

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Pichia pastoris* MAYASINDA ALKOL DEHİDROGENAZ (*ADH3*)  
PROMOTORU İLE REKOMBİNANT FİTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ**

**Merve HADİMİOĞLU**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEMMUZ 2019**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Pichia pastoris* MAYASINDA ALKOL DEHİDROGENAZ (*ADH3*)  
PROMOTORU İLE REKOMBİNANT FİTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Merve HADİMİOĞLU  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez  
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından  
yüksek lisans tez projesi olarak FYL-2019-4328 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2019

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Pichia pastoris* MAYASINDA ALKOL DEHİDROGENAZ (ADH3)  
PROMOTORU İLE REKOMBİNANT FİTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

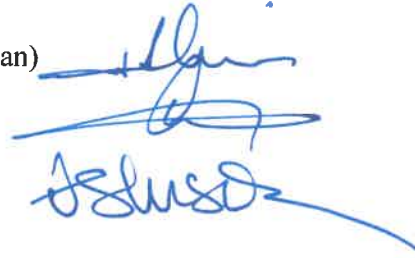
Merve HADİMİOĞLU  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 19/07/2019 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 ALKOL DEHİDROGENAZ (*ADH3*) PROMOTORU İLE REKOMBİNANT FİTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Merve HADİMİOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Temmuz 2019; 64 sayfa

Fitaz enzimi kağıt endüstrisinde, gıda sanayide, myo-inositol fosfatların hazırlanmasında ve özellikle yem sanayide kullanılan önemli bir enzimdir. Fitazlar genellikle hayvan beslenmesinde kullanılır. Fitazlar, fitattan fosfatı ayırarak fosforun yeme takviye ihtiyacını azaltır, yemin besleyici değerini artırır ve atılan fosfor seviyesini düşürür. Böylece biyoyararlılık artar ve çevresel kontaminasyon azalır. Gıda ve yem endüstrisinde kullanılan fitazlar genellikle bakteriler ve funguslardan elde edilmektedir. Mikrobiyal fitazlar geniş pH aralıklarında termostabil olarak bilinir. Son zamanlarda doğal kaynaklı enzimlerin yetersiz olmasından dolayı rekombinant üretimlerine olan ilgi artmıştır. *Pichia pastoris* rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan bir mayadır. Metanol, glikoz, sorbitol, gliserol, mannitol gibi karbon kaynaklarının yanı sıra etanolü de karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir.

Bu çalışmada *Escherichia coli* fitaz geni metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*'te alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotörü kontrolü altında üretilmiştir. Sentetik SNT5 ve doğal *ADH3* promotörü (900 bp) kullanılarak rekombinant fitaz üretilmiş ve iki promotör ile üretilen fitaz verimleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen üretim suşlarının kopya numaraları Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GT-PZR) analizi ile belirlenerek tek kopya klonlar seçilmiş ve erlenmayerde 96 saat boyunca etanol ile beslenerek üretimi gerçekleştirilmiştir. Sentetik *ADH3* promotörü ve doğal *ADH3* promotörü için enzim aktiviteleri sırasıyla 12203 U/ml ve 7613 U/ml olarak hesaplanmıştır. Sentetik promotörün doğal promotöre göre 96. saat sonunda yaklaşık % 60 daha fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir. SDS-PAGE analizi sonucu fitazın moleküler ağırlığının yaklaşık 55 kDa olduğu saptanmıştır. Enzimin optimum çalışma şartları pH 4.0 ve 60°C olarak tespit edilmiştir. Enzim 2 saatte pH 2.5-6.0 arası %90'ın üzerinde stabilitesini korumuştur. Fitaz 30 dakikada 60°C ve 75°C'de sırasıyla %87 ve %49 aktivitesini korumuştur. Fitaz aktivitesi  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonları tarafından artırılırken  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$  iyonları tarafından azaltılmıştır. Bu çalışma sonunda *ADH3* promotörü altında rekombinant olarak yüksek miktarda fitaz enzimi üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sisteminin uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada kullanılan yöntem, farklı promotör çalışmaları için örnek niteliğinde olmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** *ADH3* promotörü, Fitaz enzimi, *Pichia pastoris*, Rekombinant protein üretimi, Sentetik promotör

**JÜRİ:** Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

## ABSTRACT

### PRODUCTION OF RECOMBINANT PHYTASE ENZYME WITH ALCOHOL DEHYDROGENASE (*ADH3*) PROMOTER IN *Pichia pastoris*

Merve HADİMİOĞLU

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet INAN

July 2019; 64 pages

Phytase which is used in paper industry, food industry, preparation of myo-inositol phosphates and especially in feed industry, is an important enzyme. Phytases are generally used in nutrition feed. Phytase separates phosphate from phytate, decreases the need of feed supplementation by phosphorus, increases the nutritional value of the feed and decreases the level of discarded phosphorus. This situation, causes to increase bioavailability and decrease environmental contamination. Phytases which are used in food and feed industry, are usually derived from bacteria and fungi. Microbial phytases are known thermostable in wide pH ranges. Recently, because of insufficient natural sources of enzymes, interest of recombinant production has increased. *Pichia pastoris* is a yeast which is used in commonly recombinant protein production. *P. pastoris* can use carbon source such as methanol, glucose, sorbitol, glycerol, mannitol, as well as ethanol.

In this study, *Escherichia coli* phytase gene was produced under the control of alcohol dehydrogenase (*ADH3*) promoter in *P. pastoris*, which is a methylotrophic yeast. Recombinant phytase was produced to use by synthetic SNT5 and native *ADH3* promoter (900 bp) and phytase yields which are produced by two promoters, were compared. The copy numbers of the obtained production strains were determined by Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis, were selected single copy clones and this clones were produced by feeding ethanol during 96 hours in shake flasks. Enzyme activities of synthetic *ADH3* promoter and native *ADH3* promoter are 12203 U/ml and 7613 U/ml, respectively. It is determined that the synthetic promoter shows activity approximately 60% higher than the natural promoter at the end of 96th hour. According to SDS-PAGE analysis, the molecular weight of the phytase was found approximately 55 kDa. The optimum conditions of the enzyme were determined pH of 4.0 and temperature of 60°C. The enzyme was stable above 90% at pH 2.5-6.0 during 2 hours. The phytase retained 87% and 49% activities at 60 and 70°C for 30 min, respectively. The phytase was activated by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, but inhibited by Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup>. As a result of this study, *P. pastoris* is suitable expression system for recombinant high amount phytase production under the control of alcohol dehydrogenase (*ADH3*) promoter. The method used in the study has been exemplary for different promoter studies.

**KEYWORDS:** *ADH3* promoter, Phytase enzyme, *Pichia pastoris*, Recombinant protein production, Synthetic promoter

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Mehmet INAN

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Assoc. Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

## ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik alanı uçsuz bucaksız bilinmezliklerle dolu, çok fazla çalışma ve özveri isteyen bir alandır. Bu alanda çalışmayı gerçekten istiyordum, ancak biyoteknolojinin bu kadar zor bir iş olduğunu deneyimleyip öğrendim. Gece gündüz elimden gelenin en iyisini yapmaya çalıştım. 3 yıllık zorlu mücadelenin sonunda tezimi sunmak bana büyük bir mutluluktur. Bu üç yıl boyunca defalarca zorluklar yaşadım, konu değiştirdim ve bu günlere geldim. Bu süreç zarfında görüş ve fikirlerini esirgemeyen, tecrübeleriyle bana yol gösteren ve bu laboratuvarında araştırma fırsatı veren danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a çok teşekkür ederim.

Değerli jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN ve Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK hocalarıma tezimdeki yaptıkları düzeltmeler ve eleştirileri için 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 argede her zaman yanımda olan, desteklerini hiç bırakmayan ve yardımlarını esirgemeyen canım ekip arkadaşlarım Şeyda GÜLLÜ'ye, Özgül GÜZEL'e, Eroll BYTYQI'e ve Seda İÇEN'e çok teşekkür ederim.

Benden desteğini hiç esirgemeyen, en zor zamanlarımda yanımda olan, beni bu günlere getiren canım annem Nevriye HADİMİOĞLU'na, babam Mustafa HADİMİOĞLU'na ve kardeşim Emre HADİMİOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

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



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ .....	v
AKADEMİK BEYAN .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK TARAMASI .....	3
2.1. Metilotrofilik Mayalar.....	3
2.2. <i>Pichia pastoris</i> ( <i>Komagataella phaffii</i> ).....	3
2.3. Promotorlar.....	5
2.4. Etanol Metabolizması.....	7
2.5. Fitazın Tarihçesi .....	8
2.6. Fitaz Enzimi .....	9
2.7. Fitat.....	9
2.8. Fitik Asit.....	10
2.9. Fitaz Kaynakları .....	10
2.9.1. Bitkisel kaynaklı fitazlar.....	10
2.9.2. Hayvansal kaynaklı fitazlar .....	10
2.9.3. Mikrobiyal fitazlar .....	11
2.10. Fitazların özellikleri .....	11
2.10.1. Fitazların saflaştırılması .....	11
2.10.2. Sıcaklık ve pH.....	12
2.10.3. Moleküler genetik .....	12
2.10.4. Substrat spesifitesi .....	12
2.11. Fitazın Kullanım Alanları.....	12
2.11.1. Hayvan yemlerinde kullanımı.....	12
2.11.2. Gıdalarda kullanımı .....	13
2.11.3. Myo-inositol fosfatların hazırlanması.....	13
2.11.4. Kağıt endüstrisinde kullanımı.....	13

2.12. Fitaz Enzimi Üretimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar .....	13
3. MATERYAL VE METOT .....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Konukçu suşlar ve taşıyıcı plazmitler.....	20
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve restriksiyon enzimleri .....	20
3.1.3. Besiyerleri ve gelişim ortamları.....	20
3.2. Metot .....	20
3.2.1. Fitaz geni içeren plasmid pUC57FITOHIS vektörünün izolasyonu.....	20
3.2.2. Agaroz jel elektroforezi .....	21
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) .....	21
3.2.4. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu .....	23
3.2.5. Ekspresyon plazmidlerinin ligasyonu ve <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu.....	23
3.2.6. Plazmid izolasyonu.....	23
3.2.7. DNA ve plazmid konsantrasyonunun ölçülmesi .....	24
3.2.8. <i>P. pastoris</i> X33'e transformasyon .....	24
3.2.9. Fitaz üretimi.....	24
3.2.10. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi.....	24
3.2.11. Genomik DNA izolasyonu .....	25
3.2.12. Gen kopya sayısının belirlenmesi.....	25
3.2.13. SDS-PAGE analizi.....	26
3.2.14. Fitaz aktivitesinin ölçülmesi .....	27
3.2.15. Standart grafiğinin oluşturulması .....	28
3.2.16. Toplam protein tayini .....	29
3.2.17. Optimum pH'nın enzim üretimine etkisi.....	29
3.2.18. Fitazın karakterizasyonu.....	29
4. BULGULAR .....	33
4.1. Fitaz Geni İçeren Plazmid pUC57FITOHIS Vektörünün Doğrulanması .....	33
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Genlerin Çoğaltılması .....	33
4.3. Ekspresyon Plazmidlerinin Ligasyonu Ve <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu .....	34
4.4. Protein Ekspresyonunda Kullanılan Plazmitlerin Oluşturulması .....	36
4.5. Plazmitlerinin Lineer Hale Getirilmesi Ve <i>P. pastoris</i> 'e Transformasyonu .....	38
4.6. Erlenmayerde Fitaz Üretimi .....	39

4.7. Gerçek Zamanlı PZR İle Klonlarının Gen Kopya Sayılarının Belirlenmesi.....	39
4.8. SDS-PAGE Analizi İle Fitaz Üretiminin Belirlenmesi.....	41
4.9. Fitaz Aktivitesi Sonuçları.....	43
4.10. Fitaz Enziminin Karakterizasyonu .....	44
4.10.1. Enzimin optimum pH'sının tespiti.....	44
4.10.2. Enzimin pH stabilitesinin tespiti.....	45
4.10.3. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespiti .....	46
4.10.4. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespiti .....	46
4.10.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespiti.....	47
5. TARTIŞMA .....	49
6. SONUÇLAR .....	53
7. KAYNAKLAR .....	54
8. EKLER.....	60
ÖZGEÇMİŞ	

## AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "*Pichia pastoris* Mayasında Alkol Dehidrogenaz (*ADH3*) Promotoru İle Rekombinant Fitaz Enzimi Üretimi" 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

Merve HADİMİOĞLU



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

bç	: Baz çifti
dk	: Dakika
g	: Gram
xg	: Göreceli santrifüj kuvveti
$\mu$	: 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)
BMEY	: Tamponlanmış kompleks etanol besiyeri (buffered ethanol complex medium)

- 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. Mayalarda etanol metabolizması .....	8
Şekil 2.2. Myo-inositol heksakifosfatın (fitik asit) myo-inositol heksakifosfat 3- ve 6-fosfohidrolaz ile hidrolizi .....	9
Şekil 3.1. İnorganik fosfat miktarı standart grafiği .....	29
Şekil 4.1. <i>pUC57FITOHIS</i> plazmidinin <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> enzimleri ile kesimi jel görüntüsü.....	33
Şekil 4.2. PZR sonrası jel görüntüsü .....	34
Şekil 4.3. a) <i>DH5α E. coli</i> <i>pADH3αA-900-FITO</i> plazmidinin <i>EcoRV</i> enzimi ile kontrolü, b) <i>DH5α E. coli</i> <i>pSNT5αA-FITO</i> plazmidinin <i>XbaI</i> enzimi ile kontrolünün jel görüntüsü .....	35
Şekil 4.4. Seçilen plazmidlerin <i>NotI</i> , <i>XhoI</i> enzimleri ile kontrolünün jel görüntüsü .....	35
Şekil 4.5. Ligasyon sonrası elde edilen doğal <i>ADH3</i> promotorlarıyla fitaz enzim üretim vektörü, <i>pADH3αA-FITO</i> .....	36
Şekil 4.6. Ligasyon sonrası elde edilen Sentetik <i>ADH3</i> promotorlarıyla fitaz enzim üretim vektörü, <i>pSNT5αA-FITO</i> .....	37
Şekil 4.7. Plazmitlerin <i>ApaI</i> enzimi ile kesimi jel görüntüsü .....	38
Şekil 4.8. YPD agar plakada transformant <i>P. pastoris</i> hücrelerin gelişimi görüntüsü.....	38
Şekil 4.9. a) ve b) Fitaz enziminin çalkalamalı inkübatörde üretimi.....	39
Şekil 4.10. Referans gen GAP kullanılarak $C_t$ değerlerinin belirlenmesi .....	40
Şekil 4.11. Kopya sayısı belirlenecek ADH promotörü için $C_t$ değerlerinin belirlenmesi .....	40
Şekil 4.12. <i>P. pastoris</i> X33- <i>pADH3αA-900-FITO</i> ve <i>P. pastoris</i> X33- <i>pSNT5αA-FITO</i> klonlarının fitaz üretimlerinin 72. saat örneklerinin SDS görüntüsü .....	41
Şekil 4.13. <i>P. pastoris</i> X33- <i>pSNT5αA-FITO</i> S7 klonunun farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0) fitaz üretiminin 72. saat örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü .....	42
Şekil 4.14. <i>P. pastoris</i> X33- <i>pSNT5αA-FITO</i> S7 klonu ve <i>P. pastoris</i> X33 - <i>pADH3αA-900-FITO</i> D4 klonunun zamana karşı karşılaştırmasının SDS PAGE görüntüsü .....	43

<b>Şekil 4.15. a) ve b) Fitaz aktivitesi tayini analizi</b> .....	44
<b>Şekil 4.16. <i>P. pastoris</i> X33- pADH3αA-900-FITO D4 klonu ve <i>P. pastoris</i> X33- pSNT5αA-FITO S7 klonunun zamana karşı fitaz aktivitesi karşılaştırmasının sonuçları</b> .....	44
<b>Şekil 4.17. Enzimin optimum pH'sının tespit grafiği</b> .....	45
<b>Şekil 4.18. Enzimin pH stabilitesinin tespit grafiği</b> .....	45
<b>Şekil 4.19. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespit grafiği</b> .....	46
<b>Şekil 4.20. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespit grafiği</b> .....	47
<b>Şekil. 4.21. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespit grafiği</b> .....	48



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>P. pastoris</i> promotorları .....	6
Çizelge 2.2. Mikrobiyal fitazların özellikleri .....	11
Çizelge 3.1. PZR ısı döngüsü programı için süre ve sıcaklık koşulları .....	21
Çizelge 3.2. PZR ısı döngüsü programı için süre ve sıcaklık koşulları .....	22
Çizelge 3.3. KOD PZR karışım hazırlanışı.....	22
Çizelge 3.4. PZR'de kullanılacak olan primerler.....	22
Çizelge 3.5. PZR için karışımın hazırlanışı .....	25
Çizelge 3.6. Gerçek zamanlı PZR programı için süre ve sıcaklık koşulları .....	26
Çizelge 3.7. Fitaz aktivitesinde kullanılan bileşen miktarları .....	27
Çizelge 3.8. İnorganik fosfat bileşen miktarları .....	28
Çizelge 3.9. 1 mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam .....	31
Çizelge 3.10. 10 mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam .....	31
Çizelge 3.11. 20 mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam .....	32
Çizelge 4.1. Gerçek zamanlı pzs ile klonların gen kopya sayısının belirlenmesi .....	40

## 1. GİRİŞ

Fitazlar (miyo-inositol heksakifosfat 3- veya 6-fosfohidrolazlar; EC 3.1.3.8 veya EC 3.1.3.26) fitik asidin ve onun tuzlarının (fitatlar) hidrolitik bozulmasını katalize eder. 3-Fitazlar mikroorganizmalardan, 6-fitazlar bitkilerden elde edilir (Mullaney vd. 2000). Mikrobiyal kaynaklı fitazlar genellikle funguslardan izole edilmektedir (Kaur vd. 2010). Mikrobiyal fitazlar pH ve ısıya duyarlıdır, geniş pH aralıklarında termostabil olarak bilinir (Pasamontes vd. 1997).

Fitaz enzimi gıda sanayide, kağıt endüstrisinde, myo-inositol fosfatların hazırlanmasında ve özellikle yem sanayide kullanılan önemli bir enzimdir (Kerovuo 2000). Fitazlar yem sanayide kullanılarak yemin besleyici değerini artırır, atılan fosfor seviyesini düşürür çevresel kontaminasyonu azaltır. Bu nedenle fitazların ticari üretimi önem taşımaktadır (Johnson vd. 2010). Son yıllarda, özellikle endüstriyel ölçekte enzim üretiminde daha yüksek verim elde etmek amacıyla rekombinant protein üretimi oldukça önem kazanmıştır.

Günümüzde büyük ölçekli rekombinant protein üretiminde özellikle birkaç mikroorganizmanın önemi artmıştır. Bu mikroorganizmalardan biri olan metilotrofik mayalar metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), rekombinant protein üretiminde kullanılan sistemlerin başında gelmektedir. *P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde kullanılan besi ortamında birçok faktör enzim üretimini etkilemektedir. Bunlar arasında metanol konsantrasyonu, karbon kaynağı, oksijen konsantrasyonu, sıcaklık, yüksek proteaz ekspresyon seviyeleri, besin eksikliği, ürün spesifikliği, metanolün sağlık ve güvenlik açısından negatif etkileri yer almaktadır. Proteinin stabilitesi ve aktivitesi biyoteknolojik, farmakolojik ve gıda endüstrisinde büyük önem arz etmektedir. Proteinin stabilitesi; üretimin optimizasyonu, proteinin saflaştırılması, formülasyonu, depolanması, proteinin üç boyutlu yapısı için gereklidir (Zepeda vd. 2018).

Son yıllarda, heterolog proteinlerin üretiminde *P. pastoris* metilotrofik mayasında çalışmalar devam etmektedir. Protein ekspresyon sisteminde *P. pastoris* mayasının popüler olarak kullanılmasının sebepleri şunlardır: (1) *Saccharomyces cerevisiae* ile benzerliği ve *P. pastoris*'te genetik manipülasyonların kolaylığı, (2) *P. pastoris*'in yüksek seviyelerde hücre içi ve hücre dışı protein üretimi, (3) birçok ökaryotik post translasyonel modifikasyonda yeteneği: glikozilasyon, disülfid bağları ve proteolitik süreçler, (4) mevcut ticari kitlede uygun ekspresyon sistemine sahip olmasıdır (Cereghino ve Cregg 2000).

*P. pastoris*, genellikle biyofarmasötik ve endüstriyel enzimlerin üretimi için kullanılan bir protein ekspresyon hostudur. *P. pastoris*, mevcut ve güçlü promotorlar varlığında, hücre içinde ve dışında yüksek miktarda g/l rekombinant protein üretimi yapabilir (Ahmad vd. 2014). *P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde *AOX1*, *DAS*, *FLD1*, *ICL1*, *PEX8* gibi birçok indüklenebilir promotorlar kullanılmaktadır (Vogl ve Glieder 2013). Bu promotorlara alternatif olarak alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotoru da kullanılabilir. *ADH3* promotoru etanolla indüklenebilen güçlü bir promotordur. Bu promotor, *P. pastoris* mayasında etanol metabolizmasında etanolün katabolize edilmesinde görev alan *ADH3* geninin regülasyonundan sorumludur (Karaoglan 2016b).

*ADH3* promotorunun diğer promotorlara göre gücü, rekombinant protein üretimlerinde kullanılabilirliği ile ilgili çalışma laboratuvarımızda yapılmıştır. Çalışmada *Aspergillus niger* ksilanaz geni kullanılarak üç farklı  $P_{ADH3}$ ,  $P_{AOX1}$  ve  $P_{GAP}$  ile *P. pastoris* 'te rekombinant protein üretimi karşılaştırılmıştır.  $P_{ADH3}$  etanolla,  $P_{AOX1}$  metanolla ve  $P_{GAP}$  glikozla beslenmiştir. Fermentörde 72 saat sonunda en fazla üretim *ADH3* promotoruyla sağlanmış ve bu değer *AOX1*'e göre 1.8 kat, *GAP*'a göre 6.4 kat fazla çıkmıştır. Sonuçlar *ADH3* promotorunun diğer promotorlara alternatif olabileceğini göstermiştir (Karaoglan vd. 2016).

Laboratuvarımızda yapılan diğer bir çalışmada, *P. pastoris ADH3* promotorunun sondan silme analizleri ile promotor aktivitesinden sorumlu en kısa DNA bölgesi belirlenmiş ve doğal (900 bç) *ADH3* promotoru olarak adlandırılmıştır. *ADH3* promotor bölgesinde içten silme analizleri gerçekleştirilmiş ve pozitif regülasyondan sorumlu bölgeler ile sentetik *ADH3* promotorları oluşturulmuş, en fazla aktivite sentetik (SNT5) *ADH3* promotorunda gözlenmiştir (Karaoglan 2016a).

Bu çalışmada *Escherichia coli* fitaz geni sentetik promotor SNT5 ve doğal *ADH3* promotoru (900 bç) kullanılarak *P. pastoris* mayasında üretilmiştir. Analizler yapıldıktan sonra aynı kopya sayısındaki klonlar belirlenmiş ve erlenmayerde 96 saat boyunca üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretimler sonucunda klonların ürettikleri enzim miktarı tayin edilmiş, 2 promotorun verimleri karşılaştırılmıştır. Sonrasında fitazın karakterizasyonu yapılarak enzimin optimum çalışma şartları belirlenmiş ve çeşitli metal iyonlarının aktiviteye etkisi incelenmiştir.

## 2. KAYNAK TARAMASI

### 2.1. Metilotrofilik Mayalar

Ökaryotik metilotroflar, gelişebilmek için karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanmaktadır ve bu kapsamda sınırlı sayıda maya türü mevcuttur. Metanol metabolizmasında membranlı organeller, peroksizomlar anahtar öneme sahiptir. Metanolde gelişebilen hücreler glikoz ve gliserol gibi farklı karbon kaynağına sahip kültür ortamına transfer edildiğinde; peroksizomlar proteolitik degradasyona uğrayarak aktivitesini kaybeder. Diğer mayaların aksine metilotrofik mayalar gliserol, etanol ve asetatı kullanabilir (Zepeda vd. 2018). Metilotrofik mayaların, metilotrofik bakterilerden farklı olmasının üç sebebi vardır:

1) Mayalar, metanol oksidasyonu için metanol dehidrogenaza sahip değilken, alkol oksidaza sahiptir.

2) Bu prosesi bölümlere ayırırsak; mayalarda metanol oksidasyonunun gerçekleştiği kısım peroksizom organelidir. Bu membranlı yapılar, alkol oksidaz ve katalaz gibi metanol oksidasyonu sürecindeki bazı enzim ve metabolitleri içerir. Mevcut metanol varlığında, peroksizomlar hücre hacminin %90'ını oluştururken glikoz, gliserol gibi karbon kaynaklarının varlığında bu oran belirlenemez.

3) Enerji üretim metabolik yolları metilotrofilik bakterilerde elektron transferi zinciri, metanol oksidasyonu ile bağlantılıdır. Fakat metilotrofilik mayalarda metanol, formaldehite dönüştürüldüğünde, reaksiyonlarda NADH formu üretilerek enerji kaybı meydana gelir (Zepeda vd. 2018).

Metilotrofilik mayalar biyoteknolojik alanda çok önem taşımaktadır. *Pichia* ve *Hansenula* yabancı proteinlerin ekspresyon sistemlerinde *E.coli* ve *S.cerevisia*'ya alternatif olarak kullanılmaktadır.

