGase F) ile muamelesi sonucu 45 kDa büyüklüğündeki bant kaybolmuştur. Bu da gösteriyor ki rekombinant protein kısmen de olsa glikolize olmaktadır. Kimozin aktivitesi 20 °C' nin altında ve 70°C ' nin üstünde tamamen yok olmaktadır. Düşük pH'da prokimozin; mature ve aktif kimozine dönüşmektedir. Aktif kimozin; k-kazeini parçalayarak pH 5.04 ve 45-50°C sıcaklıkları arasında optimum süt pıhtılaştırma aktivitesi göstermektedir. Rekombinant enzimin aktif ve stabil olduğu geniş pH aralığı 2.5-6.5 iken; pH değeri 6.0'ın üzerine çıktıkça pıhtılaşma aktivitesi aniden düşmektedir. pH 6.5 değerinde ise aktivite gözlenmemiştir. Maksimum pıhtı aktivitesi 20-40 mM CaCl₂ arasında bulunmuştur. Büyük ölçekli 5 litrelik fermantasyon üretimi, 144 saat boyunca sürdürülmüştür. Fermantasyon sonucunda ise 300 mg/L rekombinant enzim üretilmiştir. Enzim aktivitesi 4000 U/mL bulunmuştur. Bunun sonucunda *P. Pastoris* hostunda aktif deve kimozin geni üretiminin; peynir endüstrisi için alternatif bir kaynak olduğu görülmüştür (Wang vd. 2015).

Bu çalışmada sığır prokimozin B geni, *AOX1* promotörü altında *P. pastoris* GS115 suşunda üretilmiştir. Sıcaklık ve pH'nın süt pıhtı aktivitesi üzerine etkisi incelenerek, enzimin optimum pH ve sıcaklığı bulunmuştur. Rekombinant kimozin için optimum pH 5.5 iken, sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca metanol indüklenmesi ile gerçekleştirilen heterolog protein üretiminde; spesifik büyüme hızının fermantasyona etkisi incelenmek istenmiş ve sabit spesifik büyüme hızının 0,01 h olması amaçlanmıştır. Metanol indüklenmesi ile gerçekleştirilen fermantasyon 96 saat boyunca sürdürülmüştür. Sabit spesifik büyüme hızında heterolog rekombinant protein üretiminin artış gösterdiği gözlenmiştir. Fermantasyon sonucu saflaştırılan kimozinin spesifik süt pıhtılaştırma aktivitesi 6400 IMCU/mg olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonucu 120 mg/l rekombinant kimozin üretildiği bulunmuştur. Ayrıca bu çalışma sonrası rekombinant sığır kimozinin *P. pastoris* mayasında fermentör medyası için düşük maliyetli karbon kaynağı olarak gliserolun kullanılabilmesi gözlenmiştir. Böylece maliyeti düşürmesinin yanısıra, biyoteknolojik proseslerin devamlılığı da sağlanabilmektedir (Noseda vd. 2014).

Bu çalışmada sığır prokimozin B geni, *AOX1* promotörü altında *P. pastoris* GS115 hostunda üretilmiştir. Rekombinant sığır kimozinini üretiminde; flask kültürü optimize edilmesi ve metanol indüklenmesi ile en yüksek seviyede pıhtılaştırma aktivitesi elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu yüzden üretim medyası düşük pH ayarlanmış, başlangıç periyodunda askorbik asit ve sorbitol eklenmiş ve üretim sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır. Metanol indüklenme evresinin başında, besiyere askorbik asit ve sorbitol eklenmesi hücre ağırlığı seviyesini ve süt pıhtı aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Bu optimizasyon çalışmaları sonucunda laboratuvar ölçekli bioreaktör üretim sonucunda; pıhtı aktivitesi 96 IMCU/mL iken 120 saatlik metanol indüklenmesi sonucu rekombinant protein üretimi 53 mg/L bulunmuştur. Optimizasyon çalışmaları sonucunda yüksek seviyede rekombinant sığır kimozin üretimi pH'sı; pH3 ve pH4 'de bulunurken; sıcaklığı 25°C bulunmuştur. Diğer bir metod olan yüksek performans jel filtrasyon kromatografisine 3 kDa hızlı ultrafiltrasyon yöntemine göre rekombinant

protein pürüfike ve konsantre edilmiştir. Bunun sonucunda proteinin spesifik aktivitesi 800 IMCU/Toplam, Abs 280nm bulunmuştur. Sonuçlara göre *S. cerevisiae*' den alınan α -mating sinyal faktörü sayesinde prokimozin geni hücre kültürüne salgılandığı gözlenmiştir (Noseda vd. 2013).

P. pastoris mayasında *AOXI* promotörü altında kimozin üretimi için indüksiyon için metanol gerektirecektir. Bu tür sorunların önüne geçebilmek için de yapısal promotör kullanımı ön plana çıkmaktadır (Waterham vd. 1997).Yapılan bu çalışmada sığır prokimozini geni; *GAP* promotörü altında pGAPZ α A vektörü kullanılarak *P. pastoris* GS115 hostunda üretilmiştir. DNA sekansına göre sığır prokimozinin moleküler ağırlığı 40.777 kDa olarak tahmin edilmesine rağmen; SDS-PAGE analizi sonucunda yaklaşık olarak 36 kDa büyüklüğünde tek bir bant gözükmiştir. Enzimin stabil olduğu sıcaklık 25-50°C iken, optimum sıcaklığı 37°C'dir. Enzimin stabil olduğu pH aralığı 2.0-2-6 arası iken; optimum pH 4.0'tür. Enzimin %24.2'si saflaştırıldıktan sonraki spesifik aktivitesi 3.705 U/mg bulunmuştur. Rekombinant kimozin Mn⁺², Mg⁺², Fe⁺³ ve Na⁺ gibi katyonlarla aktivite olurken, K⁺, Co⁺², Zn⁺² ve Ni⁺² gibi elementler tarafından inhibe edilmektedir (Jiang vd. 2013).

Bu çalışmada Cheddar tipi peynir üretiminde koagülant olarak deve ve buzağı rennet kaynakları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda deve kimozini ile yapılan peynirdeki olgunlaşma esnasındaki proteoliz aktivitesinin; buzağı kimozini ile yapılan peynirdekenden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Deve kimozini ile yapılan peynirlerde de bazı karakteristik özellikler tespit edilmiştir. Bu kimozinle üretilen peynirlerde sülfür yoğunluğu oldukça düşük olduğu için; daha az acı bir tat oluşmaktadır. Bunun yanısıra; buzağı kimozin ile yapılan peynirlerde; tekstürde büyük bir bozulma, daha fazla bir yumşak tekstür olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre; deve kimozini Cheddar peyniri yapımında etkili ve başarılı bir koagülanttir (Bansal vd. 2009).

Su buffalosuna ait (*Bubalus arnee bubalis*) preprokimozin, prokimozin ve kimozin genleri *GAP* promotörü altında alfa- mating faktörü kullanılarak, *P. pastoris* GS115 hostunda üretilmiştir. Böylece aktif buffalo rekombinant kimozini kültür süpernatantına salgılanmıştır. SDS- PAGE analiz sonucuna göre ise 36 kDa ve 40 kDa olmak üzere iki bant bulunduğu görülmüştür. Bu iki bant farklılığının varolması glikolizasyon mekanizmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Yalnızca rekombinant prokimozin sekansı içeren *Pichia pastoris* klonları; aktif kimozin üretmiştir. Enzimin optimum pH' sı 4.5 iken, optimum sıcaklığı 37°C olarak bulunmuştur. Bu çalışmada buffalo kimozin geni seçilme sebebi ise; *Bos taurus* kimozin kaynağına göre daha stabil bir enzim olmasıdır. Ayrıca bu çalışmada ilk kez; *Pichia pastoris* mayasında rekombinat kimozin üretimi için önceden laboratuvar ortamında bir aktivasyon işlemi yapılmasına ihtiyaç duyulmamıştır (Vallejo vd. 2008).

Keçi prokimozini *AOXI* promotörü altında; *P. pastoris* X33 hostunda başarılı bir şekilde üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermentör hücre kültürü; shakeflask kültürüne göre yaklaşık olarak 8 kat daha fazla bulunmuştur. SDS-PAGE sonuçlarına göre 41 kDa büyüklüğünde bir bant görülmüştür. Fermantasyon üretimi sonucunda en yüksek prokimozin aktivitesi 96. saatte bulunmuştur. Enzimin optimum olduğu pH 5.5' tir. Enzimin aktif olduğu sıcaklık 30-45°C' nin üzerinde; optimum sıcaklığı ise 35-38 °C'dir. Yapılan analizlere göre enzimin geniş pH ve sıcaklık aralığında stabil

kalabilmektedir. Bu durum bu enzimin peynir endüstrisindeki kullanım olasılığını arttırabilmektedir. Özellikle bu enzimin kullanımı ile yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen peynir üretim prosesleri hızlandırabilir. Rekombinant keçi kimozi; sığı/buzağı kimozininden sonra gelecek vaat eden alternatif bir kimozi kaynağıdır. Aynı zamanda keçi kimozi; sığı kimozine göre daha iyi katalitik proteoliz ve termostabilite gibi karakteristik özellikler göstermektedir (Tyagi vd. 2016).

Halen kullanılan standart maya kuvveti tayin yönteminde , görselliğe dayalı bazı zayıf noktalar bulunmaktadır. Hata ihtimalini arttırabilecek olan bu zayıflığın giderilebilmesi amacı ile cihaza dayalı yeni bir yöntem üzerinde çalışılmıştır (Budak ve Afşar 2011). Yeni yöntemde, sütün rennin (kimozi) ile reaksiyonu ile oluşan kazeinomakropeptid molekülü, Amberlite IRC86 zayıf asidik katyon değiştirici reçine tarafından tutulmuştur. Ardından Harding ve MacLean's (ninhidrin) yöntemi ile, pıhtılaşma sonrası sütün içerisinde bulunan primer amin azotu konsantrasyonundaki artış incelenmiştir. Bu artış ile pıhtı zamanı arasında geliştirilen bir formül yardımıyla, peynir mayası aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem, klasik peynir mayası aktivitesi tayin yöntemi ile kıyaslanmış ve standart sapmalar arasında anlamlı bir fark olmadığı anlaşılmıştır (Budak ve Afşar 2011).

Herhangi mayanın bir fermantasyonu sonucu oluşan ürünleri için medya içeriği oldukça önemlidir. Rekombinant buzağı kimozi *Kluyveromyces lactis*, GG799 hostunda üretimi için; besiyeri komponentleri response yüzey methodu kullanılarak optimize edilmiştir. Önceki çalışmalara göre en uygun karbon, nitrojen, tuz ve vitamin kaynağı sırası ile; glikoz, maya ekstraktı, KH₂PO₄ ve Ca D-Pantothenate'dir. Bu dört medya komponentinin optimize edilebilmesi için; merkez komposit dizayını ile response yüzey medodu kullanılmıştır. Rekombinant calf kimozi üretimi için gerekli olan optimum medya komponent içeriği; glikoz 29.84 g•L⁻¹, maya extract 19.85 g•L⁻¹, KH₂PO₄ 0.1 g•L⁻¹ ve Ca D-Pantothenate 4.49 mg•L⁻¹ olarak bulunmuştur. Bu medya içeriği ile fermantasyon 28°C, pH6 'da yapılmış ve üretilen rekombinant enzimin aktivitesi 722 U/mL olarak bulunmuştur (Feng vd. 2010).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Konukçu suşlar ve taşıyıcı plazmitler

Laboratuvarımızda mevcut olan pPICZ α ACM içerisinde bulunan deve prokimozin geni (*Camelus dromedarius*) enzim üretiminde kullanılmıştır. Plazmitlerin çoğaltılması amacıyla kimyasal transformasyona elverişli konukçu *E. coli* suşu olan XL1Blue (Invitrogen, CA, ABD) kullanılmıştır. Üretim çalışmaları için *Pichia pastoris* X33 (Invitrogen, CA, ABD) suşu kullanılmıştır. Tüm mikroorganizmalar %50 gliserol içeren uygun ortamda -80°C’de muhafaza edilmiştir. -80°C stokta bulunan GAP (500bç) promotörü içeren üretim plasmidi pGAPZ α A (3147bç) (Invitrogen, CA, ABD) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı Merck (Almanya) ve Sigma-Aldrich (MO, ABD) firmalarından, restriksiyon enzimleri ise Thermo Fisher Scientific (MA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Besiyerleri ve gelişim ortamları

P. pastoris suşlarının gelişiminde YPD (%1 maya özütü, %2 pepton, %2 glukoz) besiyeri, *P. pastoris* üretim suşunda deve kimozin üretiminde BYED (30 g/L yeast extract, 13.4 g/L YNB, 0.2 g/l biotin, 20g/L glikoz ve 1M sodyum sitrat buffer pH3; pH4; pH5 ve pH6) kullanılacaktır. *E. coli* suşların geliştirilmesinde LB Miller (%0.5 maya özütü, %1 pepton ve %1 NaCl) ya da LB Lennox (%0.5 maya özütü, %1 pepton ve %0.5 NaCl) besiyerleri kullanılmıştır.

3.2. Metot

Çalışmalarda kullanılan moleküler biyoloji teknikleri Sambrook ve Russel (2001)’a ve kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Ayrıca *P. pastoris*’de klonlama çalışmalarında İnan vd (2007) kaynak olarak kullanılmıştır.

3.2.1. Deve kimozin geni içeren pPICZ α ACM plazmidinin izolasyonu ve pGAPZ α A vektörünün doğrulanması

pPICZ α ACM plazmidini içeren *E. coli* XL1-Blue hücreleri -80 C’den alınarak amfisilinli LB Miller sıvı besiyerine inokule edilmiş ve 37 C’de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Transformant *E. coli* hücrelerinden plazmit izolasyonu Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen pPICZ α ACM plazmidini *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. Laboratuvarımızda daha önceden yapılan çalışmalarda pGAPZ α A vektörü izole edilmiş halde bulunmaktadır. Bu yüzden bu klonlama vektörüne sadece aynı kesim reaksiyonu kurulmuştur. Kesim reaksiyonlarından sonra elde edilen DNA parçaları %1’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Görüntüleme sonucu beklenen büyüklükte bantlar elde edilmiştir. Daha sonra istenilen prokimozin geni ve klonlama vektörü jelden kesilerek, jel ekstraksiyonu yapılmıştır.

3.2.2. Agaroz jel elektroforezi

Genomik DNA izolasyonlarının kalitesi, PZR ürünlerinin ve plazmidlerin kesim analizleri ile doğruluğunun kontrolünde agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken, 100 ml 1xTAE tampon çözeltisine (Tris-Asetat-EDTA, 1 mM EDTA, 40 mM Tris ve 20 mM asetik asit) %1 oranında 1 gr agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilerek mikrodalgada çözündürülmüştür. Biraz soğuduktan sonra içerisine 2 µl etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml, Invitrogen, CA, ABD) ilave edilmiştir. Uygun ebatta seçilen jel kalıplarına dökülerek jel donuncaya kadar bekletilmiştir. Jel katılaştıktan sonra jelin üzeri 1xTAE tamponu dökülmüştür. Daha sonra örnekler, 6X yükleme boyası ile karıştırılıp jel kuyucuklarına yaklaşık 10-15 µl yüklenmiştir. 100-120V'da 45-60 dakika 1xTAE tamponu içerisinde örnekler yürütülmüştür. DNA standardı olarak GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmış ve jele 5 µl yüklenmiştir. Etidyum bromürün UV ışınları altında (312nm) ışımaya yapmasıyla, agaroz jel içinde moleküler büyüklüklerine göre ayrılan DNA molekülleri jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat EBox-VX2, Fransa) görüntülenmiştir.

3.2.3. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu

Agaroz jelde yürütüldükten oluşan DNA bantları jelden kesilmiş ve jel pürifikasyonu MinElute Gel Extraction Kite (Qiagen, Germany) göre yapılmıştır. Kit talimatları doğrultusunda jel hacminin 3 katı kadar tampon eklenip jelin 55 C'de 10 dakika bekletilerek erimesi sağlanmıştır. Belirli miktarda sodyum asetat ve jel hacminde isopropanol eklenmiş, jel kolondan geçirilip santrifüjlenmiştir. Diğer solisyonlarda eklenip protokole göre işleme devam edilmiştir. Son aşamada membrana pH 8.0'de 10 mM Tris-Cl içeren 12 µl elüsyon tamponu eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 17900xg'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA parçasının elüsyonu yapılmıştır.

3.2.4. pGAPZaA vektörü ile prokimozin geninin ligasyonu ve *E. coli*'ye transformasyonu

Jel pürifikasyonu ile elde edilen ürünlerin ligasyonu yapılmıştır. Transformasyon için kompetent XL1-blue suşu kullanılacaktır. Ligasyon aşamasında vektör miktarının yaklaşık 3 katı kadar insert kullanılmıştır. Transformasyon işlemi Calcium Chloride metodu ile gerçekleştirilmiştir (Sambrook and Russell 2001).

3.2.4.1. DNA parçalarının plazmide ligasyonu

pGAPZaA plazmidi ve deveprokimozin genini kodlayan DNA fragmenti ligasyon işleminden önce *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Reaksiyon karışımı Çizelge 3.1 'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır. Ligasyon için toplam 10 µl içerisinde 50 ng vektör DNA, 150 ng insert DNA karıştırılmış, 1X T4 DNA ligasyon tamponu varlığında 5 U T4 DNA ligaz eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon sonrası ligasyon karışımının 1/10'u ile yetenekli *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transformasyon işlemine devam edilmiş, karışımın kalan miktarı -20°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. DNA parçalarının restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu

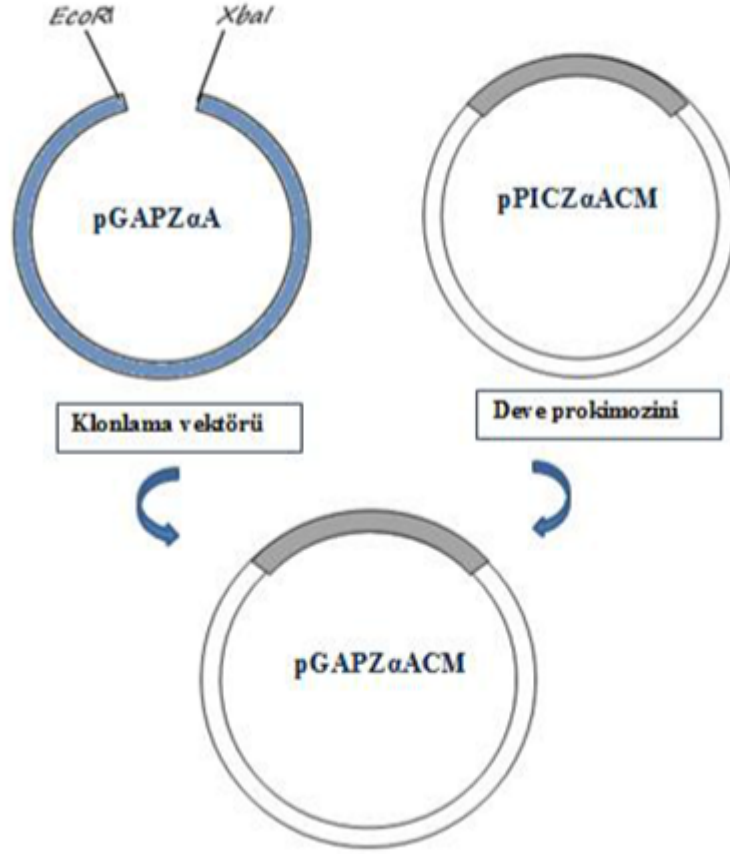
10X reaksiyon tamponu	10 µl
Restriksiyon enzimleri (EcoIR/XbaI)	4 µl/4 µl
DNA (Plazmid DNA)	10 µl
Steril su (NFW)	100 µl'ye kadar tamamlanmıştır

3.2.4.2. Yetenekli *E. coli* hücrelerine transformasyon

Buz üzerinde çözdürülen 100 µl yetenekli *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 plazmide 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 seçilerek 3 ml sıvı LB lenox (25µg/ml zeosin) besiyerinde 37°C'de bir gece çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Ligasyonda kullanılan reaksiyon içeriği

Malzeme	Miktar-Reaksiyon	Miktar-Kontrol
10X T4 ligasyon Tamponu	1 µl	1 µl
İnsert DNA	52ng (7 µl)	-
Vektör DNA	50ng (0.5 µl)	50ng (0.5 µl)
T4 DNA ligaz	1 µl	1 µl
Steril Su (NFW)	10 µl'ye tamamlanmıştır	20 µl'ye tamamlanmıştır



Şekil 3.1. Ligasyon aşaması

3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Ligasyon sonrası petri kutularındaki koloniler için sayım yapılmıştır. Plakalar incelendiğinde 500' lük zeosinli plakada hiç koloni gelişmediği görülmüştür. Bu yüzden 100 'lük zeosinli petri kutusunda gelişen kolonilerden 10 koloni seçilmiştir. Seçilen bu kolonilerden koloni PZR yapılmıştır. PZR analizi için; ileri primeri olarak 5'GAP ve geri primeri 3'AOX kullanılarak istenilen bölge çoğaltılmıştır

Çizelge 3.3. PZR ısı döngüsü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre (sn)
1.Denatürasyon	95 C	120
2.Bağlanma	95 C	20
3. Bağlanma	55 C	10
4. Bağlanma	70 C	20 35 kez 2.'ye git
5. Uzama	72 C	120
6.Bekleme	4 C	∞

Çizelge 3.4. PZR'de kullanılacak olan primerler

Primer	Sekans	Kaynak
R-3' AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC	Sentegen
F-5' GAP	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Sentegen

Reaksiyonun kontrolü, örneğin 5 µl'sinin 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılarak etidiyum bromür içeren %1 agaroz jelde yürütülmesi ve UV jel görüntüleme kutusunda hedef parçanın görüntülenmesi ile yapılmıştır. PZR sonrası elde edilen ürünler jelden kesilmiş ve jel pürifikasyonu yapılmıştır.