### 2.2. *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)

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

Geçmişte rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan ilk ökaryotik ekspresyon sistemi *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Bunun başlıca sebebi ise genetik çalışmaların bu maya ile başlamasıdır. Fakat *S. cerevisiae* ekspresyon sistemi büyük ölçekli üretimler için her zaman uygun değildir. Bunun sebepleri ise; üretim esnasında plazmid kayıpları, aşırı glikolizasyon ve düşük protein verimidir (Zhang vd. 2000). Bu sebeplerden dolayı *Pichia* ekspresyon sistemine yönelim artmıştır. *P. pastoris*'in birçok avantajlarının yanı sıra modern biyolojide iyi karakterize edilmiş ekspresyon sistemlerinden biri olan *S. cerevisiae* ile benzerliği de host sisteminin başarısını arttırmıştır (Cregg vd. 2007).

*P. pastoris*, genellikle biyofarmasötik protein ve endüstriyel enzimlerin üretimi için kullanılan bir protein ekspresyon konukçusudur. *P. pastoris*, mevcut ve güçlü promotorlar varlığında, hücre içinde ve dışında yüksek miktarda (gram/litre) rekombinant protein üretimi yapabilen metilotrofik bir mayadır. *P. pastoris* yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilmekte ve birçok kompleks proteinin ekspresyonu için kullanılmaktadır. Bu kompleks proteinlerde heterooligomerler membrana bağlıdır, proteolitik bozulmaya eğilimlidir. Üretim verimleri düşüktür ve üretimi tam olarak çözülememiştir. Bunu artırmaya yönelik vektör ve host dizaynı gibi çalışmalar yapılmaktadır. *P. pastoris* ile ticari olarak uygulamalar yapılmakta, membran protein ekspresyonu için çalışmalar sürmektedir (Ahmad vd. 2014).

*P. pastoris* özellikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için mükemmel özelliklere sahip bir mayadır. *P. pastoris*'in seçilmesinin nedenleri arasında ekonomik, hızlı ve etkili bir protein ekspresyon sistemine sahip olması özellikleri yer almaktadır. Promotor, karbon kaynağı, üretim hacmi, pH, sıcaklık gibi birçok faktör protein üretimini etkilemektedir (Zepeda vd. 2018).

*P. pastoris* ekspresyon sisteminin diğer ökaryotik ve prokaryotik sistemlere göre birçok avantajı bulunmaktadır. Bunların başlıcaları; kompleks olmayan besiyeri şartları istememesi, hızlı büyümesi sayesinde yüksek hücre ağırlığına (130 g/kuru ağırlık) ulaşması, ürettiği proteinin çoğunun rekombinant protein olmasıdır. Endotoksin ve bakteriyofaj kontaminasyonlarını elemine etmektedir. İyi tasarlanmış maya vektörleri sayesinde genetik manüplasyonları kolaydır. Ekspresyon sistemi için ticari kiti bulunmaktadır. Çeşitli postranlasyonel modifikasyonlara sahiptir. Bunlar; polipeptid katlanması, disülfüt bağlarının oluşması, glikolizasyon, metilasyon, açilleme (asilasyon) ve hücre içi bölgeleri hedefleyerek hücre dışına protein salgılanmasıdır. Bu salgılan proteini maya hücrelerini hasat etmeden, besiyerinden saflaştırılabilmektedir (Cregg vd. 2007).

*P. pastoris* mayasında yabancı bir genin ekspresyonu üç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama; istenilen genin ekspresyon vektörüne konulması, ikincisi ekspresyon vektörünün *P. pastoris* genomu ile bütünleşmesi ve son aşaması üretilen yabancı genin seçimidir (Cregg vd. 2007). Yabancı proteinlerin ekspresyonunda verimi etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar; promotor, gen kopya sayısı, transkripsiyonel ve translasyonel verimlilik, proteinlerin katlanması gibi. *P. pastoris*'te ekspresyonda gen kopya sayısı ve gen dizisi optimizasyonu iki önemli faktördür. Gen kopya sayısı ekspresyon seviyesini artırabilir (Yang vd. 2012).

*P. pastoris*'in fermentasyonunda glikoz karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Glikoz; gliserol, sorbitol ve diğer birçok karbon kaynağına göre daha düşük maliyete sahiptir. Fitaz enziminin endüstriyel üretimlerinde de gliserol toplam maliyetin yarısından fazlasını tutmaktadır. Bu nedenle glikoz, gliserole alternatif olarak kullanılabilir (Hang vd. 2009).

Heterolog proteinlerin fermentörde, yüksek hacimde üretilmesi üç aşamada gerçekleşir. İlk aşama, gliserol gibi fermente olmayan karbon kaynaklarıyla tuz içeren ortamda geliştirilmesidir. Gliserol tükendiğinde ikinci faz gliserolün eklenmesiyle başlar. İkinci aşamada yan ürünler (etanol vb.) oluştuğu için önemlidir, kesikli fazda yan ürünler tüketilir ve hücreler indüksiyona hazırlanır. Üçüncü faz, sınırlı

konsantrasyonda metanol eklenmesiyle başlayarak rekombinant protein üretimi gerçekleştirilir. Sonra ortama metanol eklenmesiyle, peroksizomların kütlelerinde artış meydana gelir. AOX enzimi gibi 10'dan fazla enzim metanol metabolizmasında kullanılır (Zepeda vd. 2018).

*P. pastoris*'de protein sentezinde metanolün indüklenmesi farklı heterolog gen ekspresyonunda kullanılabilir. Bu mayanın hücre içi ve hücre dışı protein ekspresyonu gerçekleştirilmesi nedeniyle en önemli mikroorganizmaların başında gelir. Bu ekspresyon modeli mg'dan g başına aktif üretimi mümkün kılar. Bu sistem üretimde yüksek hücre yoğunlukları ve verimlilikte olmakla birlikte sistemin bazı karakteristik özellikleri şöyle sıralanabilir; (1) besi ortamı, ekipman ve malzeme maliyeti diğer memeli ve böcek hücrelerinden daha ekonomiktir, (2) *P. pastöris*'te rekombinant protein üretimi için metanol eklenmesi yapılabilir ve genetik yapıdaki stabilitenin sağlanması için genellikle kromozom içerisine entegre edilir, (3) bu mikroorganizmalar glikolizasyon gibi post translasyonel modifikasyonları gerçekleştirilmesi ile ökaryotik hücre yapısı göstermektedir, (4) klonlanan proteinin sekresyonu sayesinde ön saflaştırma işlemleri pratik bir şekilde üretilebilir, (5) bu maya endotoksin üretmediği için güvenli bir mikroorganizma olarak değerlendirilebilir (Zepeda vd. 2018).

### 2.3. Promotorlar

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*, son zamanlarda heterolog protein üretiminde önemli bir çalışma kaynağı haline gelmiştir. Tek hücre proteini (SCP) ile çalışmalar yaklaşık 40 yıldır devam etmektedir. 1980'lerde *P. pastoris* ile heterolog protein ekspresyon sisteminde güçlü ve düzenleyici alkol oksidaz (*AOXI*) promotörü kullanılmıştır (Cregg vd. 1985). *P. pastoris*'te glikoz, gliserol veya etanol varlığında *PAOXI* kuvvetle baskılanır. Bu karbon kaynaklarının tükenmesi üzerine baskı kalkar, ve sadece metanol eklenmesi üzerine tamamen indüklenir (Inan ve Meagher 2001).

*P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan indüklenebilir bir promotor olan *AOXI* ile yüksek miktarda heterolog protein üretimi yapılmıştır. Büyük çaplı üretime 1990'larda geçilmiş ve 20 g/l hidroksinitril liyaz enzimi üretilmiştir (Hasslacher vd. 1997). *P. pastoris*'te *AOXI* promotörü altında protein ekspresyonu üç aşamadan oluşmaktadır. Bunların ilki gliserol kesikli faz, ikincisi gliserol yarı kesikli faz ve sonuncusu metanol indüklenme fazıdır. Metanol indüklemesi *AOXI* promotörü altında olur ve rekombinant protein sentezi yapılır (Parashar ve Satyanarayana 2016).

*AOXI* promotörü kullanımı, proteinlerin ekspresyonu için birçok avantaja sahiptir. Toksik proteinlerin ekspresyonunda indüklenebilir promotorlar tercih edilir. İndüklenebilir promotorlarla rekombinant protein üretiminde, protein ekspresyonu ve protein üretim fazı büyüme fazını etkilemez. 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 ekspresyonunu sağlayabilir. Ayrıca bu kurucu promotor, prosesin yönetimini kolaylaştırabilir. Bu promotor selection marker'ını ekspres etmek için ve metabolit akışını kontrol etmek için kullanılabilir (Ahmad vd. 2014). Metanol son derece yanıcı ve tehlikeli bir maddedir, bunun için büyük ölçekli fermentasyonlar için arzu edilmez.

Bu nedenle  $P_{AOXI}$ 'e alternatif, metanol olmadan uyarılabilecek yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşılabilir başka promotörler arzu edilmektedir (Ahmad vd. 2014).

**Çizelge 2.1.** *P. pastoris* promotörleri (Vogl ve Glieder 2013; Özçelik vd. 2019)

Gen adı	Gen ürünü	Regülasyonu	Ekspresyon seviyesi
<i>AOXI</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

$P_{GAP}$ , *P. pastoris*'te rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan güçlü yapısal bir promotördür. Metanol indüksiyonu gerektirmez, glukoz içeren ortamda yapısal ekspresyon gösterir. Gelişim için karbon kaynağının değişimine ihtiyaç duyulmaz. Ancak toksik proteinlerin ekspresyonunda kullanılmaz (Macauley-Patrick vd. 2005).

Diğer bir güçlü promotör olan ve metanolden yararlanan *FLD1* promotörü, formaldehit dehidrojenaz enziminin ekspresyonunu kontrol eder ve metanolü karbon kaynağı, metilamini azot kaynağı olarak kullanır. Diğer bir indüklenebilir promotör olan peroksizomal matriks proteini (*PEX8*), metanol ya da oleik asit ile indüklenir. İsositrat liyaz (*ICL1*) promotörü, etanolla indüklenebilir (Shen vd. 1998).

Dihidroksiaseton sentaz (*DAS*), metanolla indüklenebilen *AOXI* promotörüne alternatif kullanılabilen güçlü bir promotördür. Translasyon uzama faktörü 1 (*TEF1*), diğer bir güçlü yapısal promotördür. *YPT1* geni, salgılamada rol alan GTPaz enzimini kodlamaktadır. *YPT1* promotörü, düşük seviyede yapısal ekspresyon sağlamaktadır. *PET9*; iç mitokondiyal membranda ADP/ATP taşıyıcı, yapısal bir promotördür (Vogl ve Glieder 2013).

*P. pastoris* mayası; glukoz, gliserol, metanol, sorbitol, mannitol gibi karbon kaynaklarının yanı sıra etanolü de karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. *P. pastoris*'in crabtree-negatif bir maya olmasına rağmen aerobik ortamında az da olsa etanol üretiminin gerçekleştiği ortaya konulmuştur (İnan ve Meagher 2001).

Alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotörü ile rekombinant protein üretimi üzerine patent (US 8,222,386) önceden alınmıştır. Ancak *ADH3* promotörünün diğer promotörlere göre gücü, rekombinant protein üretimlerinde kullanılabilirliği ile ilgili çalışma laboratuvarımızda yapılmıştır. Çalışmada *Aspergillus niger* ksilanaz geni kullanılarak üç farklı  $P_{ADH3}$ ,  $P_{AOX1}$  ve  $P_{GAP}$  ile *P. pastoris* 'te rekombinant protein üretimi karşılaştırılmıştır.  $P_{ADH3}$  etanolle,  $P_{AOX1}$  metanolle ve  $P_{GAP}$  glikozla beslenmiştir. Fermentörde 72 saat, 30°C, pH 5.0 ve %30 çözünmüş O<sub>2</sub> ile üretim sağlanmıştır.  $P_{ADH3}$  ile 3725 U/ml,  $P_{AOX1}$  ile 2095 U/ml ve  $P_{GAP}$  ile 580 U/ml ksilanaz üretilmiştir. En fazla üretim *ADH3* promotörüyle sağlanmış ve *AOX*'e göre 1.8 kat, *GAP*'a göre 6.4 kat fazla olmuştur. Sonuçlar *ADH3* promotörünün diğer promotörlere alternatif olabileceğini göstermiştir (Karaoglan vd. 2016).

*ADH3* geni, *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanolün katabolize edilmesinde görev alan tek genidir ve bu genin regülasyonundan *ADH3* promotörü sorumludur. *ADH3* promotörü etanolle indüklenebilen güçlü bir promotördür (Karaoglan 2016b).

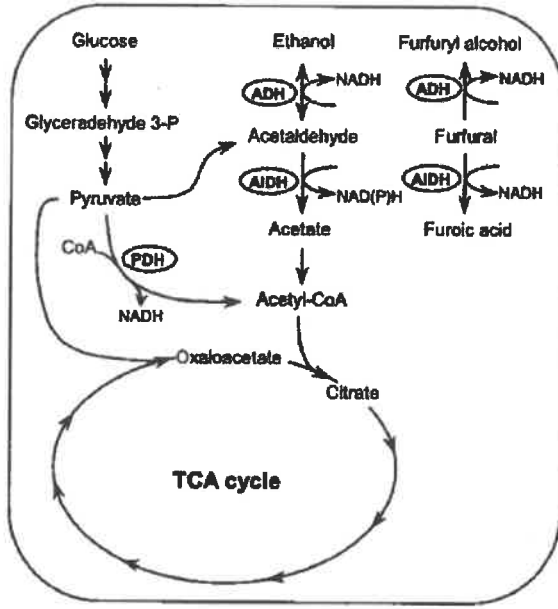
Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, *P. pastoris ADH3* promotörünün sondan silme analizleri ile promotör aktivitesinden sorumlu en kısa DNA bölgesi 900 bp olarak belirlenmiş ve bu doğal (900 bp) *ADH3* promotörü olarak isimlendirilmiştir. Belirlenen *ADH3* promotör bölgesinde içten silme analizleri gerçekleştirilmiş ve promotörün pozitif ve negatif regülasyonundan sorumlu DNA bölgeleri tespit edilmiştir. Saptanan pozitif regülasyondan sorumlu bölgeler (UAS) ile beş farklı sentetik *ADH3* promotörü oluşturulmuş, en fazla aktivite sentetik 5 (SNT5) *ADH3* promotöründe gözlenmiştir. SNT5 ve doğal (900 bp) *ADH3* promotörleri kullanılarak ksilanaz enzimi üretilmiş ve verimleri karşılaştırılmıştır. SNT5 ile doğal (900 bp) *ADH3* promotörüne göre yaklaşık iki katı aktivite kaydedilmiştir (Karaoglan 2016a).

## 2.4. Etanol Metabolizması

Etanol metabolizması üzerine çalışmalar çoğunlukla *S. cerevisiae* üzerinde yapılmış ve metanolün yanında etanolü de karbon kaynağı olarak kullanabilen *P. pastoris* mayasında bu bilgilerden faydalanılarak etanol metabolizması üzerine çalışmalar mevcuttur. Mayalarda ortaya çıkarılmış glukozdan etanol üretimi Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir.

Alkol fermantasyonu, piruvatın parçalanmasıyla başlar, glikolizin metabolik hızına ve solunum kapasitesine bağlıdır. Bu süreçte alkol dehidrogenaz enziminin reaksiyonu katalizlemesiyle piruvat, asetaldehit ve son aşamada etanole dönüşür. Ayrıca mayanın solunumu için etanol, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Bu olayda etanol, alkol dehidrogenaz tarafından asetaldehite, asetaldehit dehidrogenaz tarafından asetata ve son olarak asetil-coA döngüsüyle asetil-coA'ya dönüştürülür (Zepeda vd. 2018).





Şekil 2.1. Mayalarda etanol metabolizması (Karaoglan 2016b)

Metilotrofilik organizmalardaki metanol metabolizmasının düzenlenmesi, enzimlerin sentezlenmesi, aktivasyonu ve degradesyonu gibi karmaşık prosesleri içermektedir. Bu enzimler, metanol, formaldehit ve format (pozitif etki) tarafından indüklenir. Fakat alkol oksidaz enziminin glikoz ve etanol yoluyla (negatif etki) iki düzenleme mekanizması vardır: katabolit baskılanma ve inaktivasyon. Bu mekanizmaların ilki, RNA sentezini kontrolünü düzenler; ikincisi, enzimlerin inaktivasyonundan ya da degradesyonundan sorumludur. Asetat oluşumu sonuç olarak, alkol oksidazın ekspresyonunda etanol kullanımını baskılamaktadır (Zepeda vd. 2018).

*P. pastoris*'in aerobik ortamda az miktarda etanol ürettiği ve yan ürün olarak ortaya çıkan etanolün *AOX1* promotorunu baskılayarak rekombinant protein üretimini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Inan ve Meagher 2001). *ADH3* geninin etanol ile indüklenen, *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanolün katabolize edilmesinde görev alan tek gen olduğu ortaya konmuştur (Karaoglan 2016b).

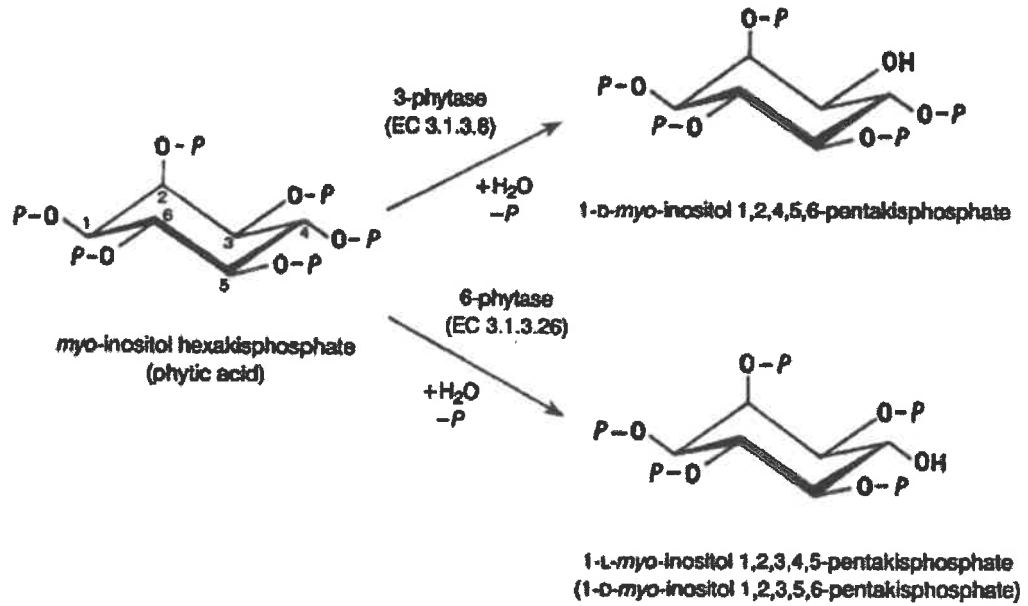
## 2.5. Fitazın Tarihçesi

Fitik asit ilk kez 1872 yılında Pfeffer tarafından keşfedilmiş olsa da fitaz, 1907 yılında Suzuki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sırasında pirinç kepeğinde kayıtlara geçmiştir (Dvorakova 1998). Bu çalışmada pirinç kepeğindeki fitik asitin ortofosforik asit ve inositole hidrolizini katalizleyen enzimi bulmuşlar ve fitaz olarak adlandırmışlardır (Liu vd.1998). İlk olarak 1908 yılında McCollum ve Hart tarafından buzağının karaciğeri ve kanında bulunan fitaz, hayvansal kaynaklı fitaz ile ilgili ilk rapordur.

## 2.6. Fitaz Enzimi

Fitazlar (myo-inositol heksakifosfat fosfohidrolaz) fosforik monoester hidrolaz grubuna aittir; myo-inositol heksakifosfatı (myo-inositol-P<sub>6</sub>, fitik asit) myo-inositolün alt fosforik esterine, inorganik monofosfata ve bazı durumlarda serbest myo-inositole hidrolizini kataliz eden enzimdir (Dvorakova 1998).

Fitazlar (myo-inositol heksakifosfat 3- veya 6-fosfohidrolazlar; EC 3.1.3.8 veya EC 3.1.3.26) fitik asidin ve onun tuzlarının (fitatlar) hidrolitik bozulmasını katalize eder. 3-Fitazlar mikroorganizmalardan, 6-fitazlar bitkilerden elde edilir (Mullaney vd. 2000).



Şekil 2.2. Myo-inositol heksakifosfatın (fitik asit) myo-inositol heksakifosfat 3- ve 6-fosfohidrolaz ile hidrolizi (Dvorakova 1998)

## 2.7. Fitat

Fitatlar (myo-inositol heksakifosfat) fitik asitin tuzu olarak bilinir. Fitatlar; baklagillerde, tahıllarda, tohumlarda ve polenlerde fosforun temel depolanma şekli olarak bilinir (Pandey vd. 2001). Fitatlar, hayvan yemlerinde fosforun temel kaynağıdır. Monogastrik hayvanların sindirim sistemlerinde hazmedilmeden geçerler. Monogastriklerin beslenmesinde inorganik fosfatlar kullanılır (Wodzinski ve Ullah, 1996). Fitatlar; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> gibi metal iyonlarıyla şelat oluşturur. Mide ve bağırsak pH koşullarında çözünmez metal-fitat kompleksi, minerallerin absorpsiyonunu ve sindirimini olumsuz etkiler. Bu nedenle anti besinsel faktör olarak nitelendirilir (Casey ve Walsh 2004).

## 2.8. Fitik Asit

Fitik asit (myo-inositol heksakifosfat) bitki tohumunda fosforun ana depo formudur. Fitik asit; kalsiyum, çinko, magnezyum ve demir gibi çeşitli metal iyonları ile çözünmeyen kompleksler oluşturduğundan ve bu minerallerin biyoyararlılığını azalttığından anti besinsel bir faktör olarak kabul edilir (Chen vd. 2004). Fitik asit bitkilerde; enerji deposu, çok değerlikli katyonlarla çözünmez bileşik oluşturması ve inorganik fosfat seviyesinin düzenlenmesi gibi pek çok rol oynamaktadır. Bu nedenle bitki tohumlarındaki fitik asit, insan ve hayvan diyetlerinin bir parçasıdır (Dvorakova 1998).

Fitik asitin yararları şunlardır: Bazı çok değerlikli metal iyonlarıyla kompleksler oluşturur ve bu nedenle önemli eser metallerin asimilasyonuna müdahale eder. Demiri şelatlaması nedeniyle güçlü bir antioksidandır ve insanları çeşitli kansellere karşı korur. Proteinlere bağlanır ve proteolitik sindirime karşı daha dayanıklı olmasını sağlar. Hayvan yemlerine ilave edilen fitaz, fosforun biyoyararlılığını artırmaktadır (Dvorakova 1998).

## 2.9. Fitaz Kaynakları

Fitazlar doğada yaygın olarak bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvanlarda bulunmaktadır. Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Adlandırma Komitesi tarafından fitazlara 3-fitaz (EC 3.1.3.8) ve 6-fitaz (EC 3.1.3.26) olarak ilk fosfat grubuna göre 2 tür sınıflandırma yapılmıştır. 3-Fitazlar mikroorganizmalardan, 6-fitazlar bitkilerden elde edilir (Tai vd. 2013).

### 2.9.1. Bitkisel kaynaklı fitazlar

Fitaz bitkilerde sıklıkla görülmektedir. Başlıca kaynakları: buğday, çavdar, arpa, bezelye, fasulye, soya fasulyesi, mısır, pirinç, beyaz hardal, patates, turp, marul gibi türler, ıspanak, çimen ve lily polen'dir. Çimlenme döneminde bitki tohumlarında hızlı bir fitaz aktivitesi artışı görülmektedir. Genel olarak, tohum çimlenmesi sırasında fitatın, fitaz ile ayrışmasından sonra, fosfat ve inositol şeklinde kullanıldığı varsayılır (Dvorakova 1998).

### 2.9.2. Hayvansal kaynaklı fitazlar

Hayvansal kaynaklı fitaz ilk kez buzağının karaciğeri ve kanında bulunmuştur. Fitazlar, memeli kanı dışında kuşlar, sürüngenler, balıklar ve deniz kaplumbağaları gibi omurgalıların kanında da tespit edilmiştir (Dvorakova 1998).

Tahıllardan gelen ham fitat, insan gibi hayvanlar için de olumsuz sonuçlara sahip olduğundan çeşitli hayvanların gastrointestinal kanalında fitazın varlığı araştırılmıştır. Sıçan bağırsaklarındaki fitat hidrolizi ilk Patwardhan (1937) tarafından not edilmiş ve fitaz ile ilişkilendirilmiştir. Daha sonra, diğer yazarlar domuz ve ineğin bağırsaklarında fitaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, Bitar ve Reinhold (1972) sıçan, tavuk, baldir ve insan bağırsaklarından fitazı kısmen saflaştırmıştır. İnsanın ince bağırsağı bozulmamış fitatları sindirme konusunda sınırlı bir yeteneğe sahiptir. Fitatların sindiriminde fitazlar önemli rol oynamaktadır (Frolich 1990).

### 2.9.3. Mikrobiyal fitazlar

Fitazlar genellikle funguslardan izole edilmektedir. Fitazlar rekombinant olarak *Pichia pastoris* ve *Pichia anomala*'da üretilebileceği gibi *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* gibi birçok mikroorganizmada da üretilebilir (Kaur vd. 2010). Mikrobiyal fitazlar pH ve ısıya duyarlıdır. *Pichia anomala*'dan elde edilen hücreye bağlı fitaz, termostabil ve asit stabildir (Kaur vd. 2010).

Yüksek bir aktiviteye veya termostabiliteye sahip fitazları elde etmek için *Escherichia coli* ve *Aspergillus niger* dışında *Aspergillus terreus*, *Emericella nidulans* ve *Myceliophthora thermophila* gibi birçok mikroorganizma fitaz geninin klonlanmasında ve ekspresyonunda kullanılır (Chen vd. 2004). Özellikle *E. coli* fitaz geni (*appa*) diğer mikroorganizmalara göre daha yüksek spesifik aktivite göstermektedir. AppA geni *E. coli*, *Pichia pastoris* ve *Streptomyces lividans* ile başarıyla ekspres edilmiştir (Chen vd. 2004).

**Çizelge 2.2.** Mikrobiyal fitazların özellikleri (Kerovuo 2000; Pandey vd. 2001)

Fitaz kaynağı	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>Aspergillus carbonarius</i>	4.7	53	(Asheh ve Duvnjak 1994)
<i>Aspergillus niger</i>	2.2,5.0-5.5	58	(Ullah ve Gibson 1987)
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5	50	(Shimizu 1993)
<i>Aspergillus terreus</i>	4.5	70	(Yamada vd.1968)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	4.5	55	(Sutardi ve Buckle 1988)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4.5, 5.2	-	(Tambe vd. 1994)
<i>Klebsiella terrigena</i>	5.0	58	(Greiner vd. 1997)
<i>S. cerevisiae</i>	2.0, 2.5	55-60	(Han vd. 1999)
<i>Citrobacter freundii</i>	2.7, 5.0	52	(Delucca vd. 1992)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	4.0-5.0	45-50	(Greaves vd. 1967)
<i>Escherichia coli</i>	4.5	55	(Greiner vd. 1993)
<i>Bacillus subtilis</i>	6.0-6.5	60	(Shimizu 1992)
<i>Schwanniomyces castelii</i>	4.4	77	(Segueilha vd. 1992)
<i>Pichia anomala</i>	4.0	60	(Kaur vd. 2010)

### 2.10. Fitazların özellikleri

#### 2.10.1. Fitazların saflaştırılması

Fitazların saflaştırılmasında hücre parçalama, berraklaştırma, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz aşamaları birincil ayırma yöntemleridir. Ancak daha saf enzim gerekli olursa jel kromatografisi, iyon değiştirici, HPLC gibi daha ileri saflaştırma yöntemleri de kullanılmaktadır (Ekren 2013).

### 2.10.2. Sıcaklık ve pH

Fitazlar yüksek termal stabiliteye sahiptir. Fitaz aktivitesi, termal stabilitesi, pH stabilitesi, farklı fitat formlarının degradasyonu ve üretim verimleri endüstriyel uygulamalarda önemlidir ve geliştirilebilir (Tai vd. 2013).

Fitazlar genellikle geniş pH aralıklarında termostabil olarak bilinir. *Aspergillus fumigatus* ve *E. coli* fitazı yüksek termal stabiliteye; *A. niger* fitazı ise geniş pH profiline sahiptir (Pasamontes vd. 1997).

Çoğu mikrobiyal fitazlar, funguslardan elde edilir ve fungal fitazların optimum pH'sı 4.5-5.5'dir. Bakteriyel fitazların optimum pH'sı ise 6.5-7.5 arasında değişmektedir. Bitkilerden izole edilen fitazlar ise genellikle 4.0-5.6 arasında optimum pH'ya sahiptir (Dvorakova 1998). Baklagil tohumlarından, lily poleninden izole edilen bazı alkali fitazların ise optimum pH'sı 8.0'dir (Scott 1991).

### 2.10.3. Moleküler genetik

Yem uygulamalarında fungal fitaz kullanımına duyulan ilgi nedeniyle, maliyeti azaltıcı endüstriyel üretimi geliştirme amaçlı çalışmalar yapılmaktadır. Genetik çalışmalarda fitaz geni genellikle *Aspergillus niger*, *A. ficuum*, *A. terreus*, *A. fumigatus* türlerinden elde edilmekte ve termostabil enzimler üretilmektedir. Bunlar yemlerin sindirilebilirliğini artırmak amacıyla ilave edilmektedir (Dvorakova 1998).

### 2.10.4. Substrat spesifitesi

Fitazlar çoğunlukla geniş substrat spesifitesi sahiptir. Fitazlar; ATP, ADP, fruktoz 1,6-bifosfat, glikoz 6-fosfat  $\alpha$ - ve  $\beta$ -gliserofosfat gibi birçok molekülü hidroliz ederler. Fitik asit için oldukça spesifik olarak *Bacillus* fitazı ve zambak poleninden izole edilen alkali fitazı belirtilmiştir (Kerovuo, 2000).

## 2.11. Fitazın Kullanım Alanları

### 2.11.1. Hayvan yemlerinde kullanımı

Fitazlar hayvan beslenmesinde yüksek konsantrasyonda kullanılabilir. Fitaz, fitattan fosfatı ayırarak fosforun yeme takviye ihtiyacını azaltır. Sindirilebilirliği dolayısıyla yemin besleyici değerini artırır ve atılan fosfor seviyesini düşürür. Böylece biyoyararlılık artar ve çevresel kontaminasyon azalır. Bu nedenle fitazların ticari üretimi önem taşımaktadır (Johnson vd. 2010).

Yaygın olarak *Aspergillus niger* fitazı ticari olarak hayvan yemlerinde kullanılmaktadır. Yemlerin peletleme sıcaklığı 70-90°C arasında en az 30 saniye yapılmaktadır ve fitazların termostabil olup bu sıcaklıkta inaktive olmaması gerekmektedir (Maurya vd. 2017).

### 2.11.2. Gıdalarda kullanımı

Tahıl lifleri, baklagiller ve soya proteininin diyetle tüketimi, fitat alımının artmasına neden olur. Fitat proteinlere bağlandığından, soya fasulyesinden gelen protein izolatları fitat bakımından zengindir.

Çiğ tahıllardan elde edilen tahıl fitatı, diyet fitazı sayesinde insanlar tarafından büyük ölçüde sindirilir. Diyet fitazı ekstrüzyonla pişirme sırasında etkisiz hale getirildiğinde, fitatın sindirimini çok zayıflatır. İnce bağırsakta sindirilmemiş fitat, çinko, magnezyum ve demirin emilimini olumsuz yönde etkiler. Kolonda sindirilmemiş fitat varlığı ise kolonik karsinom gelişimine karşı koruyabilir (Igbal vd. 1994).

### 2.11.3. Myo-inositol fosfatların hazırlanması

Hücre içi rezervlerde kalsiyumun hareketini sağlaması ve transmembran sinyalizasyonunda önemli bir rol oynaması nedeniyle çeşitli inositol fosfat preparatlarına ihtiyaç duyulmaktadır. İnositol fosfatların kimyasal sentezi aşırı sıcaklık ve basınçta gerçekleştirilir. Fitazlar, fitik asitten serbest myo-inositol, myo-inositol bileşikleri, inorganik fosfat eldesinde kullanılabilir. Ayrıca inositol, inositol fosfatların endüstriyel üretimi için de önerilmiştir (Billington 1993). İmmobilize fitazlar çeşitli myo-inositol fosfatları üretmek için kullanılabilir. Myo-inositol fosfatlar ilaç olarak kullanılabilen gibi myo-inositol fosfat türevleri, biyokimyasal ve metabolik çalışmalar için enzim substratları olarak da kullanılabilir (Kerovuo 2000).

### 2.11.4. Kağıt endüstrisinde kullanımı

Kağıt endüstrisinde önemli bir aşama olan bitki fitik asidinin uzaklaştırılmasında termostabil fitazlar kullanılmaktadır. Burada kullanılacak fitaz, kağıdın işlenmesi sırasında fitik asidi parçalamak için yeni bir biyolojik ajan olabilecek potansiyele sahip olmalıdır. Fitik asidin enzimatik bozunması sonucu tehlikeli ve toksik yan ürünler oluşmadığı için kağıt endüstrisinde fitazların kullanılmasının çevreye olumlu etkisi söz konusudur (Kerovuo 2000).

## 2.12. Fitaz Enzimi Üretimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

*E. coli* fitaz geni *appA*, *AOXI* promotörünün kontrolü altında *P. pastoris*'te yüksek oranda rekombinant üretilmiştir. Metanol indüksiyonundan önce gliserol ve metabolik atıkların baskısını kaldırmak için kültür ortamının taze ortama değiştirilmesi fitaz ekspresyonunu önemli ölçüde artırmıştır. Fitaz aktivitesi, gerekli koşulları değiştirilerek erlende 118-204 U/ml, fermentörde 1180-4946 U/ml enzim aktivitesi ölçülmüştür. Rekombinant fitazın karakteristik özellikleri doğal *E. coli* fitazıyla benzerlik göstermiştir (Chen vd. 2004).

Afrikaya özgü Salyangoz (*Achatina fulica*)'dan izole edilen *Aspergillus fumigatus*'da fitaz elde edilmiş, saflaştırılmış ve fitazın karakterizasyonu yapılmıştır. 23 U/ml fitaz aktivitesi görülmüştür. Fitazın optimum sıcaklığı 40°C, optimum pH'sı 6.0 olarak bulunmuştur. pH 8.0'de aktivitesinin %83'ünü korurken, pH 9.0'da aktivitesinin %78'ini korumuştur. pH stabilitesi için 6 saat oda sıcaklığında tutulmuş ve pH'sı 6.0'da %100, pH 4.0-6.0 arası %70-75; pH 8.0'de %19, pH 9.0'da %11 stabil kalmıştır. 30°C

ve 80°C arasında 1 saat bekletilerek stabilitesine bakılmıştır. 50°C'de %48 stabil iken 80°C'de %14 stabil olduğu görülmüştür. Farklı metal iyonlarının 5 mM, 10 mM ve 20 mM konsantrasyonda etkisi incelenmiştir.  $Ca^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$ 'nin aktive ettiği,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$ 'nin de inhibe ettiği saptanmıştır (Sanni vd. 2019).

*E. coli* fitaz geni *P. pastoris*'te *GAP* promotörü altında rekombinant üretilmiştir. Erlende 72 saatte üretim yapılmış ve fitaz aktivitesi 112.5 U/ml olarak bulunmuştur. Optimum pH 4.0 ve 6.0, optimum sıcaklık ise 50 °C bulunmuştur. Fitaz enziminin pH 3.0-8.0 ve 25-40°C'de %80 stabil olduğu saptanmıştır. Çeşitli metal iyonlarıyla 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda denemeler yapılmış ve  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesini en çok etkileyen inhibitörler olduğu bulunmuştur (Tai vd. 2013).

*Lactobacillus plantarum* ile fitaz üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Üretim ortamı olarak MRS besiyeri kullanılmış ve ortama %1, %10, %20 ve %30 oranlarında mısır likörü ilave edilmiştir. Mısır likörünün fitaz aktivitesine etkisine bakılmıştır. %30 oranında ilave edilen mısır likörü enzim aktivitesini en fazla artırmıştır ve 415 U/ml fitaz aktivitesi ölçülmüştür. Aktivitede optimum sıcaklık 50°C, optimum pH 5.0 bulunmuştur. 100°C'de 30 dakika %92 stabilitesini korumuştur. 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda metal iyonları eklenmiş ve  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi artırdığı görülmüştür (Uslu vd. 2016).

*Rhizopus oligosporus* fungusundan üretilen fitaz enzimi ve enzimin fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. 124 kDa'luk enzim saflaştırılmış, kromatografik analizler yapılmıştır. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 65°C, optimum pH 5.0 bulunmuştur. pH 2.0'de aktivitesini 6 saat boyunca korumuştur. Enzimin 80°C'de 5 dakikada %20 stabil olduğu görülmüştür. Metal iyonlarının aktiviteye etkisi incelenmiş ve sadece  $Ca^{+2}$ 'nin inhibitör etki yaptığı bildirilmiştir (Casey ve Walsh 2004).

Zambak poleninden elde edilen LIALP2 alkali fitazının *P. pastoris*'te rekombinant üretimi yapılmıştır. Doğal LIALP2 ve rekombinant rLIALP2 arasında benzerlikler ve farklılıklar karşılaştırılmıştır. 30-70°C arasında aktivitesi ölçülmüştür ve optimum sıcaklık 55°C, optimum pH 8.0 bulunmuştur. pH 6.0'da %90 aktivite gösterirken pH 9.0'da %40 aktivite göstermiştir. 1 mM  $Ca^{+2}$ 'nin aktiviteyi artırdığı, 5 mM EDTA'nın ise aktiviteyi azalttığı görülmüştür (Johnson vd. 2010).

*E. coli* fitaz geni (*appA*), *Streptomyces lividans* ve *P. pastoris* ile rekombinant üretilmiştir. *S. lividans*'ta (SLEP) üretilen fitaz, glikozile edilmemiştir ve 45 kDa büyüklüğündedir. *P. pastoris*'te üretilen glikozile fitaz (PPEP) ile karşılaştırıldığında, glikolize olmayan fitaz pH 2.0-3.5 ve 45-55°C'de %25-50 oranında daha az aktivite gösterirken, 75°C'de %50 daha fazla aktivite göstermiştir. Glikozile olmayan fitazın termo toleransı 45-55°C'de glikolize fitaz'a göre %26-48 daha yüksek, ancak 75°C'de %94 daha düşük ölçülmüştür. *S. lividans*'da 950 U/l, *P. pastoris*'te 117 U/ml fitaz aktivitesi görülmüştür (Stahl vd. 2003).

*Aspergillus niger* N25'dan üç tane rekombinant phyA mutant fitazı elde edilmiş, enzimin termostabilitesi ve katalitik özellikleri gösterilmiştir. Modifiye fitazın özelliklerinin geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır. 37-90°C'de enzimin aktivitesi ve

stabilitesine bakılmıştır. Optimum pH 5.5 bulunmuş, 3 Mutantın optimum sıcaklıkları 60-61°C civarında benzerlik göstermiştir. 37°C'de %100 stabilken 90°C'de %30 stabilitesini korumuştur. Mutasyon sonucunda enzimde yapılan karakterizasyonlar ve yapısal analizler, termositabilitede ve katalitik etkinlerde gelişme sağlamıştır (Tang vd. 2018).

*Hansenula fabianii* J640 mayasından (atık su arıtımında kullanılan) Hffitaz'ı saflaştırılmış ve *P. pastoris*'te rekombinant üretilmiştir. Enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Optimum sıcaklık 50°C, optimum pH 4.5 bulunmuştur. Fermentörde 23 g/l enzim üretimi sağlanmıştır. Metal iyonlarının aktiviteye etkisine bakılmış ve Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> iyonlarının hiçbiri inhibe etmemiştir. Zn<sup>+2</sup> iyonu ise aktive etmiştir. Hffitazın *Debayomyces castelli* fitazı ile %40, *A. niger* PhyB ile %37, *S. cerevisiae* fitazı ile %34 benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Watanabe vd. 2009).

Termostabil fitaz geni *fphy*, *A. fumigatus*'tan alınmış ve *P. pastoris* FPHY34 suşunda rekombinant üretilmiştir. Glikolizasyonun fitazın biyokimyasal karakterizasyonuna etkisini göstermek amaçlanmıştır. 30-90°C arası 30 dakika enzimin stabilitesine bakılmıştır. 40-50°C'de glikozile fitazın termostabil olduğu saptanmıştır. Glikolize fitaza (*phy*) göre deglikolize fitazda (*dphy*) yaklaşık %15-20 arası daha az enzim aktivitesi gözlenmiştir. Glikolize fitazda optimum pH 5.0 iken deglikolize fitazda optimum pH 2.5'dir. Deglikolize fitaz pH 6.0'da %60 aktivitesini korumuştur. Her ikisi de 30°C'de %100 aktivitesini korumuştur. Glikolize fitaz 80°C'de on dakika boyunca %40, 90°C'de ise %30 aktivitesini korurken deglikolize fitaz 40°C'den sonra aktivitesini kaybetmiştir. Glikolize fitazın termostabilite açısından önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Guo vd. 2008).

*E. coli* fitazının gelişme performansını artırmak için çalışma yapılmıştır. Ayrıca Ca<sup>+2</sup> ve P sindirilebilirliğine ve kemik külü konsantrasyonuna domuzların mısır ve soya bazlı diyetlerinde bakılmıştır. Bunun için 60 domuz test edilmiştir. Domuz beslenmesine *E. coli* fitazının dahil edilmesinin fosfor kullanımını geliştirdiği görülmüştür (She vd. 2017).

Zambak poleninden alkali fitaz elde edilmiş ve *P. pastoris*'te *AOX1* promotörü ile rekombinant üretimi sağlanmıştır. 8-10 mg/l üretilmiştir. Bu enzimin düşük potansiyelde üretimini sınırlayan faktörlerin: gen kopya sayısı, kodon etkisi, sekans optimizasyonu ve enzim üretim sıcaklığı olduğu bildirilmiştir. Tek kopya klon en yüksek aktiviteye (%100) sahipken, 2 kopyanın %70, 4 kopyanın %25, 7 ve daha fazla kopyanın ise %10 aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. 24.5°C, 29.5°C sıcaklıklarında üretim yapılmış ve 20.5°C'de 29.5°C'e göre 1.2-2 kat fazla enzim aktivitesi görülmüştür (Yang vd. 2012).

Bakteriden izole edilen fitaz geni (*EAS1*), *E. coli*'de rekombinant üretilmiştir. Rekombinant bakteriden üretilen hücre içi fitazın karakterizasyonu yapılmıştır. pH 4.0-7.0 ve 37-55°C arası sıcaklıklarda aktiviteye bakılmıştır. Optimum pH'sı 5.0, optimum sıcaklığı 40°C bulunmuştur. Optimum enzim inkübasyon süresi 60 dakika, optimum substrat konsantrasyonu %2 bulunmuştur. Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi denenmiş; Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Pb<sup>+3</sup> iyonlarının aktiviteyi artırdığı, Fe<sup>+3</sup> iyonunun ise tamamen aktiviteyi inhibe ettiği görülmüştür (Nuhriawangsa vd. 2009).



*AOXI* promotörü ile *P. pastoris* mayasında substrat olarak glikoz kullanılarak rekombinant fitaz üretimi sağlanmıştır. *P. pastoris* YY113'den gliserol yerine glikoz substrat olarak kullanılmış, glikoz beslemesi fermentörde kontrol edilmiş ve 2200 FTU/ml yüksek verimlilikle fitaz enzimi üretilmiştir. Glikozun metanol indüksiyonu ve yabancı proteinlerin ekspresyonunda etkili olduğu görülmüştür. Düşük maliyetli ve mevcut bulunabilir olduğu için glikozun potansiyel bir karbon kaynağı olduğu bildirilmiştir (Hang vd. 2009).

Çürümüş keresteden izole edilen *Streptomyces luteogriseus* R10'den fitaz enzimi üretilmiş ve enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırılan 65 kDa'luk fitaz enziminin pH 3.0-9.0 arası enzim aktivitesine bakılmış ve pH 5.0'de optimum ölçülmüştür. 20-70°C arası enzimin aktivitesi ölçülmüş ve optimum sıcaklık 45°C bulunmuştur. Çeşitli metal iyonları 10 mM eklenerek aktiviteye etkine bakılmıştır. Mg<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> iyonları aktiviteyi artırmış, Zn<sup>+2</sup> etkilememiş, Fe<sup>+3</sup> ve Cu<sup>+2</sup> iyonları aktiviteyi azaltmıştır. Karbon kaynağı olarak besiyerinde buğday kepeği, saman, pirinç kabuğu, saman kullanılmış ve en yüksek aktivite buğday kepeğinde görülmüştür (Aly vd. 2015).

*Aspergillus sp.*, *E. coli*, *Myceliophthora thermophila* ve *Emericella nidulans* fungal fitazlarının karakterizasyonu yapılmış ve enzimin katalitik özelliklerine değinilmiştir. Fungal fitazların spesifik aktiviteleri 23-196 U/mg arasında ve optimum pH'ları 2.5-7.0 arasında değişmiştir. *A. niger*, *A. terreus* ve *M. thermophila* fitazının optimum pH'sı 5.5, *E. coli* fitazının 4.5, *E. nidulans* ve *A. fumigatus* fitazının 6.5 olduğu bildirilmiştir. Çeşitli metal iyonlarının enzim aktisine etkine bakılmış ve Fe<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, EDTA'nın inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır (Wyss vd. 1999).

*Aspergillus japonicus* C03'dan histidin asit fosfataz fitazı elde edilmiş ve *P. pastoris*'de rekombinant üretilmiştir. Fitaz enziminin biyokimyasal özellikleri ve karakterizasyonu üzerine çalışılmıştır. 72 saat sonunda 143 mg/l enzim üretilmiştir. 75 kDa protein üretilmiş, deglikozilasyon sonucunda bant 55 kDa'da görülmüştür. 30-90°C arası sıcaklıkta ve pH 3.0-9.0 arası aktiviteye bakılmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı 50°C, optimum pH 6.0 bulunmuştur. 60°C'de 23 dakikada aktivitesinin yarısını korurken, 70°C'de bu süre 7 dakikaya düşmüştür (Maldonado vd. 2014).

*Sporotrichum thermophile*'den izole edilen fitaz enzimi *P. pastoris* mayasında yapısal *GAP* promotörü ve indüklenebilir *AOX* promotörüyle rekombinant üretilmiştir. Fermentörde yarı kesikli üretim yapılmıştır. Fitaz öncelikle *AOX* promotörüyle üretilmiş, daha sonra *AOX* ve *GAP* promotörüyle birlikte üretilmiş ve karşılaştırılmıştır. Fitaz *AOX* promotörü altında 480 U/ml üretilirken, *AOX* ve *GAP* promotörü altında 780 U/ml üretilmiştir. Sonuçlar iki promotörün birlikte kullanımının verimi artırabileceğini göstermiştir (Parasha ve Satyanarayana 2016).

Termofilik *Thermomyces lanuginosus* SSBP küfünden fitaz enzimi üretilmiş, amonyum sülfat yöntemiyle saflaştırılmış ve enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. 49 kDa protein üretilmiştir. pH 2.0-9.0 arası aktiviteye bakılmış ve pH 5.0'de en yüksek aktivite gözlenmiş bu değer optimumdur. 40-90°C sıcaklık arası fitaz aktivitesine bakılmış ve optimum sıcaklık değeri 55°C bulunmuştur. 30 dakika ile 2 saat arası bekletilip enzimin stabilitesi ölçülmüştür. 2 saat sonunda pH 4.0'de %90 stabil iken 50°C'de %95, 80°C'de ise %15 stabil olduğu görülmüştür. Çeşitli metal iyonları 1mM

ve 5mM eklenerek enzim aktivitesine etkisine bakılmıştır. Ba<sup>+2</sup> aktiviteyi artırırken, Cu<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve EDTA aktiviteyi azaltmıştır (Makolomakwa vd. 2017).

*A. niger* SK-57'den alınan fitaz geni (appA) *P. pastoris* mayasında AOX promotörü altında rekombinant üretilmiştir. 64 kDa'luk enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Fermentörde üretim sonucu 865 U/ml enzim aktivitesi görülmüştür. 20-80°C'de ve pH 1.5-6.5 arasında enzim aktivitesine bakılmış ve optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C, optimum pH'sı ise 5.5 bulunmuştur. Enzim optimum pH'da %100 aktifken pH'sı 2.5 iken %80 aktivite göstermiştir. 80°C'de stabilitesine bakılmış, 10 dakikada %50 stabil iken 18 dakikadan sonra stabilitesini tamamen kaybetmiştir (Xiong vd. 2005).

Termofilik bir küf olan *Sporotrichum thermophile*'den fitaz geni alınmış ve rekombinant olarak *P. pastoris* mayasında üretilmiştir. Üretim gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAP) promotörü altında fermentörde gerçekleşmiştir. 495 U/ml enzim üretilmiştir. 40-90°C sıcaklıklarda pH 4.0-8.0 arası enzim aktivitesine bakılmıştır ve enzim optimum pH 5.0 ve 60°C'de aktivite göstermiştir (Maurya vd. 2017).

*Penicillium chrysogenum* CCT 1273'den izole edilen fitaz enziminin rekombinant üretimi *P. griseoroseum* T73'de gerçekleşmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. pH 2.0-8.0 arası enzimin aktivitesine bakılmış ve 2 saat sonunda stabilitesi ölçülmüştür. 30-80°C arası enzimin aktivitesine bakılmıştır. 70°C'de %40 aktivite göstermiş, optimum aktivite gösterdiği değerler pH 5.0 ve 50°C olarak bulunmuştur. 80°C'de 30 dakikada aktivitesinin %30'unu korurken 70°C'de %60'ını korumuştur. pH 3.0-8.0 arası stabilitesini korumuştur (Corrêa vd. 2015).

*Selenomonas ruminantium* bakterisinden fitaz elde edilmiş ve *E. coli* BL21'de rekombinant üretimi büyük ölçekte gerçekleşmiştir. T7 promotörü altında üretilen mutant fitazın büyüklüğü 37 kDa bulunmuştur. Farklı karbon kaynakları (glukoz, gliserol, laktoz ve maya ekstraktı) üretim ortamına eklenmiş ve enzim aktivitesine etkisine bakılmıştır. Ayrıca 20-37°C arası farklı üretim sıcaklıklarının enzim aktivitesine etkisine bakılmıştır. Erlende en yüksek enzim aktivitesi 30°C sıcaklıkta ve %5 maya ekstraktı eklendiğinde gerçekleşmiş ve 107 U/ml fitaz aktivitesi bulunmuştur. 20 litrelik fermentörde üretimde ise 1204 U/ml enzim aktivitesine ulaşılmıştır (Lan vd. 2014).