3.2.6. Plazmid izolasyonu

E. coli'den plazmid izolasyonu Qiaprep Spin Miniprep Kiti (MN, Germany) kullanılarak yapılmıştır. LB Lennox sıvı besiyerinde 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 18 saat geliştirilen hücrelerden 2 ml örnek alınmış ve 11000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatantı dökülüp pelete kitte verilen talimatlar doğrultusunda işlemler uygulanmıştır. İşlem sırasında plazmid DNA'nın miniprep kolonundan geçirilmesi ve kolona tutunması sağlanmıştır. Etanolü yıkama çözeltisinin kolondan geçirilmesi ile tuzlar uzaklaştırılmıştır. Elüsyon işlemleri pH 8.0'de 10 mM, 50 µl Tris ile yapılmış ve plazmid kolondan alınmıştır. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ölçülmüştür.

3.2.7. DNA ve plazmit konsantrasyonunun ölçülmesi

Elde edilen genomik DNA, PZR ürünü ve plazmit izolatlarındaki DNA konsantrasyonu Qubit dsDNA BR Assay Kiti (Invitrogen, CA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan Qubit tamponu, örnek ve boya karışımı ile hazırlanan

toplam 200 µl'lik karışım, 2 tane standarda karşı Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, CA, ABD) cihazında okutularak örneğin konsantrasyonu ölçülmüştür.

3.2.8. *P. pastoris* X33'e transformasyon

pGAPZαACM vektörü XmaJI restriksiyon enzimi ile lineer hale getirildikten ve saflaştırıldıktan sonra, Lityum Asetat transformasyon metodu (Wu and Letchwoth 2004) ile kompetent hale getirilen *P. pastoris* X33 suşuna aktarılmıştır. Elektroporasyon işlemi gerçekleştirmek için 80 µl'lik elektrokompotent maya hücrelerine 3-5 µg lineer DNA eklenerek pipetlenip karıştırılmıştır. Sonra buz soğukluğundaki 2mm elektroporasyon küvetine aktarılmış ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Cihazda 1500 V akıma 5 ms süre ile maruz bırakılmıştır. Hemen sonra 1 ml 1 M'lık soğuk sorbitol eklenerek 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 28 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Son olarak farklı zeosin miktarı içeren (100 µg/ml ve 500 µg/ml) YPD plakalar üzerine hücreler 200 µl ve 300 µl olacak şekilde yayılmıştır. 28°C'de etüvde 3 günlük inkübasyon süresinden sonra plakalarda oluşan koloniler YPD sıvı besiyerine ekilmiştir. Yeteri kadar gelişme sağlandıktan sonra hücrelerden gliserol stokları yapılmış ve pelletleri genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.9. Genomik DNA izolasyonu

Southern Blot analizinde kullanılacak olan *P. pastoris* suşlarından genomik DNA izolasyonu için MasterPure Yeast DNA Purification Kiti (Epicentre Biotechnologies, WI, ABD) kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonunda, YPD agar (%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %2 glukoz, %1,5 agar) üzerinde geliştirilen saf kültürdeki tek koloniden alınarak ekim yapılan ve 24 saat çalkalamalı inkübatörde 28°C'de 3 ml YPD sıvı besiyerinde geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Gelişen kültürlerden tüplere 2 ml örnek alınmış, 20000xg'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantı dökülüp pelet üzerine 200 µl liziz solüsyonu eklenerek resüspanse edilmiş ve maya hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Hücreler -80°C'de 20 dakika bekletilip 95°C'de 2 dakika tutulmuş ve bu işlem ard arda 5 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra 30 sn güçlü karıştırılmış ve üzerine 200 µl kloroform eklenmiştir. 2 dakika daha karıştırılmış ve dış macunu rengini aldığı anda 3 dakika santrifüjlenmiştir. Üstteki sıvı tabakadan alınarak içinde 400 µl %100 etanol bulunan yeni tüplere aktarılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 5 dakika santifüj edilmiş, peletin üzerine 500 µl %70 etanol eklenmiş ve 2 dakika daha santrifüj edilmiştir. Pelet alınarak 60°C'de 10 dakika vakumlu kurutucuda bekletilmiş ve sonra üzerine 20 µl TE tamponu eklenerek çözülmüştür. Üzerine 1 µl RNase enzimi ilavesi ile 37°C'de en az 1 saat inkübe edilerek RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.10. Gen kopya sayısının belirlenmesi (Southern Blot)

Southern blot analizi rekombinant *P. pastoris* suşlarının kontrolü ve plazmid DNA kopya sayısının belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. DNA parçalarının tayini için ilk olarak uygun prob tasarlanmıştır. Prob olarak belirlenen DNA parçasının uygun primer dizaynı ve kalıp DNA seçilerek gerçekleştirilmiştir. PZR tekniği ile prob bölgesinin çoğaltılması yapılmıştır. PZR ürünü olan DNA parçaları agaroz jele

yüklenerek elektroforez jel yöntemi ile kontrol edilmiş ve PZR pürifikasyon ile saflaştırılmıştır.

DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche, Almanya) ile üretici talimatlarına uygun olacak şekilde DNA etiketleme işlemi yapılmıştır. Kaynayan suda denatüre edilen DNA parçaları, buza alınan reaksiyon karışımı, DIG High prime tüpünden 4 l eklenerek, 37 C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu yapılan örneklerin konsantrasyonları ölçülerek 1µg DNA uygun restriksiyon enzimi (*ClA*) ile gece boyu kesim reaksiyonuna bırakılmıştır. Restriksiyon karışımına 1 l RNase enzimi eklenerek 2-3 saat inkübe edilmiş ve %0,8 agaroz jelde 100V akım değerinde 5 saat süre boyunca yürütülmüştür. Jel elektroforez ve x-ray görüntüsü için kullanılan markırlar GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) ve DNA Molecular Weight Marker II DIG-labeled (Roche, Almanya) kullanılmıştır.

Jel üzerinde ayrılan DNA bantlarına membrana aktarmadan önce denatürasyon ve nötralizasyon işlemleri yapılmıştır. 1,5M NaCl ve 0,5M NaOH' dan oluşan denatürasyon çözeltisinde 30 dakika boyunca çalkalamalı cihaz üzerinde yıkandıktan sonra, 1,5 M NaCl, 1 mM EDTA ve 0,5 M Tris-Cl (pH 7,5)' den oluşan nötralizasyon çözeltisinde yıkanmaya devam edilmiştir.

Jelden membrana aktarım pozitif yüklü naylon membran (Nylon Membranes, positively charged, Roche, Almanya) kullanarak gerçekleştirilmiştir. Aynı boyutlarda kesilen membran nötrale edilmiş jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlanan 10xSSC blotlama tamponunda (3 M NaCl, 0,3 M sodyum sitrat, 1 mM EDTA) yıkanmıştır.

DNA bantların jelden membrana geçişini sağlamak için emilim düzeneği kurulmuştur. Ters çevrilen jel üzerine sırayla membran, vatman kağıdı, ve kağıt havlular yerleştirilmiştir. 10XSSC tamponu (3 M NaCl, 1mM EDTA, 0,3 M sodyum sitrat) bu düzenekte DNA bantlarının 5-6 saat içinde jelden membrana aktarılmasında kullanılmıştır.

Düzenekten alınan membran crosslinker (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) cihazında, 3 defa 120mJ enerji seviyesi kullanarak DNA'ların membrana bağlanmasını sağlanmıştır.

Hibridizasyon solüsyonu (DIG Highprime DNA Labeling and Detection Starter Kit, Roche, Almanya) hazırlanarak hibridizasyon tüpündeki membrana 20ml kadar eklenmiş ve 41 C' de 1 saat ön hibridizasyonla muamele edilmiştir. Hibridizasyon solüsyonu içine DIG-etiketli prob ilave edilerek, 15 saat boyunca hibridizasyona bırakılmıştır.

Yıkama solüsyonları, yıkama solüsyonu I (2xSSC + %0,1 SDS) ve yıkama solüsyonu II (0,5X SSC + %0,1 SDS) şeklinde hazırlanarak membran yıkaması için kullanılmıştır. 1xDIG blocking solution içinde 1 saat bekletilen membran maleik asit yıkama tamponu (0,1 M Maleik Asit, 0,15 M NaCl, %0,3 Tween20, pH 7,5) ile 2 kez 5 dakika yıkanmıştır. DIG blocking solution içine anti-DIG antikor eklenerek 1 saat cihazda çalkalamaya bırakılmıştır. Bu aşamada maleik asit yıkama tamponu ile yıkama

işlemleri gerçekleştirerek, membrandan DIG blocking solution ve anti-DIG antikor uzaklaştırılmıştır. Membran 5 dakika dedeksiyon tamponu (0,1 M Tris (pH 9,5), 0,1 M NaCl) ile yıkanmış, şeffaf dosyanın arasına alınmış ve üzerine birkaç damla CSPDR çözeltisi damlatılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Membran X-ışını film kasetine yerleştirilerek 20-30 dakika arasında karanlık odada bekletilmiştir. Bu süre sonrası, kasetten alınan film Kodak film görüntüleme çözeltileri ile muamele edilerek görüntüleme yapılmıştır.

3.2.11. Protein üretimi

Southern Blott analizi ile filmleme sonucunda seçilen rekombinant *P. pastoris* klonu 3 ml YPD besiyerine inokulumu yapılmış, 225 rpm, 28°C'de 20 saat geliştirilmiştir. Gelişen klondan 250 ml'lik erlenlerdeki 50 ml BYED besiyerine başlangıç OD'si 0.1 olacak şekilde inoküle edilmiştir. Hücreler; 20°C pH 3, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0; , 24°C pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0 ve 28°C pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0 olmak üzere, 200 rpm'de 96 saat boyunca geliştirileceklerdir Erlenmayer denemeleri 3 paralelli olarak yürütülmüştür. Örnek medyası içerisine her 24 saatte yaklaşık %20'lik 2,5ml glikoz eklemesi yapılmış ve medyadaki glikoz miktarının %1 olması sağlanmıştır. Ayrıca 24 saatte bir medyadan 1 ml örnek alınmış santrifüj edilerek süpernatantı ayrılmış ve enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır. Hücreler 96 saat sonunda 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek hasat edilmiştir.

3.2.12. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi

Hücre yoğunlukları uygun besiyeri ile seyreltilen sıvı kültür örneklerinin 600 nm dalga boyunda absorbanslarının ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Tek kullanımlık spektrofotometre küvetleri ile Libra S50 (Biochrom, İngiltere) spektrofotometre cihazında okuma yapılmıştır.

3.2.13. SDS-PAGE analizi

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

Örnekler toplam hacim 50 µL olacak şekilde protein üretiminden alınan süpernatantların 1:3 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (%8 SDS, %40 Glycerol, 200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %0.4 Bromphenol Blue ve 0.1 M DTT) ile karıştırılarak hazırlanmış ve 70°C'de 10 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Sonra buz üzerine alınmış ve hazırlanan jele 10 µl'lik kısmı yüklenmiştir.

150 V'da 70 dakika yürütülmesi ile elektrofrez işlemi, 1XTGS (% 0.1 SDS, 0.192 M Glycine, 0.025 M Tris base, pH 8.3) tamponunda gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel ayrı bir kap üzerine alınarak boyama tamponu (0.1 g Coomassie blue 250, %10 asetik asit, %50 metanol, %40 H₂O) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış,

sonra boya içermeyen aynı özellikteki tampon (%10 asetik asit, %50 metanol, %40 H₂O) ile protein bantları görünür hale gelene kadar yaklaşık 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde yıkanarak boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra saf su ile 20 dakika yıkanmış ve jel LiCor (Odyssey) cihazına alınarak görüntülenmiştir. Protein standardı olarak PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır.

3.2.14. Kimozin aktivitesinin ölçülmesi

Kimozin aktiivtesini belirlemek için; 40Mm CaCl₂ (pH 6.5) içinde 26% (w/v) oranında yeniden yapılandırılan yağsız süt tozu 25±1 °C'de 30 dk karıştırılmış ve 37±1°C'de 20 dk boyunca ön inkübasyon uygulanmıştır. İçinde 1 mL süt bulunan test tüplerine her örnekten 20 µL eklenmiştir. Tüpleri çalkaladıktan sonra, köpürmesi engellenecek şekilde 37±1°C'de su banyosuna koyulmuş ve çökeltme süresi test tüpünün duvarında oluşan ilk çökelmeye göre belirlenmiştir. Kontrol olarak da içinde kimozin geni bulundurmeyen X33 klonu kullanılmıştır (Noseda vd. 2014; ISO 11815 IDF 157).

Enzim ünitesi(UNIT):

37 derecede 40 dk içerisinde, 1 ml süt solüsyonunu pıhtılaştırabilecek enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Jiang vd. 2013).

Soxhlet UNIT:

Rennet aktivitesi= Yağsız süt tozunun hacmi× 40/ rennet solüsyonun hacmi × zaman (Luo vd. 2016).

3.2.15. Toplam protein tayini

Süpernatant örneklerinde toplam protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak Coomassie plus Assay kit ile ölçülmüştür. Protein standardında sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu, örneklerle birlikte okutulan BSA standart çözeltilerinin (25-2000 µg/ml) absorban değerleri referans alınarak belirlenmiştir. 1.5 ml Bradford çözeltisi içine 50 µl süpernatant örneği koyulmuş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilerek 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbanları okunmuştur. Standart grafiğinden elde edilen formülden örneğin toplam protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.16. Optimum pH'nın enzim üretimine etkisi

En fazla enzimin üretildiği optimum pH'yı bulmak için, erlenmayerde 20°C, 24°C ve 28°C ve 225 rpm'de farklı pH'larda (pH 3.0; 4.0; 5.0 ve 6.0) üretim gerçekleştirilmiştir. Üretim 3 paralelli ve 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Örnek medyasına 24 saat arayla glikoz eklenmiş ve besiyerdeki glikoz miktarının %1 olması sağlanmıştır. Ayrıca 24 saatte bir besiyerden 1 ml örnek alınarak santrifüj edilerek süpernatantı ayrılmış ve enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır. Üretim 96 saat boyunca devam etmiştir. Fermantasyon üretimi için sıcaklık ve pH değerini bulmak için SAS programında faktöriyel analiz yapılmıştır. Böylece fermentör prosesi için gerekli olan pH ve sıcaklık değeri elde edilmiştir.

3.2.17. Deve kimozin enziminin karakterizasyon

3.2.17.1. Enzimin optimum pH'sının tespit edilmesi

Enzimin çalıştığı optimum pH'nın tespiti için pH 3-8.0 arasında 37°C'de çalışılmıştır. Tampon olarak pH 3 ve pH 6.0'da sodyum sitrat buffer kullanılırken; pH 7.0 ve pH 8.0 arasında potasyum fosfat buffer kullanılmıştır. Tamponlar 50 Mm konsantrasyonda hazırlanmıştır. Süpernatant örnekleri her pH'nın kendi tamponunda hazırlanmış ve daha sonrasında enzim aktivitesi yapılmıştır.

3.2.17.2. Enzimin pH stabilitesinin tespit edilmesi

Enzimin pH stabilitesinin tespiti için pH 3.0-8.0 arasında 37°C'de çalışılmıştır. Tampon olarak pH 3.0 ve pH 6.0'de sodyum sitrat kullanılırken; pH 7.0 ve pH 8.0 arasında potasyum fosfat bufferi kullanılmış ve tamponlar 50 Mm konsantrasyonda hazırlanmıştır. Süpernatant örneği her pH'nın kendi tamponunda hazırlanmış ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletilmiştir. Her bir pH'nın ilk ölçülen aktivitesi %100 olarak belirlenmiştir. 22°C sıcaklıkta iki saat bekletmenin sonrasında ölçülen değer kalan aktivite olmuştur ve % şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.17.3. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespit edilmesi

Enzimin çalıştığı optimum sıcaklığın tespiti için 20-80°C arasındaki sıcaklıklarda on derecelik aralıklarla çalışılmıştır. Süpernatant örnekleri hazırlanmış ve örnekler 20-80°C arasında farklı sıcaklıklarda bekletilerek belirli koşullarda enzim aktivitesi yapılmıştır.