*A. fumigatus* fitaz geni (r-Afp) *P. pastoris* mayasında AOX1 promotörü altında rekombinant üretilmiş, enzimin karakterizasyonu yapılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. 128 U/l enzim üretilmiştir. 20-90°C ve pH 1.5-9.0 arası enzim aktivitesine bakılmıştır. Optimum sıcaklık 60°C, pH 5.5-6.0 bulunmuştur. 80°C %45 aktivite göstermiştir. Farklı konsantrasyonlarda sodyum asetat ve sodyum sitrat buffer'ları kullanılarak enzimin stabilitesine bakılmıştır. 90°C'de 20 dakikada sodyum sitrata göre sodyum asetat bufferı daha stabil olup ve %60 stabilitesini korumuştur (Rodriguez vd. 2000).

*Mitsuokella jalaludinii* bakterisinden elde edilen yeni fitaz geninin (phy7) *E. coli*'de rekombinant üretimi gerçekleşmiştir. Elde edilen 55 kDa büyüklüğündeki enzimin karakterizasyonu yapılmış ve 25-70°C sıcaklıkta ve pH 2.0-9.0 arasında aktivitesine bakılmıştır. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 55°C, pH 4.5

bulunmuştur. 1 saat bekletilip stabilitesine bakılmış ve pH 3.5-5.5 arasında enzimin stabil olduğu görülmüştür. Çeşitli metal iyonlarından 1mM ve 5 mM eklenerek enzim aktivitesine etkisine bakılmıştır.  $Ca^{+2}$  enzim aktivitesini artırırken  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  ve EDTA enzim aktivitesini inhibe etmiştir. *M. jalaludinii*'den elde edilen fitaz geni (PHY7), *Selenomonas ruminatum* gibi hiçbir bakteriyel fitazla benzerlik göstermediği için yeni bir fitaz olarak kabul edilmiştir (Wan-qin vd. 2015).

*Pichia anomala* mayasında hücreye bağlı fitaz geni (Pphy) alınmış, *Arxula Adeninivorans*, *S. cerevisiae* ve *Hansenula polymorpha*'de rekombinant üretilmiştir. En iyi üretim FMD promotörü altında *H. polymorpha*'de olmuş ve 210 U/l enzim üretilmiştir. 55 kDa büyüklüğündeki enzimin karakterizasyonu yapılmış ve enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 60°C, pH 4.0 bulunmuştur. 55-65°C sıcaklığında, pH 3.7-4.4 aralığında enzimin stabil olduğu görülmüştür (Kaur vd. 2010).

Transgenik mısır tohumundan reaktörde fitaz enzimi üretilmiştir. Yao vd (1998) yaptıkları önceki çalışmada *A. niger*'den elde edilen ve *P. pastoris*'te rekombinant üretilen fitazı (PprPhy) ve *Zea mays* rekombinant fitazı (ZmrPhy) karşılaştırılmıştır. İki enzimin de optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C, pH 5.8 bulunmuştur. ZmrPhy 60 kDa, PprPhy 85 kDa büyüklüğündedir. Transgenik mısır fitazının enzim aktivitesi 127.8 FTU/g'dir. 2 yıl sonunda ise aktivitesinin %20'sini kaybetmiştir (Chen vd. 2013).

Tahıl purple asit fosfotaz tip fitaz (PAPhy) *P. pastoris* KM71H mayasında AOX promotörü kontrolü altında rekombinant olarak üretilmiştir. Yaklaşık 57 kDa büyüklüğünde protein üretilmiştir.  $Fe^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi artırdığı görülmüştür. 6300 U/l enzim aktivitesi ölçülmüştür (Dionisio vd. 2012).

*Shigella* sp. CD2'den appA fitaz geni elde edilmiş ve *P. pastoris*'te rekombinant üretilmiş, *E. coli*'de rekombinant üretim ile karşılaştırılmıştır. *P. pastoris*'te üretilen ve glikozile edilen rAppA<sub>P</sub> fitazı 967 U/mg, *E. coli*'de üretilen ve glikozile edilmeyen rAppA<sub>E</sub> fitazı 967 U/mg spesifik aktivite göstermiştir. Her ikisinde de optimum pH 5.5 ve sıcaklığı 60°C bulunmuştur. rAppA<sub>P</sub> fitazının termotoleransının rAppA<sub>E</sub>'e göre 60°C'de %30, 70°C'de %24 daha fazla olduğu bildirilmiştir (Roy vd. 2016).

*A. niger* BCC18081 ve *Aspergillus japonicus* BCC18313'den fitaz elde edilmiş ve *P. pastoris*'te rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. 66 kDa'luk enzimlerin karakterizasyonu yapılmıştır. *A. niger* fitazında 100 U/ml, *A. japonicus* fitazında ise 140 U/ml enzim aktivitesi görülmüştür. İki enzimin de optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C, pH 5.5 olmuştur. Enzimlerin 50-100°C arası 5 ile 60 dakika stabilitelere bakılmıştır. 90°C 15 dakikada %50, 100°C'de 5 dakikada %60 stabilitesini koruduğu saptanmış, bu da enzimin termostabil olduğunu kanıtlanmıştır. Ayrıca enzimler pH 2.0-10.0 arası 3 saat oda koşullarında bekletilerek stabilitesi test edilmiş ve pH 2.0-8.0 arası %70'in üzerinde stabiliteyi koruduğu görülmüştür. Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir.  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının inhibitör etki;  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  ise aktivatör etki göstermiştir (Promdonkoy vd. 2009).

*E. coli*'den alınan fitaz geni (appA)'nin *P. pastoris*'te rekombinant üretimi sağlanmıştır. 6 tane mutant (M1, C2, K24E, K43E, M2 ve M4) elde edilmiş, appA ile verimleri karşılaştırılmıştır. Enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. pH 2.0-8.0 arası enzim aktivitesine bakılmış ve stabilite için iki saat 37°C'de tutulmuştur. 37-90°C arası

enzim aktivitesine bakılmış ve 20 dakika boyunca aynı sıcaklıklarda bekletilerek stabilitesi ölçülmüştür. Optimum sıcaklık appA fitazı için 60°C iken, M2 ve M4 mutanları 65°C optimum sıcaklığa ulaşmıştır. 70°C'de appA fitazı 20 dakikada yaklaşık %3 stabilken 80°C tamamen stabilitesini kaybetmiştir. M4 mutanları ise 70°C'de %70 stabilken 80°C'de %50 stabilitesini korumuştur. Fitazların optimum pH'sı 4.5 bulunmuştur. pH 2.0-8.0 arası appA fitazı %80'in üzerinde stabilken, K43E and C2 mutantları pH 8.0'de %50'den fazla stabilitesini kaybetmiştir (Zhang vd. 2016).

Fitaz geni (phyA2) *P. pastoris* mayasında *AOX1* promotörü altında rekombinant üretilmiştir. Klonlamada pPIC9 plazmidi kullanılmış ve erlende yaklaşık 108 saat sonunda üretilmiştir. 64 kDa'luk enzimin aktivitesi ölçülmüştür. 36 saat ve 108 saatte aktivitede önemli farklılık görülmemiştir. Erlende 15656 U/ml enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu değerini modifiye edilmemiş *A. niger* 963'in 5 U/ml'lik enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında yaklaşık 3000 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Bin vd. 1998).

*Peniophora lycii*'den alınan fitaz geni, *AOX1* promotörü altında *P. pastoris* mayasında rekombinant üretilmiş ve enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. 20-80°C ve pH 1.5-7.5 arası enzim aktivitesine bakılmıştır. Enzim pH 5.5 ve 50°C sıcaklıkta optimum aktive göstermiştir. 80°C'de 10 dakikada %25 stabilken 20 dakikadan sonra stabilitesini kaybettiği görülmüştür. Fermentörde 140 saatte üretim sonucunda 10.540 U/ml enzim aktivitesi ölçülmüştür (Xiong vd. 2006).

*Lactobacillus sanfranciscensis* CB1'den fitaz geni elde edilmiş ve *P. pastoris*'de rekombinant üretilmiştir. 50 kDa'luk enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Optimum pH fitaz için 4.0 iken optimum sıcaklık 45°C olarak saptanmıştır. Enzim 60°C'de 30 dakikada %100 stabil, 70°C'de %70 stabilken 80°C'de 20 dakikada %5 stabilitesini koruduğu görülmüştür. 420 U/ml fitaz aktivitesi ölçülmüştür. Çeşitli metal iyonlarından 2mM eklenerek enzim aktivitesine etkisine bakılmıştır. Ca<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> iyonları inhibitör etki gösterirken Fe<sup>+2</sup> iyonunun aktiviteyi tamamen yok ettiği görülmüştür (Angelis vd. 2003).

*Yersinia intermedia*'den alınan fitaz geni (appA)'nin *P. pastoris*'te rekombinant üretimi sağlanmış ve enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Enzimin pH 1.0-10.0 arası aktivitesine bakılmış, optimum pH'sı 4.5, sıcaklığı 55°C bulunmuştur. Enzim pH 1.0-3.0 arası %83, pH 3.5-10.0 arası %93 stabilitesini korumuştur. 80°C'de 15 dakika boyunca %54 stabil kalmıştır. 3960 U/mg spesifik enzim aktivitesi ölçülmüştür. Çeşitli metal iyonlarından 1mM eklenerek enzim aktivitesine etkisine bakılmıştır. Fe<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> iyonları inhibitör etki gösterirken Mn<sup>+2</sup> iyonu aktivatör etki göstermiştir (Huang vd. 2006).

*Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696'den fitaz geni (appA)'nin *P. pastoris*'te rekombinant üretimi sağlanmıştır. 46.3 kDa'luk enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Enzimin pH 2.0-8.0 arası aktivitesine bakılmış, optimum pH'sı 4.5, sıcaklığı 55°C bulunmuştur. Enzimin pH 3.0-10.0 arası bir saat sonunda stabilitesini %85 koruduğu görülmüştür. Çeşitli metal iyonlarından 1 mM eklenerek enzim aktivitesine etkisine bakılmıştır. Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> iyonları aktivatör etki gösterirken Fe<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> iyonları inhibitör etki göstermiştir. Fermentörde üretim sonucu fitaz aktivitesi 15.000 U/ml, spesifik aktivitesi ise 3548 U/mg ölçülmüştür (Luo vd. 2007).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Konukçu suşlar ve taşıyıcı plazmitler

Laboratuvarımızda mevcut olan Genscript'den temin edilen puc57 klonlama vektörü içerisinde *E. coli* fitaz geni enzim üretiminde kullanılmıştır.

Plazmitlerin çoğaltılması amacıyla kimyasal transformasyona elverişli konukçu *E. coli* suşu olan DH5 $\alpha$  (Invitrogen, CA, ABD) kullanılmıştır.

Ekspresyon çalışmaları için *P. pastoris* X33 (Invitrogen, CA, ABD) suşu kullanılmıştır.

Tüm mikroorganizmalar %50 gliserol içeren uygun ortamda -80°C'de muhafaza edilmiştir.

-80°C stokta bulunan alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotorlarından oluşan doğal pADH3 $\alpha$ A Ksi/HIS4 (900 bç) ve sentetik pSNT5 $\alpha$ A Ksi/HIS4 ekspresyon plazmitleri kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı Merck (Darmstadt, 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 fitaz üretiminde BMGY (%10 gliserol, 10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l soyton, 13.4 g/l YNB,  $4 \times 10^{-5}$  g/l biotin, ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH 6.0) ve BMEY (%10 saf etanol, 10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l soyton, 13.4 g/l YNB,  $4 \times 10^{-5}$  g/l biotin ve 0.1 M sodyum fosfat tamponu, pH 4.0) besiyerleri kullanılırken *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. Fitaz geni içeren plasmid pUC57FITOHIS vektörünün izolasyonu

pUC57FITOHIS plazmidini içeren *E. coli* XLI-Blue hücreleri -80°C'den alınarak plazmidin taşıdığı direnç genine uygun antibiyotikli (amfisilin) 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 Kiti (Qiagen, CA, ABD) kullanılarak 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) konulmuştur. 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) ışın yapmasıyla, agaroz jel içinde moleküler büyüklüklerine göre ayrılan DNA molekülleri jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat EBox-VX2, Fransa) görüntülenmiştir.

### 3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Fitaz geni F-Fito-opt-gibson ve R-Fito-opt-notI primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. Elde edilen ürün template olarak kullanılarak F-Fito-opt-gibson ve R-Fito-opt-gibson primerleriyle yeniden PZR kurulmuştur. Çizelge 3.1'de döngü programı için uygulanan şartlar verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** PZR ısı döngüsü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Sıra	Sıcaklık(°C)	Süre (sn)	Döngü Komutu
1	95	120	
2	95	20	
3	56	10	
4	70	28	38 kez 2.'ye git
5	72	120	
6	4	∞	

Doğal pADH3αA Ksi/HIS4 template olarak kullanılıp PZR kurulmuş, F-snt5-2-gibson ve R-snt5-2-gibson primerleri ile çoğaltılmıştır. Sonra Sentetik pSNT5αA Ksi/HIS4 template olarak kullanılıp PZR kurulmuş, F-snt5-2-gibson ve R-snt5-2-gibson primerleri ile çoğaltılmıştır. Daha sonra HIS4 için pADH3αA Ksi/his4 template olarak kullanılmış, F-snt5-1-gibson ve R-snt5-1-gibson primerleri ile PZR kurulmuştur. Üç PZR için de Çizelge 3.2'de verilen döngü programı için uygulanmıştır.

**Çizelge 3.2.** PZR ısı döngüsü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Sıra	Sıcaklık(°C)	Süre (sn)	Döngü Komutu
1	95	120	
2	95	20	
3	56	10	
4	70	100	38 kez 2.'ye git
5	72	120	
6	4	∞	

Yukarıdaki tüm reaksiyonlar KOD Hot Start DNA Polymerase (EMD Biosciences, San Diego, CA, ABD) kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.3'de KOD PZR karışım hazırlanışı verilmiştir. Çizelge 3.4'de PZR'de kullanılacak olan primerler ve sekansları verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** KOD PZR karışım hazırlanışı

Bileşen	Final Konsantasyon	Hacim
ddH <sub>2</sub> O	-	32 µl
10XKOD Reaction Buffer	1x	5 µl
2mM dNTP Mix	0.2 mM	5 µl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1.5 mM	3 µl
10 µM Forward primer	15 pmol	1,5 µl
10 µM Reverse primer	15 pmol	1,5 µl
Template DNA (5 ng/µl)	-	1 µl
KOD polymerase (1 U/µl)	0.02 U/µl	1 µl
<b>TOPLAM</b>		<b>50 µl</b>

**Çizelge 3.4.** PZR'de kullanılacak olan primerler

Primer	Sekans	Kaynak
R-Fito-opt-gibson	5' TTGTTCTAGAGCGGCCGCTTAAAGGGAAC 3'	Sentegen
F-snt5-1-gibson	5' TAAGCGGCCGCTCTAGAACAAAACTCATCTCAG 3'	Sentegen
R-snt5-1-gibson	5' TAGATACTCGACGCTCTCCCTTATGCGAC 3'	Sentegen
F-snt5-2-gibson	5' AGGGAGAGCGTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATG 3'	Sentegen
R-snt5-2-gibson	5' GCTCTGACTGTCTTTTCTCGAGAGATACCCCTTCTTC 3'	Sentegen
F-Fito-opt-gibson	5' CGAGAAAAGACAGTCAGAGCCAGAGTTGAAG 3'	Sentegen
R-Fito-opt-notI	5' GCGGCCGCTTAAAGGGAACAAGCAGGGATTC 3'	Sentegen

Reaksiyonun kontrolü, örneğin 5 µl'sinin 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılarak etidyum 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.

### 3.2.4. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu

PZR sonrası elde edilen ürünler agaroz jelden yürütüldükten sonra jelden kesilmiş ve jel pürifikasyonu MinElute Gel Extraction Kite (Qiagen, Germany) göre yapılmıştır. Kite verilen talimatlar doğrultusunda jel hacminin 3 katı kadar buffer eklenip jelin 55°C'de 10 dakika bekletilerek çözünmesi 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.

### 3.2.5. Ekspresyon plazmidlerinin ligasyonu ve *E. coli*'ye transformasyonu

PCR sonrası jel purifikasyonu ile elde edilen ürünlerin ligasyonunda Gibson Assembly Cloning Kiti (New England Biolabs, USA) kullanılmıştır. Fitaz geni, pADH3αA-900, his4 ve fitaz geni, pSNT5αA, his4 ile iki ayrı 3'lü ligasyon kurulmuştur. 2 ligasyon reaksiyonu da 20 µl toplam hacimde gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan iki ayrı ligasyon karışımı 25°C'de 10 dakika bekletilmiştir. -80°C'den çıkarılan 100 µl kompetent *E. coli* DH5α hücrelerinin üzerine 2 µl ligasyon karışımı eklenmiş ve 30 dakika buz üzerinde tutulmuştur. Sonra 42°C'de 1 dakika ısı şokuna maruz bırakılan hücreler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek soğutulmuştur. Hücreler buz üzerinden alınmış ve üzerine 1 ml LB lennox sıvı besiyeri eklenerek 37°C çalkalamalı inkübatörde 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Transformant hücreler 25 µg/ml zeosin içeren LB Lennox agara 120 µl ekilmiş ve 37°C'de gece boyu geliştirilmiştir. Zeosin dirençli koloniler seçilerek plazmid izolasyonu yöntemi ile kontrolü için zeosinli LB Lennox sıvı besiyerine inoküle edilmiş, 37°C'de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

### 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 kite verilen talimatlar doğrultusunda işlemler uygulanmıştır. İşlem sırasında plazmid DNA'nın miniprep kolonundan geçirilmesi ve kolona tutunması sağlanmıştır. Etanollü 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 plazmid 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

pADH3αA-900-Fitohis ve pSNT5αA-Fitohis vektörleri *Apal* restriksiyon enzimi ile linear hale getirildikten ve saflaştırıldıktan sonra, Lityum Asetat transformasyon metodu (Wu ve Letchwoth, 2004) ile *P. pastoris* X33 suşuna aktarılmıştır. *P. pastoris* hücreleri Lityum Asetat yöntemi ile kompetent hale getirilmiştir. Elektroporasyon işlemini gerçekleştirmek için 80 µl'lik elektrokompotent maya hücrelerine 3-5 µg linear 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'lik 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 ekilmiş ve sonrasında fitaz ekspresyonu için kullanılmıştır.

### 3.2.9. Fitaz üretimi

Transformasyon sonucu zeosinli plakalarda oluşan rekombinant *P. pastoris* kolonilerinin 3 ml YPD besiyerine inokulumu yapılmış, 225 rpm, 28°C'de 20 saat geliştirilmiştir. Gelişen kolonilerin her biri 250 ml'lik erlenlerdeki 50 ml BMGY besiyerine başlangıç OD'leri 0.1 olacak şekilde inoküle edilmiş ve 16 saat aynı sıcaklıkta ve rpm'de geliştirilmiştir. BMGY besiyerinde çoğalan, yaklaşık 12 OD olan hücreler 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre peleti, 50 ml BMEY besiyeri içinde süspanse edilmiş ve 96 saat boyunca inkübasyona devam edilmiştir. Erlenmayer denemeleri 3 paralelli olarak yürütülmüştür. Örneklerden her birine 12 saatte bir yaklaşık 500 µl etanol eklemesi yapılmış, besi ortamındaki etanol miktarının %1 olması sağlanmıştır. Ayrıca 12 saatte bir besi ortamından 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.

### 3.2.10. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi

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

### 3.2.11. Genomik DNA izolasyonu

Gerçek zamanlı PZR'de 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 oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika 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 santrifüj 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.

### 3.2.12. Gen kopya sayısının belirlenmesi

Seçilen klonların kopya sayılarının belirlenmesi için *P. pastoris*'ten izole edilen genomik DNA'larına gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile analiz yöntemi uygulanmıştır. GZ-PZR, Rotor gene SYBR Green PCR Kit protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak GAP (Gsileraldehit-3fosfat dehidrogenaz), kopya sayısı belirlenecek promotör ADH ve kalibratör suş *P. pastoris* X33 suşu kullanılmıştır. Genomik DNA'lar 5 ng'a seyreltilerek; ADH primerleri R-ADH3A1, F-ADH3A1 ve referans primerleri (GAP), R-GAPrt, F-GAPrt 1:10 seyreltilerek kullanılmıştır. Her bir primer çifti için gerekli miktarda karışım Çizelge 3.5'deki gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım, tüplere dağıtılıp kalıp DNA'lar eklenmiştir. Tüpler Rotor Gene cihazına yerleştirilip çizelge 3.6'daki şartlarda yürütülmüştür.  $\Delta\Delta Ct$  değerine göre kopya sayıları belirlenmiştir.

#### Çizelge 3.5. PZR için karışımın hazırlanışı

Sybr Green	6.25 µl
Forward Primer	0.375 µl
Reverse Primer	0.375 µl
Template DNA	2 µl
NFW	3.5 µl
<b>Toplam</b>	<b>12.5 µl</b>

**Çizelge 3.6.** Gerçek zamanlı PZR programı için süre ve sıcaklık koşulları

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Komut
PZR Başlangıç Adımı	95	300	
Denatürasyon	95	5	35-40
Uzama	60	10	Döngü

Eşik değeri; bir örnekten üretilen sinyalin, arka plan floresanından önemli ölçüde daha büyük olduğu nokta olarak tanımlanmaktadır.  $C_t$  değeri, eşik değerini aşmak için gerekli PZR döngü sayısıdır. Verilerin normalizasyonu, referans olarak standart (GAP geni) kullanılarak sağlanmıştır. Bu nedenle sonuçlar, hesaplanan hedef gen kopyalarının referans genine oranı olarak verilmiştir.

$C_t$  değerini manuel olarak belirlerken; elde edilen grafikte Threshold (eşik) değeri manuel olarak girilmiş, bu değere karar verirken linear scale ekranında görünen grafikte eşik değeri logaritmik fazın ortalarında, log scale ekranında görünen grafikte eşik değeri logaritmik fazın başlangıcında olacak şekilde ayarlanmıştır.

Hesaplamanın yapılması; verilerin sonucuna bakıldığında kalibratör suş 1 kopya olarak gösterilmiş olup, örneklerden bu değer çıkarılarak gen kopya sayısı bulunmuştur.

$\Delta\Delta C_t$  hesaplamasının manuel olarak yapılışı aşağıda verilmiştir;

İlgili gen  $C_t$  - Referans gen  $C_t = \Delta C_t$

$\Delta C_t$  - Kalibratör suş (X33)  $\Delta C_t = \Delta\Delta C_t$

$2^{-\Delta\Delta C_t}$  - kalibratör suşun kopya sayısı = gen kopya sayısı

### 3.2.13. SDS-PAGE analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) OWL P8D8 (Thermo Scientific) cihazı ile %5 poliakrilamid yükleme jeli (dH<sub>2</sub>O, %30 akrilamid, 8X yükleme jeli tamponu, %20 SDS, %20 APS, TEMED) ve %10 poliakrilamid ayırma jeli (dH<sub>2</sub>O,%30 akrilamid, 4X yükleme jeli tamponu, %20 SDS, %20 APS, TEMED) olacak şekilde hazırlanarak yürütülmüştür.

Örnekler toplam hacim 50  $\mu$ L 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  $\mu$ L'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 H<sub>2</sub>O) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, sonra boya içermeyen aynı özellikteki tampon (%10 asetik asit, %50 metanol, %40 H<sub>2</sub>O) 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. Fitaz aktivitesinin ölçülmesi

Fitaz aktivitesi tayinde fitaz enziminin substrat olarak kullanılan sodyum fitatı hidrolizlemesi ile oluşan organik fosfatın analizi, kolorimetrik bir yöntem olan askorbik asit metodu kullanılarak yapılmıştır (Kim ve Lei 2005).

**Çizelge 3.7.** Fitaz aktivitesinde kullanılan bileşen miktarları (Ekren 2013)

Tepkime bileşeni miktarları	Enzim	Kör
Sodyum sitrat tamponu (0.2 M, 37°C, pH 4.0)	350 µl	350 µl
Süpernatant örneği	20 µl	20 µl
37°C sıcaklıkta 5-6 dakika tutulması		
TCA (trikloroasetik asit) çözeltisi	--	400 µl
0.1 M Sodyum fitat	30 µl	--
15 dakika 37°C sıcaklıkta tutulması		
TCA çözeltisi	400 µl	--
0.1 M Sodyum fitat	--	30 µl
8 dakika santrifüj (5.000xg)		
1.8 ml ddH <sub>2</sub> O + 2 ml renk bileşeni + 0.2 ml süpernatant		
15 dakika 50°C su banyosunda tutulması		
Absorbans ölçümü (820 nm)		

Süpernatant örneği, sodyum sitrat tamponunda (0.2 M, 37°C, pH 4.0) belirli oranlarda seyreltilerek hazırlanmış ve Çizelge 3.7’de belirtilen koşullar altında aktivite tayini yapılmıştır. Sodyum fitat, 0.2 M glisin-HCl tamponunda hazırlanmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyon 400 µl, % 15 (g/ml) TCA ile durdurulmuştur. Karışım 8 dakika santrifüjlenmiş ve üst kısımdan alınan süpernatant ile ddH<sub>2</sub>O karıştırılmış ve üzerine renk bileşeni eklenmiştir. Renk bileşeni 1:1:3 oranında % 2.5 (g/ml) amonyum molibdat, % 10 (g/ml) askorbik asit ve 1 M sülfirik asit içermektedir. 4 mL’lik karışım 50°C’de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir (Ekren 2013). Örnekler su banyosundan alınarak oda sıcaklığına getirilmiş ve 820 nm’de spektrofotometrede köre karşı (BMEY) absorbansları ölçülmüştür. Bulunan değer Şekil 3.1’deki inorganik fosfat standart grafiğinde formülde yerine konularak örneğin inorganik fosfat konsantrasyonu hesaplanmıştır.

**Enzim ünitesi:** 1 µmol sodyum fitattan inorganik fosfatın oluşmasını sağlayan dakikadaki enzim miktarı (U) şeklinde belirtilmiş ve tüm çalışma boyunca kullanılmıştır (Ekren 2013).

Fitaz tayininde kullanılan formül aşağıdaki gibidir;

$$\text{Hacimsel Aktivite} = \frac{P (\mu\text{M}) \times V_t (\text{ml})}{T (\text{dk}) \times V_e (\text{ml})} = \text{U/ml}$$

P : İnorganik fosfat miktarı (µM)

V<sub>t</sub> : Reaksiyonun toplam hacmi (ml)

V<sub>e</sub> : Reaksiyondaki enzim miktarı (ml)

T : Zaman (dk)

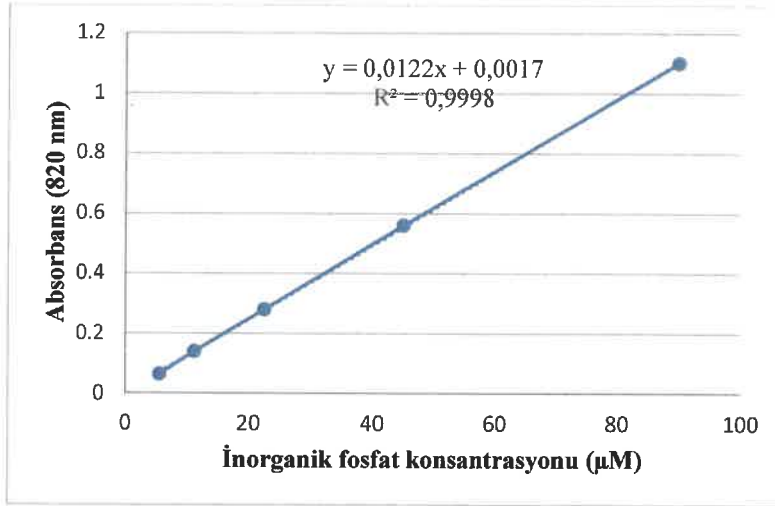
### 3.2.15. Standart grafiğinin oluşturulması

Standart KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltileri 5.625 ile 90 µM arasında artan konsantrasyonlarda hazırlanmış, Çizelge 3.8'de belirtildiği gibi standart çözeltiliye renk bileşeni ilave edilmiş ve karışım 50°C'de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. 820 nm'de spektrofotometrede absorbansları okunarak inorganik fosfat miktarı ölçülmüştür (Ekren 2013).

5.625 µM, 11.25 µM, 22.5 µM, 45 µM ve 90 µM konsantrasyonlara karşı okunan absorbans değerleri çizilerek Şekil 3.1'de standart grafiği oluşturulmuştur. Standart grafiğinden elde edilen formülden örneğin inorganik fosfat konsantrasyonu hesaplanmıştır.

**Çizelge 3.8.** İnorganik fosfat bileşen miktarları (Ekren 2013)

Tepkime bileşeni miktarları	Kör	Standart
Standart fosfat çözeltisi	--	2 ml
ddH <sub>2</sub> O	2 ml	--
Renk bileşeni	2 ml	2 ml
15 dakika 50°C su banyosunda tutulması		
Absorbans ölçümü (820 nm)		



Şekil 3.1. İnorganik fosfat miktarı standart grafiği

### 3.2.16. Toplam protein tayini

Süpernatant örneklerinde toplam protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak Coomassie plus Assay (Thermo Scientific, ABD) kit ile ölçülmüştür. Protein standardında sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu, örneklerle birlikte okutulan BSA standart çözeltilerinin (25-2000 µg/ml) absorbans 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 absorbansları okunmuştur. Standart grafiğinden elde edilen formülden örneğin toplam protein miktarı hesaplanmıştır.

### 3.2.17. Optimum pH'nın enzim üretimine etkisi

Enzimin en yüksek miktarda üretildiği optimum pH'yı bulmak için, erlenmayerde 28°C ve 225 rpm'de farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0 ve 6.0) üretim gerçekleştirilmiştir. 50 ml BMGY besiyerinin pH'sı 6.0'da sabit tutulurken, 50 ml BMEY besiyerinin başlangıç pH'sı 3.0-6.0 arasında değiştirilerek üretim yapılmıştır. Erlenmayer denemeleri 3 paralelli olarak yürütülmüştür. Örneklerden her birine 12 saatte bir etanol eklemesi yapılmış, besi ortamındaki etanol miktarının %1 olması sağlanmıştır. Ayrıca 12 saatte bir besi ortamından 1 ml örnek alınmış santrifüj edilerek süpernatantı ayrılmış ve enzim aktivitesi denemelerinde kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır. Üretim 96 saat boyunca devam etmiştir.

### 3.2.18. Fitazin karakterizasyonu

#### 3.2.18.1. Enzimin optimum pH'sının tespit edilmesi

Enzimin çalıştığı optimum pH'nın tespiti için pH 2.5-6.0 arasında 37°C'de çalışılmıştır. Tampon olarak pH 2.5 ve pH 3.0'de glisin-HCl kullanılırken pH 4.0, 5.0 ve 6.0'da sodyum sitrat kullanılmış ve tamponlar 0.2 M konsantrasyonda hazırlanmıştır. 0.1 M sodyum fitat çözeltisi glisin-HCl (pH 4.0) tamponunda hazırlanmıştır. Süpernatant örnekleri her pH'nın kendi tamponunda belirli oranlarda seyreltilerek

hazırlanmış ve laboratuvarında belirli koşullarda spektrofotometrede (820 nm) enzim aktivitesi ölçülmüştür (Ekren 2013).

### **3.2.18.2. Enzimin pH stabilitesinin tespit edilmesi**

Enzimin pH stabilitesinin tespiti için pH 2.5-6.0 arasında 37°C'de çalışılmıştır. Tampon olarak pH 2.5 ve pH 3.0'de glisin-HCl kullanılırken pH 4.0, 5.0 ve 6.0'da sodyum sitrat kullanılmış ve tamponlar 0.2 M konsantrasyonda hazırlanmıştır. 0.1 M sodyum fitat çözeltisi glisin-HCl (pH 4.0) tamponunda hazırlanmıştır. Süpernatant örneği her pH'nın kendi tamponunda belirli oranlarda seyreltilerek hazırlanmış ve oda sıcaklığında (22°C) 2 saat bekletilmiştir. Sonra laboratuvarında belirli koşullarda spektrofotometrede (820 nm) enzim aktivitesi ölçülmüştür 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 (Ekren 2013).

### **3.2.18.3. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespit edilmesi**

Enzimin çalıştığı optimum sıcaklığın tespiti için 20-80°C arasındaki sıcaklıklarda on derecelik aralıklarla çalışılmıştır. Tampon olarak pH 4.0'de sodyum sitrat kullanılmıştır. 0.1 M sodyum fitat da aynı tamponda hazırlanmıştır. Süpernatant örnekleri aynı tamponda belirli oranlarda seyreltilerek hazırlanmış ve örnekler 20-80°C arasında farklı sıcaklıklarda bekletilerek belirli koşullarda spektrofotometrede (820 nm) enzim aktivitesi ölçülmüştür (Ekren 2013).

### **3.2.18.4. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespit edilmesi**

Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespiti için 20-80°C arasındaki sıcaklıklarda çalışılmıştır. Tampon olarak pH 4.0'de sodyum sitrat kullanılmıştır. 0.1 M sodyum fitat da aynı tamponda hazırlanmıştır. Süpernatant örnekleri aynı tamponda belirli oranlarda seyreltilerek hazırlanmış ve enzim bu sıcaklıklarda 30 dakika inkübe edilmiştir ve laboratuvarında belirli koşullarda spektrofotometrede (820 nm) enzim aktivitesi ölçülmüştür. Her bir sıcaklığın ilk ölçülen aktivitesi %100 olarak belirlenmiştir. 30 dakika bekletmenin sonrasında ölçülen değer kalan aktivite olmuştur ve % şeklinde ifade edilmiştir (Ekren 2013).

### **3.2.18.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespit edilmesi**

Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisininin tespit edilmesi için CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ve ZnCl<sub>2</sub> kullanılmıştır. Tampon çözeltisi olarak optimum pH 4.0'de 0.2 M sodyum sitrat tamponu kullanılmıştır. Çizelge 3.9, 3.10 ve 3.11'de verildiği gibi metal iyonları 1, 10 ve 20 mM olacak biçimde ortama eklenmiştir. Kontrol olarak metal iyonu içermeyen ortam kullanılmış ve belirli koşullarda spektrofotometrede (820 nm) 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 (Ekren 2013).

**Çizelge 3.9.** 1 mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam (Ekren 2013)

Tepkime bileşeni miktarları	Enzim	Kör
Sodyum sitrat tamponu (0.2 M, 37°C, pH 4.0)	346 µl	346 µl
1 mM metal iyonu	4 µl	4 µl
Süpernatant örneği	20 µl	20 µl
37°C sıcaklıkta 5-6 dakika tutulması		
TCA(trikloroasetik asit) çözeltisi	--	400 µl
0.1 M Sodyum fitat	30 µl	--
15 dakika 37°C sıcaklıkta tutulması		
TCA(trikloroasetik asit) çözeltisi	400 µl	--
0.1 M Sodyum fitat	--	30 µl
8 dakika santrifüj (5.000xg)		
1.8 ml ddH <sub>2</sub> O + 2 ml renk bileşeni + 0.2 ml süpernatant		
15 dakika 50°C su banyosunda tutulması		
Absorbans ölçümü (820 nm)		

**Çizelge 3.10.** 10 mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam (Ekren 2013)

Tepkime bileşeni miktarları	Enzim	Kör
Sodyum sitrat tamponu (0.2 M, 37°C, pH 4.0)	310 µl	310 µl
1 mM metal iyonu	40 µl	40 µl
Süpernatant örneği	20 µl	20 µl
37°C sıcaklıkta 5-6 dakika tutulması		
TCA(trikloroasetik asit) çözeltisi	--	400 µl
0.1 M Sodyum fitat	30 µl	--
15 dakika 37°C sıcaklıkta tutulması		
TCA(trikloroasetik asit) çözeltisi	400 µl	--
0.1 M Sodyum fitat	--	30 µl
8 dakika santrifüj (5.000xg)		
1.8 ml ddH <sub>2</sub> O + 2 ml renk bileşeni + 0.2 ml süpernatant		
15 dakika 50°C su banyosunda tutulması		
Absorbans ölçümü (820 nm)		



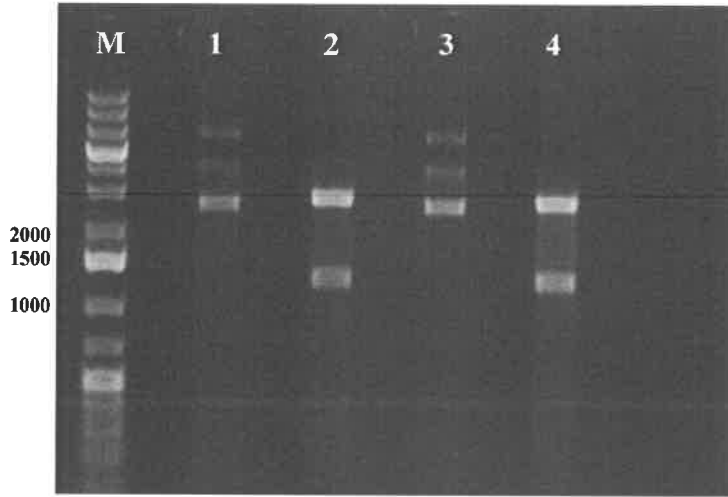
**Çizelge 3.11.** 20 mM konsantrasyonda metal iyonları içeren ortam (Ekren 2013)

<b>Tepkime bileşeni miktarları</b>	<b>Enzim</b>	<b>Kör</b>
Sodyum sitrat tamponu (0.2 M, 37°C, pH 4.0)	270 µl	270 µl
10 mM metal iyonu	80 µl	80 µl
Süpernatant örneği	20 µl	20 µl
37°C sıcaklıkta 5-6 dakika tutulması		
TCA(trikloroasetik asit) çözeltisi	--	400 µl
0.1 M Sodyum fitat	30 µl	--
15 dakika 37°C sıcaklıkta tutulması		
TCA(trikloroasetik asit) çözeltisi	400 µl	--
0.1 M Sodyum fitat	--	30 µl
8 dakika santrifüj (5.000xg)		
1.8 ml ddH <sub>2</sub> O + 2 ml renk bileşeni + 0.2 ml süpernatant		
15 dakika 50°C su banyosunda tutulması		
Absorbans ölçümü (820 nm)		

## 4. BULGULAR

### 4.1. Fitaz Geni İçeren Plazmid pUC57FITOHIS Vektörünün Doğrulanması

*pUC57FITOHIS* plazmidini içeren *E. coli XLI-Blue*, amfifilimli LB Miller sıvı besiyerine inokule edilerek 37°C'de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılıp ertesi gün plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen *pUC57FITOHIS* plazmidini *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 1100 bç ve 2700 bç uzunluğunda beklenen parçalar elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.1). Daha sonra 1100 bç uzunluğundaki fitaz geni jel'den kesilerek jel ekstraksiyonu ile elde edilmiştir.



**Şekil 4.1.** *pUC57FITOHIS* plazmidinin *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile kesimi jel görüntüsü 1 ve 3: negatif kontrol (1100 ve 2700 bç), M: 1 kb DNA standardı kontrol, 2 ve 4: pozitif kontrol

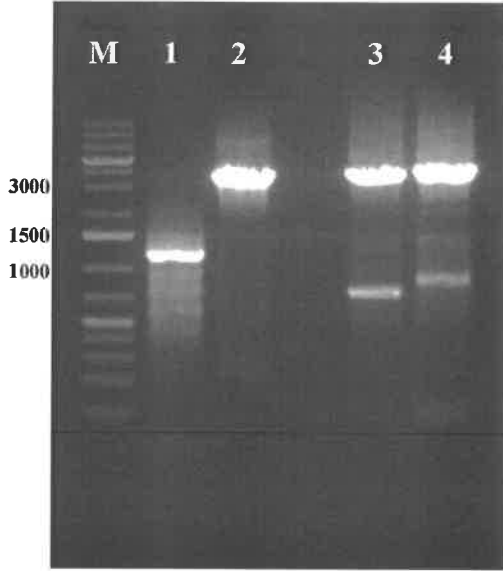
### 4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Genlerin Çoğaltılması

Jel purifikasyonu sonucunda elde edilen fitaz geni F-Fito-opt-gibson ve R-Fito-opt-notI primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu için 56°C bağlanma sıcaklığında çalışılmıştır. 1250 bç uzunluğundaki fitaz geni jel purifikasyonu ile elde edilmiştir. Elde edilen ürün template olarak kullanılarak F-Fito-opt-gibson ve R-Fito-opt-gibson primerleriyle yeniden PZR kurulmuş ve 1252 bç uzunluğunda fitaz geni elde edilmiştir.

Doğal pADH3αA Ksi/HIS4 template olarak kullanılıp PZR kurulmuş, F-snt5-2-gibson ve R-snt5-2-gibson primerleri ile çoğaltılmıştır. Sonucunda 3960 bç uzunluğundaki PADH3αA geni elde edilmiştir.

Sentetik pSNT5αA Ksi/HIS4 template olarak kullanılmış PZR kurulmuş, F-snt5-2-gibson ve R-snt5-2-gibson primerleri ile çoğaltılmıştır. Sonucunda 3960 bç uzunluğundaki PSNT5αA geni elde edilmiştir.

pADH3 $\alpha$ A-KSI/HIS4 template olarak kullanılmış, F-snt5-1-gibson ve R-snt5-1-gibson primerleri ile PZR kurulmuştur. Sonucunda 3708 bç uzunluğundaki HIS4 geni elde edilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri %1 agaroz jelde yürütülmüş ve doğrulanan bantlar jel pürifikasyonu yapılarak bir sonraki aşamaya geçilmiştir (Şekil 4.2).



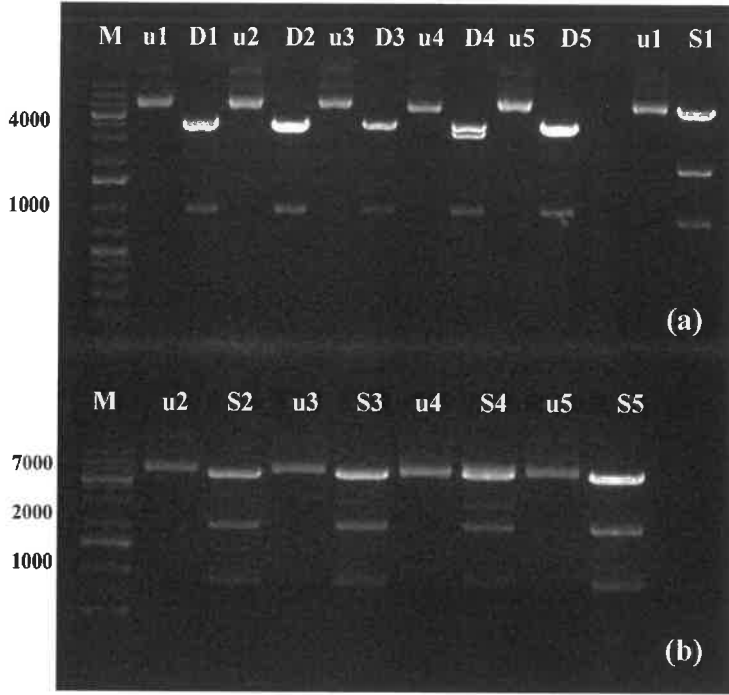
Şekil 4.2. PZR sonrası jel görüntüsü 1: Fitaz geni (1250 bç), 2: His4 geni (3708 bç), 3: pADH3 $\alpha$ A geni (3960 bç), 4: pSNT5 $\alpha$ A geni (3960bç) ve M: 1 kb DNA standardı

#### 4.3. Ekspresyon Plazmidlerinin Ligasyonu Ve *E. coli*'ye Transformasyonu

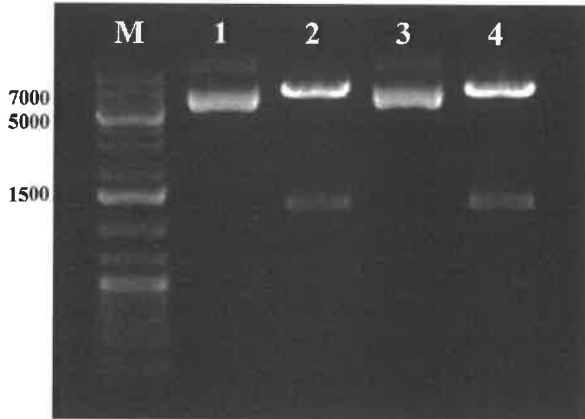
PCR sonrası jel purifikasyonu ile elde edilen ürünlerin ligasyonunda Gibson metodu kullanılmıştır. Fitaz geni, pADH3 $\alpha$ A-900, his4 arasında ve fitaz geni, pSNT5 $\alpha$ A, his4 ile iki ayrı 3'lü ligasyon kurulmuştur. Ligasyon karışımları *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine transforme edilmiştir. 25  $\mu$ g/ml zeosin içeren LB lennox agar plakalara ekim yapılmış ve plakada gelişen kolonilerden 5'er tanesi seçilerek LB Lennox sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Geliştirilen hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır.

Oluşturulan DH5 $\alpha$  *E. coli* pADH3 $\alpha$ A-900-FITO plazmitinin doğruluğu *EcorV* enzimi ile kesilerek kontrol edilmiştir. 969 bç, 3825 bç ve 4083 bç uzunluğunda beklenen parçalar elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.3). Oluşturulan DH5 $\alpha$  *E. coli* pSNT5 $\alpha$ A-FITO plazmitinin doğruluğu ise *XbaI* enzimi ile kesilerek kontrol edilmiştir. 849 bç, 1977 bç ve 6051 bç uzunluğunda beklenen parçalar elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.3).

DH5 $\alpha$  *E. coli* pADH3 $\alpha$ A-900-FITO plazmitinde doğrulanan parçalardan tekrar kontrol edilmek üzere D2 numara seçilmiştir. DH5 $\alpha$  *E. coli* pSNT5 $\alpha$ A-FITO plazmitinde ise tekrar kontrol edilmek üzere S5 numara seçilmiştir. Her iki plazmit de *NotI*, *XhoI* enzimleri ile kesilerek tekrar kontrol edilmiştir. 1250 bç ve 7627 bç uzunluğunda beklenen parçalar elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.4).

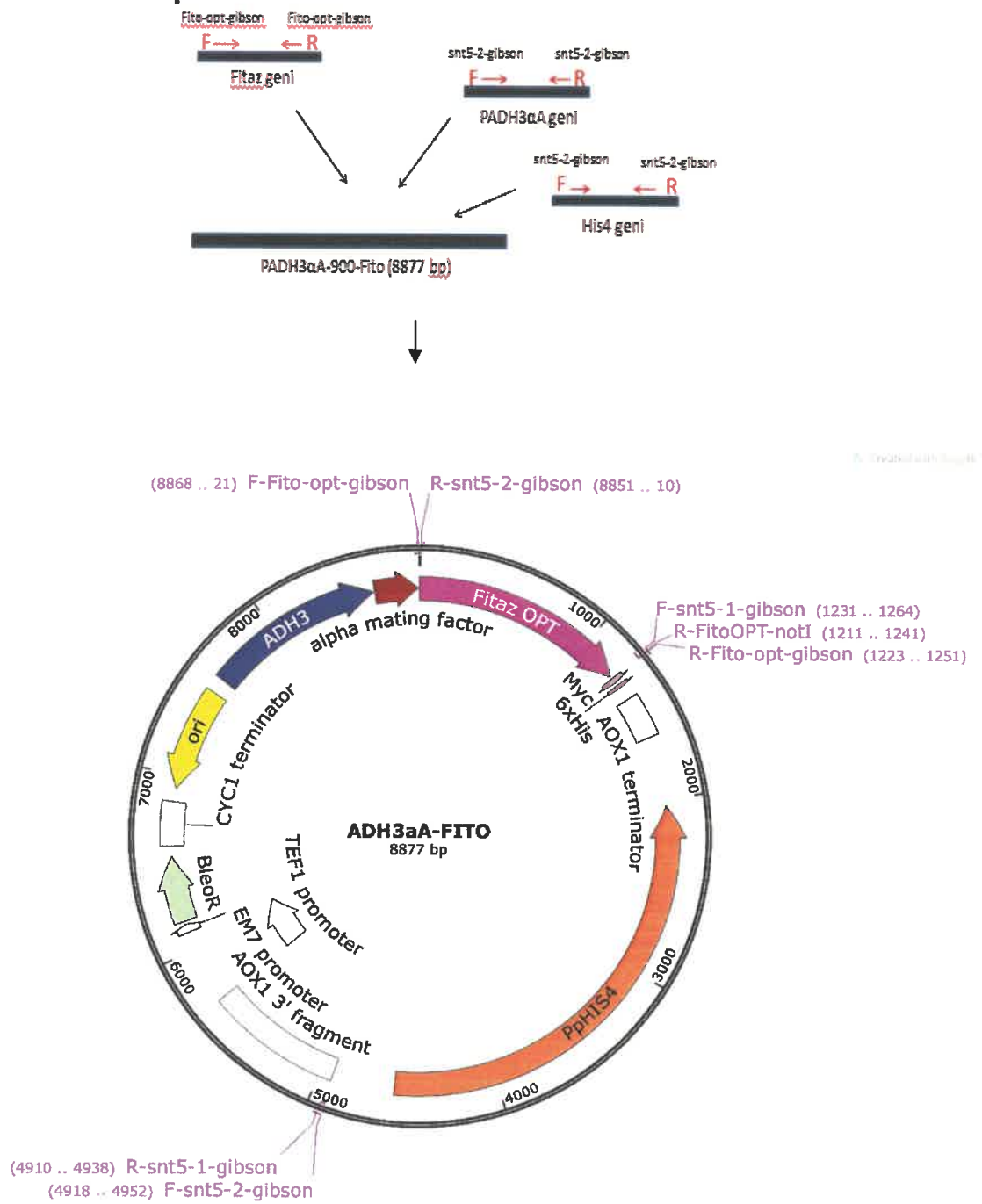


**Şekil 4.3.** a) DH5α *E. coli* pADH3αA-900-FITO plazmitinin *EcorV* enzimi ile kontrolü, b) DH5α *E. coli* pSNT5αA-FITO plazmitinin *XbaI* enzimi ile kontrolünün jel görüntüsü, D1-D5: DH5α *E. coli* pADH3αA-900-FITO plazmitinin farklı klonları, S1-S5: DH5α *E. coli* pSNT5αA-FITO plazmitinin farklı klonları, u1-u5: negatif kontrol, M: 1 kb DNA standardı