3.2.17.4. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespit edilmesi

Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespiti için 20-80°C arasındaki sıcaklıklarda çalışılmıştır. Süpernatant örnekleri hazırlanmış ve enzim bu sıcaklıklarda 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra laboratuvarında belirli koşullarda enzim aktivitesi yapılmıştır. Her bir sıcaklığın ilk ölçülen aktivitesi %100 olarak belirlenmiştir. 2 saat bekletmenin sonrasında ölçülen değer kalan aktivite olmuştur ve % şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.17.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespit edilmesi

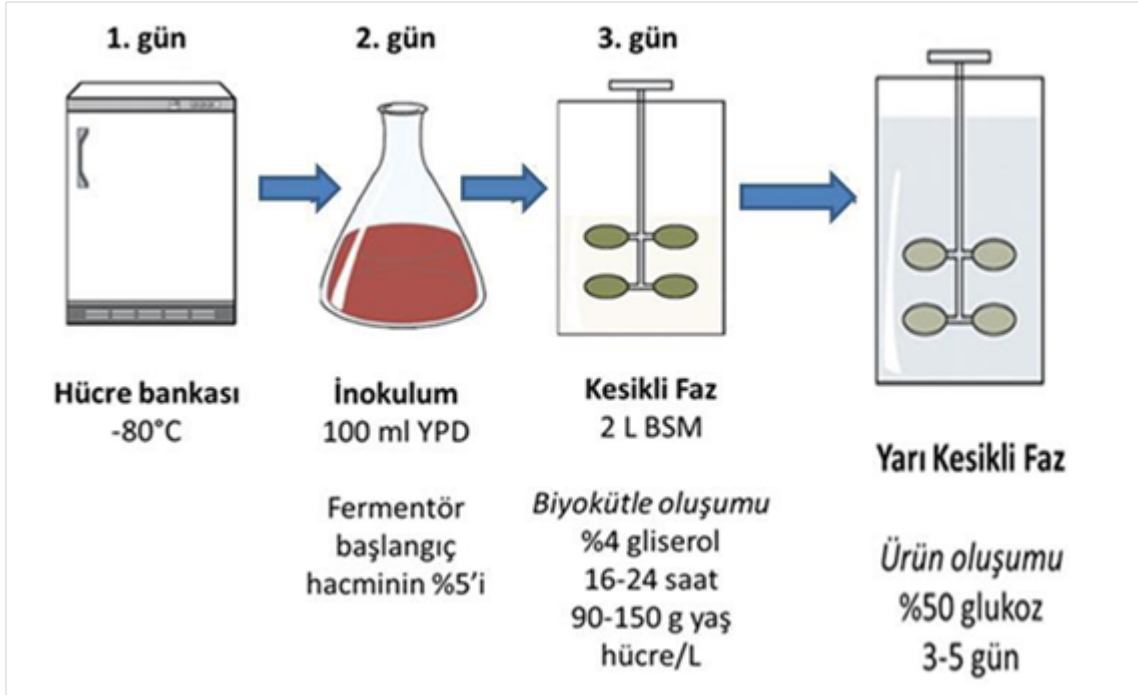
Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisininin tespit edilmesi için CuCl_2 , FeCl_2 , MgCl_2 ve ZnCl_2 kullanılmıştır. metal iyonları 2 Mm ve 10 Mm olacak biçimde ortama eklenmiştir. Kontrol olarak metal iyonu içermeyen ortam kullanılmış ve belirli koşullarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Kontrol ortamının enzim aktivitesi %100 şeklinde belirlenmiştir. Diğer metal iyonları ilave edilen ortamlarının aktivite değişimleri kontrol'e göre kıyaslanarak % şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.17.6. Farklı CaCl_2 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

Farklı CaCl_2 e konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisininin tespit edilmesi için, 20-100 Mm arasında; 20 Mm aralıklarla çalışılmıştır. En kısa sürede pıhtı veren konsantrasyonun enzim aktivitesi %100 şeklinde belirlenmiştir. Diğer konsantrasyonların aktivite değişimleri kontrol'e göre kıyaslanarak % şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.18. Deve kimosini geninin büyük ölçekte fermentörde ekspresyonu

Fermentasyon çalışmaları iki hazneli 5 L Biostat B (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) biyoreaktöründe Kesikli ve Yarı-kesikli olmak üzere 2 aşamada gerçekleştirilecektir. Yaklaşık 20 saat süren kesikli faza 2 L besiyeri ile başlanmış, yarı kesikli fazda toplam 2.000 gr besleme solüsyonunun (~1.600 ml %50 glukoz solüsyonu) eklenmesi ile maksimum çalışma hacmine ulaştığında fermentasyon bitirilmiştir.



Şekil 3.2. Çalışmada gerçekleştirilen yarı-kesikli proseslerin genel hatları (Yılmaz 2018)

3.2.18.1. Kesikli faz

Üretimin ilk aşaması olan kesikli fazda, hücrelerin %4gliserol içeren 2 L temel tuz besiyeri (BSM, 1 litre besiyerinde 26,7 ml 85% H₃PO₄, 0,93 g CaSO₄, 18,2 g K₂SO₄, 14,9 g MgSO₄-7H₂O, 4,13 g KOH, ve 40,0 g gliserol) kullanılmıştır. Daha sonra inokulum yapılmadan önce pH değeri 5.0'e ayarlanmıştır. PTM1 tuzu (1 litrede 6.0 g CuSO₄-5H₂O, 0,08 g NaI, 3,0 g MnSO₄-H₂O, 0,2 g Na₂MoO₄-2H₂O, 0,02 g H₃BO₃, 0,5 g CoCl₂, 20,0 g ZnCl₂, 65,0 g FeSO₄-7H₂O, 0,2 g biotin ve 5,0 ml H₂SO₄) 8,7 ml eklenmiştir (Invitrogen Corporation 2002). BMGY besiyerinde 100 ml içerisinde geliştirilen klonun, spektrofotometrede OD değeri ölçülmüş ve 10-12 OD olunca, cihaza inokulum verilmiştir.

Kesikli faz aşamasında sıcaklık 28°C'de, hava girişi 1,0 vvm'de sabit tutulmuştur. Köpüklenmenin engellenmesi için %5 köpük kırıcı çözeltisi kullanılmıştır. İnokulum verildikten sonraki çözünmüş oksijen değeri (DO) %100'dür. Daha sonra

hücrelerin büyümesi ile bu değer düşmeye başlayacaktır. Ve yaklaşık DO değeri %20 civarlarına düşecektir. Bu düşüşle birlikte karıştırıcı(Stirrer) değeri 600 rpm ' den 900 rpm 'e yükseltilmiştir. Sisteme giren havaya, saf oksijen ilave edilerek sistem kaskad modunda tutulmuştur.

3.2.18.2. Yarı-kesikli faz

Oksijen değerinin (%DO) pik yaptığı noktada kesikli faz sonlanmaktadır. Bu aşamada yarı kesikli fazda klon protein üretmeye başlayacaktır. Bunun için enzime uygun ve sıcaklık değerleri girilecektir. Deve kimosini için sistem 24°C, pH 3.0' de tutulmuştur. Üretim aşamasında besleme profili başlatılmıştır. *GAP* promotörü altında hipoksik şartlarda etanol seviyesi 0.5 düzeylerinde tutulması için; %50 glikoz (weight/weight) solüsyonu ile besleme yapılmıştır (Yılmaz 2018).

Daha sonra yaklaşık 12 saatte bir örnek alımı yapıp, yaş hücre ağırlıkları kaydedilmiştir. Glikoz solüsyonunun bitimi ile fermantasyon sonlandırılmıştır.

3.2.19. Deve kimosini kullanılarak Beyaz Peynir yapımı

- Peynir üretimine kullanılacak süt Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesine bağlı inek çiftliğinden temin edilmiştir. Peynir üretiminde 2 paralel örneği ile 1 kontrol örneği (ticari) kullanılmıştır.
- Maya Kuvvetinin Belirlenmesi
Süpernatantlar için öncelikle maya kuvveti belirlenmiştir. Maya kuvveti belirlenirken 30°C sıcaklığa ısıtılmış olan erlenmayer içerisindeki 20 ml süte 1 ml enzim süpernatantları ilave edilip ve erlenmayer yüzeyinde görülen ilk pıhtı saniyesi tespit edilmiştir. Bir mayanın kuvveti, bir birim (1 mL ya da 1 g) peynir mayasının sabit şartlarda (35 °C' de 40 dakikada) pıhtılaşırabileceği rekonstitüe sütün hacmine (mL ya da g) oranı ile ifade edilir ve birimsizdir (g/g ya da mL/mL) (TSE 1996).

$$MK = (2400 \times S) / (Z \times M) \quad (1)$$

MK: Maya kuvveti

S: Rekonstitüe süt miktarı (mL) (20 mL)

Z: Pıhtılaşma süresi (sn)

M: Maya miktarı (mL) (2 mL içindeki maya miktarı)

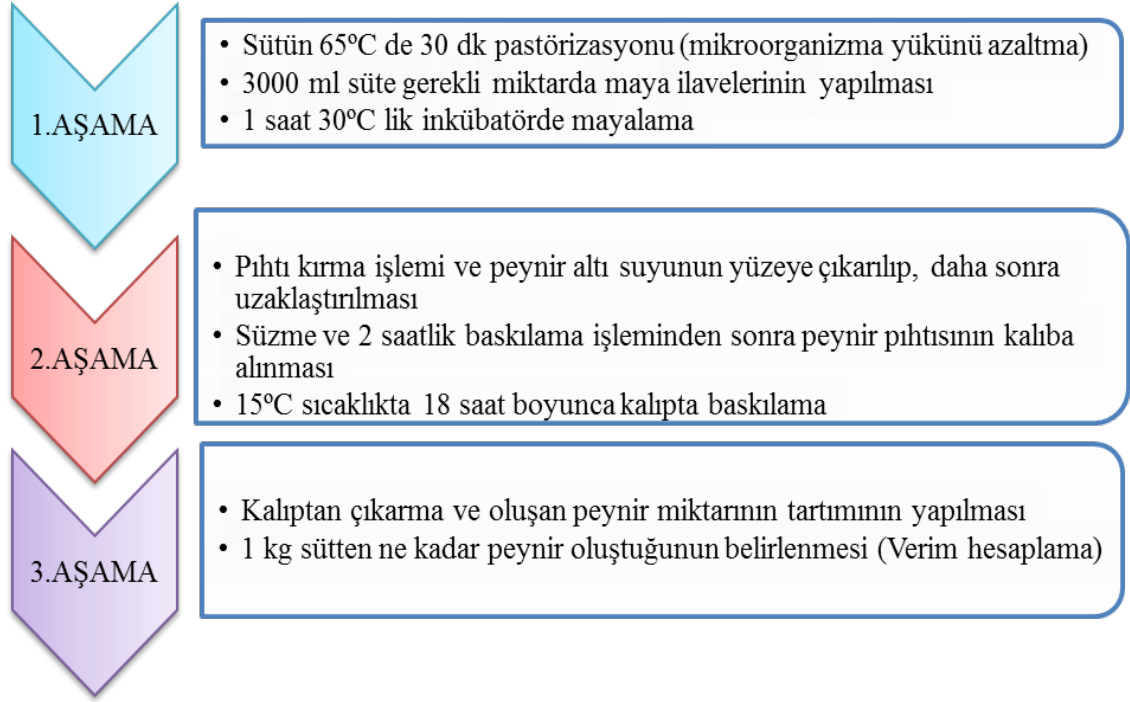
- Maya miktarının belirlenmesi

Hesaplamalar sonucu maya kuvveti belirlenen kimosin süpernatantlarından 3 litre süte peynir yapımı için ne kadar maya koyulması gerektiği, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Budak ve Afşar 2011).

Maya Miktarı = 2400*süt miktarı maya kuvveti*pıhtılaşma süresi

▪ Peynir Üretim Akış Şeması

Araştırmamda sadece üretilen rekombinant deve kimozin enziminin etkinliği incelenmek istendiği için CaCl₂ ile starter kültür ilavesi yapılmamıştır. Ayrıca maya kuvvetinin belirlenmesi için ticari rekombinant fermente sıvı kimozin CHYMO-REN (660 IMCU/ml) kullanılmıştır. Ticari rennet 1:9 oranında seyreltilip, çözeltisi kullanılmıştır. Peynir üretim prosesi Şekil 3.1' de gösterilmiştir.

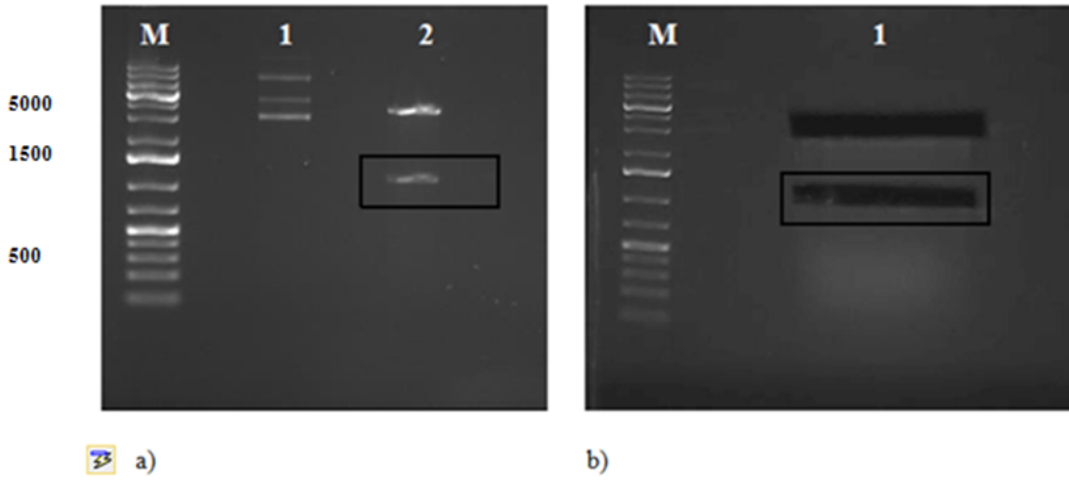


Şekil 3.3. Peynir üretim prosesi (Ersöz 2016)

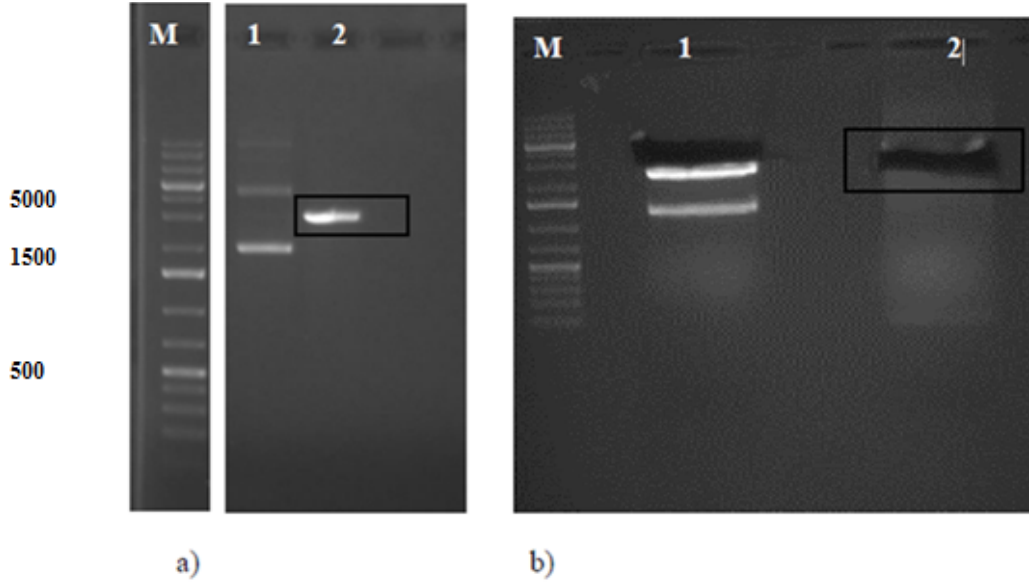
4. BULGULAR

4.1. Deve kimoziini Geni İçeren Plazmid pPICZ α CM Vektörünün Doğrulanması ve pGAPZ α A Vektörünün Doğrulanması

pPICZ α CM plazmidini içeren *E. coli* XLI-Blue, amfisilinli LB Miller sıvı besiyerine inokule edilerek 37°C’de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılıp ertesi gün plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen pPICZ α CM plazmidini *Eco*RI ve *Xba*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve %1’lik agaroz jelde yürütülmüştür. 1110bç ve 3524 bç uzunluğunda beklenen parçalar elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.1 a). Daha sonra 1110 bç uzunluğundaki deve kimoziini geni jel’den kesilerek jel ekstraksiyonu ile elde edilmiştir (Şekil 4.1 b).



Şekil 4.1. a) pPICZ α CM plazmidinin *Eco*RI ve *Xba*I enzimleri ile kesimi jel görüntüsü M: 1 kb DNA standardı kontrol; 1: Uncut (4634bç); 2: Cut (1110 bç) **b)** pPICZ α ACM agaroz jel kesimi M: 1 kb DNA standardı kontrol 1: Deve prokimoziini geni jel kesimi

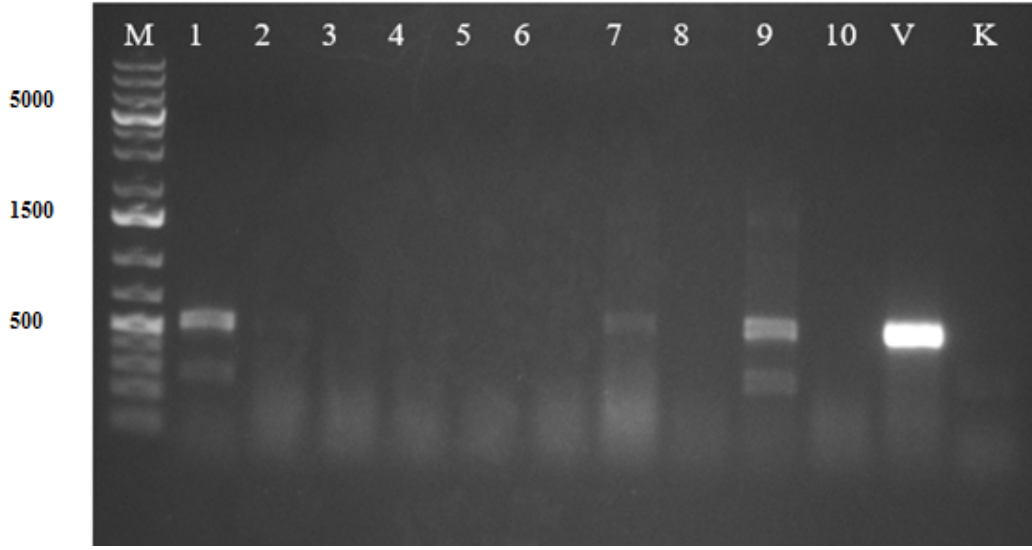


Şekil 4.2. a) pGAPZ α A vektörünün doğrulanması M: 1 kb DNA standardı kontrol, 1: Uncut, 2: Cut **b)** pGAPZ α A agaroz jel kesimi M: 1 kb DNA standardı kontrol, 1: Uncut, 2: pGAPZ α A vektörü jel kesimi

4.2. pGAPZ α A vektörü ve prokimozin geninin ligasyonu ve *E. coli*' ye transformasyonu

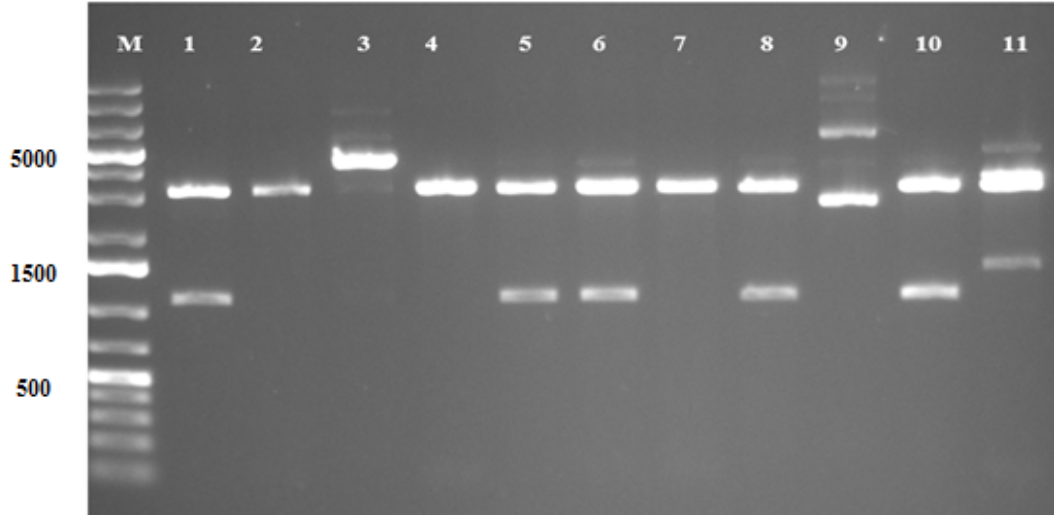
PCR sonrası jel purifikasyonu ile elde edilen ürünlerin ligasyonu yapılmıştır. İnsert olarak deve prokimozin geni (1110 bç), vektör olarak pGAPZ α A (3147 bç) kullanılmıştır.

Ligasyon karışımları *E. coli* XLblue hücrelerine transforme edilmiştir. 25 μ g/ml zeosin içeren LB lennox-zeosin agar plakalara ekim yapılmıştır. Ligasyon sonrası petri kutularındaki koloniler için sayım yapılmıştır. Plakalar incelendiğinde 500 μ g/ml'lük zeosinli plakada hiç koloni gelişmediği görülmüştür. Bu yüzden 100 μ g/ml'lik zeosinli petri kutusunda gelişen kolonilerden 10 koloni seçilmiştir. Seçilen bu kolonilerden koloni PZR yapılmıştır. PZR analizi için; Forward primeri olarak 5'GAP ve Reverse primeri 3'AOX kullanılarak istenilen bölge çoğaltılmıştır (Şekil 4.3.).