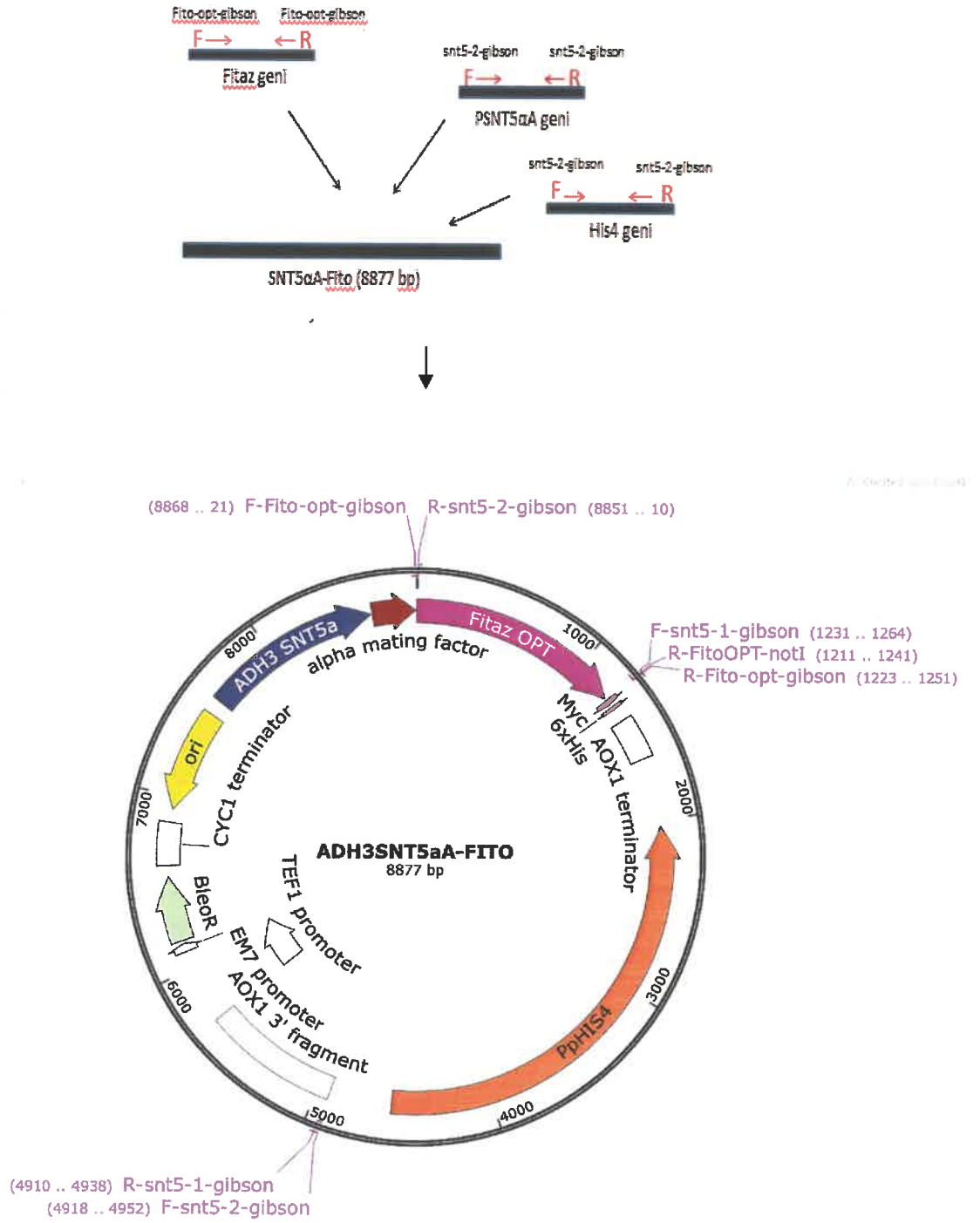


**Şekil 4.4.** Seçilen plazmitlerin *NotI*, *XhoI* enzimleri ile kontrolünün jel görüntüsü 2: DH5α *E. coli* pADH3αA-900-FITO, 4: DH5α *E. coli* pSNT5αA-FITO, 1 ve 3: negatif kontrol, M: 1 kb DNA standardı

#### 4.4. Protein Ekspresyonunda Kullanılan Plazmidlerin Oluşturulması



**Şekil 4.5.** Ligasyon sonrası elde edilen Doğal *ADH3* promotorlarıyla fitaz enzim üretim vektörü, pADH3a-FITO

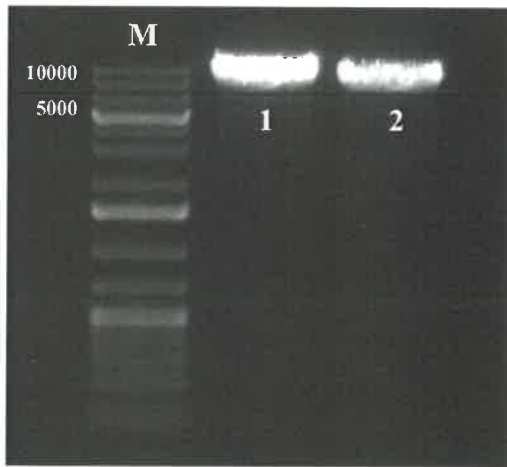


**Şekil 4.6.** Ligasyon sonrası elde edilen Sentetik *ADH3* promotorlarıyla fitaz enzim üretim vektörü, *pSNT5a-FITO*

#### 4.5. Plazmitlerinin Linear Hale Getirilmesi Ve *P. pastoris*'e Transformasyonu

DH5α *E. coli* pADH3αA-900-FITO ve DH5α *E. coli* pSNT5αA-FITO plazmitlerinin *NotI* ve *XhoI* enzimleri ile kesilerek jelde kontrol edilmesinden sonra linear hale getirilmesi için *ApaI* enzimi kullanılmıştır. *ApaI* enzimi ile kesimi sonucunda %1 agaroz jelde yürütülmüştür ve 8877 bp uzunluğunda beklenen parça elde edilmiştir (Şekil 4.7).

pADH3αA-900-FITO ve pSNT5αA-FITO plazmitlerinin 3-5 µg'ı *ApaI* enzimi ile linear hale getirildikten sonra *Pichia pastoris* X-33 suşuna ayrı ayrı transform edilmiştir. Transformant hücreler farklı zeosin miktarı içeren (100 µg/ml ve 500 µg/ml) YPD agar plakalara ekilmiştir. Plakalar 3 gün boyunca 28°C'de gelişmeye bırakılmıştır. Her iki zeosinli plakada da gelişim gözlenmiş ve 8'er tane klon seçilerek YPD sıvı besiyerine inokulum edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Plazmitlerin *ApaI* enzimi ile kesimi jel görüntüsü 1: DH5α *E. coli* pADH3αA-900-FITO, 2: DH5α *E. coli* pSNT5αA-FITO ve M: 1 kb DNA standardı



Şekil 4.8. YPD agar plakada transformant *P. pastoris* hücrelerin gelişimi görüntüsü

#### 4.6. Erlenmayerde Fitaz Üretimi

Transformasyon sonucu zeosinli plakalardan 8'er koloni seçilerek 3 ml YPD besiyerine inoküle edilmiş ve 28°C'de, 20 saat geliştirilmiştir. Gelişen kolonilerin her biri BMGY besiyerine başlangıç OD'leri 0.1 ( $10^6$  hücre) olacak şekilde inoküle edilmiş ve 28°C'de, 16 saat geliştirilmiştir. BMGY besiyerinde çoğalan, yaklaşık 12 OD olan hücreler BMEY besiyerine aktarılmış ve 28°C'de, 96 saat boyunca inkübasyona devam edilmiştir. Erlenmayer denemeleri 3 paralelli olarak yürütülmüş ve örnekler 12 saatte bir %1 etanol eklemesi yapılmıştır. Hücreler 96 saat sonunda santrifüjlenerek hasat edilmiş ve süpernatantlar fitaz enzim aktivitesinde kullanılmıştır.

*P. pastoris*'in en fazla fitaz ürettiği optimum başlangıç pH'sını belirlemek için, erlenmayerde 3 paralelli 28°C'de, pH 3.0, 4.0, 5.0 ve 6.0'da 96 saat boyunca üretim gerçekleştirilmiştir.



(a)



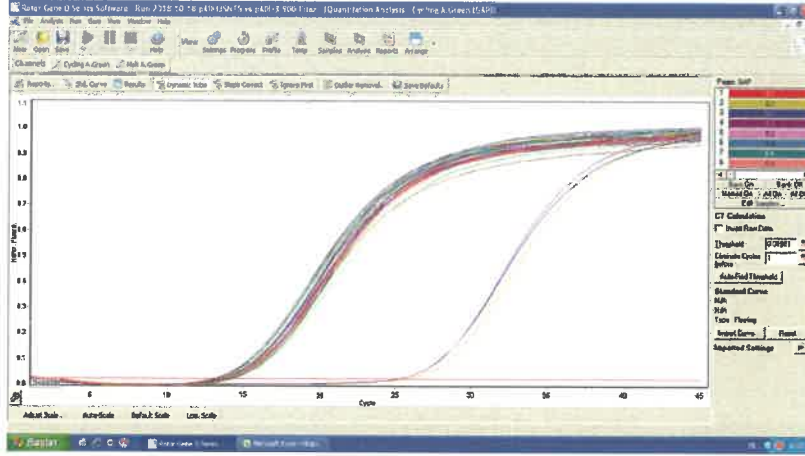
(b)

Şekil 4.9. a) ve b) Fitaz enziminin çalkalamalı inkübatörde üretimi

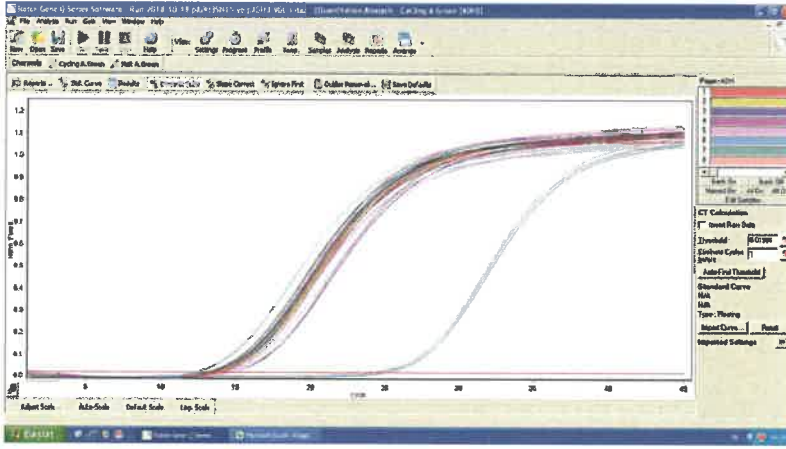
#### 4.7. Gerçek Zamanlı PZR İle Klonlarının Gen Kopya Sayılarının Belirlenmesi

*P. pastoris*'ten izole edilen genomik DNA'ların gerçek zamanlı PZR ile analizi yöntemi kullanılarak *P. pastoris* X33-pADH3 $\alpha$ A-900-FITO ve *P. pastoris* X33-pSNT5 $\alpha$ A-FITO klonlarının  $\Delta\Delta C_t$  değerine göre gen kopya sayıları belirlenmiştir (Şekil 4.10).  $C_t$  değeri belirlenirken, log scale ekranında görünen grafikte eşik değeri logaritmik fazın başlangıcında olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 4.11).





Şekil 4.10. Referans gen GAP kullanılarak  $C_t$  değerlerinin belirlenmesi



Şekil 4.11. Kopya sayısı belirlenecek ADH promotörü için  $C_t$  değerlerinin belirlenmesi

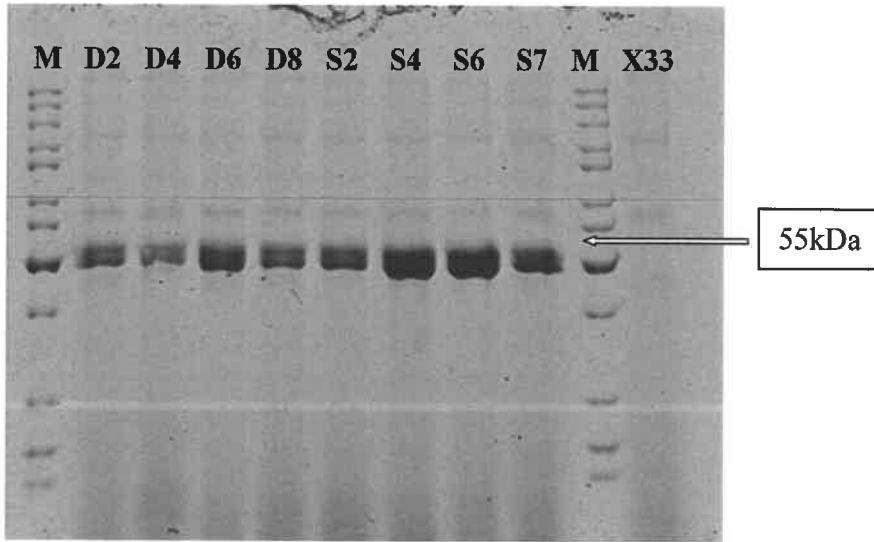
Çizelge 4.1. Gerçek zamanlı pcr ile klonların gen kopya sayısının belirlenmesi

Name	ADH GOI CT	GAP Norm. CT	Relative Conc.
D2	14,31	14,64	1,62
D3	14,26	14,58	1,62
D4	14,19	14,26	1,18
D6	13,34	14,12	2,58
D8	14,78	15,31	2,01
S2	14,54	14,77	1,45
S4	14,5	14,87	1,68
S6	15,08	15,22	2,29
S7	14,76	14,92	1,32
S8	14,69	14,9	1,41
X33	15,77	14,71	

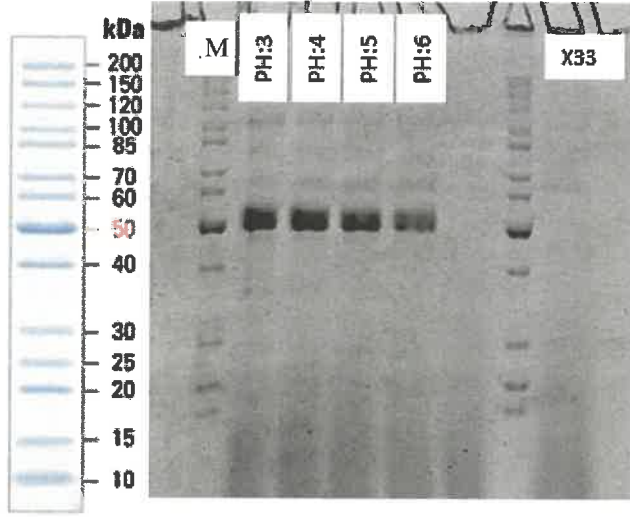
Gerçek zamanlı PZR analizi sonucunda *P. pastoris* X33- pADH3 $\alpha$ A-900-FITO klonlarından D2, D3 ve D8 2 kopya, D6 3 kopya, D4 ise tek kopya iken; *P. pastoris* X33-pSNT5 $\alpha$ A-FITO klonlarından S2, S7 ve S8 tek kopya S4 ve S6'nın 2 kopya olduğu görülmüştür.

#### 4.8. SDS-PAGE Analizi İle Fitaz Üretimini Belirlenmesi

SDS-PAGE analizi ile *P. pastoris* X33-pADH3 $\alpha$ A-900-FITO ve *P. pastoris* X33- pSNT5 $\alpha$ A-FITO klonları ile fitaz üretimlerinin 72. saat örnekleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmanın en doğru şekilde yapılabilmesi için her bir örnekten eşit hacimde (10  $\mu$ l) yüklenmiştir (Şekil 4.12).



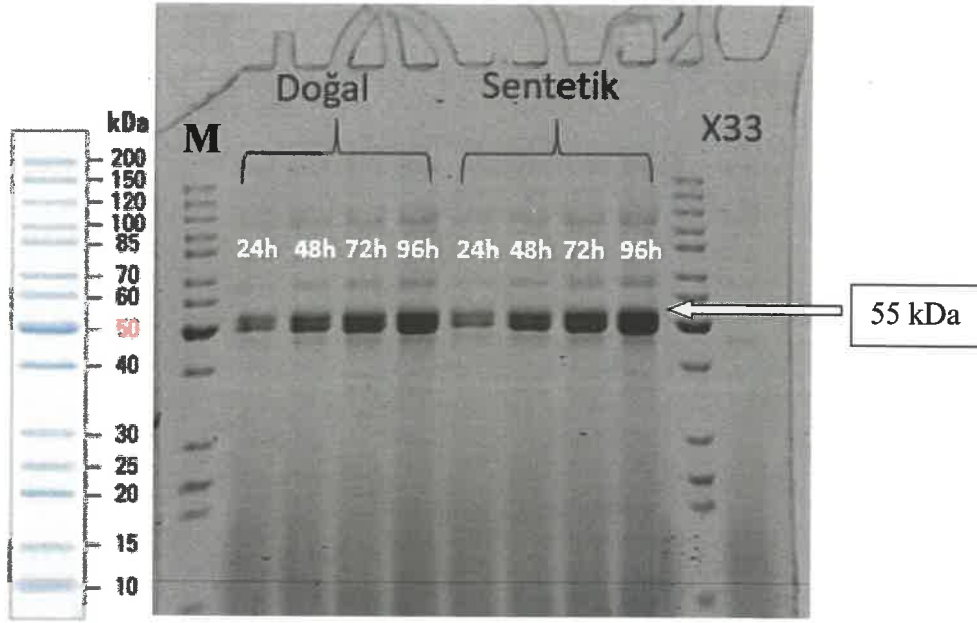
**Şekil 4.12.** *P. pastoris* X33-pADH3 $\alpha$ A-900-FITO ve *P. pastoris* X33- pSNT5 $\alpha$ A-FITO klonlarının fitaz üretimlerinin 72. saat örneklerinin SDS görüntüsü M: protein marker, X33: Negatif kontrol *P. pastoris* X-33 suşu, D2-D8: *P. pastoris* X33- pADH3 $\alpha$ A-900-FITO farklı klonlar, S2-S7: *P. pastoris* X33- pSNT5 $\alpha$ A-FITO farklı klonlar



**Şekil 4.13.** *P. pastoris* X33- pSNT5 $\alpha$ A-FITO S7 klonunun farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0) fitaz üretiminin 72. saat örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü M: protein marker, X33: Negatif kontrol *P. pastoris* X-33 suşu

Tek kopya olduğu kesinleşen *P. pastoris* X33-pSNT5 $\alpha$ A-FITO S7 klonu seçilmiş ve farklı pH'larda (pH 3.0, 4.0, 5.0 ve 6.0) üretiminin 72. saat örnekleri SDS-PAGE analizi ile karşılaştırılmıştır. En iyi üretim pH 4.0'de görülmüştür (Şekil 4.13).

Tek kopya olduğu doğrulanan *P. pastoris* X33-pSNT5 $\alpha$ A-FITO S7 klonu ve *P. pastoris* X33-pADH3 $\alpha$ A-900-FITO D4 klonu karşılaştırılmak üzere optimum pH 4.0'de 96 saat boyunca üretilmiş ve SDS-PAGE analizi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** *P. pastoris* X33-pADH3 $\alpha$ A-900-FITO D4 klonunu ve *P. pastoris* X33-pSNT5 $\alpha$ A-FITO S7 klonunun zamana karşı karşılaştırmasının SDS PAGE görüntüsü M: protein marker, X33: Negatif kontrol *P. pastoris* X-33 suşu, Doğal: *P. pastoris* X33-pADH3 $\alpha$ A-900-FITO D4 klonu, Sentetik: *P. pastoris* X33- pSNT5 $\alpha$ A-FITO S7 klonu, 24h-96h: süre (saat)

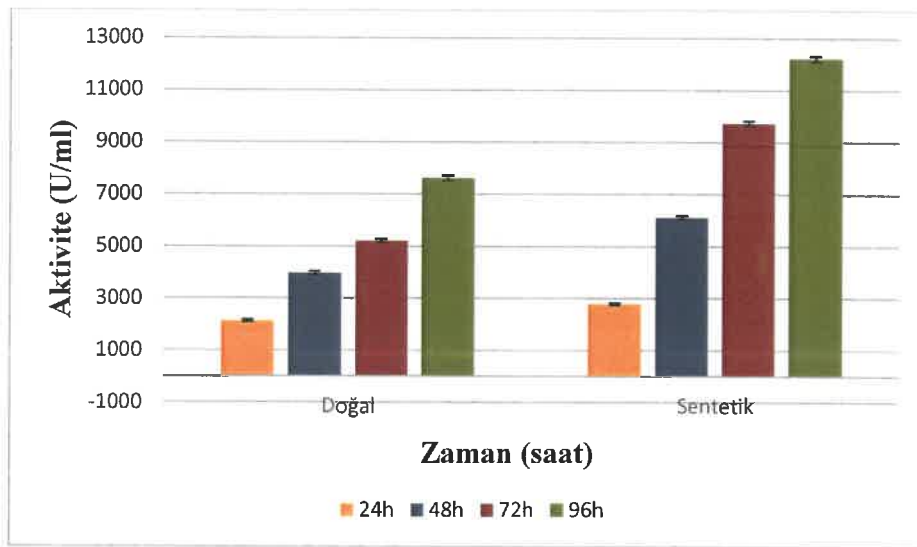
SDS PAGE analizi sonucunda 55 kDa'luk fitaz üretilmiş, bu çalışma ile elde edilen *P. pastoris* X33- pSNT5 $\alpha$ A-FITO S7 klonunun *P. pastoris* X33- pADH3 $\alpha$ A-900-FITO D4 klonundan daha yüksek spesifik verimlilik ile protein üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür.

#### 4.9. Fitaz Aktivitesi Sonuçları

*P. pastoris* X33- pADH3 $\alpha$ A-900-FITO D4 klonu ve *P. pastoris* X33-pSNT5 $\alpha$ A-FITO S7 klonunun zamana karşı fitaz aktivitesi karşılaştırmasının sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir. Sentetik promotorla *P. pastoris* X33- pSNT5 $\alpha$ A-FITO S7 klonunda 96. saat sonunda 12203 U/ml, doğal promotorla *P. pastoris* X33-pADH3 $\alpha$ A-900-FITO D4 klonunda 7613 U/ml enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Enzim aktivite sonuçlarında her bir değer ortalaması ve üç paralelin standart sapması gösterilmiştir (Şekil 4.16). Sentetik *ADH3* promotorun doğal promotora göre 96. saat sonunda yaklaşık %60 daha fazla aktivite gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.15. a) ve b) Fitaz aktivitesi tayini analizi



Şekil 4.16. *P. pastoris* X33-pADH3αA-900-FITO D4 klonu ve *P. pastoris* X33-pSNT5αA-FITO S7 klonunun zamana karşı fitaz aktivitesi karşılaştırmasının sonuçları Doğal: *P. pastoris* X33- pADH3αA-900-FITO D4 klonu, Sentetik: *P. pastoris* X33-pSNT5αA-FITO S7 klonu, 24h-96h: süre (saat)

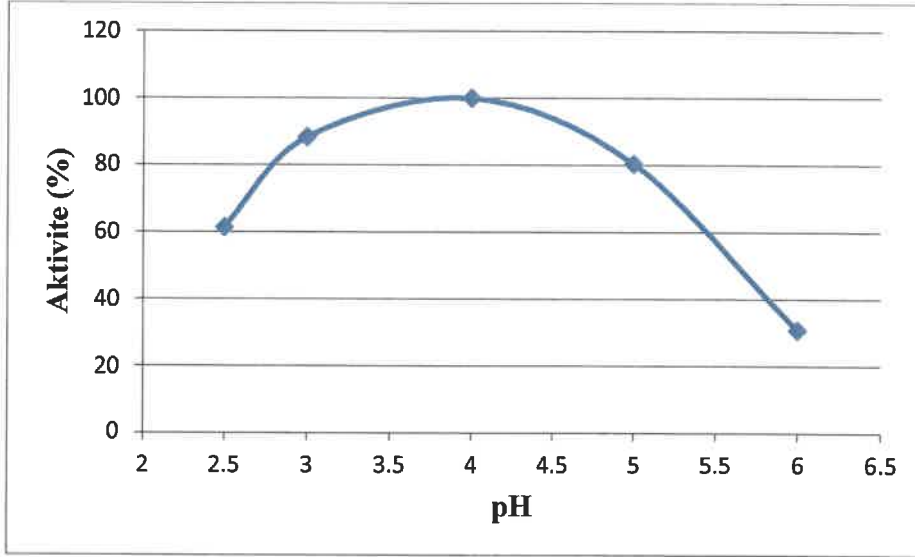
Bradford yöntemi kullanılarak Coomassie plus Assay kit protokolüne göre hazırlanan farklı konsantrasyonlarda Bovine Serum Albumin (BSA) standardına göre yapılan toplam protein hesaplamalarında 96 saatlik erlenmayer üretimi sonucunda toplam protein miktarları doğal *ADH3* promotoruyla üretilen fitaz için 315 mg/l iken sentetik *ADH3* promotoruyla üretilen fitaz için 373 mg/l olarak bulunmuştur.