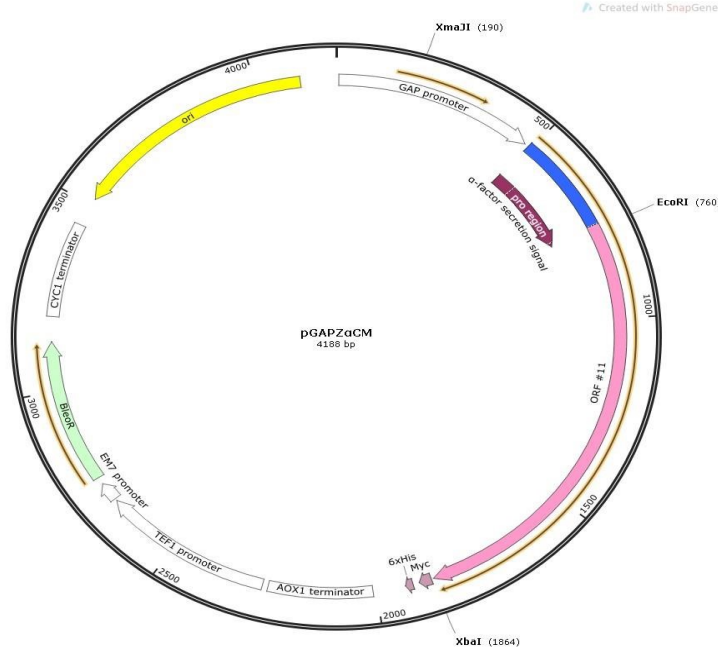
Şekil 4.3. Ligasyon analizi sonucu yapılan koloni PZR, M: 1 kb DNA standardı kontrol, 1: Klon1, 2: Klon 2, 3: Klon3, 4: Klon 4, 5: Klon 5, 6: Klon 6, 7: Klon7, 8: Klon 8, 9: Klon 9, 10: Klon 10, V: Vektör, K: Kontrol

Koloni PZR sonrası plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Plazmit izolasyonu sonrası, agaroz jelde klonların DNA büyüklüklerine bakılmıştır. Bu analiz sonucunda klon9 seçilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Plazmit DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü; M: 1 kb DNA standardı kontrol, 1: Plazmid 1, 2: Plazmid 2, 3: Plazmid 3, 4: Plazmid 4, 5: Plazmid 5, 6: Plazmid 6, 7: Plazmid 7, 8: Plazmid 8, 9: Uncut 9, 10: Plazmid 9, 11: Plazmid 10

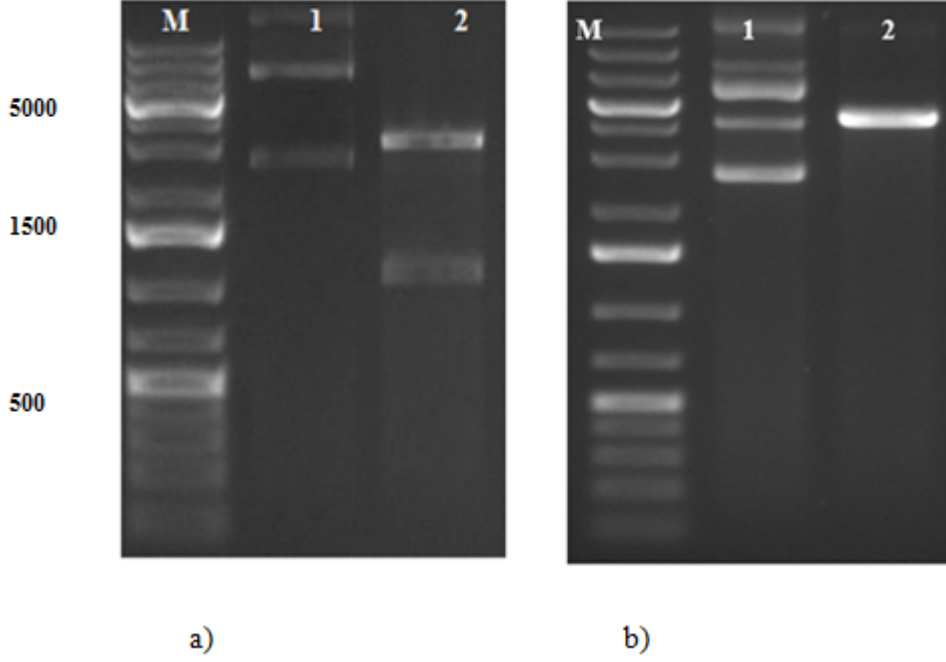
4.3. Protein Ekspresyonunda Kullanılan Plazmitlerin Oluşturulması



Şekil 4.5. Ligasyon sonrası elde edilen yapısal *GAP* promotorlarıyla deve kimozin geninin gösterimi ve oluşturulan pGAPZαCMchy klonlama vektörü

4.4. Plazmitlerinin Lineer Hale Getirilmesi ve *P. pastoris*'e Transformasyonu

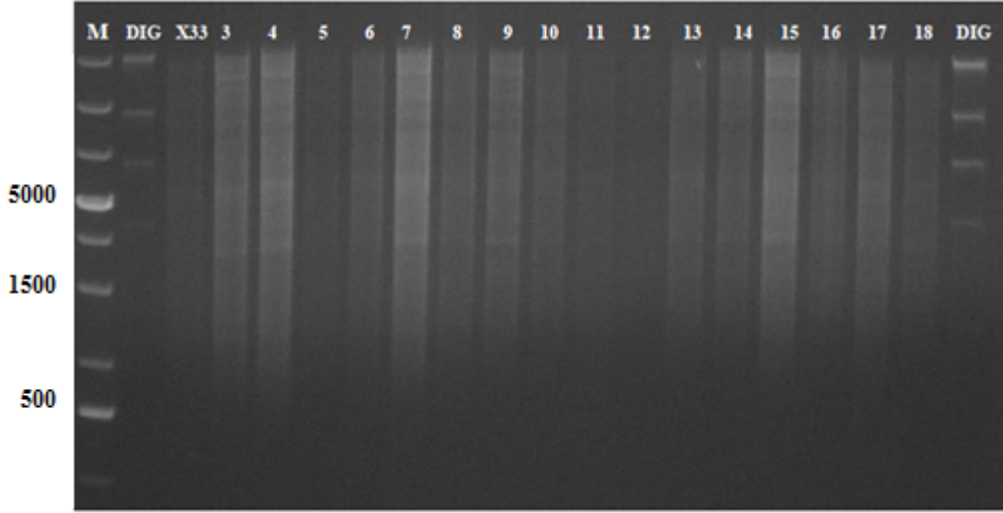
Transformasyon işleminden sonra klon için; *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri kullanılarak kesim reaksiyonu yapılmış ve %1'lik agoraz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.6 a). pGAPαACM =9 klonu lineer hale getirilmesi için *XmaJI* enzimi kullanılmıştır. Bunun sonucunda %1 agoraz jelde yürütülmüştür. Beklenen büyüklükte 4188 bç bant gözükümüştür (Şekil 4.6 b).



Şekil 4.6. a) EcoIR ve XbaI enzimleri ile kesim reaksiyonu; M: 1 kb DNA standardı; 1:Kontrol(Uncut); 2: Pozitif kontrol(Cut) **b)** pGAP α ACM =9 klonunun, XmaJI enzimi ile lineer hale getirilmesi; M: 1 kb DNA standardı; 1:Kontrol; 2: Pozitif kontrol (4188 bç)

4.5. Gen kopya sayısının belirlenmesi(Southern Blott)

Transformasyon sonucu zeosinli plakalardan 15'şer koloni seçilerek 3 ml YPD besiyerine inokule edilmiş ve 28°C'de, 20 saat geliştirilmiştir. Geliştirilen bu klonlara genomik DNA izolasyonu yapılmış ve Southern Blott analizi için kesim reaksiyonu kurulmuştur. Daha sonra da % 0,8 lik agoraz jelde görüntüleme yapılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. % 0.8' lik agaroz jelde görüntüleme; M: 1 kb DNA standardı DIG: DIG marker; X33: (Negatif kontrol); 3: Klon3, 4: Klon 4, 5: Klon 5, 6: Klon 6, 7: Klon7, 8: Klon 8, 9: Klon 9, 10: Klon 10, 11: Klon 11, 12: Klon 12, 13: Klon 13, 14: Klon 14, 15: Klon 15, 16: Klon 16, 17: Klon 17, 18: Klon 18, DIG: DIG Marker

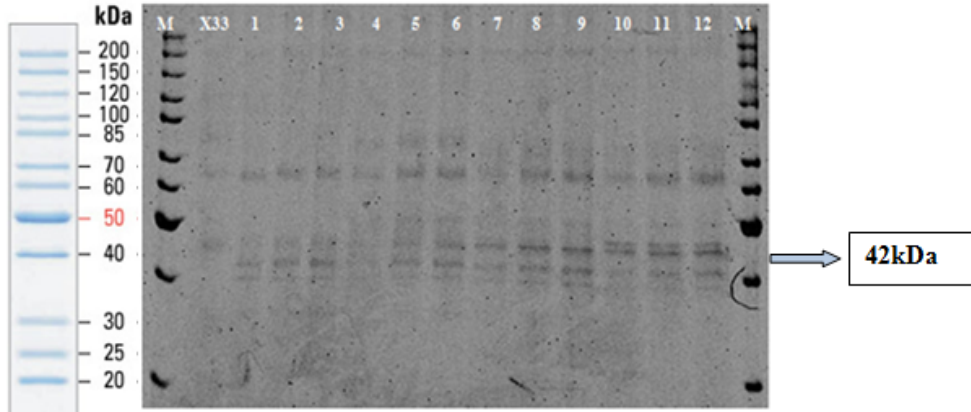
Southern Blot anazli sonucunda tek kopya olduğuna karar verilen 18 numaralı pGAPZ α ACM=18 klonu ile kimoziin ekspresyonu çalışmalarına devam edilmiştir.

4.6. Engelli Erlenmayerde Deve Kimoziin Üretimi

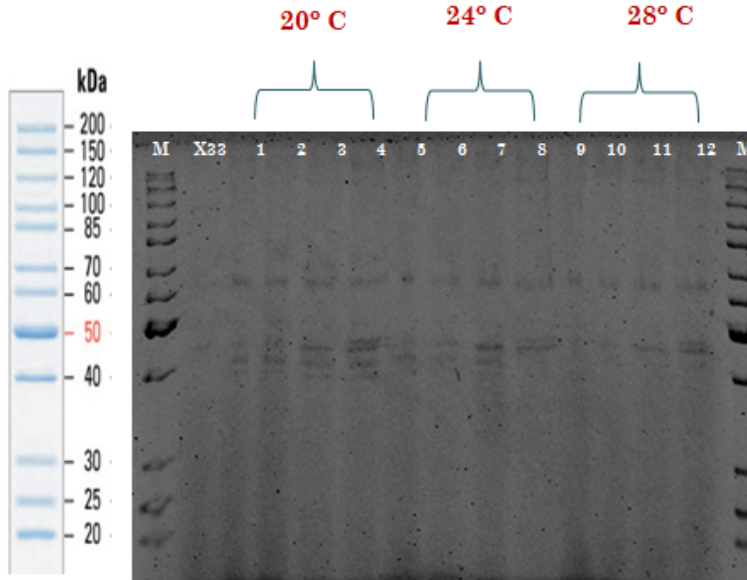
Southern Blott analizi sonucu tek kopya olduğu belirlen klon18; 3 ml YPD besiyerine inokule edilmiş ve 28°C'de, 20 saat geliştirilmiştir. Gelişen kolonilerin her biri BYED besiyerine başlangıç OD'leri 0.1 olacak şekilde inoküle edilmiştir. Erlenmayerde 20°C, 24°C ve 28°C ve 225 rpm'de farklı pH'larda (pH 3.0; 4.0; 5.0 ve 6.0) üretim gerçekleştirilmiştir. Üretim 3 paralelli ve 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Örneklerden her birine 24 saatte bir glikoz eklemesi yapılmış, besiyerdeki glikoz miktarının %1 olması sağlanmıştır. Üretim 96 saat boyunca devam etmiştir. Fermantasyon üretimi için optimum sıcaklık ve pH değerini bulmak için SAS programında faktöriyel desen deneme analiz yapılmıştır. Bu sonuçlara göre fermentör prosesi için gerekli olan pH ve sıcaklık değerleri tespit edilmiştir.

4.7. SDS-PAGE Analizi İle Deve Kimozini Üretiminin Belirlenmesi



Şekil 4.8. Engelli erlendeki 20 °C’ de; pH 3.0; 4.0; 5.0 ve 6.0 üretimindeki 48.saat, 72. saat ve 96. Saat örneklerinin SDS-Page görüntüsü; M: Protein Page-Ruler Marker, X33: Negatif, 1: pH 3 48. Saat, 2: pH 3 72. Saat, 3: pH 3 96. Saat, 4: pH 4 48. Saat, 5: pH 4 72.Saat, 6: pH 4 96. Saat, 7: pH 5 48. Saat, 8: pH 5 72. Saat, 9: pH 5 96. Saat, 10: pH 6 48. Saat, 11: pH 6 72. Saat, 12: pH 6 96. Saat, M: Protein Page-Ruler Marker



Şekil 4.9. Engelli erlendeki 20° C; 24°C ve 28°C; pH 3.0; 4.0; 5.0 ve 6.0; 96. Saat örneklerinin SDS-Page görüntüsü; M: Protein Page-Ruler Marker, X33: Negatif kontrol, 1: 20 °C pH 3 96. Saat, 2: 20 °C pH 4 96. Saat, 3: 20 °C pH 5 96. Saat, 4: 20 °C pH 6 96. Saat, 5: 24 °C pH 3 96. Saat, 6: 24 °C pH 4 96. Saat, 7: 24 °C pH 5 96. Saat, 8: 24 °C pH 6 96. Saat, 9: 28 °C pH 3 96. Saat, 10: 28 °C pH 4 96. Saat, 11: 24 °C pH 5 96. Saat, 12: 2 °C pH 6 96. Saat, M: Protein Page-Ruler Marker

4.8. Deve Kimozini Aktivitesi Sonuçları

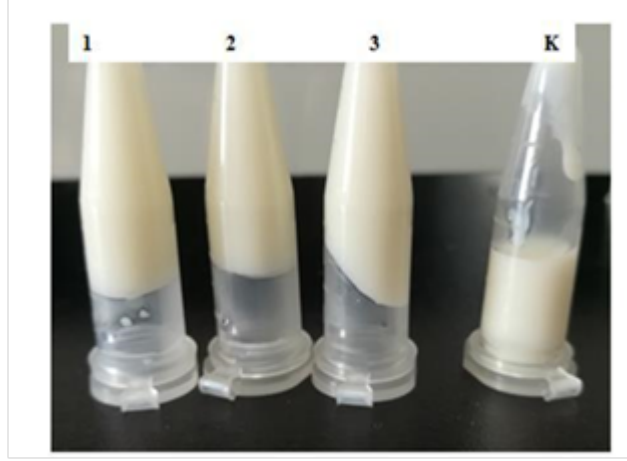
PGAPZ α ACM=18 klonunun engelli erlende üretimi sonucunda deve kimozini enziminin aktivite testleri yapılmıştır. Deve kimozini ortalama 3 dakikada süt solüsyonunu pıhtılaştırmaktadır. Fermantasyon sonucunda ise en iyi pıhtı veren 56. Saat örneği 40.8 mg/mL rekombiant protein ürettiği bulunmuştur.

Engelli erlen üretimlerinde pH 6.0 bufferı içeren besiyeri ile gerçekleştirilen üretim sonucunda süpernatant, enzim aktivite testlerinde kullanılmış ve enzimin bu pH değerindeki 24, 48, 72 ve 96. saat örneklerinde pıhtı oluşmadığı görülmüştür. Ayrıca diğer pH 3.0, ph 4.0 ve pH 5.0 bufferları ile gerçekleştirilen üretimlerdeki 24. Saat süpernatant örenklerinin de pıhtı oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Bu yüzden grafiklerde ve matematiksel modellemede 24. saat zaman dilimi ve pH 6.0 ' ya ait zaman dilimleri hesaba katılmamıştır. Matematiksel modellemeye göre; en düşük aktivite sonuçlarının 28 dereceye ait olduğu görülmüştür. Diğer bir yandan en yüksek aktivite değerlerinin 20 ve 24 derecelere ait olduğu, fakat bu iki sıcaklık arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. En yüksek enzim aktivite sonuçlarının ise pH 3.0.' e ait olduğu bulunmuştur. Bu istatistiksel analiz sonuçlarına göre büyük ölçekli üretim için gerekli olan optimum sıcaklık ve pH değeri elde edilmiştir. Matematiksel hesaplamalara göre verilen enzim aktivitesi sonuçlarında birim olarak dakika seçilmiştir (Çizelge 4.1).

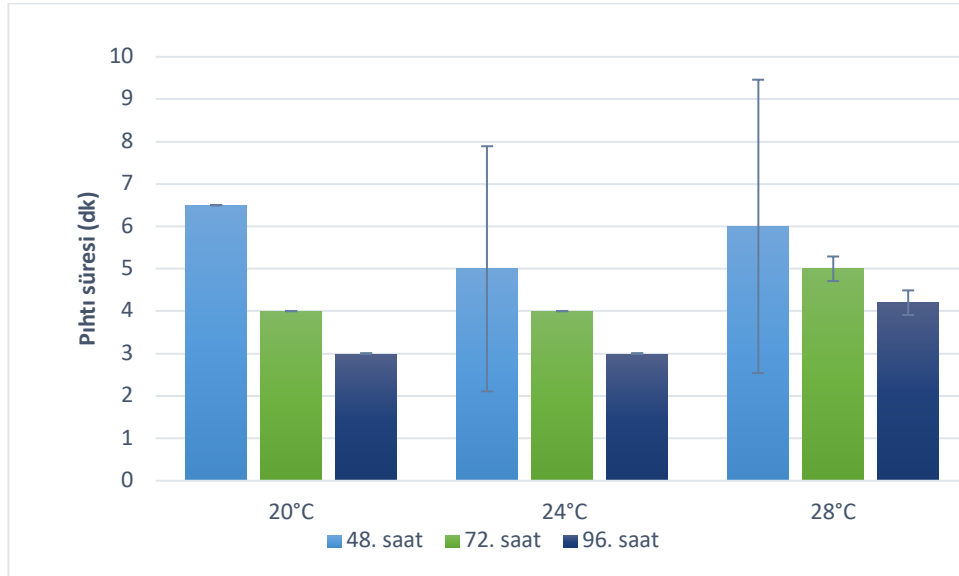
Çizelge 4.1. Enzim aktivite sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi; Her bir değerlerin ortalaması ve üç paralelin standart sapması gösterilmiştir. İstatistiksel açıdan birbirleri ile anlamlı ilişkileri olan parametreler; sıcaklık ve zaman; pH ve zaman iken; sıcaklık, pH ve zaman üçlüsü arasında interaksiyon olmadığı görülmüştür ($p < 0.05$)

ZAMAN			
pH	48.saat	72.saat	96.saat
3	6,24 ± 0,215 cd	4,88 ± 0,215 ef	3,97 ± 0,215 f
4	9 ± 0,248 a	6,67± 0,215 cb	5,49 ± 0,215 ed
5	7,65 ± 0,215 b	5,26 ± 0,215 ed	4,87 ± 0,215 ef
ZAMAN			
Sıcaklık	48.saat	72.saat	96.saat
20° C	7,94 ± 0,215 a	4,56 ± 0,215d	3,46 ± 0,215e
24° C	6,72 ± 0,248c	4,75 ± 0,215d	4,06 ± 0,215ed
28° C	8,23 ± 0,215a	7,51 ± 0,215ba	6,81± 0,215bc