#### 4.10. Fitaz Enziminin Karakterizasyonu

##### 4.10.1. Enzimin optimum pH'sının tespiti

Fitaz enziminin optimum pH'sının tespit grafiği Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Fitaz aktivitesinin değeri pH 2.5-4.0 arası doğrusal artış göstermiş ve en yüksek değere pH 4.0'de ulaşmıştır. Daha sonra azalarak pH 6.0'da en düşük değere göstermiştir. Fitazın aktivite gösterdiği en yüksek değer 100 olarak belirlenmiştir. Optimum değer

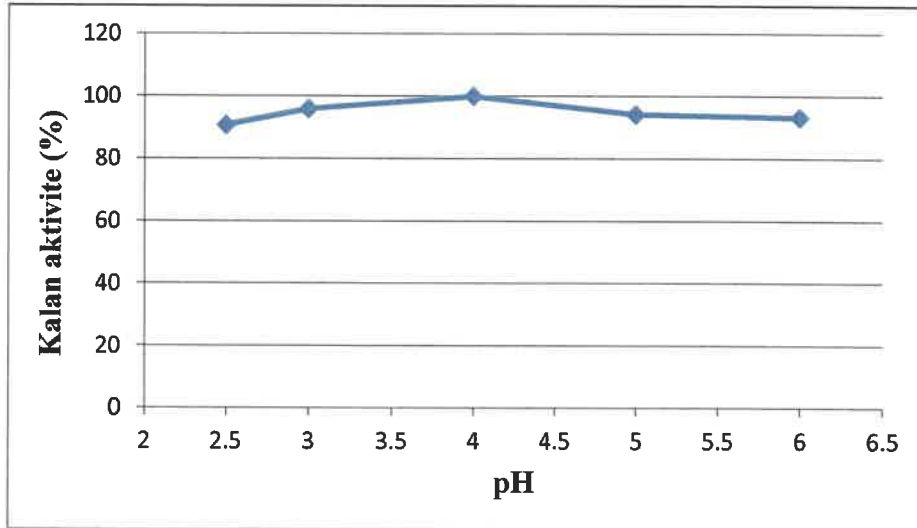
olarak pH 4.0 bulunmuş ve burada bağlı aktivite %100 iken, pH 3.0'de %88, pH 5.0'de %80, pH 2.5'de %61 ve pH 6.0'da %31 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.17. Enzimin optimum pH'sının tespit grafiği

#### 4.10.2. Enzimin pH stabilitesinin tespiti

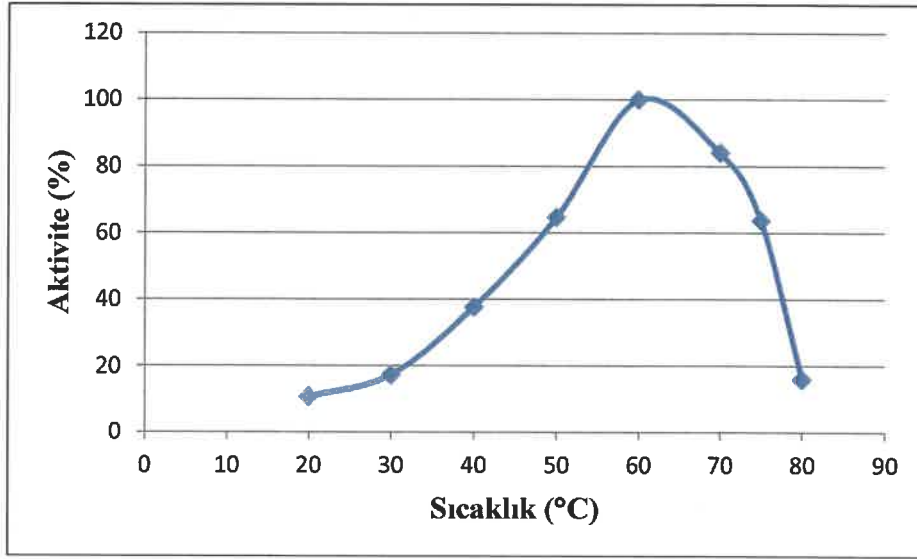
Enzimin pH stabilitesinin tespit edilmesi için 22°C'de 2 saat inkübasyonu sonunda aktivite sonuçları Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Maksimum enzim stabilitesi 100 olarak belirlenmiş, pH 4.0'de %100 stabilitesini korumuştur. pH 3.0'de %96, pH 5.0'de %94 iken pH 6.0'da %93 ve pH 2.5'de %91 stabil kalmıştır. Genel olarak bu beş pH değerinde %90'ın üzerinde stabilitesini koruduğu saptanmıştır.



Şekil 4.18. Enzimin pH stabilitesinin tespit grafiği

#### 4.10.3. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespiti

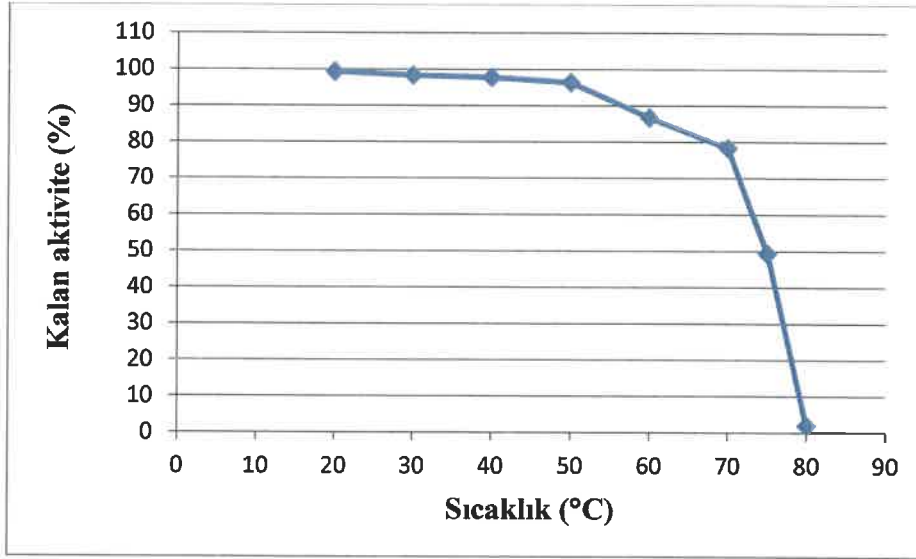
Fitaz enziminin optimum çalıştığı sıcaklığın belirlendiği sonuçlar Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Fitaz 20°C'de en düşük aktivite göstermiş ve sıcaklığın 10'ar derece yükseltilmesi ile enzim aktivitesi doğrusal artış göstermiştir. En yüksek değere ulaştığı ve %100 aktivite gösterdiği enziminin optimum çalışma sıcaklığının 60°C olduğu bulunmuştur. Sıcaklığın 60°C'den daha yüksek dereceye çıkarılmasıyla aktivitenin hızla düştüğü görülmüştür. Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde, 20°C'de %11 aktivite gösterirken 30°C'de %17, 40°C'de %38 ve 50°C'de %65 aktivite göstermiştir. 70°C'de %84, 75°C'de %64 aktivite gösterirken 80°C'de bu değer %16'ya düşmüştür.



Şekil 4.19. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklığın tespit grafiği

#### 4.10.4. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespiti

Fitazın 30 dakika boyunca inkübasyonu sonucu sıcaklık stabilitesinin tespit sonuçları Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesini 20°C'de %99 korurken sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle bu değer giderek azalmıştır. 30°C'de %98, 40°C'de %97,5 ve 50°C'de %96 aktivitesini korurken enzimin maksimum aktivite gösterdiği 60°C'de ise %87 aktivitesini koruduğu saptanmıştır. 70°C'de %78, 75°C'de %49 aktivitesini korumuş ve 80°C'de aniden bu değer %2'ye düşmüştür.



Şekil 4.20. Enzimin sıcaklık stabilitesinin tespit grafiği

#### 4.10.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespiti

Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespiti için 1 mM, 10 mM ve 20 mM konsantrasyonlarda  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{FeCl}_2$  metal iyonlarının ortama eklenmesi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.21’de gösterilmiştir.

$\text{Ca}^{+2}$  iyonunun 1 ve 10 mM konsantrasyon varlığında enzim aktivitesi artmış, sırasıyla %102 ve %113 aktivasyon gözlenmiştir. 20 mM’de ise aktivite azalmış ve %75’e düşmüştür.

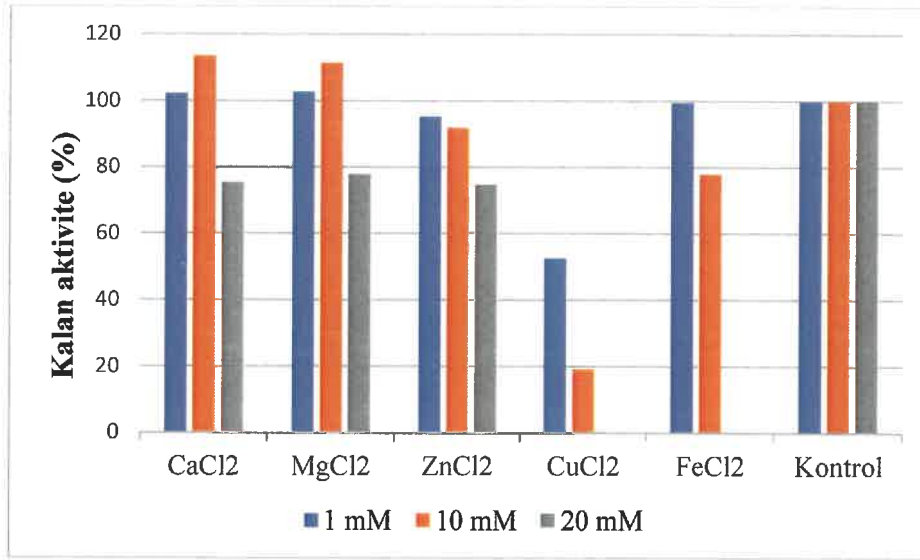
$\text{Mg}^{+2}$  nin 1 ve 10 mM konsantrasyon varlığında enzim aktivitesi artmış, sırasıyla %103 ve %111 aktivasyon gözlenmiştir. 20 mM’de ise aktivite azalmış ve %78 inhibisyon görülmüştür.

$\text{Zn}^{+2}$  iyonunun 1 ve 10 mM konsantrasyon varlığında sırasıyla %95 ve %92 inhibisyon gözlenirken 20 mM’de %75 inhibe etmiştir.

$\text{Cu}^{+2}$  iyonu ortama eklenen tüm konsantrasyonlarda enzimi inhibe etmiştir. 1 mM için bu değer % 53, 10 mM’de % 19 iken 20 mM’de tamamen inhibe olarak sıfıra düşmüştür.

$\text{Fe}^{+2}$  iyonunun 1 mM konsantrasyon varlığında enzim aktivitesi nerdeyse hiç değişmezken, 10 mM için %78 inhibe olmuş, 20 mM’de ise tamamen inhibe olarak hiç aktivite gözlenmemiştir.





Şekil. 4.21. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin tespit grafiği

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma *E. coli* fitaz geninin *P. pastoris* mayasında sentetik SNT5 ve doğal (900 bç) alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotorları ile rekombinant üretilmesi, enzimin karakterizasyonunun yapılması ve iki promotorun rekombinant fitaz üretimine etkisinin karşılaştırması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Literatürde *P. pastoris*'de *ADH3* promotoru ile fitaz enziminin rekombinant üretimi üzerine çalışma bulunmamaktadır. *P. pastoris* mayasında diğer promotorlarla fitaz enziminin rekombinant üretimi üzerine çalışmalar yapılmıştır. *P. pastoris*'de rekombinant fitaz üretiminde *ADH3* promotorunun kullanılması, sentetik SNT5 ve doğal (900 bç) *ADH3* promotorların enzim üretimi ve aktivitesine etkisinin araştırılması ile fitaz enziminin daha ekonomik üretimi gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada *E. coli* fitaz enzimini kodlayan genler sentetik SNT5 ve doğal *ADH3* promotorları ile *P. pastoris* mayasında klonlanmış ve tek kopya klonları seçebilmek amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi kullanılmıştır. Sentetik SNT5 ve doğal *ADH3* promotorları ile üretilen klonlardan tek kopya olarak seçilenler erlenmayerde 96 saat boyunca BMEY besiyerinde %1 etanol beslenerek üretilmiştir. Sentetik *ADH3* promotoru için enzim aktivitesi 12203 U/ml iken doğal *ADH3* promotoru için 7613 U/ml olarak hesaplanmıştır. Sentetik promotorun doğal'a göre 96. saat sonunda yaklaşık % 60 daha fazla enzim üretimi gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

*P. pastoris* fitaz enzimini doğal olarak üretmemektedir. Literatürde fitaz enziminin *P. pastoris*'te rekombinant üretimi üzerine diğer promotorlarla çalışmalar yapılmıştır. Chen vd. (2004) tarafından, *E. coli* fitaz geni *appA AOX1* promotörünün kontrolü altında *P. pastoris*'te erlende 118-204 U/ml, fermentörde 1180-4946 U/ml üretilmiştir. Tai vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada *E. coli* fitaz geni *P. pastoris*'te *GAP* promotoruyla erlende 72 saatte üretim yapılmış ve fitaz aktivitesi 112.5 U/ml olarak bulunmuştur. Xiong vd. (2005) tarafından, *Aspergillus niger* SK-57'den alınan fitaz geninin (*appA*) *P. pastoris* mayasında *AOX* promotoru altında fermentörde üretimi sonucu 865 U/ml enzim aktivitesi görülmüştür. *Peniophora lycii*'den alınan fitaz geni, *AOX1* promotoru altında *P. pastoris* mayasında rekombinant üretilmiş ve fermentörde 140 saat üretim sonucunda 10.540 U/ml enzim aktivitesi ölçülmüştür (Xiong vd. 2006). *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696'den fitaz geni (*appA*)'nin *P. pastoris*'te fermentörde üretim sonucu fitaz aktivitesi 15.000 U/ml ölçülmüştür (Luo vd. 2007). Literatürdeki çalışmalarda üretilen yüksek fitaz aktivite değerleri fermentör ile elde edilmiştir. Oysa bu çalışmada erlenmayerde yüksek değerlere ulaşılmıştır.

Erlenmayerde çok yüksek üretimin sağlandığı literatürdeki çalışmada Bin vd. (1998) tarafından fitaz geni (*phyA2*) *P. pastoris* mayasında *AOX1* promotoru altında rekombinant üretilmiş, klonlamada pPIC9 plazmidi kullanılmış ve erlenmayerde yaklaşık 108 saat sonunda 15656 U/ml enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu değer çalışmadaki SNT5 *ADH3* promotoru ile fitaz üretiminden fazladır. Ancak çok eskilere dayanan bir çalışma olduğu için ve *AOX1* promotoru ile gerçekleştirildiğinden tam bir kıyaslama yapılamamaktadır. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, *A. niger* ksilanaz geni kullanılarak üç farklı  $P_{ADH3}$ ,  $P_{AOX1}$  ve  $P_{GAP}$  ile *P. pastoris*'te rekombinant protein üretimi karşılaştırılmıştır. Fermentörde 72 saat üretim sonucu;  $P_{ADH3}$  ile 3725

U/ml, P<sub>AOX1</sub> ile 2095 U/ml ve P<sub>GAP</sub> ile 580 U/ml ksilanaz üretilmiştir. En fazla üretim *ADH3* promotoruyla sağlanmış ve *AOX*'e göre 1.8 kat fazla olmuştur. Sonuçlar *ADH3* promotorların diğer promotorlara alternatif olabileceğini göstermiştir (Karaoglan vd. 2016). Laboratuvarımızda yapılan diğer çalışmada ise *ADH3* promotoruyla ksilanaz üretilmiş ve SNT5 promotorunda doğal 900 bç promotoruna göre yaklaşık iki katı aktivite kaydedilmiştir (Karaoglan 2016a). Bu sonuçlar, sentetik *ADH3* promotorunun fitaz üretiminde doğal'a göre yaklaşık % 60 daha fazla aktivite gösterdiği çalışmamızı destekler niteliktedir. SNT5 *ADH3* promotorunda EK-3'de görüldüğü gibi doğal 900 bç *ADH3* promotorundaki URS (Upstream Repressor Site) bölgesi, UAS2 (Upstream Activator Site) bölgesi ile değiştirilmiştir. UAS2 bölgesi pozitif regülasyondan sorumlu bir aktivatör bölge olduğu için enzim aktivitesinin SNT5 *ADH3* promotorunda daha yüksek çıkmasında etkili olmuştur.

Erlenmayer üretimleri sonucunda SDS-PAGE analizinde yaklaşık 55 kDa büyüklüğünde fitaz bantları görülmüştür. Angelis vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1'den fitaz geni elde edilmiş ve *P. pastoris*'de rekombinant üretimi sonucu 50 kDa'luk bant gözlenmiştir. Tahıl purple asit fosfotaz tip fitaz (PAPhy) *P. pastoris* mayasında yaklaşık 57 kDa büyüklüğünde protein üretilmiştir (Dionisio vd. 2012). *Pichia anomala* mayasında hücreye bağlı fitaz geni (Pphy) alınmış, *S. cerevisiae*'de rekombinant üretimi sonucu 55 kDa büyüklüğünde fitaz bandı gözlenmiştir (Kaur vd. 2010). Wan-qin vd. (2015) tarafından, *Mitsuokella jalaludinii* bakterisinden elde edilen fitaz geninin (phy7) *E. coli*'de rekombinant üretimi sonucu 55 kDa büyüklüğünde fitaz bandı elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde fitazın moleküler büyüklüğünün genellikle 45-65 kDa arasında değişmekte olduğu sonucuna varılmıştır. Büyüklüklerin farklı olma sebebi fitazın kaynaklarının birbirine özgü karakteristik özelliklerinden kaynaklanmıştır.

Çalışmada enzimin karakterizasyonu yapılmış, enzimin optimum pH'sının 4.0 ve sıcaklığının 60°C olduğu saptanmıştır. Fitaz için optimum pH ve sıcaklık şartlarını belirlemeye yönelik çalışmalar incelendiğinde, Tai vd. (2013) tarafından, *E. coli* fitazı için optimum pH 4.0 ve 6.0, optimum sıcaklık ise 50°C bulunmuştur. *A. niger* N25'den elde edilen rekombinant phyA mutant fitazı için optimum pH 5.0, optimum sıcaklık 60°C belirlenmiştir (Tang vd. 2018). *Hansenula fabianii* J640 mayasından elde edilen Hffitaz'ı için optimum sıcaklık 50°C, optimum pH 4.5 bulunmuştur (Watanabe vd. 2009). Nuhriawangsa vd. (2009) yaptıkları çalışmada *E. coli* fitazı için optimum pH 5.0 ve optimum sıcaklık 40°C olarak bulunurken, Wyss vd. (1999) çalışmasında *E. coli* fitazının optimum pH'sı 4.5 bulunmuştur. *A. niger* SK-57'den alınan fitazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C, pH 5.5 bulunmuştur (Xiong vd. 2005). Termofilik bir küf olan *Sporotrichum thermophile*'den üretilen fitaz enziminin optimum pH'sı 5.0 ve sıcaklığı 60°C bulunmuştur (Maurya vd. 2017). Rodriguez vd. (2000), yaptıkları çalışmada *Aspergillus fumigatus* fitazı için optimum sıcaklık 60°C, pH 5.5 vebulunmuştur. *Mitsuokella jalaludinii* bakterisinden elde edilen fitaz geninin (phy7) *E. coli*'de üretiminde enzimin optimum sıcaklığı 55°C, pH'sı 4.5 bulunmuştur (Wan-qin vd. 2015). Kaur vd. (2010) tarafından, *Pichia anomala* mayasından üretilen fitaz için optimum sıcaklık 60°C, pH 4.0 bulunmuştur ve bu değer çalışma ile birebir örtüşmektedir. *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1'de optimum pH fitaz için 4.0 iken optimum sıcaklık 45°C olarak saptanmıştır (Angelis vd. 2003). *Yersinia intermedia*'den alınan fitaz geni (appA)'nin üretimi sonucu enzimin optimum pH'sı 4.5, sıcaklığı 55°C bulunmuştur (Huang vd. 2006). *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696'den fitaz geni

(appA) 'nin üretimi sonucu fitazın optimum pH'sı 4.5, sıcaklığı 55°C bulunmuştur (Luo vd. 2007). Fitaz için bu kadar değişen optimum sıcaklık ve pH değerleri enzim kaynağının farklı olmasından kaynaklanmıştır. Çoğu mikrobiyal fitazlar, funguslardan elde edilir ve fungal fitazların optimum pH'sı 4.5-5.5'dur, 50-60°C optimum sıcaklığa sahiptir.

Fitaz enzimi iki saat boyunca pH 4.0'de %100 stabil iken, pH 3.0'de %96, pH 5.0'de %94, pH 6.0'da %93 ve pH 2.5'de %91 stabil kalmıştır. Enzimin pH 2.5-6.0 arası %90'ın üzerinde stabilitesini koruduğu saptanmıştır. *A. fumigatus* fitazı 6 saat boyunca pH 4.0-6.0 arası aktivitesinin %70-75'ini korumuştur (Sanni vd. 2019). *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696 fitazının pH 3.0-10.0 arası bir saat sonunda aktivitesinin %85'ini koruduğu görülmüştür (Luo vd. 2007). *E. coli* fitazı iki saatte pH 2.0-8.0 arası %80'in üzerinde stabil kalmıştır (Zhang vd. 2016). Termofilik *Thermomyces lanuginosus* SSBP fitazı 2 saat sonunda pH 4.0'de aktivitesinin %90'ını korumuştur (Makolomakwa vd. 2017). Sonuçlara bakıldığında zaman enzimin geniş pH aralığında oldukça stabil olduğu görülmüştür. Ayrıca enzimin asidik koşullarda kullanılabilecek olduğu saptanmıştır.

Enzimin 30 dakika boyunca maksimum aktivite gösterdiği 60°C'de %87, 70°C'de %78, 75°C'de %49 aktivitesini korumuş ve 80°C'de aniden bu değer %2'ye düşmüştür. Angelis vd. (2003) çalışmalarında *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 fitazı 60°C'de 30 dakikada %100 stabil, 70°C'de %70 stabilken 80°C'de 20 dakikada %5 stabilitesini koruduğu görülmüştür. *A. niger* SK-57 fitazı 80°C'de 10 dakikada %50 stabilken 18 dakikadan sonra stabilitesini tamamen kaybetmiştir (Xiong vd. 2005). *E. coli* fitazı 20 dakika boyunca 70°C'de %70 stabilken 80°C'de %50 stabilitesini korumuştur (Zhang vd. 2016). *Peniophora lycii* fitazı 80°C'de 10 dakikada %25 stabilken 20 dakikadan sonra stabilitesini kaybetmiştir (Xiong vd. 2006). Sonuçta, yemlere ilave edilecek fitaz enzimi pelletleme işlemleri sırasında yaklaşık otuz saniye boyunca yüksek sıcaklığa (70-90°C) dayanıklı olması gerekir. Bu nedenle özellikle ilk 5 dakika enzimin stabilitesini koruması önem taşır. Enzimin 20-70°C'de 30 dakika boyunca aktivitesinin çoğunluğunu muhafaza etmesi fitazın iyi bir sıcaklık stabilitesinin olduğunu göstermiştir.

Çalışmada enzim aktivitesi üzerine 1 mM, 10 mM ve 20 mM metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. 1 ve 10 mM Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> iyonları aktivatör etki gösterirken, 20 mM inhibitör etki göstermiştir. 1 ve 10 mM Zn<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> iyonları inhibitör etki gösterirken 20 mM Cu<sup>+2</sup> tamamen inhibe ederek sifira düşmüştür. 1 mM Fe<sup>+2</sup> iyonunun enzim aktivitesinde fazla etkisi olmamış, 10 mM inhibe etmiş, 20 mM'de ise tamamen inhibe ederek sifira düşmüştür. Luo vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada 1mM Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> iyonları aktivatör etki gösterirken Fe<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> iyonları inhibitör etki göstermiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermiştir. *A. niger* BCC18081 fitazı için Cu<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> iyonları inhibitör etki; Ca<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> ise aktivatör etki göstermiştir (Promdonkoy vd. 2009). *Mitsuokella jalaludinii* fitazı için 1mM ve 5 mM Ca<sup>+2</sup> iyonu enzim aktivitesini artırırken Fe<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> iyonları enzim aktivitesini inhibe etmiştir (Wan-qin vd. 2015). Aly vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada *Streptomyces luteogriseus* R10 fitazında 10 mM Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> varlığında aktivite artmış, Zn<sup>+2</sup> varlığında değişmemiş, Cu<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> varlığında aktivite azalmıştır. *E. coli* BL21 fitazında Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Pb<sup>+3</sup> iyonlarının aktiviteyi artırdığı, Fe<sup>+3</sup> iyonunun ise tamamen aktiviteyi inhibe ettiği görülmüştür (Nuhriawangsa vd. 2009).

Tai vd. (2013) tarafından, *E. coli* fitazında 5 mM ve 10 mM  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesini en çok etkileyen inhibitörler olduğu bulunmuştur. *Lactobacillus plantarum* fitazında 1 mM ve 5 mM  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi artırdığı görülmüştür (Uslu vd. 2016). *A. fumigatus* fitazında 5,10 ve 20 mM  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Fe}^{+2}$ 'nin enzimi aktive ettiği,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$ 'nin da inhıbe ettiği saptanmıştır (Sanni vd. 2019).