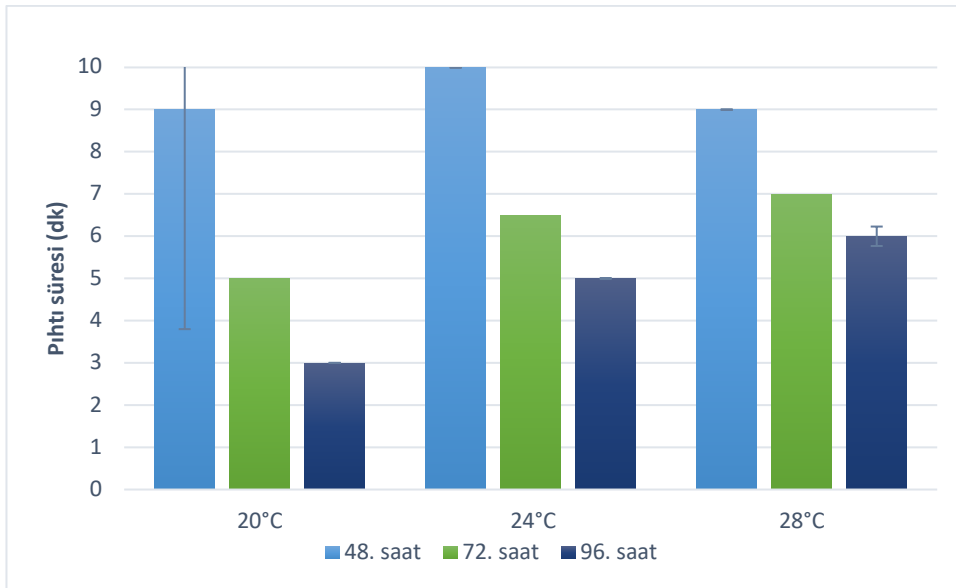


Şekil 4.10. Engelli erlenmayerdeki üretim sonucu enzim aktivitesi tayini; sırası ile 1;2;3: Pozitif kontrol (Deve kimoziin geni içeren süpernatant örnekleri); K: Negatif Kontrol (Deve kimoziin geni içermeyen süpernatant örneği)

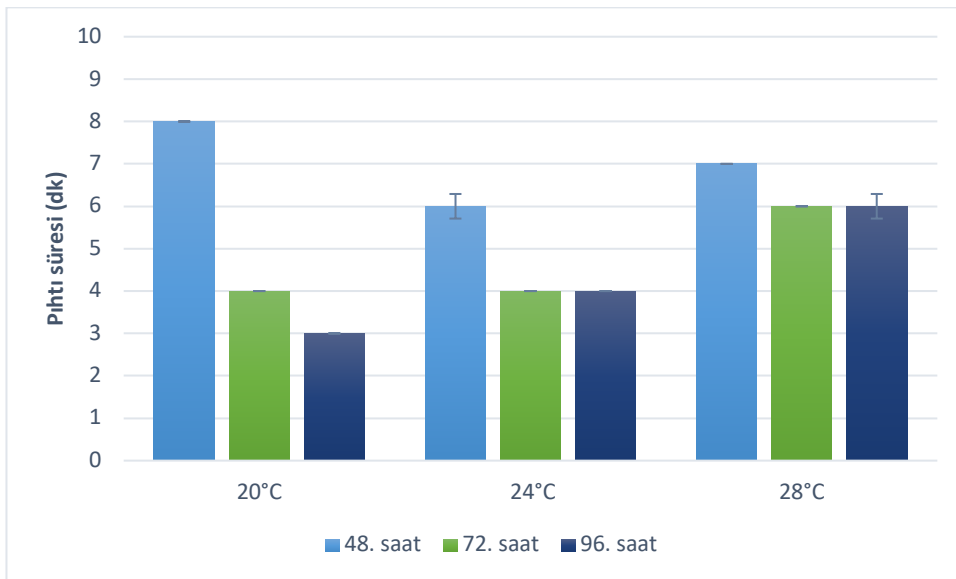
Engelli erlenmayerdeki üretim sonucu 20, 24 ve 28 derecede pH 3.0; pH 4.0; pH 5.0'e ait 24.saat, 72.saat ve 96.saat saat örneklerinin enzim aktivite sonuçları grafiklerde gösterilmiştir. Grafiklerde gösterilen pıhtı süresi birimi dakika cinsinden verilmiştir (Şekil 4.11., Şekil 4.12. ve Şekil 4.13).



Şekil 4.11. 20°C, 24 °C, 28°C; pH 3.0' e ait 48. saat, 72. saat ve 96. saat örneklerin pıhtı grafiği



Şekil 4.12. 20°C, 24 °C, 28°C; pH 4.0' e ait 48. saat, 72. saat ve 96. saat örneklerin pıhtı grafiği



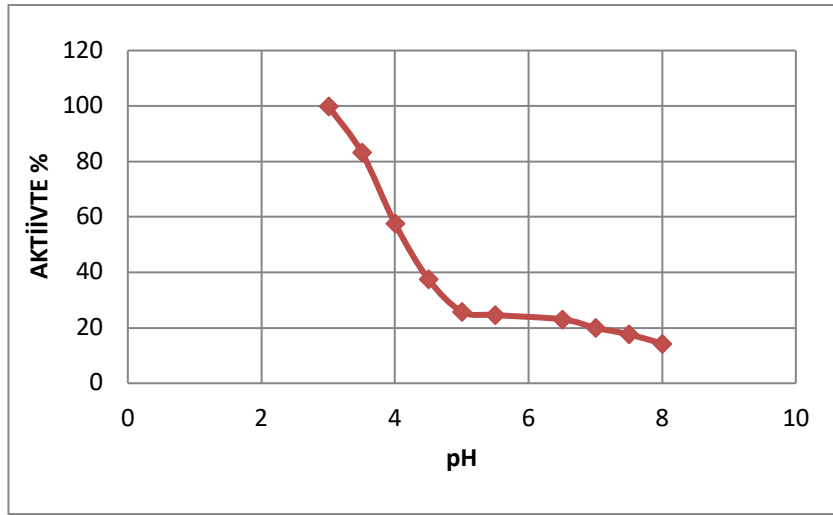
Şekil 4.13. 20°C, 24 °C, 28°C; pH 5.0' e ait 48. saat, 72. saat ve 96. saat örneklerin pıhtı grafiği

4.9. Deve Kimozini Enziminin Karakterizasyonu

4.9.1. Enzimin optimum pH'sının tespiti

Deve kimozeni enziminin optimum pH'sının tespit grafiği Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Kimozin aktivitesinin değeri pH 3.0-4.0 arası doğrusal azalış göstermiş ve en yüksek aktiivteyi pH 3.0'de göstermiştir.

Daha sonra azalarak pH 8.0'da en düşük değeri göstermiştir. Kimozinin aktivite gösterdiği en yüksek değer 100 olarak belirlenmiştir. Optimum değer olarak pH 3.0 bulunmuş ve burada bağıl aktivite %100 iken, pH 3.5'de %83.3, pH 4.0 'da %57.6; pH 5.0'de %25.9, pH 7'de %20.1 ve pH 8.0'da %14.28 olarak hesaplanmıştır.

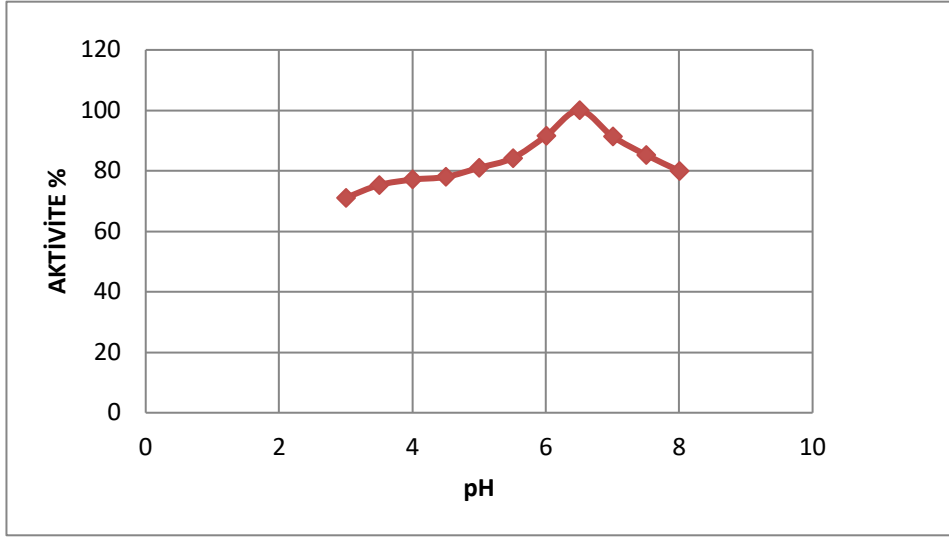


Şekil 4.14. Enzimin optimum pH'sının tespit grafiği

4.9.2. Enzimin pH stabilitesinin tespiti

Enzimin pH stabilitesinin tespit edilmesi için 22°C'de (ortam sıcaklığında) 1 saat inkübasyonu sonunda aktivite sonuçları Şekil 4.15'de gösterilmiştir. Maksimum enzim stabilitesi 100 olarak belirlenmiş, pH 6.5'de %100 stabilitesini korumuştur.

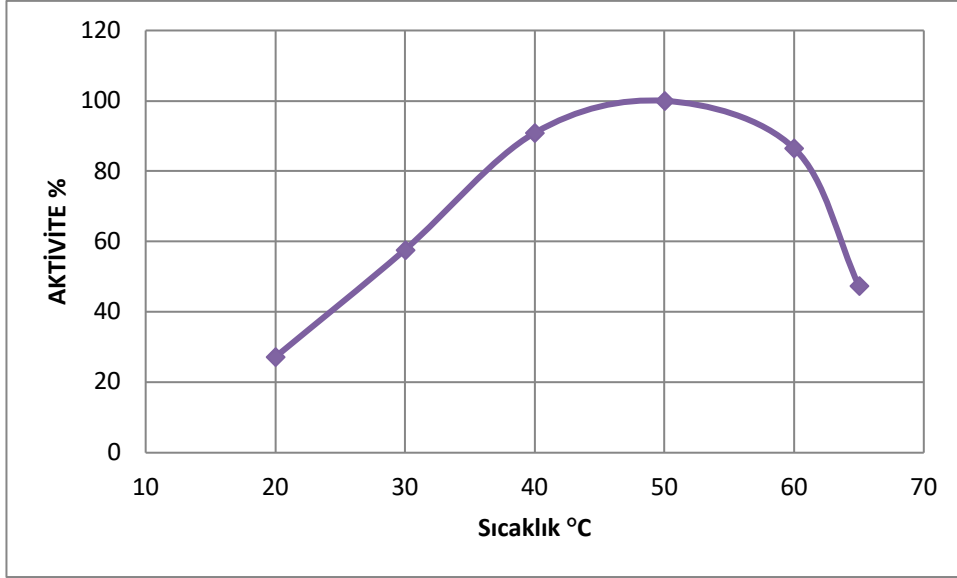
pH 3.0'de %71.11, pH 4.5'de %78 iken pH 7.0'de %91.04 ve pH 8.0'de %80 stabil kalmıştır. Genel olarak; pH 6.0, pH 6.5 ve pH 7.0 değerlerinde %90'ın üzerinde stabilitesini koruduğu saptanmıştır.



Şekil 4.15. Enzimin pH stabilitesinin tespit grafiği

4.9.3. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespiti

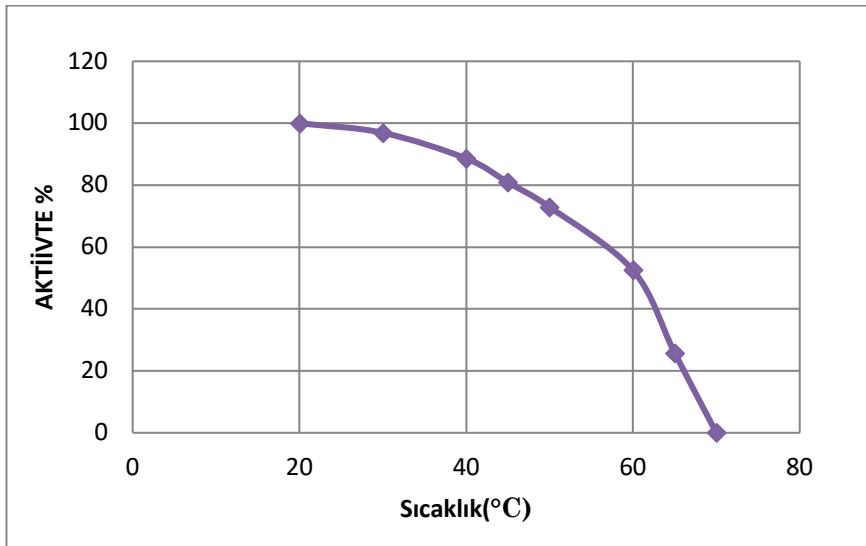
Deve kimozi enziminin optimum çalıştığı sıcaklığın tespit sonuçları Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Kimozi 20°C'de en düşük aktivite göstermiş ve sıcaklığın 10'ar derece yükseltilmesi ile 50 dereceye kadar enzim aktivitesi doğrusal artış göstermiştir. En yüksek değere ulaştığı ve %100 aktivite gösterdiği enziminin optimum çalışma sıcaklığının 50°C olduğu bulunmuştur. Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde, 20°C'de %27.2 aktivite gösterirken 30°C'de %57.7, 40°C'de %90.9 ve 60°C'de %86.5 ve 65°C'de %47.4 aktivite göstermiştir. 60°C'den daha yüksek sıcaklıklarda, aktivitenin hızla düştüğü görülmüştür. Özellikle 70 dereceden itibaren süt solüsyonunun kendiliğinden pıhtı oluşturduğu için 70 derece ve üstü sıcaklıklarda enzim aktivitesi belirlenmemektedir.



Şekil 4.16. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespit grafiği

4.9.4. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespiti

Kimozinin 120 dakika boyunca inkübasyonu sonucu sıcaklık stabilitesinin tespit sonuçları Şekil 4.17'de gösterilmiştir. 30°C'de %96.9, 40°C'de %88.6, 45°C'de %80.9 ve 50°C'de %72.9 aktivitesini korumuştur. 60°C'de %5.5 iken; 70°C'de %0 aktivite göstermiştir. Enzim aktivitesini 20°C'de %100 korurken sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle bu değer giderek azalmıştır.



Şekil 4.17. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespit grafiği

4.9.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespiti

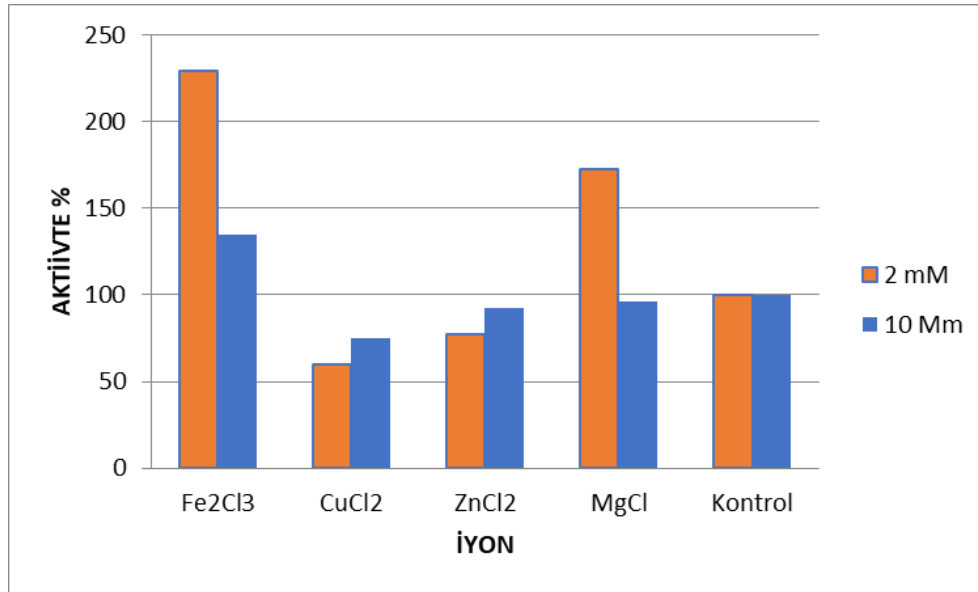
Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisininin tespit edilmesi için CuCl_2 , FeCl_2 , MgCl_2 ve ZnCl_2 kullanılmıştır. Metal iyonları 2 Mm ve 10 Mm olacak biçimde ortama eklenmiştir. Kontrol olarak metal iyonu içermeyen ortam kullanılmış ve 37 derecede enzim aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

Fe^{+2} iyonunun 2 Mm ve 10 Mm konsantrasyon varlığında enzim aktivitesi arttırmıştır. Fe^{+2} iyonunun ortama 2 Mm 'da %134.57 ve 10 Mm'da ise %229.58 enzim aktivitesi göstermiştir. Özellikle demir konsantrasyon yoğunluğunun artması ile 10 Mm'daki aktivitesi 1.7 katına çıkmıştır.

Mg^{+2} 'nin 2 Mm konsantrasyonunda çok az bir miktarda azalma varken; 10 Mm konsantrasyon varlığında enzim aktivitesi oldukça artmıştır. 2 Mm ve 10 Mm' da sırasıyla; %96.26 ve %172.5 aktivasyon gözlenmiştir.

Zn^{+2} iyonunun 2 Mm ve 10 Mm konsantrasyon varlığında sırasıyla enzim aktivitesi düşmüştür. Sırası ile %92.60 ve %77.43 aktivite göstermişlerdir.

Cu^{+2} iyonu ortama eklenen tüm konsantrasyonlarda enzimi inhibe etmiştir. 2 Mm için bu değer %75.39 iken 10Mm' da %60.15'tir.

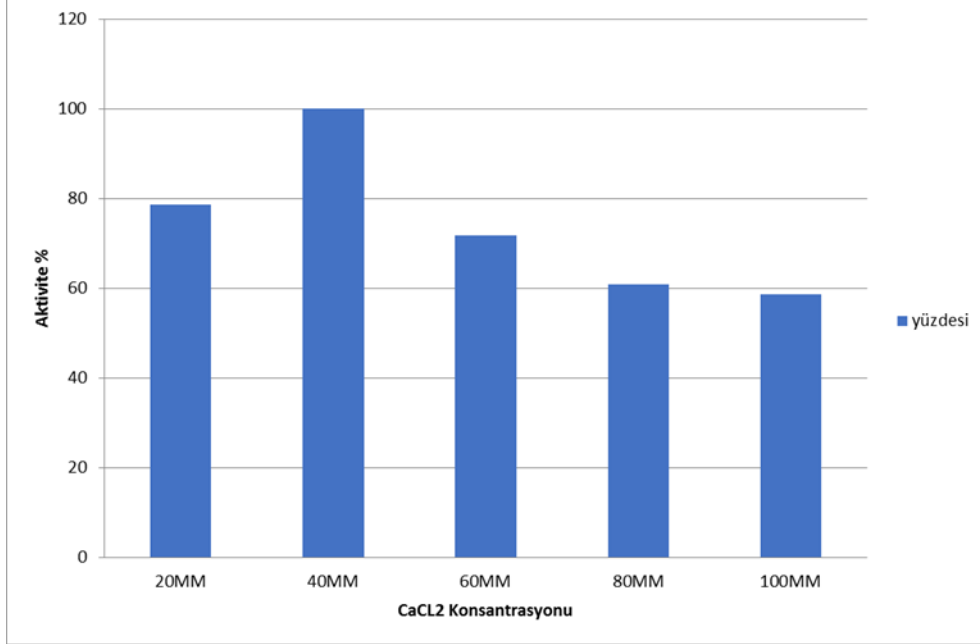


Şekil 4.18. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespit grafiği (2Mm ve 10Mm)

4.9.6. Farklı CaCl_2 konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

20Mm-100Mm arasındaki farklı CaCl_2 'e konsantrasyonlarının enzim aktivitesi sonuçları Şekil 4.19. 'da gösterilmiştir. 40 Mm CaCl_2 konsantrasyonu 100% en yüksek

aktiviteyi gösterirken; en düşük aktivite %58.7 ile 100 Mm CaCl₂'dir. Enzim aktivitesi 40 Mm 'a kadar doğrusal bir şekilde artarken, bu konsantrasyon değerinin artması ile enzim aktivitesi hızlıca düşmeye başladığı görülmüştür.

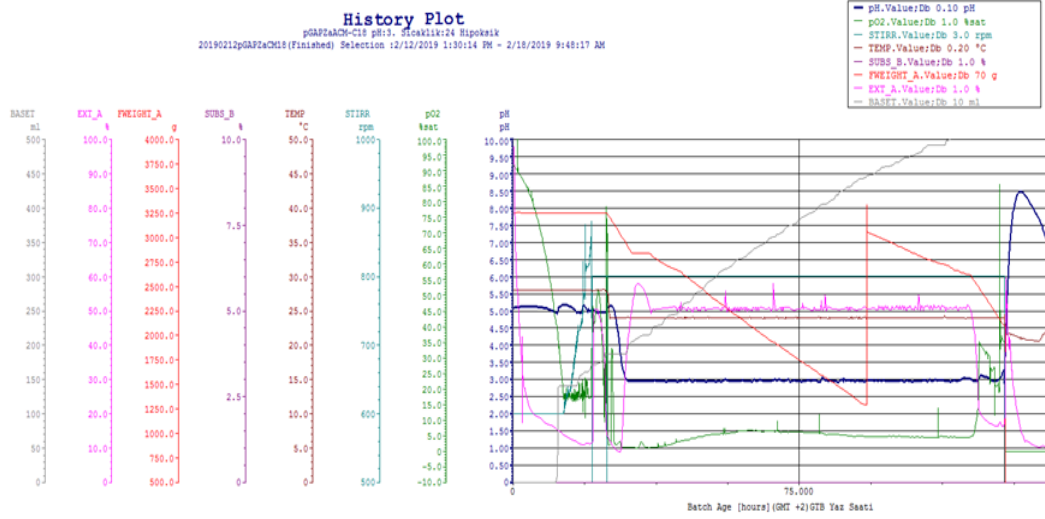


Şekil 4.19. Farklı CaCl₂ konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi

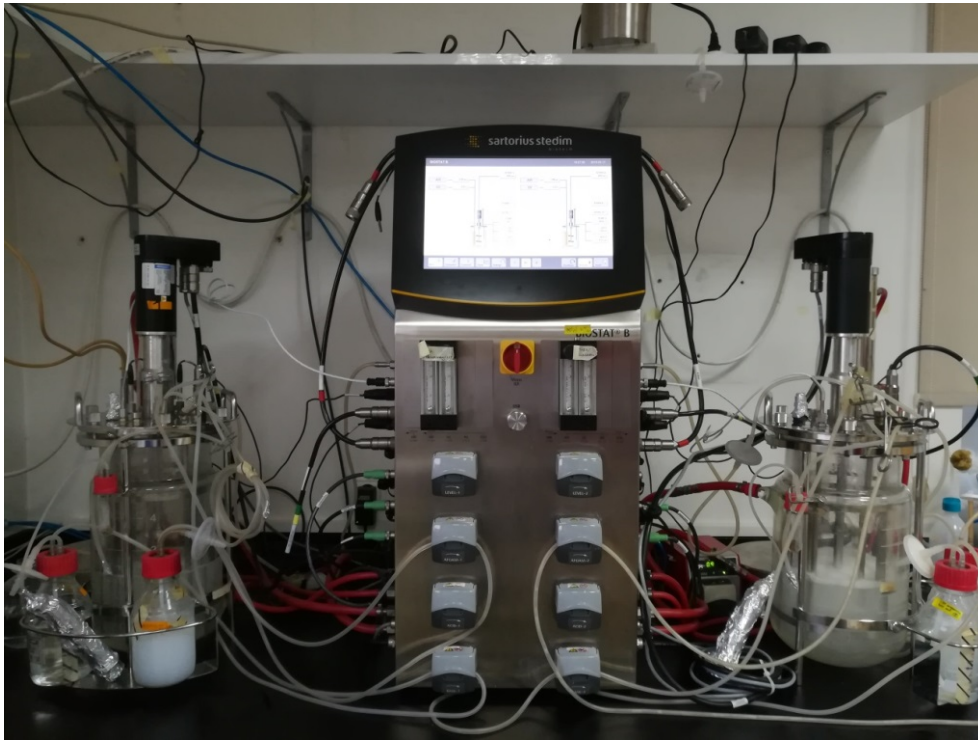
4.10. Deve Kimozinin Büyük Ölçekte Fermentörde Üretimi

4.10.1. Fermantasyon Prosesinin Akış Şeması

Fermantasyon 24 derecede, pH 3.0 'de 103 saat boyunca sürdürülmüştür. Fermentör süresi boyunca *GAP* yapısal promotörü altında deve kimozini üretilmiştir. Fermantasyon prosesi hipoksik şartlar altında %50'lik Glikoz besleme ile etanol seviyesi 0.5 düzeyinde tutularak gerçekleştirilmiştir. Etanol seviyesinin kontrolü metanol probu ile ölçülerek kontrol edilmiştir. Prosesin akış şeması Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



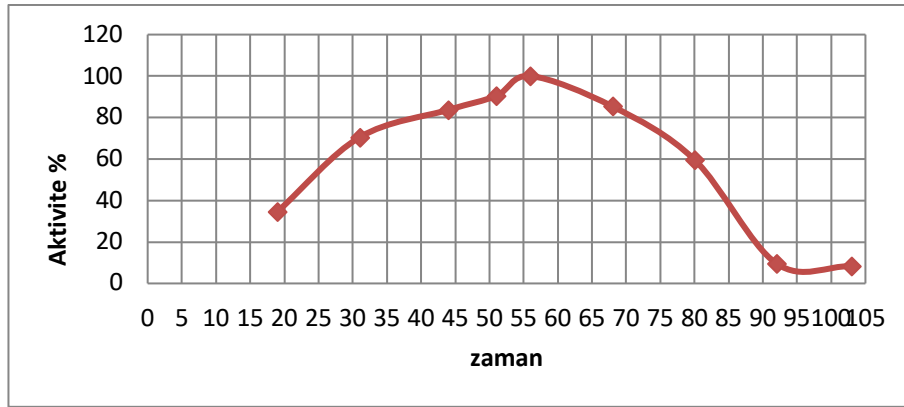
Şekil 4.20. pGAPZαACM=18 klonunun hipoksik şartlar altında gerçekleştirilen fermentör prosesi akış şeması



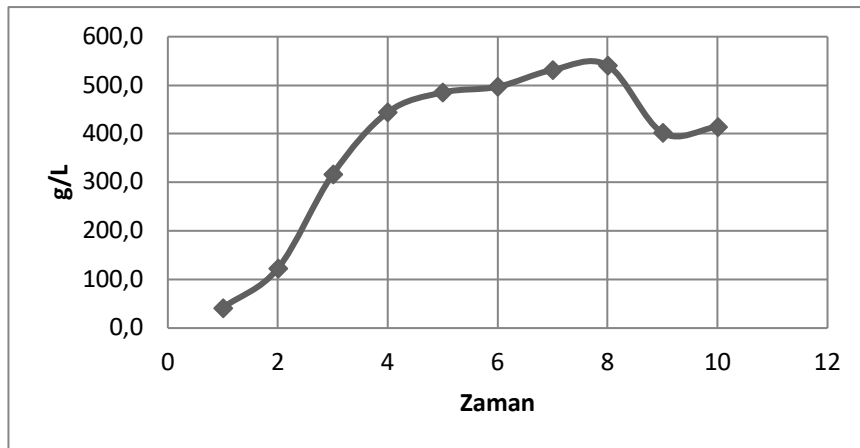
Şekil 4.21. 24°C, pH 3' de *Pichia pastoris* X33 hostunda gerçekleştirilen deve kimozin üretimi

4.10.2. Fermantasyon sonucu elde edilen kimozin enzim aktivitesi

Büyük ölçekli üretim sonucunda bulunan enzim aktivitesi sonuçları Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Fermantasyon sürecinde alınan örneklerden en yüksek enzim aktivitesi 56. Saat örneğinde bulunmuştur. Enzim aktivitesi 2000 Soxhelet Unit/ mL olarak bulunmuştur. Bu enzimin aktivitesi ticari kimozin ile kıyaslanmıştır ve sonuç yaklaşık olarak 20 IMCU/ mL bulunmuştur. Fermantasyon sürecinde 56. saatten sonra aktivite hızla düşmeye başladığı görülmüştür. Fermantasyon süreci boyunca alınan örneklere göre oluşturulan WCW (Yaş Hücre Ağırlığı) grafiği Şekil 4.23’de gösterilmiştir.



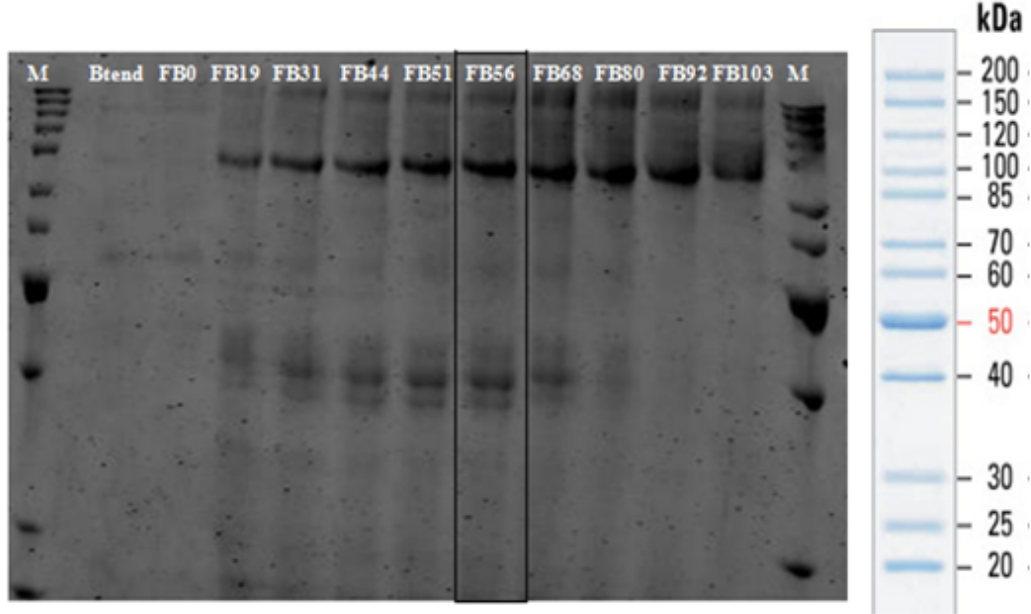
Şekil 4.22. Büyük ölçekte 24°C, pH 3’ de *Pichia pastoris* X33 hostunda gerçekleştirilen deve kimozin üretimi, enzim aktivitesi tespit grafiği



Şekil 4.23. Büyük ölçekte 24°C, pH 3’ de *Pichia pastoris* X33 hostunda gerçekleştirilen deve kimozin üretimi, WCW tespit grafiği

4.10.3. Deve kimozinin büyük ölçekte üretiminin SDS-Page analizi

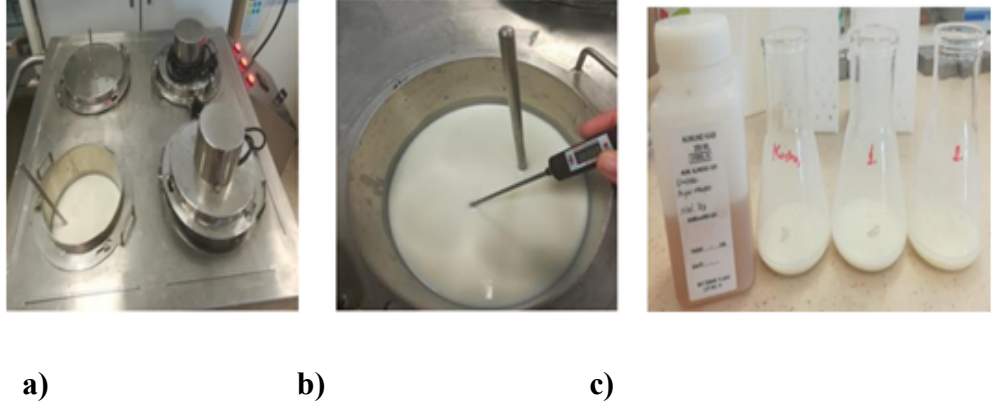
Fermentör örnekleri SDS-PAGE protokolüne hazırlanmış ve sonuçları Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



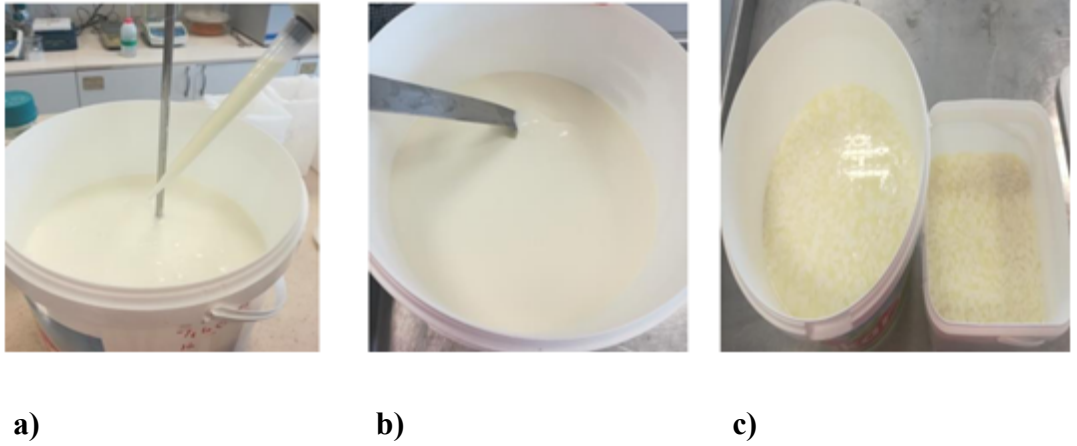
Şekil 4.24. *Pichia pastoris* mayasında büyük ölçekte 24°C, pH 3.0' de gerçekleştirilen deve kimozin protein üretiminin, SDS-PAGE tespit grafiği; M: Protein- Page Ruller Protein Marker, Btend: Batch fazın sonu; FB0: Besleme fazının başlangıcı; FB19: Besleme fazında 19. Saat örneği; FB31: Besleme fazında 31.Saat örneği; FB44: Besleme fazında 44. Saat; FB51: Besleme fazında 51. Saat; FB56: Besleme fazında 56. Saat; FB68: Besleme fazında 68. Saat; FB80: Besleme fazında 80. Saat; FB92: Besleme fazında 92. Saat; FB103: Besleme fazında 103. Saat; M: Protein- Page Ruller Protein Marker

4.10.4. Rekombinant deve kimozini ile beyaz peynir yapımı

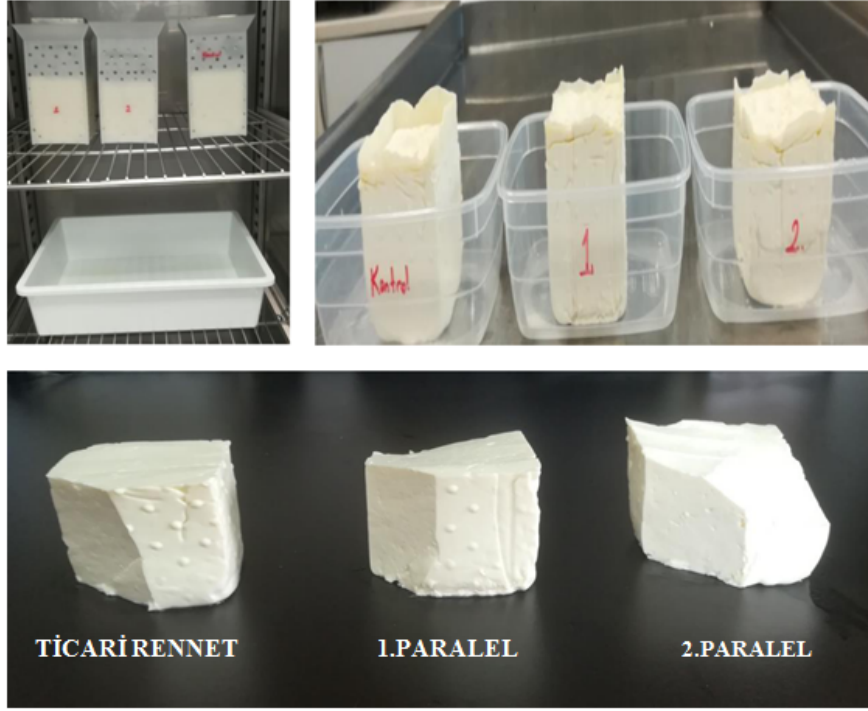
Peynir yapımı için enzim içeren 2 paralel ve enzim içermeyen 1 kontrol örneği kullanılmıştır. Fermentörde en yüksek aktiviteyi gösteren 56. Saat süpernatantı, peynir yapımında kullanılmıştır. Peynir üretim akış şeması Şekil 4.25; Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. a) Sütün 65°C de 30dk pastörizasyonu **b)**Termometre ile sıcaklık kontrolü **c)** Kontrol örneği; 1. ve 2. Paralel örneklerinin pıhtı sürelerinin tayini



Şekil 4.26. a) Maya miktarı ve kuvvetinin hesaplanması ve enzimin süre ilave edilmesi **b)** Mayalama işlemi için 1 saat boyunca 30 derecede inkübasyona bırakılması ve pıhtı kırma işleminin yapılması **c)** Peynir altı suyunun yüzeye çıkarılması



Şekil 4.27. a) Peyniraltı suyunun uzaklaştırılmasından sonra, peynirin kalıba konulması ve kalıba alındıktan sonra 15 derecede, 18 saat boyunca inkübasyona bırakılması **b)** Kalıptan örneklerin çıkarılması ve tartım yapılması **c)** Sırası ile soldan sağa Kontrol peynir örneği; 1. Paralel peynir örneği ve 2. Paralel peynir örneği

Öncelikle ticari rennetin (10 kat seyreltilmiş çözeltiden 0.1 mL kullanılarak) ve 2 paralel (1mL süpernatant kullanılarak) örneğinin pıhtılaşması bulunmuştur. Bu sonuçlara göre maya kuvvetleri ve gereken maya miktarları hesaplanmıştır. Peynir yapımından sonra 1 kg süttten, ne kadar peynir oluştuğuna dair verim hesabı yapılmıştır. Bu analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Peynir yapımında kullanılacak kontrol ve 2 paralel örneğe ait sonuçlar

Örnek Adı	Pıhtılaşma (sn)	Maya miktarı(mL)	Maya kuvveti	Peynir Miktarı(gram)	Peynir verimi(%)
Kontrol (Ticari rekombinant sığır kimozeni)	13sn	1.083 mL	1: 3692	444,2 gram	14,8
1.paralel örneği	37sn	3.083 mL	1: 1297.3	467,9 gram	15,56
2.paralel örneği	40sn	3.333 mL	1: 1200	460,1 gram	15,33

5.TARTIŞMA

Bu çalışma deve kimozin geni geninin *P. pastoris* mayasında gliseraldehit - 3fosfat dehidrojenaz genini kodlayan yapısal *GAP* promotörü ile rekombinant olarak üretilmesi, enzimin karakterizasyonunun yapılması ve *GAP* promotörünün rekombinant deve kimozin üretimine etkisinin karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Engelli erlenmayerde üretimi sonucu aktivitesi olduğu belirlenen rekombinant enzimin, büyük ölçekte 5 litrelik fermentörde üretimi gerçekleştirilmiştir. Peynircilik sektöründe yoğun bir şekilde kullanılan kimozin kaynağının; ürüne uygulanabilirliğinin teyit edilmesi için üretilen rekombinant enzim peynir yapımında kullanılmıştır. Ve böylece ticari sığır rekombinant kimozi ile rekombinant deve kimozin kaynağı kıyaslanabilmiştir.

Yapılan bu çalışmada amaçlanan birkaç parametre bulunmaktadır. *P. pastoris*' e ait belirlenen yapısal *GAP* promotörünün rekombinant enzim üretimindeki yeteneği, süt ve peynir endüstrisindeki rennet kaynaklarının azalması ve artan nüfusa göre talebin artması dolayısıyla uygun bir rennet kaynağının sağlanması amaçlanmaktadır. Rekombinant enzimin engelli erlende üretimi için optimizasyon çalışmaları yapılarak; bulunan enzim aktivitesi sonuçlarına göre istatistik modelleme ile büyük ölçekli üretim için optimum pH ve sıcaklığın belirlenebilmesi sağlanmıştır.