Enzimin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin tespiti ile ilgili yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar görülmüştür. Genellikle  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonları aktivatör,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları inhibitör etki göstermiş  $\text{Fe}^{+2}$  iyonu ise hem aktivatör hem inhibitör etki göstermiştir. Çalışmada 10 mM  $\text{Fe}^{+2}$  enzim aktivitesini inhıbe etmiş, 20 mM'de ise tamamen inhıbe ederek sıfıra düşmüştür. Bunun sebebi Fe-fitat kompleksi oluşması sonucu enzimin kullanacağı fitatın azalması enzimin inhibisyona uğramasına neden olmuştur şeklinde yorumlanabilir.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu ise tüm konsanrasyonlarda inhibitör etki göstermiştir.  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  iyonları diğer metal iyonlarına göre fitata daha kuvetli bağlanma eğiliminde olduğu için fitatla çözünmez kompleks oluşturmuş, bu nedenle yüksek inhibisyona neden olmuştur diyebiliriz. 1 ve 10 mM  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonları aktivatör etki göstermiş yani enzimi stimüle etmiştir, 20 mM ise inhibitör etki göstermiştir. Bu inhibisyonun,  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonlarının enzimin substrata bağlanma bölgesinde ve katalitik merkezinde yer alan amino asitlerle etkileşmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Araştırma sonucunda yüksek aktiviteye sahip, rekombinant üretilen, endüstriyel potansiyeli yüksek bir fitaz enzimi elde edilmiştir. Elde edilen fitaz enzimi gıda sanayide, kağıt endüstrisinde, myo-inositol fosfatların hazırlanmasında ve özellikle yem sanayide kullanılabilir. Sonuçlar, enzimin endüstriye uygulanmasına yönelik çeşitli araştırmaların yapılmasına olanak sağlamıştır.

Çalışma, SNT5 *ADH3* promotorunun doğal promotora göre daha yüksek miktarda protein üretme yeteneğine sahip olduğunu elde edilen verilerle sunmuştur. *P. pastoris* ile rekombinant protein üretiminde *ADH3* promotorunun başarılı bir promotor olduğunu göstermiştir. Bu araştırmada, farklı birçok enzim ile yapılacak çalışmalar için örnek niteliğinde olacak, daha üstün özelliklere sahip promotorlar geliştirmeye yönelik ileride yapılacak çalışmalara da ışık tutacak sonuçlar elde edilmiştir.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışma *E. coli* fitaz geninin rekombinant klonlama teknikleri kullanılarak sentetik SNT5 ve doğal alkol dehidrogenaz (*ADH3*) promotorları (900 bp) ile *P. pastoris* mayasında rekombinant fitaz üretiminin yapılması ve iki promotorun verimlerinin karşılaştırmasını kapsamaktadır.

Çalışmanın ilk amacı fitaz enzimini *ADH3* promotoru ile rekombinant olarak üretmek, ikincisi enzim üretimine, aktivitesine sentetik SNT5 ve doğal *ADH3* promotorların etkisini incelemektir. Enzimin rekombinant olarak üretilmesi amacıyla *E. coli* fitaz enzimini kodlayan genler sentetik SNT5 ve doğal *ADH3* promotorları ile *P. pastoris* mayasına klonlanmıştır. Klonlama sonucunda tek kopya klonları bulabilmek amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi kullanılmış ve tek kopya olarak seçilen klonlar erlenmayerde 96 saat boyunca etanol beslenerek üretilmiştir.

Süpernatantların SDS-PAGE analizi sonucu enzimin molekül ağırlığının yaklaşık olarak 55 kDa olduğu bulunmuş ve bant kalınlığı ekspresyon süresi boyunca artmıştır. Sentetik *ADH3* promotoru için enzim aktivitesi 12203 U/ml iken doğal *ADH3* promotoru için 7613 U/ml olarak hesaplanmıştır. Sentetik promotorun doğal'a göre 96. saat sonunda yaklaşık %60 daha fazla aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Toplam protein miktarları doğal *ADH3* promotoru ile üretilen fitaz için 315 mg/l iken sentetik *ADH3* promotoru ile üretilen fitaz için 373 mg/l olarak bulunmuştur.

Çalışmada enzimin karakterizasyonu yapılmış, enzimin optimum pH'sının 4.0 ve sıcaklığının 60°C olduğu saptanmıştır. Enzimin 2 saatte pH 2.5-6.0 arası %90'ın üzerinde stabilitesini koruması geniş pH aralığında oldukça stabil olduğunu göstermiştir. Fitaz 30 dakikada 60°C ve 75°C'de sırasıyla %87 ve %49 aktivitesini korumuştur. Enzimin 20-70°C'de 30 dakika boyunca aktivitesinin çoğunluğunu muhafaza etmesi fitazın iyi bir sıcaklık stabilitesinin olduğu sonucunu doğurmuştur. Fitaz aktivitesi  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonları varlığında artarken  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonları varlığında inhibe olmuştur.

Bu çalışma sonunda *ADH3* promotoru altında rekombinant olarak yüksek miktarda fitaz enzimi üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sisteminin uygun olduğu belirlenmiştir. Sentetik *ADH3* promotorunun doğal'a göre daha yüksek spesifik verimlilik ile protein üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlar, *ADH3* promotorunun *P. pastoris* ile rekombinant protein üretimlerinde başka enzimlerde de kullanılabilecek başarılı bir promotor olduğunu göstermiştir. Çalışmada kullanılan yöntem, farklı promotor çalışmaları için örnek niteliğinde olmuştur.

## 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.
- Al Asheh, S. and Duvnjak, Z. 1994. Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnol*, 14: 223-233.
- Aly, M.M., Tork, S., Al-Garni, S.M. and Kabli, S.A. 2015. Production and Characterization of Phytase from *Streptomyces luteogriseus* R10 Isolated from Decaying Wood Samples. *International Journal of Agriculture & Biology*, 17: 515–522.
- Angelis, M.D., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Giovine, M. and Gobetti, M. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 259–270.
- Billington, D.C. 1993. The inositol phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bin, Y., Chunyi, Z., Jianhua, W. and Yunliu, F. 1998. Recombinant *Pichia pastoris* overexpressing bioactive phytase. *Science in China*, 41(3): 331-336.
- Bitar IC, Reinhold J.G. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Biochim. Biophys. Acta* 268, 442-452.
- Casey, A. and Walsh, G. 2004. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, 110: 313-322.
- Chen, CC., Wu, PH., Huang, CT. and Cheng, KJ. 2004. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 315–320.
- Chen, R., Zhang, C., Yao, B., Xue, G., Yang, W., Zhou, X., Zhang, J., Sun, C., Chen, P. and Fan, Y. 2013. Corn seeds as bioreactors for the production of phytase in the feed industry. *Journal of Biotechnology*, 165: 120-126.
- Corrêa, T.L.R., De Queiroz, M.V. and De Araújo, E.F. 2015. Cloning, recombinant expression and characterization of a new phytase from *Penicillium chrysogenum*. *Microbiological Research*, 170: 205-212.
- Cregg, J.M. 2007. *Pichia* Protocols Methods in Molecular Biology Series, (389): 1-10.
- Cregg, JM., Barringer, KJ., Hessler, AY. and Madden, KR. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol*, 5: 3376–3385.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- Deluccaa, J., Dischinger, C. and Ullah, A.H.J. 1992. Identification of a phytase from *Citrobacter freundii*. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol*, 92: 385.
- Dionisio, G., Jørgensen, M., Welinder, K.G. and Brinch-Pedersen, H. 2012. Glycosylations and truncations of functional cereal phytases expressed and

- secreted by *Pichia pastoris* documented by mass spectrometry. *Protein Expression and Purification*, 82: 179-185.
- Dvorakova, J. 1998. Phytase: Sources, Preparation and Exploitation. *Folia Microbiology*, 43(4): 323-338.
- Ekren, G.S. 2013. Fitaz üreten fungusun enzimin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 175 s.
- Frolich W. 1990. Chelating properties of dietary fiber and phytate. The role for mineral availability. *Adv.Exp.Med.Biol.* 270, 83-93.
- Greaves, M.P., Anderson G. and Webley, D.M. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim.Biophys. Acta*, 132: 412-418.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U. and Jany, K.D. 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 341(2): 201-206.
- Greiner, R., Konietzny, U. and Jany, K.D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys*, 303: 107-113.
- Guo, M., Hang, H., Zhu, T., Zhuang, Y., Chu, J. and Zhang, S. 2008. Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 340-345.
- Han, Y.M., Wilson, D.B. and Lei, X.G. 1999. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5): 1915-1918.
- Hang, H., Ye, X., Guo, M., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, M. and Zhang, S. 2009. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 185-188.
- Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., Griengl, H., Kohlwein, SD. and Schwab, H. 1997. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein expression and Purification*, 11: 61-71.
- Huang, H., Luo, H., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Yuan, T., Bai, Y. and Yao, B. 2006. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350: 884-889.
- Igbal, T. H., Lewis, K.O. and Cooper, B.T. 1994. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut* 35, 1233-1236.
- Inan, M. and Meagher, MM. 2001. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 92: 585-589.
- Johnson, S.C., Yang, M. and Murthy, P.N. 2010. Heterologous expression and functional characterization of a plant alkaline phytase in *Pichia pastoris*. *Protein expression and Purification*, 74:196-203.
- Karaoglan, F.E. 2016a. *Pichia pastoris* Alkol Dehidrogenaz (ADH3) promotörü üzerine çalışmalar. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 64 s.



- Karaoglan, M. 2016b. *Pichia pastoris* etanol metabolizması üzerine çalışmalar. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 109 s.
- Karaoglan, M., Karaoglan, F.E. and Inan, M. 2016. Comparison of ADH3 promoter with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 121: 112-117.
- Kaur, P., Singh, B., Böer, E., Straube, N., Piontek, M., Satyanarayana, T. and Kunze, G. 2010. PphyA cell-bound phytase from the yeast *Pichia anomala*: Molecular cloning of the gene PPHY and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biotechnology*, 149: 8-15.
- Kerovu, J. 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. *Academic Dissertation*, Helsinki, 68 s.
- Kim, T.W. and Lei, X.G. 2005. An improved method for a rapid determination of phytase activity in animal feed. *Journal of animal science*, 83: 1062-1067.
- Lan, J.C.W., Chang, C.K. and Wu, H.S. 2014. Efficient production of mutant phytase (phyA-7) derived from *Selenomonas ruminantium* using recombinant *Escherichia coli* in pilot scale. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(3): 305-310.
- Liu, B.L., Rafiq, A, Tzeng Y., and Rob, A. 1998. Induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 415-424.
- Luo, H., Huang, H., Yang, P., Wang, Y., Yuan, T., Wu, N., Yao, B. and Fan, Y. 2007. A Novel Phytase appA from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: Gene Cloning and Overexpression in *Pichia pastoris*. *Curr Microbiol.*, 55: 185–192.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L. and McNeil, B. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22: 249-270.
- Makolomakwa, M., Puri, A.K., Permaul, K. and Singh, S. 2017. Thermo-acid-stable phytase-mediated enhancement of bioethanol production using *Colocasia esculenta*. *Bioresource Technology*, 235: 396-404.
- Maldonado, R.F., Maller, A., Bonneil, E., Thibault, P., Botelho-Machado, C., Ward, R.J., De Moraes Polizeli, M.L.T. 2014. Biochemical properties of glycosylation and characterization of a histidine acid phosphatase (phytase) expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 99: 43-49.
- Maurya, A.K., Parashar, D. and Satyanarayana, T. 2017. Bioprocess for the production of recombinant HAP phytase of the thermophilic mold *Sporotrichum thermophile* and its structural and biochemical characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94: 36-44.
- Mullaney, E.J., Daly, C., Ullah, A.B., 2000. Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.* 47: 157–199.
- Nuhriawangsa, A.M.P., Bachruddin., Z., Sajidan. and Wibowo, A. 2009. Production and characterization of crude intracellular phytase from recombinant bacteria *pEAS1AMP*. *J.Indonesian Trop.Anim.Agric*, 34(4): 265-271.

- 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*, pp. 97-112.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. and Soccol, V.T. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*, 77: 203-214.
- Parashar, D. and Satyanarayana, T. 2016. Enhancing the production of recombinant acidic  $\alpha$ -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.
- Pasamontes L., Haiker, M., Wyss M., Tessier and Van Loon A.P. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of a heatstable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1696-1700.
- Patwardhan V.N. 1937. The occurrence of a phytin splitting enzyme in the intestines of albino rats. *Biochem. J.* 31: 560-564.
- Promdonkoy, P., Tang, K., Sornlake, W., Harnpicharnchai, P., Kobayashi, R.S., Ruanglek, V., Upathanpreecha, T., Vesaratchavest, M., Eurwilaichitr, L. and Tanapongpipat, S. 2009. Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Letter*, 290: 18–24.
- Rodriguez, E., Mullaney, E.J. and Lei, X.G. 2000. Expression of the *Aspergillus fumigatus* Phytase Gene in *Pichia pastoris* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268: 373–378.
- Roy, M.P., Mazumdar, D., Dutta, S., Saha, S.P. and Ghosh, S. 2016. Cloning and Expression of Phytase appA Gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and Comparison of Properties with Recombinant Enzyme Expressed in *E. coli*. *Plos one*, 11(1): e0145745.
- Sambrook, J. and Russel, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
- Sanni, D.M., Lawal, O.T. and Enujiugha, V.N. 2019. Purification and characterization of phytase from *Aspergillus fumigatus* Isolated from African Giant Snail (*Achatina fulica*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17: 225-232.
- Scott, J.J. 1991. Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. *Plant Physiol*, 95: 1298-1301.
- Segueilha L., Lambrechts, C., Boze H., Moulin G. and Galzy, P. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castelii*. *J. Ferment. Bioeng*, 74: 7-11.
- She, Y., Liu, Y., González-Vega, J.G. and Stein, H.H. 2017. Effects of graded levels of an *Escherichia coli* phytase on growth performance, apparent total tract digestibility of phosphorus, and on bone parameters of weanling pigs fed phosphorus-deficient corn-soybean meal based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 232: 102-109.

- Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T.W. and Cregg, J.M. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*, *Gene*, 216: 93-102.
- Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 56: 1266-1269.
- Shimizu, M. 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci. Biotech. Biochem*, 57: 1364-1365.
- Stahl, C.H., Wilson, D.B. and Lei, X.G. 2003. Comparison of extracellular *Escherichia coli* AppA phytases expressed in *Streptomyces lividans* and *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 25: 827-831.
- Sutardı M. and Buckle, K.A. 1988. Characterization of extra- and intracellular phytase from *Rhizopus oligosporus* used in tempeh production. *Int. J. Food Microbiol*, 6: 67-69.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M. and Parekh, L.J. 1994. 2 distinct molecular-forms of phytase from *Klebsiella-aerogenes* evidence for unusually small active enzyme peptide. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77 (1): 23-27.
- Tai, H.M., Yin, L.J., Chan, W.C. and Jiang, S.T. 2013. Overexpression of *Escherichia coli* Phytase in *Pichia pastoris* and Its Biochemical Properties. *Agricultural and Food Chemistry*, 61: 6007-6015.
- Tang, Z., Jin, W., Sun, R., Liao, Y., Zhen, T., Chen, H., Wu, Q., Gou, L. and Li, C. 2018. Improved thermostability and enzyme activity of a recombinant phyA mutant phytase from *Aspergillus niger* N25 by directed evolution and sitedirected mutagenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 108: 74-81.
- Ullah A.H.J. and Gibson D.M. 1987. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem*, 17: 63-91.
- Uslu, F.M., Kızılkaya, E.G., Yigittekin, E.S., Gencoglu, M., Toroglu, S. and Dincer, S. 2016. Phytase Characterization and Production from *Lactobacillus plantarum* Strain on Corn Steep Liquor. *Journal of Applied Biological Sciences*, 10(2): 64-66.
- Vogl, T. and Glieder, A. 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnol.*, 30(4): 386-404.
- Wan-qin, T., Yee, P.C., Chin, S.C., Chin, Y.B., Ling, C.M.W.V., Abdullah, N. Radu, S. and Wan, H.Y. 2015. Cloning of a novel phytase from an anaerobic rumen bacterium, *Mitsuokella jalaludinii*, and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(9): 1816-1826.
- Watanabe, T., Ikeda, H., Masaki, K., Fujii, T. and Lefuji, H. 2009. Cloning and characterization of a novel phytase from wastewater treatment yeast *Hansenula fabianii* J640 and expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(3): 225-230.
- Wodzinski, R.J., Ullah, A.H.J., 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-303.

- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. and Loon, A.P.G.M. 1999. Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): *Catalytic Properties. Applied and Environmental Microbiology*, 65: 367-373.
- Xiong, A.S., Yao, Q.H., Peng, R.H., Han, P.L., Cheng, Z.M. and Li, Y. 2005. High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 418-428.
- Xiong, A.S., Yao, Q.H., Peng, R.H., Zhang, Z., Xu, F., Liu, J.G., Han, P.L. and Chen, J.M. 2006. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72: 1039-1047.
- Yamada, K., Minoda, Y. and Yamamoto, Y. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus* production, purification and some general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem*, 32: 1275-1282.
- Yang, M., Johnson, S.C. and Murthy, P.P.N. 2012. Enhancement of alkaline phytase production in *Pichia pastoris*: Influence of gene dosage, sequence optimization and expression temperature. *Protein expression and Purification*, 84: 247-254.
- Yao, B., Zhang, C.Y., Wang, J.H., Fan, Y.L., 1998. Recombinant *Pichia pastoris* overexpressing bioactive phytase. *Science in China Series C, Life Sciences* 41, 330-336.
- 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*, 49S: 119-127.
- Zhang W. and Inan, M. Meagher M.M., 2000. Fermentation Strategies for recombinant proein expression in the methyophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 5: 275-287. Zhang, J., Liu, Y., Gao, S., Zhu, L., Li, W., Tian, X. and Liu, Y. 2016. Site-directed mutagenesis and thermal stability analysis of phytase from *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 9(3): 357-365.

## 8. EKLER

### EK-1. Sentetik Promotor ADH3-SNT5'in DNA Dizisi

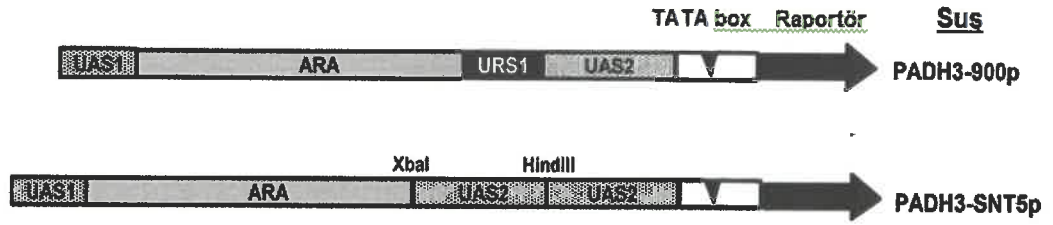
atgcccgagg agacttgcccc ctaatttcgcg gcgctgctccc  
 gatcgcagggt gagactgtaga gacccacata gtgacaatgat  
 tatgtaagaag aggggggtgat tcggccggcta tcgaactctaa  
 caactaggggg gtgaacaatgc ccagcagtcct cccactcttt  
 gacaaatcagt atcaccgatta acaccccaat cttattctcaa  
 cggtcocctcat ccttgacccc tctttggacaa atggcagttag  
 cattggtgcac tgactgactgc ccaaccttaa cccaaattct  
 tagaaggggcc catctagttag cgaggggtgaa aaattcctcca  
 tcggagatgta ttgaccgtaag ttgctgcttaa aaaaaatcagt  
 tcagatagcga gacttttttga tttcgcaacgg gactgcctggt  
 ccattcgattg caattctcacc cttctgcccc gtctgccaat  
 tgcccatgaat ctgctaatttc gttgattcca ccccccttcc  
 aactccacaaa tctagatagtt ttcaacatttt gtgctcccc  
gctgtttgaaa acgggggtgag cgctctccggg gtgcgaattcg  
tgcccaattcc tttcacctgc ctattgtagac gtcaaccgca  
tctgggtgcgaa tatagcgcacc cccaatgatca caccaacaatt  
ggtccaccct cccaaaagct ttagttttcaa cattttgtgct  
 cccccgctgt ttgaaaacggg ggtgagcgtc tccgggtgcg  
 aattcgtgcc aattccttca cctgcctatt gtagacgtcaa  
 cccgcatctgg tgcaatatag cgcaccccaa tgatcacacca  
 acaattgtcc accctccca atctctaata tcaaatcac  
 ctactataaa taccctgtcc tgcctccaaat tctttttct  
 tcttccatcag ctactagcttt tatcttattta ctttacgaaa

Doğal Promotor ADH3-900 ile farkı

**EK-2. Doğal Promotor ADH3-900'ün DNA Dizisi**

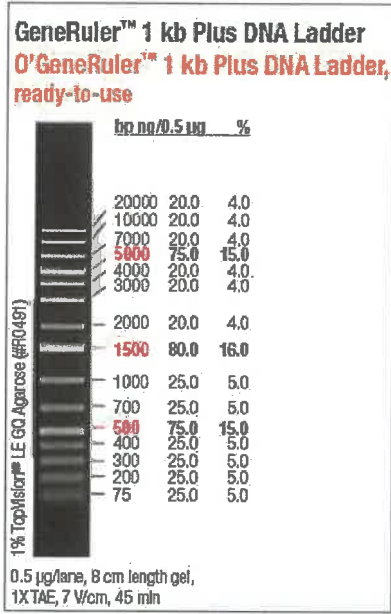
atgcccggagg agacttgcccc ctaatttcgcg gcgctgcccc  
 gatcgcagggt gagactgtaga gacccacata gtgacaatgat  
 tatgtaagaag aggggggtgat tcggccggcta tgaactotaa  
 caactaggggg gtgaacaatgc ccagcagtcct cccactcttt  
 gacaaatcagt atcaccgatta acaccccaaat cttattctcaa  
 cggcccccat ccttgaccccc tctttggacaa atggcagttag  
 cattggtgcac tgactgactgc ccaaccttaa cccaaatttct  
 tagaaggggcc catctagttag cgaggggtgaa aaattcctcca  
 tcggagatgta ttgaccgtaag ttgctgcttaa aaaaaatcagt  
 tcagatagcga gacttttttga ttogcaacgg gagtgctggt  
 ccattcgattg caattctcacc cttctgcccc gtcttgccaat  
 tgcccatgaat ctgctaatttc gttgattccca cccccctttcc  
 aactccacaaa ttgtccaatct cgttttccatt tgggagaatct  
gcatgtcgact acataaagcga ccggtgtccga aaagatctgtg  
tagttttcaa cattttgtgct cccccgctgt ttgaaaacggg  
 ggtgagcgctc tccgggtgcg aattcgtgcc aattcctttca  
 ccctgectatt gtagcgtcaa cccgcatctgg tgcgaatatag  
 cgcacccccaa tgatcacacca acaattgtcc acccctccca  
 atctctaatat tcacaattcac ctactataaa taccctgtcc  
 tgcctccaaat tcttttttct tcttccatcag ctactagctt  
 tatcttattta ctttacgaaa

Sentetik Promotor ADH3-SNT5 ile farkı

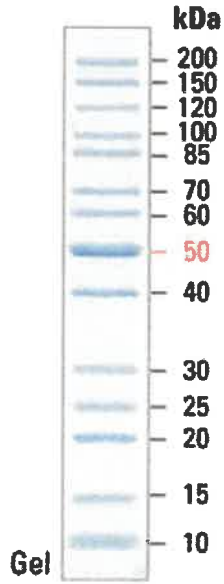
**EK-3. Sentetik ADH3-SNT5 ve Doğal ADH3-900 promotorlarının şematik gösterimi**

Promotorlar üzerinde nükleotit 0 ila 99 (-900 ila -801) UAS1, nükleotit 616 ila 792 (-284 ila -108) UAS2, nükleotit 539 ila 638 (-361 ila -262) URS1 olarak tanımlanan şematik gösterim

## EK-4. Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları



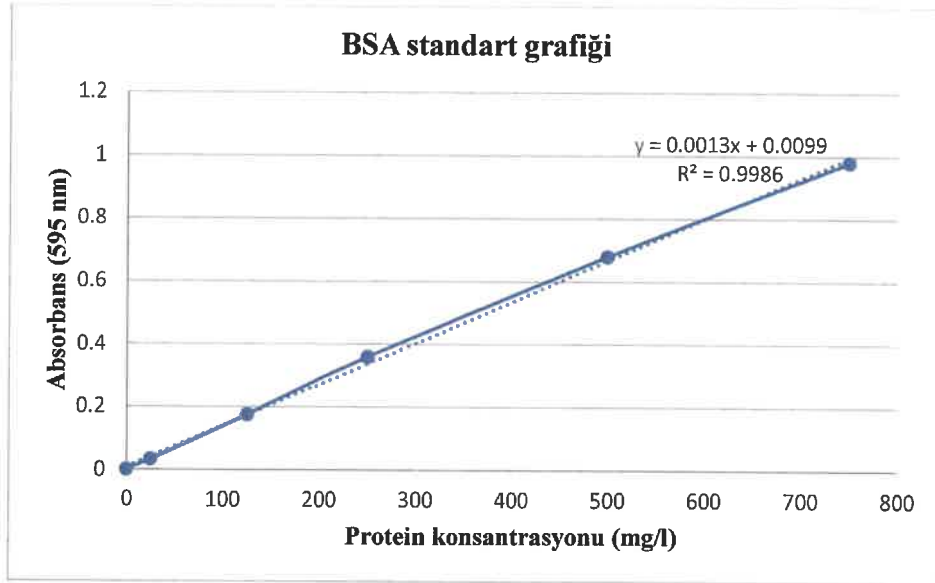
Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



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



## EK-5. Toplam protein tayini standart grafiği



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

## ÖZGEÇMİŞ

**MERVE HADİMİOĞLU**

**merve.hadimi@gmail.com**



### ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2016-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans (Çift Ana Dal) 2013-2016	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir
Lisans 2010-2015	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir

### MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2019-Devam Ediyor	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir
--	---