P. pastoris X33 hostunun rekombinant deve kimozi üretimi için uygun bir host olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ayrıca *AOX1* promotörünün kullanılmaması dolayısıyla engelli erlenmayer ve fermentör üretimleri sırasında metanol indüklemeye yapılmamıştır. Böylece metanol gibi toksik ve yanıcı bir maddenin kullanımının önüne geçilmiştir. Aynı zamanda bu tür tehlikeli bir maddenin büyük ölçekli proseslerde kullanımı dolayısıyla oluşabilecek depolama masraflarının önüne geçilebilmesi amaçlanmıştır. Yapısal promotör olan *GAP*'in kullanımı sayesinde besiyeri değişimin gerçekleştirilmemesi dolayısıyla; küçük ölçekte laboratuvar ortamındaki çalışmalarda ve büyük ölçekli peynir üretimindeki proseslerde zaman kaybının önüne geçilebilmesi sağlanmıştır.

Deve kimozi geni seçilme sebebi ise; daha önceden deve kimozin enzimi ile kullanılarak yapılan peynirlerin tekstür ve flavorlarının diğer kimozin enzimlerine göre daha iyi olması, yüksek pıhtı ve düşük proteolitik aktivite göstermesi, deve kimozinin taşıdığı karakteristik özelliklerin (termo-stabilite vb.) daha stabil olmasının peynir üretimi prosesi için daha uygun bir kimozin kaynağı olmasını sıralayabiliriz.

Literatürde *P. pastoris*'de *GAP* promotörü ile rekombinant kimozin enzimi üretimi üzerine dair çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarında deve kimozin enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Fakat kullanılan promotörleri ve üretim hostlarının farklı olmasının yanısıra; üretilen rekombinant enzimin kullanılması ile yapılan ürüne dair çalışmalar oldukça sınırlı sayıda bulunmaktadır. Bu yüzden deve kimozin geninin yapısal *GAP* promotörü altında etkili bir üretim sistemine sahip olan *P. pastoris* mayası X33 hostunda üretimi bu çalışmanın özgünlüğünü korumaktadır. Ayrıca üretilen enzimin karakterizasyonu esnasında yapılan metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisini belirlemeye yönelik çok az miktarda veri bulunmaktadır. Üretilen rekombinant kimozin beyaz peynir yapımında kullanılmıştır.

Peynir üretimi esnasında 2 paralel ve 1 kontrol örneği kullanılmıştır. Kontrol örneğinde ticari rennet kullanılırken; paralel örneklerinde rekombinant deve kimozini kullanılmıştır. Böylece yapılan peynirlerden verim hesabı yapılarak; ticari ve rekombinant kimozin kaynakları kıyaslanabilmektedir. Aynı zamanda peynir endüstrisinde kullanılan maya miktarı, oluşturulan peynir miktarı ekonomik açıdan oldukça önemli parametrelerdir. Kullanılan rekombinant enzim miktarı ile daha yüksek oranda ve verimde peynir üretilmesi amaçlanmıştır.

Literatürde kimozin enziminin *P. pastoris* mayasında diğer promotorlarla rekombinant üretimi üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Kappeler vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada deve (*Camelus dromedarius*) kimozini *Aspergillus niger* hostunda üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan SDS- Page analizine göre deve kimozin geninin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 40 kDa olarak bulunmuştur. Enzim en yüksek aktiviteyi 55 derecede gösterirken; pH 2-3.8 arasında daha stabildir. Peynirde pıhtı oluşumunu arttırmak için; kalsiyum konsantrasyonunun artırılması deve kimozini aktivitesini azaltmaktadır. Bu sonuçlar; yaptığımız çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir (Kappeler vd. 2006).

Luo vd. (2016) genç ve yetişkin üç yakın dördüncü midelerinden prokimozini, prokimozin ve kimozin genleri izole edilerek, pPICZalfaA vektörü kullanılarak *Pichia pastoris* X33 hostunda üretilmiştir. Shake flask heterolog protein üretiminde en yüksek aktiviteyi prokimozin (14.55 Soxhlet UNIT/ mL) göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmaya göre; deve prokimozin geni aktivite göstermiştir. Büyük ölçekli heterolog protein üretim sonucu enzim 2000 Soxhlet UNIT/mL aktivite göstermiştir (Luo vd. 2016).

Tyagi vd. (2016) Keçi prokimozini *AOX1* promotoru altında; *P. pastoris* X33 hostunda başarılı bir şekilde üretmiştir. SDS-PAGE sonuçlarına göre 41 kDa büyüklüğünde bant gözükümüştür. Fermantasyonda en yüksek prokimozin aktivitesi 96. saatte ortaya çıkmıştır. Enzimin optimum olduğu pH 5.5'tir. Enzimin aktif olduğu sıcaklık 30-45 derecenin üzerinde; optimum sıcaklık ise 35-38 derecedir. Bu çalışmadaki rekombinant keçi kimozininin optimum pH aralığı; ürettiğimiz rekombinant deve kimozini ile oldukça benzerdir. Optimum sıcaklık olarak rekombinant deve kimozini 50 derece gibi daha yüksek bir sıcaklığa sahiptir. Ayrıca SDS-PAGE sonuçlarına göre deve kimozini yaklaşık olarak 42 kDa büyüklüğünde bant vermiştir (Tyagi vd. 2016).

Bu çalışmada buffalo, inek, deve ve domuz gibi dört farklı hayvan dokusundan, kimozin genleri izole edilmiştir. Bu farklı kimozin gen kaynakları SDS-PAGE'de görüntülenmiştir. SDS sonuçlarına göre ise; buffalonun ve ineğin molekül ağırlığı: 40 kDa, devenin 43 kDa; domuzun ise 30 kDa bulunmuştur. İnek ve buffalo rennetinde iki öne çıkan bant gözükürken; deve ve domuzda sadece bir bant gözükümüştür. Sığır, inek kimozinleri oldukça birbirlerine benzerken deve ve domuz kimozininden oldukça farklıdır (Attallah 2007).

Vallejo vd. (2008)'nin su buffalosuna ait (*Bubalus arnee bubalis*) preprokimozin, prokimozin ve kimozin genleri *GAP* promotoru altında alfa- mating faktörü ile *P. pastoris* GS115 hostunda üretilmiştir. SDS-PAGE sonucunda ise 36kDa ve 40 kDa olmak üzere iki bant gözükümüştür. Bizim yaptığımız çalışmada ise 42kDa

büyükliğinde bant gözükmiştir. Buffalonun optimum sıcaklığı 37 derece iken; bizim yaptığımız çalışmadaki deve kimozin enzim sıcaklığı 50 derece bulunmuştur. Rekombinant su buffalosu kimozin enzimi optimum pH'sı 4.5 iken; rekombinant deve kimozinin pH 3.0 ve pH 4.0 arasında aktivitesi doğrusal artış göstermektedir (Vallejo vd. 2008).

Diğer bir çalışmada ise deve prokimozin geni (1172 bç), *AOX1* promotörü altında, *Pichia pastoris* GS115 suşunda üretilmiş ve gerçekleştirilmiştir. Üretim sonucunda yaklaşık olarak 37mg/L rekombinant protein üretilmiştir. Yapılan SDS analizi sonucunda 42kDa ve 45kDa büyüklüğünde iki bant gözlenmiştir. Kimozin aktivitesi 20 derecenin altında ve 70 derecenin üstünde tamamen yok olmaktadır. Aktif kimozin; kazeini 45-50°C sıcaklıkları arasında optimum süt pıhtılaştırma aktivitesi göstermektedir. Rekombinant enzimin aktif ve stabil olduğu geniş pH aralığı 2.5-6.5'dir. Maksimum pıhtı aktivitesi 20-40 mM CaCl₂ arasında bulunmuştur. Bu çalışmadaki sonuçlar; GAP promotörü altında *Pichia pastoris* X33 hostunda üretilen deve kimozi enzim sonuçları ile hemen hemen aynıdır. Fakat *AOX* altındaki fermentasyon sonucu bulunan enzim aktivitesi; *GAP* promotörü altındaki üretiminden oldukça fazladır (Wang vd. 2015).

Perden vd. (1979) yaptığı çalışmada sığır prokimozinin B'nin aktivasyonu araştırılmıştır. Özellikle pH 2.5 altında deney gerçekleştirildiği zaman, süt pıhtılaştırma aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Kimozinin optimum proteolitik aktivitesi pH 3.0 aralığında gerçekleşmektedir. GAP promotörü altında *P. pastoris* X33 hostunda üretilen deve kimozinin de optimum pH'sı 3.0 bulunmuştur ayrıca sığır prokimozini gibi düşük pH değerlerinde daha yüksek aktiviteye sahiptir (Pedersen vd. 1979).

Yapılan bu çalışmada sığır prokimozini geni; *GAP* promotörü altında pGAPZalfaA vektörü kullanılarak *P. pastoris* GS115 hostunda üretilmiştir. DNA sekansına göre sığır prokimozinin moleküler ağırlığı 40.777 kDa olarak tahmin edilmesine rağmen; SDS-PAGE analizi sonucunda yaklaşık olarak 36 kDa büyüklüğünde tek bir bant gözükmiştir. Enzimin stabil olduğu sıcaklık 25-50°C iken, optimum sıcaklığı 37°C'dir. Enzimin stabil olduğu pH aralığı 2.2-6 arası iken; optimum pH 4.0'tür. Enzimin %24.2'si saflaştırıldıktan sonraki spesifik aktivitesi 3.705U/mg bulunmuştur. Rekombinant kimozin Mn⁺², Mg⁺², Fe⁺³ ve Na⁺ gibi katyonlarla aktivite olurken, K⁺, Co⁺², Zn⁺² ve Ni⁺² gibi elementler tarafından inhibe olmaktadır. Bu çalışmada rekombinant sığır kimozinine yönelik yapılan karakterizasyon sonuçları; laboratuvarımızda yapılan rekombinant deve kimozini karakterizasyon sonuçları ile oldukça benzerlik göstermektedir. Deve kimozini daha yüksek sıcaklıklarda termostabilitesini korurken, daha düşük pH değerlerinde aktif olabilmektedir. Deve kimozini Mg⁺², Fe⁺³ varlığında aktivitesi artarken; Zn⁺², Cu⁺² varlığında aktivitesi azalmaktadır. Ayrıca deve kimozinin *GAP* altındaki enzim aktivitesi; *AOX* altında üretilen sığır kimozininden oldukça düşük olduğu görülmüştür (Jiang vd. 2013).

Bu çalışmada Cheddar tipi peynir üretiminde koagülant olarak deve kimozini kullanılmıştır. Deve kimozini ile yapılan peynirlerde de bazı karakteristik özellikler tespit edilmiştir. Bu kimozinle üretilen peynirlerde sülfür yoğunluğu oldukça düşük olduğu için; daha az acı bir tat oluşmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları gösteriyor ki deve

kimozini Cheddar peyniri yapımında etkili ve başarılı bir koagülanttır (Bansal vd. 2009).

Bu çalışmada sığır prokimozin B geni, *AOX1* promotörü altında *P. pastoris* GS115 suşunda üretilmiştir. Rekombinant sığır kimozini için optimum pH 5.5 iken, sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Metanol indüklenemsi yani fermanstasyon 96 saat boyunca sürmüş ve sabit spesifik büyüme hızında heterolog rekombinant protein ekspresyonunun oldukça artış gösterdiği gözlenmiştir. Fermantasyon sonucu saflaştırılan kimozinin spesifik süt pıhtılaştırma aktivitesi 6400 IMCU/mg olarak bulunmuş ve 120 mg/l rekombinant kimozin elde edilmiştir. Fakat bu tezde üretilen rekombinant deve kimozinin daha yüksek optimum sıcaklığına (50°C) ve daha düşük optimum pH' ya (3.0) sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca fermentör üretiminde; *AOX*'e göre enzim üretimin düşük olduğu bulunmuştur. Üretilen rekombinant deve kimozinine saflaştırma işlemi yapılmamıştır ve üretilen protein miktarı ise 500 µgram/mL'dir (Noseda vd. 2014).

Yapılan diğer bir çalışmada *Aspergillus niger* ksilanaz geni (*XylB*) rekombinant olarak üretimi; *PADH3* promotörü altında *P. pastoris* mayasında yapılmıştır. *P. pastoris* *PAOX1* ve *PGAP* promotörleri ile bu üretim kıyaslanmıştır. *A. niger* ksilanaz geni(*XylB*) bu üç promotöraltında shakeflask ve 5 litrelik fermentörde üretimi yapılmıştır. Fermantasyon sonucunda en yüksek rekombinant protein miktarı *PADH3* promotörü ile gerçekleştirilirken, en düşük *GAP* promotörü olmuştur. *ADH3* 'ün WCW(yaş hücre ağırlığı) değerleri; *GAP* promotörü ile benzer olmasına rağmen protein *GAP*'da daha düşük oranda üretilmiştir. Bu çalışma sonucuna göre her enzimin üretilebilmesi için yapısal promotörün uygun bir seçenek olmadığı görülmüştür (Karaoğlan vd. 2016).

Proteoliz peynir olgunlaşmasında rol oynayan bir aşamadır. Olgun peynir çeşitlerinde tekstür, tat ve aromanın oluşumunda önemli bir yeri vardır (Fox vd. 1996). Kullanılan koagülantların; proteoliz prosesinin seviyesi ve çeşidini etkilediği bulunmuştur (Çelik ve Uysal 2009).

Saldamlı vd. (1998)'nin yaptığı bir çalışmada; peynir üretiminde farklı pıhtılaştırıcı kaynaklarının kullanımının, proteolize olan etkisini incelemek için bir araştırma yapılmıştır. Araştırmada beyaz peynirler 90 gün boyunca olgunlaştırıldıktan sonra proteoliz seviyeleri kontrol edilmiştir. En yüksek proteoliz seviyesine Fromase 46T(*Rhizomucor mihei* ' nin fermantasyon sonucu oluşturduğu kimozin) gösterdiği görülmüştür. En düşük proteoliz seviyesini ise; Maxiren 50'nin (*Kluyveromyces marxianus* var. *lactic* ' ten rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen kimozin) gösterdiği bulunmuştur (Saldamlı vd. 1998).

Yapılan diğer bir çalışmada rekombinant koyun kimozinin; süt pıhtılaştırma ve proteolitik aktiviteleri çeşitli kimozin kaynakları ile karşılaştırılmıştır. Bu kimozin kaynakları ise; rekombinant buzağı kimozini, inek renneti ve mikrobiyal rennettir. Yapılan analizler sonucunda; bu üç rennetin pH'nın yükselmesi ile koagülasyon zamanının arttığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda rekombinant deve kimozinin düşük pH'larda daha yüksek aktivite göstermesiyle paralel sonuçlar göstermiştir. Rekombinant koyun kimozinin 45 derece üzeri sıcaklıklarda stabilitesini koruyamadığı görülmüştür. bulunmuştur. Böylece deve kimozini ve koyun kimozininin göre yüksek sıcaklıklarda

stabil kalabildiğini göstermektedir. Koyun kimozinin proteolitik aktivitesinin, inek rennetinden oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca deve kimozinin de olduğu gibi koyun kimozinini de CaCl_2 konsantrasyonu ile artması ile aktivitesi artmaktadır (Rogelj vd. 2001).

İnan ve Ersöz (2016) yaptığı bir çalışmada glikolize olan ve olmayan yak kimozin geni *Pichia pastoris* mayasında *AOXI* altında, GS115 hostunda üretilmiştir. Büyük ölçekli fermentör üretimi sonucunda enzim aktivitesi 214 IMCU/mL bulunmuştur. Ayrıca enziminin optimum ph' sı 6-7 arasıyken, optimum sıcaklığı 40 derece bulunmuştur. Üretilen rekombinant yak kimozini ile beyaz peynir üretime yapılmıştır. Bunun sonucunda ticari rennet ile yapılan peynirin verimi % 12,5 bulunmuşken; rekombinant yak kimozinin ise % 12 bulunmuştur. Bu tezde yapılan çalışmaya göre ise rekombinant enzim aktivitesi 20 IMCU/mL bulunurken; enzimle yapılan beyaz peynir verim sonuçları; ticari rennet için; %14.8 iken; 1. Paralelin %15.56, 2. Paralelin ise %15.33 olduğu hesaplanmıştır. rekombinant yak kimozini ve deve kimozini verim sonuçlarına göre; ticari rennet ile oldukça yakın olduğu görülmüştür. Bu da peynir üretiminde ticari rennet yerine bu koagülantların kullanılabileceğini göstermektedir (İnan ve Ersöz 2016).

6. SONUÇLAR

Bu çalışma deve prokimozin geninin rekombinant klonlama teknikleri kullanılarak *GAP* promotörü (500 bp) altında *P. pastoris* mayasında rekombinant deve kimozinin üretimini kapsamaktadır.

Çalışmanın ilk amacı deve kimozi enzimini *GAP* promotörü ile rekombinant olarak üretimini gerçekleştirebilmektir. Üretilen bu proteinin büyük ölçekli proseslerde de etkin bir şekilde besiyeri kültürüne salgılablmesinin yanısıra, protein miktarının daha yüksek oranlarda olmasını amaçlamaktadır.

Enzimin rekombinant olarak üretilmesi amacıyla deve kimozin geni, yapısal bir promotör olan *GAP* altında; *P. pastoris* X33 hostuna entegre edilmiştir. Klonlama sonucunda tranforme olan klon kopya sayısını bulabilmek için Southern Blot analizi yapılmıştır ve analiz sonucu klonların tek kopya olduğu bulunmuştur.

Daha sonraki aşama engelli erlenmayerde deve kimozin üretimi için; pH, sıcaklık ve zaman arasındaki ilişkinin enzim üretimine olan etkisini belirleyebilmek için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bunun için 4 farklı pH değeri (3.0; 4.0; 5.0 ve 6.0); üç farklı sıcaklık (20°C; 24°C ve 28°C) kullanılmıştır. Üretim 3 paralel ve 2 tekerrür şeklinde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon 96 saat boyunca sürdürülmüştür. Her 24 saatte örnek alınmış ve her örnek besiyerine %50' lik Glikozdan 2.5 mL eklenmiştir. Yapılan enzim aktivitesi sonuçlarına göre; en yüksek aktiviteye sahip süpernatant 3 dakikada pıhtı oluşturmaktadır. Süpernatantların SDS-PAGE analizi sonucu enzimin molekül ağırlığının yaklaşık olarak 42 kDa olduğu bulunmuş ve bant kalınlığı ekspresyon süresi boyunca artmıştır. Engelli erlendeki üretim sonucu toplam protein miktarı yaklaşık olarak 40.8 mg/L bulunmuştur.

Engelli erlenmayerdeki üretim sonucu, yapılan enzim aktivitesi sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmesi için SAS programı kullanılmıştır. Böylece sıcaklık, pH ve zaman arasındaki ilişki incelenmiştir. Aynı zamanda büyük ölçekli fermentör üretimi için hangi sıcaklığın ve pH değerinin uygun olduğu tespit edilmiştir. Bu istatistiksel analiz sonuçlarına göre zaman, sıcaklık ve pH arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca üretim için en uygun pH değerinin 3 olduğu; sıcaklık için 20°C ve 24°C arasında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Fakat fermantasyon süreci boyunca; soğutucu için pH 3 ve 24°C 'de üretim yapılmasına karar verilmiştir.

Çalışmada enzimin karakterizasyonu yapılmış, enzimin optimum pH'sının 3.0 ve sıcaklığının 60°C olduğu saptanmıştır. Enzimin 2 saatte pH 3.0-6.5 arası stabilitesini korurken, pH 4 üzerine yükselmesi ile aktivitesi düşmeye başlamıştır.

Enzim aktivitesini 20-70°C'de iki saat boyunca muhafaza ettiği bulunmuştur. Sıcaklığın yükselmesi ile özellikle 65 derece ve üzeri sıcaklıklarda enzim aktivitesinde keskin bir azalış meydana gelmiştir. Bu sıcaklıklarda stabilitesini koruyabilmesi; peynir endüstrisi için alternatif, etkin bir rennet kaynağı olabileceğini göstermektedir.

Deve kimozi aktivitesi Mg^{+2} , Fe^{+3} varlığında aktivitesi artarken; Zn^{+2} , Cu^{+2} varlığında aktivitesi azalmaktadır. Enzimin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonların enzim

aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve en yüksek aktivitenin (%100) 40 Mm'da olduğu görülmüştür. 20 Mm-40 Mm CaCl₂ değerleri arasında aktivite doğrusal bir şekilde artarken, kalsiyum konsantrasyonu artması ile aktivitenin azalış gösterdiği görülmüştür.

Rekombinant deve kimozinin; *GAP* promotörü altında *P. pastoris* X33 hostunda büyük ölçekte fermentörde üretimi gerçekleştirilmiştir. Büyük ölçekte fermentörde (5-L) üretim 103 saat boyunca sürdürülmüştür. Üretim hipoksik şartlar altında pH 3.0 ve 24°C'de, %50 glikoz beslemesi ile gerçekleştirilmiştir. Üretim boyunca her örnek alınımında OD (Hücre yoğunluğu) ve WCW değerleri ölçülmüştür. Fermantasyon süresini uzatmak amacıyla, üretim esnasında fermentör vesselinden yaklaşık 2 litre örnek alınmıştır. Bu şekilde amaçlanan protein üretimini arttırmaya çalışmaktır.

Fermantasyon sonucu enzim aktivitelere bakılmıştır. 19 - 56. saat örneklerinde enzim aktivitesinin doğrusal bir şekilde arttığı görülmüştür. Bunun sonucunda en yüksek enzim aktivitesine 56. saatte ulaşılmıştır. Fakat 56. saatten sonra aktivite hızla düşmeye başlamıştır. Örneğin 19. saat örneği 6.29 IMCU/ mL (685.7 Soxhlet Unit/mL) aktivite gösterirken; 56. saat örneği 20 IMCU/mL (2000 Soxhlet Unit/mL) ve 80. Saat örneği 10.83 IMCU/mL (1181.1 Soxhlet Unit/mL) aktivite gösterdiği bulunmuştur. WCW değerlerine bakılacak olursa en yüksek değer olan 540.7g/l' ye; 80. saatte ulaşıldığı görülmüştür.

Süpernatantların SDS-PAGE analizi sonucu enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 42 kDa olduğu bulunmuş ve bant kalınlığı ekspresyonun 56. saatinden sonra azalmaya başlamıştır. Fermentördeki üretim sonucu üretim sonucu toplam protein tayini yapılmıştır. Bunun analize göre üretilen rekombinant protein miktarı yaklaşık olarak 214.7 mg/L' dir. *GAP* yapısal promotörü çok başarılı bir promotör olmasına rağmen, deve kimozinin *P. pastoris* X33 hostunda üretilmesinde yüksek bir başarı gösteremediği görülmüştür.

Üretilen rekombinant enzim ile beyaz peynir üretim çalışmaları yapılmıştır. Bu üretim aşamasında ticari rennet içeren kontrol örneği ve rekombinant deve kimozinini içeren 2 paralel örnek kullanılmıştır. Üretim için 56. saat enzim örneği ve her bir paralel için 3kg süt kullanılmıştır. Öncelikle ticari rennete göre örneklerin pıhtı süreleri belirlenmiştir. Ticari rennet 1:9 oranında seyreltilerek, sıvı çözeltisinden 0.1mL kullanılmıştır. Daha sonra maya kuvveti ve maya miktarları hesaplanmıştır. Bu hesaplamalara göre kontrolün pıhtı süresi 13 saniye iken; 1. Paralelin 37 saniye, 2. Paralelin 40 saniye bulunmuştur. Kontrolde kullanılan maya miktarı 1.083 mL iken; 1. ve 2. Paralel için sırasıyla 3.083mL, 3.333 mL maya kullanılmıştır. Kontrolün maya kuvveti 1:3692; 1. ve 2. Paralelin ise sırasıyla; 1:1297.3 ve 1:1200'dür. Peynir akış şemasına göre peynir üretimi yapılmıştır. Ticari rennetin kullanıldığı Kontrol örneğinden 444.2 gram; 1. paralelden 467.9 gram ve 2. paralelden 460.1 gram peynir elde edilmiştir.

En son olarak peynirler için verim hesabı yapılmıştır. Böylece 1 kg süttten ne kadar peynir oluştuğu hesaplanmıştır. Kontrolün verimi %14.8 iken; 1. paralelin %15.56, 2. paralelin ise %15.33 olduğu hesaplanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, (98): 5301–5317.
- Attallah, A.G. 2007. Characters of Chymosin Gene Isolated from Different Animal Sources at Molecular Level. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(9): 904-907.
- Bansal, N., Drake, M. A., Piraino, 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.
- Budak, T., Afşar, H. 2011. Development of a New Method for The Determination of Rennin Activity *Journal of Engineering and Natural Sciences Sigma*,(29):35-42.
- Cregg, J.M. 2007. *Pichia* Protocols Methods in Molecular Biology Series, (389): 1-10.
- Çakmakçıl, S., Cantürk, A., Çakır, Y. 2017. Peynir Üretimi İçin Sütü Pıhtılaştırıcı Enzimlere Genel Bir Bakış ve Güncel Gelişmeler. *Akademik Gıda*, 15(4): 396-408.
- Çelik Ş., Uysal Ş. 2009. Beyaz Peynirin Bileşim, Kalite, Mikroflora ve Olgunlaşması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40 (1): 141-151.
- Demain, A.L., Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, (27): 297–306.
- Ersöz, F. 2016. Rekombinant Tibet Öküzü (*Bos Grunniens*) Kimozin Enzim Üretimine Glikolizasyonun Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 66 s.
- Ersöz, F., İnan, M. 2019. Large scale production of yak chymosin A in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, (154): 126-133.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev.Int.*, (12); 457-509. Teuber, M., *Int. Dairy Fed. Bull.*, 1990, 251.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2000). *Fundamentals of Cheese Sciences*. Gaithersburg, Maryland: *Aspen Publication*.
- Goodrick, Jr., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B.M., Schiavi, S., Hoppe, H., Wan, N.C. 2001. High-Level Expression and Stabilization of Recombinant Human Chitinase Produced in a Continuous Constitutive *Pichia pastoris* Expression System. *Biotechnol Bioeng*, (74):492–497.
- Gümüş, P. 2015. Deve Kimozini ve Şirden Mayası Karışımının Beyaz Peynirin Bazı Kalite Özelliklerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 77 s.
- Hayaloğlu, A. A., Güven M., Fox, P. F. 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White Cheese ‘Beyaz Peynir’. *Int. Dairy J.*, (12); 635-648.

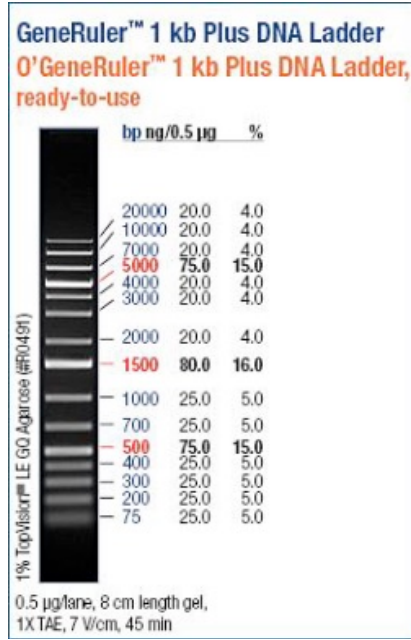
- Inan M, Fanders SA, Zhang W, Hotez PJ, Zhan B, Meagher MM.2007. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). *Methods Mol Biol* (389):65–76.
- Inan M., Meagher M.M., Zhang W.2000. Fermentation Strategies for recombinant proein expression in the methyophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, (5):275-287.
- 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.
- Jensen, L.J., Molgaard, A., Christian, J., Poulsen, N., Harboe, M., Simonsen, J., Lorentzen, A., Hjerno, K., Brink, J., Qvist, K., Larsen, S. 2013. Camel and Bovine Chymosin; The Relationship Between Their Structures and Cheese-Making Properties. *Acta Crystallographica*, (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. Biotechnology*, (28): 2087–2093.
- Kappeler S. R., van den Brink H. J., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B. & ohansen, E. 2006. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, (342): 647–654.
- Karaoglan, M., Karaoglan, F.E. and Inan, M. 2016. Comprasion of ADH3 promotor with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, (121): 112-117.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, Xiu., Ilangovan, K., Suzara, V., Düzgüneş, N., Renegopalakrishnan. 2007. Ekspression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *App Bichem Bitechnol*, (142): 105-124.
- Luo F., Jiang W.H., Yang Y.X., Li J., Jiang M.F.2016. Cloning and Expression Yak Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *The Asian- Australasian*, 29(10):1363-1370.
- Mohanty, A.K., Mukhopadhyay, U.K., Grover, S., Batish, V.K. 1999.Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances* (17): 205–217.
- Neelakantan, S., Mohanty, A.K., Kaushik, K. 1999. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Current Science*, (77): 143-148.
- Nosedá, D.G., Recupero, M.N., Blasco, M., Galvagno, M.A. 2014. Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under metanol- inducible AOX1 promoter” *Protein. Expression and Purification*, (104): 85-91.
- Nosedá, D.G., Recupero, M.N., Blasco, M., Ortiz, G.E.,Gavagno, M.A. 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.

- Özçelik, A.T., Yılmaz, S. and Inan, M. 2019. *Pichia pastoris* promoters. Brigitte Gasser and Diethard Mattanovich (Eds.), *Recombinant Protein Production in Yeast, Methods in Molecular Biology*, 97-112.
- Parashar, D. and Satyanarayana, T. 2016. Enhancing the production of recombinant acidic α -amylase and phytase in *Pichia pastoris* under dual promoters [constitutive (GAP) and inducible (AOX)] in mixed fed batch high cell density cultivation. *Process Biochemistry*, (51): 1315-1322.
- Petsch D, Anspach FB. 2000. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*, (76):97–119.
- Rogelj, B., Perko, A., Francky, A., Penca, V., Pungerc, J. 2001. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production. *American Dairy Science Association J. Dairy Science*, (84):1020–1026.
- Saldamlı, I., Kaytanlı, M. 1998. Utilisation of Fromase, Maxiren and Rennilase as alternative coagulating enzymes to rennet in Turkish White cheese. *Milchwissenschaft*, (53); 22-25.
- Schutter, K., Cheng-Lin, Y., Tiels, P., Hecke, A., Glinka, S., Lehman, J., Rouze, P., Peer, Y., Callewaert, N. 2009. Genome Sequence of The Recombinant Protein Production Host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, (27) : 6-14.
- Türk Standartları Enstitüsü (TSE). 1996. “Peynir Mayası”. TS:3844, Nisan.
- 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.
- Vogl, T. and Glieder, A. 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnol.*, 30(4): 386-404.
- 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.
- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* (186):37–44.
- Yılmaz, S. 2018. *Pichia pastoris* GAP Promotoru Altında Hücre Dışı Üretilen Rekombinant Proteinler İçin Yarı-Kesikli Proses Geliştirilmesi. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 114 s.
- Yu, ZL., Wu, XJ., Li, DY., Yang, S., Zhou, Z., Cai, J., Yuan, ZY. 2003. Enhancement of the production of Sam by Overexpression of SAM synthetase in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (shanghai)*, (35):127–132.
- Zepeda, A.B., Pessoa Jr, A. and Farias, J.G. 2018. Carbon metabolism influenced for promoters and temperature used in the heterologous protein production using *Pichia pastoris* yeast. *Brazilian Journal of microbiology*, (49): 119–127.
- Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, Chen SC, Guan WJ. 2004. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Acta Genetica Sin* 31(6):552–557.

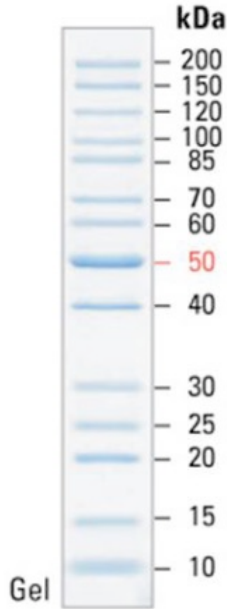
- Zhang, A., Luo, J., Zhang, T., Pan, Y., Fu, C., Tu, F. 2009. Recent Advances on The GAP Promoter Derived Expression System of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*, (36):1611–1619.
- Zhang, AL., Luo, JX., Zhang, TY., Chen, SC., Guan, WJ. 2004. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Acta Genetica Sin*, 31(6):552–55.

8. EKLER

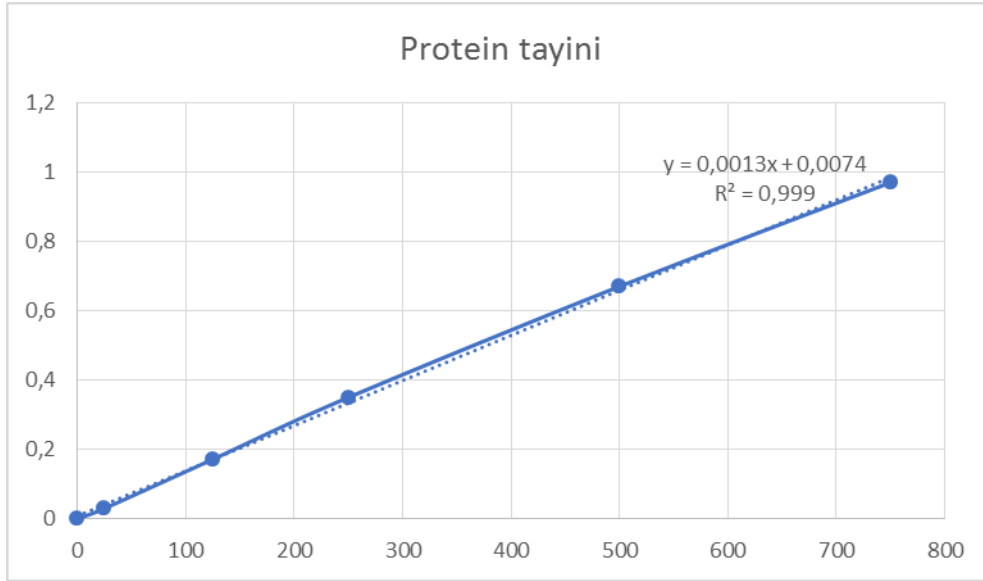
EK-1. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları



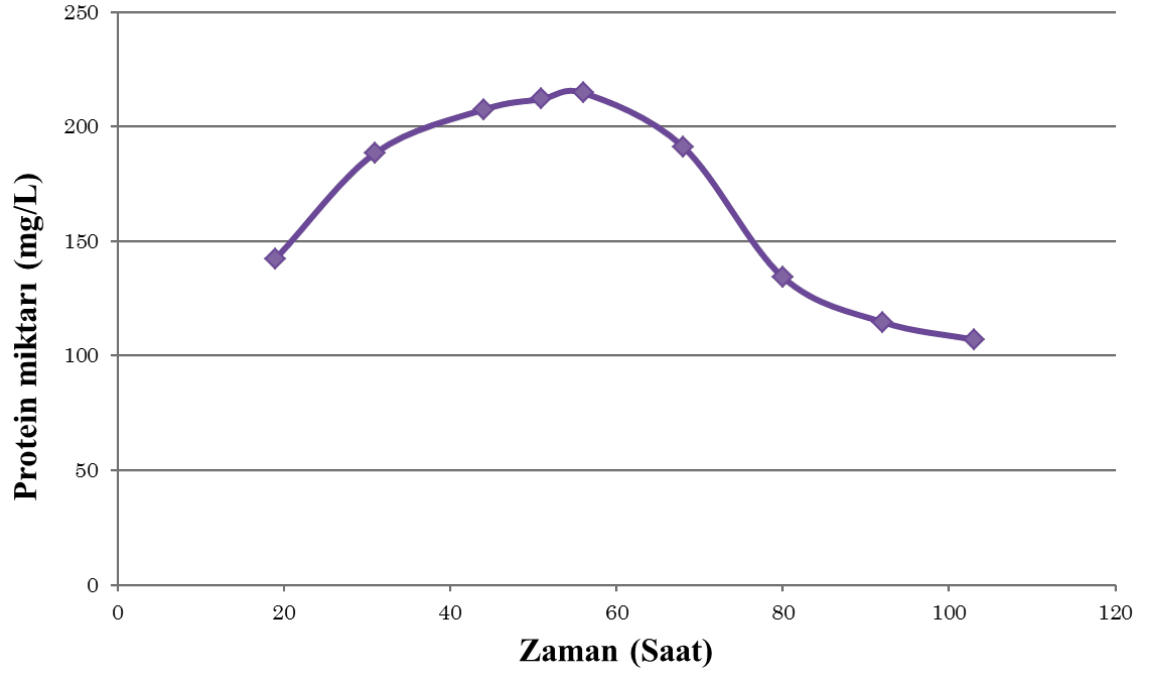
Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



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

EK-2. Toplam protein tayini standart grafiği

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

EK-3.Büyük Ölçekte Üretim Sonucu Gerçekleştirilen Toplam protein Tayini

EK-4. Kullanılan ticari rennet özellikleri

Product	Form	Strength
CHYMO-REN 660	Liquid	1/55.000 mcu/ml – 660 IMCU/ml

<https://www.maysagida.com.tr/en/urunler/fermented-chymosin-10>

EK - 5. Deve prokimozin DNA sekansı

GAATTCTCAGGTATCACCAGAATCCCATTGCATAAAGGAAAGACACTTAGA
AAGGCATTGAAGGAGAGAGAGGTTTGCTTGAGGACTTTTTGCAGAGACAACAG
TATGCTGTTTCTTCCAAGTACTCAAGTTTGGGTAAAGTTGCCAGAGAACCAT
TGACAAGTTACCTTGATTCTCAATACTTCGGTAAAATCTACATCGGAACCCC
ACCTCAGGAGTTTACAGTTGTCTTCGATACCGGATCTTCCGACTTGTGGGTT
CCTTCCATCTACTGTAAGTCAAACGTCTGCAAAAATCATCACAGATTTGACC
CAAGAAAGTCAAGTACCTTCAGAAACTTGGGTAAACCTCTTCCATTCATTA
TGGTACTGGATCAATGGAAGGTTTCTTGGGATACGATACTGTTACAGTCTCT
AACATCGTTGACCCAAATCAAACGTCTCGGTTTGTCCACAGAACAGCCTGGA
GAGGTTTTTACTTACTCAGAATTTGATGGTATTTTGGGACTTGCCTATCCATC
TTTGGCATCCGAGTACTCAGTTCCTGTCTTTGATAACATGATGGACAGACAT
TTGGTTGCAAGAGATCTTTTCTCAGTCTATATGGACAGAAATGGTCAAGGAA
GTATGTTGACTCTTGGAGCTATTGATCCAAGTTACTATACTGGTTCTTTGCAC
TGGGTTCCCTGTCACACTTCAACAGTACTGGCAATTCACTGTTGACTCTGTCA
CTATTAATGGTGTGCTGTCGCCTGTGTTGGTGGATGCCAGGCCATCTTGA
TACCGGTACTTCCGTTCTTTTCGGACCATCTTCCGACATTTTGAAGATCCAA
ATGGCAATTGGTGCTACTGAAAACAGATATGGAGAGTTTGATGTTAACTGT
GGTAATTTGAGATCTATGCCTACAGTTGTCTTTGAAATTAACGGAAGAGATT
ATCCACTTTCACCTAGTGCTTACACAAGTAAAGACCAAGGTTTTTGCACCTC
TGGTTTCCAGGGAGATAACAATTCCGAGTTGTGGATTCTTGGTGACGTTTTT
ATCAGAGAATACTACTCCGTTTTTGCAGAGCCAACAACAGAGTCGGTCTT
GCTAAAGCCATTTAATCTAGA

ÖZGEÇMİŞ

Özgül GÜZEL

ozgulguzel007@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği, Antalya
Lisans	Ankara Üniversitesi
2011-2016	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara