T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN (*Olea europaea* L.) LİPAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE ANALİZİ

Sümeyye Pınar ÖZTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Eş Danışman

Öğr. Gör. Dr. Munise YURTSEVER

Temmuz, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Zeytin (*Olea europaea* L.) Lipaz Enziminin Rekombinant Üretimi ve Analizi

Sümeyye Pınar Öztekin tarafından hazırlanan tez çalışması 20.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT	Öğr. Gör. Dr. Munise YURTSEVER
Yıldız Teknik Üniversitesi	Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman	Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL, Üye

Ahi Evran Üniversitesi _____

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Zeytin (*Olea europaea* L.) Lipaz Enziminin Rekombinant Üretimi Ve Analizi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sümeyye Pınar ÖZTEKİN

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FBA-2021-4169 numaralı projesi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2210-D Yurt İçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve deneyimleriyle destek olan saygıdeğer danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT'a, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana destek olan hem akademik hem de manevi her konuda yanımda olan değerli eş danışmanım Öğr. Gör. Dr. Munise YURTSEVER'e,

Her daim maddi manevi desteğini esirgemeyen, koşulsuz sevgi ve destekleriyle yanımda olan anne ve babama, hayatım boyunca bana örnek olan, her kararımda beni destekleyen, yardımını esirgemeyen canım ablam Elifcan ÖZTEKİN'e,

Lisansüstü eğitimimin en başından itibaren yanımda olan, neşesiyle, enerjisiyle her zaman günümü güzelleştiren, destek olmak için mesafelerin önemsiz olduğunu gösteren İrem METEOĞLU'na, ilk tanıştığımız andan beri sanki hep tanıyormuşum gibi hissettiğim, en umutsuz olduğum anlarda bile bana umut etmem gerektiğini hatırlatan, tüm bu süreç boyunca desteğini asla esirgemeyen Gülşah AKBAŞ'a, laboratuvardaki zorlu günlerimde enerjimi yükselten, birlikte vakit geçirmekten çokça keyif aldığım Fatma Şayan POYRAZ'a, geç vakitlere kadar deneye kaldığım günlerde destek olan, en yorgun olduğumuz anlarda bile gülmeyi başarabildiğimiz Emrah BERTAN'a, düşünceleriyle, konuşmalarıyla ilham veren Reyhan Dilsu ÇOLPAN'a, haftasonu ve haftaiçi, gece-gündüz, tatil demeden laboratuvarda çalıştığımız günlerde, en zorlu zamanlarda birlikteyken güçlü olduğumuz Senanur DOKUZ, Hande HANÇER, Semra TAŞDURMAZLI, İlkgül AKMAYAN, Şebnem GÖK, Kübra ATİK, İlknur YILMAZ'a, tüm bu süreçte desteklerini esirgemeyen, tanımaktan mutluluk duyduğum Elif ARSLAN, Şener ÇİNTESUN ve Furkan ÇALIŞ'a,

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen dostum Nuray AKGÜL'e, liseden bu yana her daim yanımda olan Ceren YAĞIZ, Furkan KILIÇ ve Rukiyye GÜNDÜZ'e, Çocukluğumun en güzel anlarını paylaştığım, mesafelere rağmen desteğini yanımda hissettiğim Ceren SERBEST'e teşekkür ederim.

S. Pınar ÖZTEKİN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xi
ÖZET xii
ABSTRACT xiv
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Lipazların Genel Özellikleri 4
2.2 Lipazların Yapısı ve Katalizledikleri Reaksiyonlar 6
2.3 Lipaz Kaynakları 9
2.3.1 Mikrobiyal Lipazlar 9
2.3.2 Marin Kaynaklı Lipazlar 10
2.3.3 Hayvansal Lipazlar 10
2.3.4 Bitkisel Lipazlar 10
2.4 Rekombinant Lipazlar 12
2.5 Lipazların Kullanım Alanları 12
2.5.1 Deterjan Endüstrisi 13
2.5.2 Gıda Endüstrisi 13
2.5.3 İlaç Endüstrisi 15
2.6 Pichia pastoris 15
3 MATERYAL VE YÖNTEM 22
3.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler 22
3.2 Kullanılan Besiyerleri 23
3.3 Kodon Optimize Lipaz Geninin PGAPZαA Vektörüne Aktarılması ve E.Coli'de Çoğaltılması 24

3.4 Rekombinant pGAPZαA Vektörün *Pichia pastoris* Genomuna Entegrasyonu.....25
3.4.1 *Pichia pastoris* X-33 Suşlarının Kompetent Hale Getirilmesi..... 25
3.4.2 Plazmitlerin Kompetent X-33 Hücrelerine Kimyasal Yolla Transformasyonu.....26
3.4.3 Pozitif Maya Kolonilerinin taranması.....26
3.5 Kodon Optimize Zeytin Lipaz Geninin *Pichia pastoris*'te Küçük Ölçekli Ekspresyonu.....27
3.6 SDS-PAGE Analizi.....27
3.7 Enzim Aktivite Analizi.....28
3.8 Protein Miktarlarının Belirlenmesi.....28
3.9 Seçilen Koloninin Küçük Ölçekli Ekspresyonu.....28
3.10 Protein Saflaştırma.....28
3.11 Enzim Aktivite Analizi.....29
3.12 Protein Miktarının Belirlenmesi.....29
3.13 SDS-PAGE Analizi.....29
3.14 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu.....29
3.14.1 Önkültür Basamağının Optimizasyonu.....30
3.14.2 Besi Yerinin Optimizasyonu.....30
3.14.3 Ortam Sıcaklığının Optimizasyonu.....31
3.14.4 Aktivite Tampon Çözeltinin Optimizasyonu.....31
4 SONUÇ VE ÖNERİLER 33
4.1 Kodon Optimize Lipaz Geninin PGAPZαA Vektörüne Aktarılması ve *E.coli'* de Çoğaltılması.....33
4.1.1 PCR Reaksiyonu.....33
4.1.2 PCR Ürününün Jelden Kesilerek Saflaştırılması.....33
4.2 PCR Ürününün PGAPZαA Vektörüne Aktarılması ve *E.coli*'de Çoğaltılması 34
4.3 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....35
4.4 Rekombinant pGAPZαA Vektörün *Pichia pastoris* Genomuna Entegrasyonu.....35
4.4.1 Plazmitlerin Kompetent X-33 Hücrelerine Kimyasal Yolla Transformasyonu..... 35
4.4.2 Pozitif Maya Kolonilerinin Belirlenmesi.....36
4.5 Tribütirin Petri Deneyi ile Koloni Aktivitelerinin Taranması.....36
4.6 Kodon Optimize Zeytin Lipaz Geninin *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu..... 37

4.7 Protein Miktarlarının Belirlenmesi.....39
4.8 Enzim Aktivite Analizi.....40
4.9 Seçilen Koloninin *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu.....41
4.10 Protein Saflaştırma.....41
4.11 Enzim Aktivite ve Protein Miktar Analizleri.....43
4.12 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu.....43
4.12.1 Önkültür Basamağının Optimizasyonu.....43
4.12.2 Besi yerinin Optimizasyonu.....45
4.12.3 Ortam Sıcaklığının Optimizasyonu.....49
4.12.4 Tampon Çözeltinin Optimizasyonu.....52
4.13 Tartışma ve Öneriler.....53
KAYNAKÇA 56
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 67

SİMGE LİSTESİ

Bp	Baz çifti
Kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
ml	Mililitre
nM	Nanomolar
°C	Santigrat derece
UV	Ultraviyole
U	Ünite

KISALTMA LİSTESİ

cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
LB	Luria Broth
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Devir/ dakika
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-Poli akrilamid jel

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Lipazların katalizledikleri reaksiyonlar……..4

Şekil 2.2 Lipaz Enziminin 3-boyutlu yapısı……7

Şekil 2.3 Kanonik α/β hidrolaz katlanma modeli……..8

Şekil 4.1 Kodon optimize lipaz geni PCR ürünü agaroz jel görüntüsü……33

Şekil 4.2 Ligasyon PCR ürünü agaroz jel görüntüsü……..34

Şekil 4.3 Koloni PCR Agaroz Jel Görüntüsü……35

Şekil 4.4 Koloni PCR Agaroz Jel Görüntüsü……36

Şekil 4.6 Tribütirin petri deneyi……37

Şekil 4.7 X-33 ve pozitif kolonilerin ekstraselüler sıvılarındaki proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüleri……..39

Şekil 4.8 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi……41

Şekil 4.9 Kontrol X-33 ve Rekombinant α12'ye ait saflaştırma sonrası proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüleri……..42

Şekil 4.10 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi……..44

Şekil 4.11 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi……..47

Şekil 4.12 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi……..48

Şekil 4.13 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi……..50

Şekil 4.14 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi……..51

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....22
Tablo 3.2 Kullanılan Besiyerleri.....24
Tablo 4.1 Protein miktarları.....39
Tablo 4.2 Spesifik enzim aktiviteleri.....40
Tablo 4.3 Spesifik enzim aktiviteleri.....43
Tablo 4.4 Spesifik enzim aktiviteleri.....44
Tablo 4.5 Protein miktarları.....45
Tablo 4.6 Protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri.....45
Tablo 4.7 Protein miktarları.....46
Tablo 4.8 Spesifik enzim aktiviteleri.....46
Tablo 4.9 Protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri.....47
Tablo 4.10 Protein miktarları.....48
Tablo 4.11 Protein miktarları.....49
Tablo 4.12 Protein miktarları.....51
Tablo 4.13 Protein miktarları.....52
Tablo 4.14 Spesifik enzim aktiviteleri.....53

ÖZET

Zeytin (*Olea europaea* L.) Lipaz Enziminin Rekombinant Üretimi ve Analizi

Sümeyye Pınar ÖZTEKİN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Eş-Danışman: Öğr. Gör. Dr. Munise YURTSEVER

Lipazlar, triaçilgliserollerin, yağ asitleri ve gliserole hidrolize edilmesini katalizleyen hidrolazlardır. Aynı zamanda esterifikasyon, ara esterifikasyon, aminoliz, transesterifikasyon, asidoliz ve alkoliz gibi çok çeşitli reaksiyonlarda da görev alan enzimlerdir. Organik bir ortamda lipazlar esterifikasyon, transesterifikasyon ve interesterifikasyon reaksiyonlarını, su miktarının az olduğu ortamlarda ise sentetik reaksiyonları katalize edebilme özelliğine sahiptir.

Lipazların katalize ettikleri reaksiyonların çeşitliliğine bağlı olarak sayısız endüstriyel ve biyoteknolojik kullanımı mevcuttur. Lipazlar bölge seçicilik ve enantioselektivite özellikleri sayesinde lipit biyoteknolojisinde çok yönlü katalizörler olarak kabul edilirler. Çok yönlü enzimler olmaları sebebiyle kozmetik, gıda, biyodizel üretimi, tarım gibi pek çok endüstriyel üretim alanında tercih edilirler.

Lipazlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilir. En çok tercih edilen kaynaklar hayvansal ve mikrobiyal kökenli olsa da, düşük maliyet,

kolay kabul edilebilirlik ve kısmi saflaştırma ile biyokatalizör olarak doğrudan uygulamalarda kullanılabilirlik gibi avantajlarıyla bitkisel kaynaklara olan ilgi artmaktadır.

Pichia pastoris, hem araştırmada hem de endüstride çok sık kullanılan metilotrofik bir konakçı hücredir. *Pichia pastoris* hücreleri, kolay, düşük maliyetli bir besi yeri ortamında hızlı şekilde büyüyebilme, protein üretim şartlarının kolayca kontrol edilebilmesi ve genetik olarak kolay manipüle edilebilmesi gibi özelliklerinden ötürü heterolog protein üretiminde oldukça avantajlıdır. Bu projede laboratuvarımızda daha önceki bir çalışmada tam uzunlukta cDNA'sı elde edilen zeytin yaprak lipazının kodon optimizasyonu yapılarak *Pichia pastoris'te* heterolog ekspresyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla lipaz nükleotid dizisi çevrimiçi kodon optimizasyon aracı ile *Pichia* kodon kullanımına göre değiştirilip zeytin yaprak lipazının kendine ait sinyal dizisi de eklenerek ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. Ekspresyon şartları optimize edilerek denenen çalışmalarda, rekombinant zeytin yaprak lipazının pH 8-9 aralığında ve 35^0C'de aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek aktivitenin görüldüğü kültür şartları ise 6 saatlik önkültür basamağı ile 96 saat, 28^0C'dir.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, rekombinant protein üretimi, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

Recombinant Production and Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Lipase Enzyme

Sümeyye Pınar ÖZTEKİN

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Co-supervisor: Dr. Munise YURTSEVER

Lipases are hydrolases that catalyze the hydrolysis of triacylglycerols to fatty acids and glycerol. In an organic medium, lipases catalyze esterification, transesterification, and interesterification reactions. It also can catalyze synthetic reactions in less aqueous environments. The different reactions they catalyze include hydrolysis, esterification, intermediate esterification, aminolysis, transesterification, acidolysis, and alcoholysis. Lipases have numerous industrial and biotechnological applications based on the variety of reactions they catalyze. Lipases are considered versatile catalysts in lipid biotechnology due to their regioselectivity and enantioselectivity. Thanks to these properties, they are used in many industrial production areas such as cosmetics, food, biodiesel production, and agriculture. Lipases are mostly derived from plant, animal, and microbial sources. Generally, the most preferred sources are animal and microbial sources. There is an increasing interest in plant sources with advantages such as low cost, easy acceptability, and direct application as biocatalysts by partial purification.

Pichia pastoris is a methylotrophic host cell that is widely used in both academia and industry. *Pichia pastoris* cells are highly advantageous in the production of heterologous proteins due to their ability to grow rapidly in an easy, low-cost medium, to easily control protein production conditions, and to be easily manipulated genetically. In this study, we aimed to heterologously express the codon-optimized olive leaf lipase, whose full-length cDNA was obtained in a previous study in our laboratory, in *Pichia pastoris*. For this purpose, the lipase nucleotide sequence was changed according to the *Pichia* codon usage with the online codon optimization tool, and the native signal sequence of the olive leaf lipase was added and transferred to the expression vector. In the expression optimization studies, it was determined that the recombinant olive leaf lipase was active in the pH range of 8-9 and at 35^0C. The highest enzyme activity was observed in 96-hour-culture following a 6-hour preculture step at 28^0C.

Keywords: Lipase, recombinant protein production, *Pichia pastoris*

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Lipazlar, trigliseridi, yağ asitleri ve gliserole parçalayan enzimlerdir. İlk olarak 1846 yılında Claude Bernard tarafından pankreatik sıvıda keşfedilen lipazlar, mide hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır [1]. Kaynak bulma zorluğu ve kaynaktan enzimi elde etme işlemlerinin zahmetli olmasından dolayı hayvansal lipazlar yerine farklı lipaz kaynaklarına ilgi arttı. İlk olarak, 1901 yılının başlarında mikrobiyolog Eijkman, günümüzde *Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa ve Pseudomonas fluorescens* olarak bilinen bakterilerden izole etmiştir [2].

Lipazlar genel olarak seçiciliklerine, kaynaklarına ve fizyolojik özelliklerine göre üç gruba ayrılabilirler[3]. Seçiciliklerine göre ayrılan lipazlar, enantiyoseçicilik, bölgesel seçicilik ve substrat seçicilik olarak üç ayrı gruba ayrılır. Substrat seçici özelliğe sahip lipazlar, spesifik bir substrat üzerinde reaksiyon verebilmeleri sayesinde özellikle biyodizel üretiminde, bölgesel seçici lipazlar ilaç endüstrisinde yalnızca belirli konfigürasyonlarda fonksiyon gösterebilen izomerik bileşiklerin üretiminde tercih edilirler [4] [3].

Kaynaklarına göre bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal lipazlar olmak üzere üçe ayrılır. Akademik ve endüstriyel çalışmalarda mikrobiyal lipazlar daha sık tercih edilseler de bitkisel lipazlara olan ilgi gün geçtikçe daha da artmaktadır. Lipazlar, kök, yaprak, tohum, lateks gibi bitkilerin farklı bölümlerinden elde edilmektedir. Kolay saflaştırma, düşük maliyet gibi özellikler bakımından oldukça ilgi çekici olmaları aynı zamanda benzersiz substrat spesifiklikleri özellikle endüstride tercih edilmeleri için önemli sebeplerdir [5][6]

Fizyolojik özelliklerine göre lipazlar ise, aktif bölgelerinde bulundurdukları spesifik aminoasit rezidülerine göre yaygın olarak “G-X-S-X-G” ve “GDSL” olmak üzere ikiye ayrılır [2].

Pichia pastoris, karbon kaynağı olarak methanol kullanan, metilotrofik bir mayadır. Maliyeti düşük, hazırlanması basit ve hızlı bir besi yerinde kolayca büyütülebilmesi, genetik olarak kolay manipüle edilebilmesi, translasyon sonrasında yüksek ökaryotik hücrelere benzer modifikasyonlar yapabiliyor olması gibi özelliklerinden dolayı hem akademik hem de endüstriyel alanlarda çok sık tercih edilen bir konakçı organizmadır [7].

Pichia pastoris'te en sık kullanılan promotörler AOX1 ve GAP promotörleridir. AOX1 geni, methanol indüklemesi ile yüksek seviyelerde ifadelenme gösteren güçlü bir promotördür ve bu sebeple özellikle toksik proteinlerin ekspresyonunda tercih edilmektedir [8]. GAP promotörü ise herhangi bir indükleyiciye ihtiyaç duymayan konstitütif bir promotördür ve bu özelliği AOX'a göre daha hızlı ve daha az eforla ekspresyon sağlar [9].

Kodon optimizasyonu, rekombinant protein üretiminde verimi arttırmak için kullanılan bir yöntemdir. Farklı organizmalar, bir amino asidi kodlamak için farklı kodonlar kullanabilir [10]. Bu sebeple, rekombinant protein üretimi çalışmalarında ilgilenilen genin konakçı organizmanın kodon kullanımına göre optimize edilmesi gerekebilir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, zeytin lipazı dizisi Pichia kodon kullanımına uygun şekilde optimize edilerek yüksek miktarda eksprese edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrutusunda yapılan çalışmalar aşağıda verilmiştir:

1. Zeytin yaprak lipazına ait cDNA Genewiz Kodon Optimizasyon aracı ile optimize edilerek sentetik gen olarak temin edilmesi ve ekspresyon vektörüne aktarımı
2. Rekombinant vektörün *E. coli*' de çoğaltımı ve pozitif kolonilerin tespiti
3. Rekombinant plazmidin doğrusal hale getirilmesi ve integratif transformasyonla *Pichia pastoris*'e aktarımı
4. *Pichia pastoris*'te ekspresyon ve yüksek lipaz aktivitesi gösteren kolonilerin seçimi
5. Rekombinant Lipazın saflaştırılması

Tüm bu basamakların ardından, lipaz enziminin aktivite ve üretim koşullarının araştırılması hedeflenmiştir.

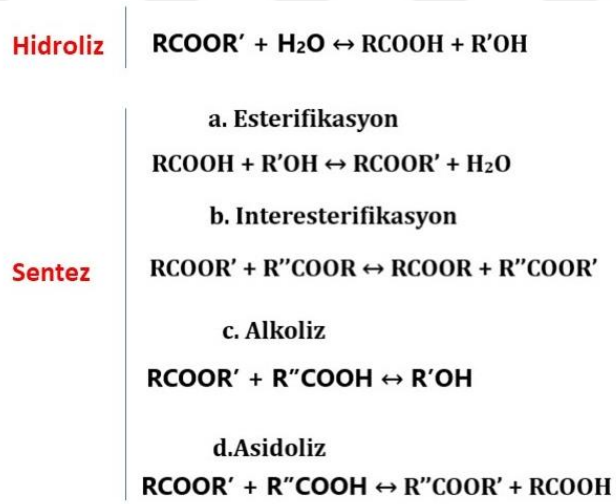
1.3 Hipotez

Lipazlar, endüstriyel alanda oldukça sık kullanılan önemli bir enzim grubudur. Lipazlara ait kaynaklar genellikle bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal kaynaklı olsa da bitkisel lipazlarla ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Laboratuvarımızda daha önceki bir çalışmada zeytin yaprak lipazını kodlayan cDNA (GenBank:MG663218.2) klonlanmış ve *Pichia pastoris'*te rekombinant ekspresyon denemeleri yapılmıştır. Ancak çalışma sonucunda yeterli ekspresyon sağlanamamıştır. *Pichia pastoris*'te kodon kullanım farklılıklarından dolayı ekspresyon gerçekleşmediği düşünülmüştür. Bu çalışmada, zeytin yaprak lipazına ait tam uzunlukta cDNA, *Pichia pastoris* kodon kullanımına uygun şekilde optimize edilerek eksprese edilip, enzimin rekombinant üretim koşulları ve aktivitesi araştırılacaktır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Lipazların Genel Özellikleri

Lipazlar, triaçilgliserolleri, yağ asitleri ve gliserole hidrolize edilmesini katalizleyen hidrolazlardır. Aynı zamanda esterifikasyon, ara esterifikasyon, aminoliz, transesterifikasyon, asidoliz ve alkoliz gibi çok çeşitli reaksiyonlarda da görev alan enzimlerdir. Organik bir ortamda lipazlar esterifikasyon, transesterifikasyon ve interesterifikasyon reaksiyonlarını, su miktarının az olduğu ortamlarda ise sentetik reaksiyonları katalize edebilme özelliğine sahiptir (Şekil 2.1) [11].



Şekil 2.1 Lipazların katalizledikleri reaksiyonlar

Lipazlar, katalize ettikleri reaksiyonlara dayanan birçok endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaya sahiptir. Sentetik reaksiyonlar yoluyla, lipazlar, bitkisel yağların ve basit alkollerin transesterifikasyonunu katalize ettikleri için biyodizel üretiminde kullanılabilir [12]. Gıda endüstrisinde, karboksilat esterleri, lipazların etkisiyle salınan lipofilik moleküller, aroma verici maddeler olarak kullanılmıştır [13]. Süt ürünlerinde hem lipazlar hem de esterazlar, istenen aromaları üretmek için yaygın olarak kullanılır [14]. Tat ve lezzet, lipazın etkisi sırasında salınan yağ asitleri zincirinin tipine bağlıdır. Kısa zincirli yağ asitleri (C4–C8) peynirsi bir tat

verirken, sabunsu tadı önlemek için uzun zincirli yağ asidi konsantrasyonu düşük olmalıdır [15].

Lipazlar, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen her yerde bulunan enzimlerdir. Her lipaz üreten türün, fizyolojik ve metabolik gereksinimlerine uyan, farklı aktivite, stabilite ve substrat seçiciliği seviyelerine sahip kendi lipaz seti vardır. Burada önemli olan, bir reaksiyonda katalizör olarak kullanılabilecek iyi potansiyele sahip varyantı, çok geniş olan doğal lipaz havuzu içerisinden belirlemektir. Başlangıç noktası olarak laboratuvarda veya metagenomik kitaplıklarında kültürlenebilen mikroorganizmalar kullanılarak yeni lipazların araştırılmasına yönelik ayrıntılı ve etkili tarama çalışmaları sürekli olarak devam etmektedir [16].

Kısa zincirli yağ asitlerinden (C6'dan daha kısa) oluşan "basit" esterleri ve trigliseritleri hidrolize eden esterazların aksine, lipazlar çoğunlukla suda çözünmeyen ve uzun zincirli yağ asitlerine sahip trigliseritler gibi substratlara karşı aktiftir[17]. Lipazların bu aktif bölgesi temel olarak serin, histidin ve aspartat üçlüsünden oluşan açil enzim komplekslerinden oluşur. Bu aktif bölge üzerinde bulunan esnek kapak domaini sayesinde katalitik bölgede konformasyonlar gerçekleşir ve bu da lipazlara spesifik kinetik özellikler kazandırır [18], [19]. Sarmal oligopeptit birimleri ile korunan bu yapı, çözünmeyen substratların varlığında, katalitik bölgeye açık bir konformasyon kazandıran ve lipaz aktivitesini artıran ara yüzey aktivasyonu adı verilen yapısal bir değişikliğe uğrar. Sulu ortamlarda ise, kapak kapalı bir yapıya bürünerek lipazı etkisiz hale getirir [20].

Lipazlar, çoğunlukla, çok çeşitli pH koşullarında hareket eder. Örneğin, bakteriyel lipolitik enzimler tipik olarak alkali pH koşullarında hareket etme eğilimindeyken, mantar lipazları asidik koşulları tercih eder [21]. Bununla birlikte, ortamda tuzların bulunması ve kullanılan emülgatör tipi gibi özel durumlar, ideal pH değerini daha asidik bir aralığa kaymasına neden olabilir.

Lipazlar bölge seçicilik ve enantioselektivite gibi özellikleri sayesinde lipit biyoteknolojisinde çok yönlü katalizörler olarak kabul edilirler. Bu özellikleri sayesinde farmasötiklerin ve emülgatörlerin üretimi, mühendislik termoplastiklerinin sentezi ve bozulması, tarım kimyasalları, kozmetik, aroma ve

kokuların üretimi, kısa zincirli trigliseritlerin transesterifikasyonu yoluyla biyodizel sentezi, alkoller, sıvı ve katı yağların hidrolizi yoluyla konsantre yağ asitlerinin üretimi dahil olmak üzere çok sayıda endüstriyel üretim alanlarında kullanılırlar [22].

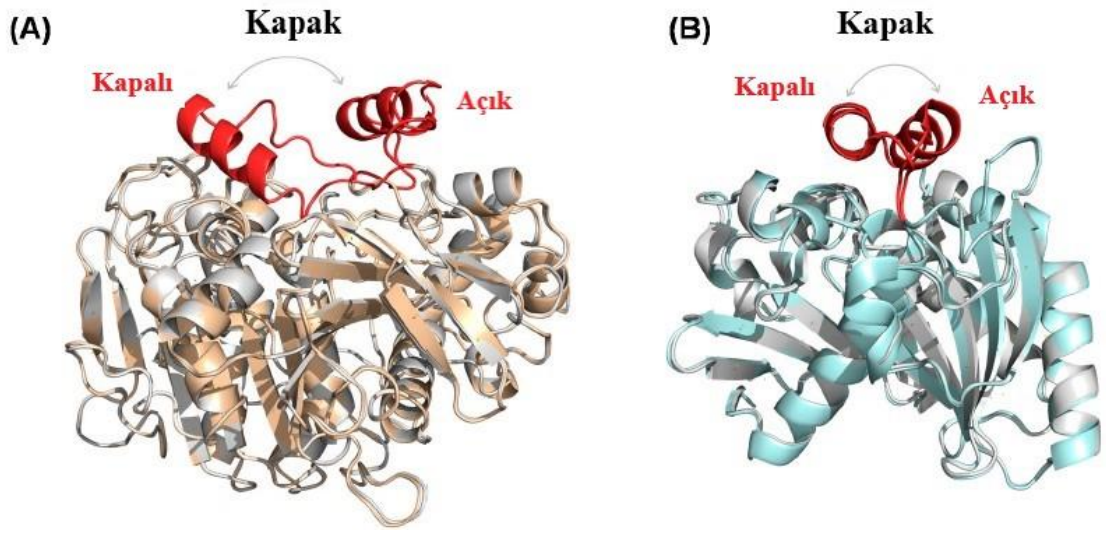
Lipazlar çoğunlukla bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilir. Genellikle en çok tercih edilen kaynaklar ise, hayvansal ve mikrobiyal kökenli olanlardır. Düşük maliyet, özel uygulamalar, kolay kabul edilebilirlik ve kısmi saflaştırma ile biyokatalizör olarak doğrudan uygulamalar gibi avantajlarıyla bitkisel kaynaklara olan ilgi artmaktadır. [23], [24].

2.2 Lipazların Yapısı ve Katalizledikleri Reaksiyonlar

1958 yılında Sarda ve Desnuelle, lipazları ara yüzey aktivasyonu olgusu çerçevesinde kinetik terimler kullanarak tanımladılar [18], [25]. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, ara yüzey aktivasyon özelliği, suda çözünür karboksilik ester moleküllerinin üzerinde etkili olan esteraz enzimleri için geçerli olmadığı ortaya çıkarıldı. Lipazların, çözünmeyen substratlar üzerinde aktivitesinin daha yüksek olduğu gösterildi. Böylece lipazlar, diğer esterazlardan farklı şekilde kategorize edildiler.[18], [26], [27].

Esterazlar, bir su molekülünün varlığında ester bağlarını hidrolize ederek bir asit veya bir alkol molekülünün açığa çıkmasını sağlar. 1972'de Whitaker, esterazları, substratın asit veya alkol kısmına olan özgüllüğüne göre sınıflandırdı. Karboksil esteraz, aril esterazlar, asetil esterazlar spesifik olmayan esterazlar iken lipaz, kolinesteraz gibi enzimler ise substrat spesifik esterazlardır [28]. Uzun zincirli yağ asitleri suda çözünmez veya daha az çözünürken, kısa zincirli yağ asitleri suda tamamen çözünür. Esterazlar, kısa zincirli yağ asitlerinde bulunan ester bağlarını koparır. Lipazlar ise daha uzun zincirli yağ asitlerinin katalizinde bile etkilidir. Lipazlar da kendi içerisinde subrat ve bölge özgüllüğüne göre üç sınıfa ayrılır. Birincisi, trigliseritlerdeki herhangi kesim bölgesine spesifiklik göstermeyen lipazlardır. İkincil tip lipazlar, trigliseritlerin 1,3 pozisyonlarından keserken, üçüncül grup içerisinde bulunanlar dokuzuncu karbonda bulunan cis karbon bağı için yüksek özgüllük gösterirler [29], [30].

1990 yılında *Rhizomucor miehei* lipazı ve insan pankreas lipazının üç boyutlu yapıları ortaya çıkarıldı [29], [31]. Bu çalışmalar sonucunda, lipazların aktif bölgelerini kaplayan, substratın ulaşamadığı halkasal bir kapak yapısına sahip olduğu gösterildi (Şekil 2.2). Bu kapak domaini amfipatik bir yapıya sahiptir. Kapalı konformasyonda iken, hidrofilik bölge subsrat ve çözücülere doğru yönlenir böylece aktif bölge çevredeki substrat ve çözücülerden korunur. Açık durumdayken ise, hidrofobik yüz açığa açığa çıkar ve substrat aktif bölge ile etkileşime girebilir[32], [33].

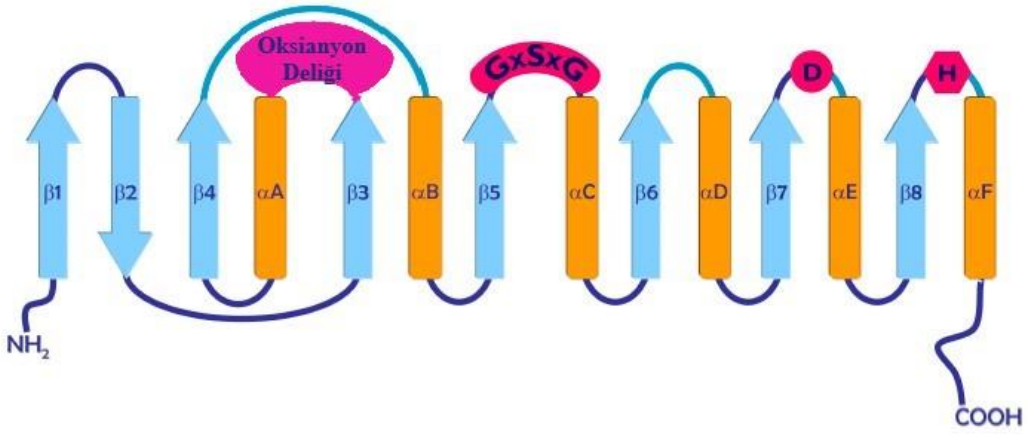


Şekil 2.2 Lipaz Enziminin 3-boyutlu yapısı. (A) Candida rugosa lipazına ait kapak domaininin açık ve kapalı konformasyonunun 3-boyutlu yapısı. (B) Rhizomucor miehei lipazına ait kapak domaininin açık ve kapalı konformasyonunun 3-boyutlu yapısı [34]

Boyut ve sekans farklılıkları olsa da lipazlar, yapısal olarak benzer bir katlanma modeline sahiptirler ve bu yapıya α/β hidrolaz katlanması denir[35]. Bu katlanma şekli, esterazlar, proteazlar gibi diğer hidrolaz grubu enzimlerinde de görülmektedir [36]. α/β hidrolaz kıvrımı, sekiz paralel β iplikçiği bulundurur. Bunlardan β2 ipliği antiparalel bir duruş gösterirken, β3 ve β8 iplikçikleri, merkezde bulunan β yaprağına, yine merkezde bulunan β yaprağının iki tarafında bulunan α sarmallar sayesinde bağlanır [37](Şekil 2.3). Bu α/β hidrolazların aktif bölgesinde, yüksek oranda korunmuş ve serin, sistein gibi nükleofilik bir rezidü, aspartik asit, glutamik asit gibi bir asidik rezidü ve bir histidinden oluşan katalitik bir üçlü bulunur. Bu aminoasit sırası çoğu enzimde bu şekilde iken, lipazlar

nükleofilik olan serinin “nükleofilik dirsek” olarak adlandırılan bir yapıyı oluşturan ve “G-X-S-X-G” şeklinde tanımlanan bir motife sahiptir. Lipazlarda rastlanan diğer bir motif ise G-D-S-L motifidir ve G-X-S-X-G motifinden farklı olarak nükleofilik dirsek yapısını bulundurmaz [38].

Ester bağı hidrolizi sonucunda tetrahedral negatif yüklü ara ürün oluşur. Lipazlarda, bu ara ürünü, enzimin katalitik aktivitesini engellememesi için stabilize eden ve oksianyon deliği adı verilen bir cep bölge bulunur [39].



Şekil 2.3 Kanonik α/β hidrolaz katlanma modeli. Oksianyon deliği, GXSXG motifi, Histidin (H), Aspartat (D) rezidülerinin pozisyonları [35]

Lipazların katalizlediği reaksiyonlar hidroliz ve sentez olarak iki ana kategoriye ayrılabilir. Hidroliz sentezlerinde, trigliseridlerin ester bağlarını hidrolize ederek gliserol ve yağ asitlerine dönüştürülmesini sağlar. Sentez reaksiyonları ise, su miktarının düşük olduğu ortamlar gibi uygun termodinamik koşullar altında tranesterifikasyon ve esterifikasyon olarak iki farklı sentez reaksiyonunu katalizlerler. Esterifikasyon reaksiyonlarında bir yağ asidinin bir alkol molekülüyle kovalent bağlanması ve bir su molekülünün açığa çıkması ile gerçekleşir. Bu reaksiyon çift yönlüdür. Ortamdaki su miktarı yüksekse reaksiyon hidroliz reaksiyonuna dönüşür. Amin ve tiyol substratlarının varlığında tiyoesterifikasyon ve amidasyon reaksiyonları da lipazlar tarafından benzer şekilde katalize edilir. Transesterifikasyon reaksiyon grubu ise, alkoliz, asidoliz, aminoliz ve interesterifikasyon reaksiyonlarından oluşur.

2.3 Lipaz Kaynakları

Lipazları ilk olarak, 1901 yılının başlarında mikrobiyolog Eijkman, günümüzde *Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa ve Pseudomonas fluorescens* olarak bilinen bakterilerden izole etmiştir [2]. Günümüzde ise, bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar gibi pek çok kaynaktan lipazlar izole edilmektedir [40].

2.3.1 Mikrobiyal Lipazlar

Mikrobiyal lipazlar, mantar, maya ve bakterilerden elde edilir. Bu lipazlar, kolayca bulunabilmesi, çok çeşitli özgüllükleri ve karakteristik özelliklerinden dolayı diğer lipaz kaynaklarına nazaran daha sık tercih edilmektedirler. Özellikle fungal lipazlar, stabiliteleri, özgüllükleri ve üretim açısından daha kolay olması sebeplerinden ötürü biyoteknolojik uygulamalarda en sık tercih edilen kaynaklardır [41], [42]. Bakterilerde lipaz kaynağı olarak en sık kullanılan türler *Bacillus, Geobacillus, Pseudomonas, Streptomyces, Burkholderia, Chromobacterium, Achromobacter, Arthobacter* ve *Alcaligenes* türleridir [35], [43]. Özellikle Bacillus lipazları, geniş pH aralıklarında ve yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterdiği için çalışmalarda çok sık tercih edilir [43]. Kanmani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yağ ve gres yağı ile kontamine alanlardan izole edilen *Staphylococcus pastoris'*in, hindistan cevizi yağı üretiminde oluşan atıkların substrat olarak eklendiği bir besiyeri ortamında büyütüldüğünde yüksek aktiviteye sahip yüksek miktarda lipaz enzimi ürettiği gözlemlenmiştir [44].

Maya ve filamentli mantarlara ait lipazlar, substrat spesifikliği, termal stabilite gibi özellikleri sebebiyle endüstride daha çok tercih edilirler. *Candida, Geotrichum, Trichosporon, Yarrowia, Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Rhizomucor* ve *Thermomyces* en önemli mantar lipaz kaynaklarındandır[43]. *Candida antarctica*'dan lipaz B (CALB) (Novozym® 435 ve NS 88011), *Thermomyces lanuginosus*'tan elde edilen Lipozyme® TL IM (Novozymes, Kopenhag, Danimarka), A. Oryzae'den elde edilen Lipaz FE-01 (ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, Germany) ticari olarak kullanıma sunulmuş önemli mikrobiyal lipaz enzimleridir [3], [45].

2.3.2 Marin Kaynaklı Lipazlar

Deniz habitatı bu alanda en az çalışılan alanlardan biridir. Ancak deniz ve okyanuslar, en ekstrem fiziksel ve kimyasal koşullarda bile yaşamayı sürdürebilen hayvan ve mikroorganizmalar tarafından büyük bir çeşitliliğe sahiptir [46]. Son yıllarda okyanuslardaki hem mikrobiyal hem de hayvansal kaynaklı enzimlerin farklı pH, sıcaklık ve basınç gibi durumlarda kararlı olabilme özellikleri sayesinde endüstride dikkat çeken kaynaklar olmaya başlamıştır[46], [47].

Basheer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Hint kıyı şeridinde Arap Denizi'nden izole edilen ve *Aspergillus awamori* BTMFW032 olarak sınıflandırılan bir deniz mantarının, yağ ile kirlenmiş atık suların yağ ve yağ içeriğini %92'ye kadar azaltabilen hücre dışı bir lipaz ürettiği bulundu [48].

2.3.3 Hayvansal Lipazlar

Endüstride en sık kullanılan hayvansal lipazlar pregastrik ve pankreas lipazlarıdır. Pankreatik lipazdan elde edilen endüstriyel fosfolipaz A2 (PLA2) üretimi, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrileri için doğal bir emülgatör olan lizolesitin üretimi, hayvansal kaynaklı lipazların en sık kullanıldığı alanlardır [49]. Kismura'nın yaptığı çalışmada bir denizyıldızı türü olan *Asterina pectinifera*, Bacha ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise bir vatoz türü olan *Dasyatis parsnip'*in PLA2 için yeni potansiyel kaynaklar olduğunu gösterdi [50], [51].

Hayvan hücreleri, yağların ve lipidlerin sindirimini sağlamaya yardımcı lipazları üretirler. Bununla birlikte, hayvansal lipazlar, esas olarak lipazların ekstrakte edilmesinin yanı sıra kültürün manipüle edilmesi ve ürünün ayrılmasındaki zorluklar gibi sebeplerden dolayı ticari üretimden ziyada klinik tanıda daha sık kullanılır [3]. Çeşitli hayvan lipazları arasında, pankreatik lipaz, birincil alkol esterlerinin hidrolizini etkin bir şekilde katalize ettiği için biyokimyanın yanı sıra lipid kimyası alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır[52].

2.3.4 Bitkisel Lipazlar

Lipazlar bitkilerin, tohum, meyve, lateks, yaprak, çekirdek gibi pek çok kısmından elde edilebilir. Bitkisel yağlardan konsantre yağ asitlerinin üretiminde ve biyotransformasyon reaksiyonları uygulamaları hakkında daha fazla çalışmaya

ihtiyaç olmasına rağmen, bitki lipazlarının farklı kullanımları ile ilgili pek çok araştırma mevcuttur [53]. Bitkisel lipazlar, özellikle saflaştırma kolaylığı, düşük maliyeti ve çeşitliliği nedeniyle oldukça ilgi çekicidir. Aynı zamanda, bitki lipazlarının substrat özgüllüğü, tohum yağlarından elde edilen lipaz ekstraktlarının saflaştırma ve immobilizasyon işlemlerine gerek olmadan doğrudan uygulanması üretim maliyetlerini düşürdüğü için oleokimya endüstrisinde önemli bir avantaj sağlar [54]. De Sousa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bitkisel yağlar, biyodizel atıkları gibi farklı biyodizel üretim kaynaklarını hidrolize edebilen, kurkas bitkisinden (*Jatropha curcas L.*) elde edilen lipaz enzimi karakterize edilmiştir [55].

Özgüllük, düşük maliyet, saflaştırma kolaylığı gibi özelliklerinden dolayı tohum lipazları endüstride ilgi çekmeye başlamıştır [56], [57]. Lipazlar, hint yağı bitkisi *(Ricinus communis*), ayçiçeği (*Helianthus annuus*), mısır (*Zea mays*) ve çarkıfelek meyvesi (*Passiflora edulis*) gibi farklı tohum bitki kaynaklarından elde edilirler. Santos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hint bitkisi (*Ricinus communis*), ayçiçeği (*Helianthus annuus*), mısır (*Zea mays*) ve çarkıfelek meyvesi (*Passiflora edulis*) tohumlarından elde edilen lipazların konsantre yağ asidi üretimi için yağ hidroliz reaksiyon aktiviteleri değerlendirildi ve dormant evredeki hint bitkisi tohumunun yağların hidrolizinde en yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterildi [58].

Bitki lipazları elde edildikleri kaynağa göre farklı özellikler gösterebilir. Örneğin, palmiye meyvelerinden elde edilen lipazlar asidik pH ile karakterize iken, portakal atıklarından elde edilen lipazlar nötral pH ile karakterizedir[59], [60]. Başka bir çalışmada ise, buğday ve soya tohumlarından elde edilen lipazların bazik pH'da karakterize olduğu gösterilmiştir[61].

Papaya lipazı, kısa ve uzun trigliseritlerin interesterifikasyonu, hint fasulyesi ve kolza lipazları, bitkisel yağların hidrolizi, tahıl lipazları trigliseritlerin hidrolizi gibi reaksiyonların katalizinde kullanılmak üzere, biyodizel üretimi, gıda endüstrisi gibi alanlarda tercih edilebilirler [62]–[64].

2.4 Rekombinant Lipazlar

DNA manipülasyonunun gelişmesi ve yaygınlaşması ile rekombinant protein üretimine olan ilgi de artmıştır. Kaynak organizma veya mikroorganizmadan elde edilen bir proteinin yüksek konsantrasyonlarda daha düşük maliyetlerde üretilmesine olanak tanıyan rekombinant protein üretimi teknolojisi, özellikle endüstride en sık tercih edilen yöntem olmuştur. Teknik olarak heterolog protein ekspresyon sistemleri üç temel basamaktan oluşur. Bunlar; ilk olarak istenilen genin, seçilim markırı bulunan bir vektöre aktarılması, ikincisi konakçı hücreye yapılandırılmış plazmidin aktarılması ve son olarak güçlü bir promotörün kontrolü altında istenilen genin ifadelenmesi şeklinde sıralanabilir. Protein ekspresyonu için en sık kullanılan konakçı hücreler, prokaryotik bir sistem olan *E. coli* ve basit ökaryotik bir sistem olan *Pichia pastoris*'tir. Salwoom ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Antartika'da bulunan *Pseudomonas sp.* Suşundan elde edilen lipaz (LSK25), E.coli BL21 suşunda eksprese edildi. Elde edilen enzimin 5-30^{0}C gibi geniş bir sıcaklık aralığında ve 6-8 pH değeri aralığında sabit bir aktivite gösterdiği rapor edildi [65]. Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Rhizopus oryzae'* ye ait lipaz enziminin *Pichia pastoris*'te heterolog ekspresyonu yapıldı. Maksimum aktivitesinin 90 IU/mL, optimum çalışma sıcaklığının 35^{0}C, pH değerinin ise 7 olduğu belirlendi [66]. Robert ve arkadaşlarının çalışmasında, *Candida antartica*'ya ait Lipaz B enziminin konstitütif bir promotör olan PGK promotörünün kontrolünde *Pichia pastoris'*te ekspresyonu gerçekleştirildi. Karbon kaynağı olarak biyodizelden geri dönüştürülen gliserin kullanılarak yapılan ekspresyon çalşmalarında, optimum 30^{0}C ve 7 pH değerinde aktivite gösterdiği kaydedilmiştir [67].

2.5 Lipazların Kullanım Alanları

Lipazlar katı ve sıvı yağların işlenmesinde, gıdaların işlenmesinde, deterjan endüstrisinde, kozmetik ve ilaçların formülasyonlarında, kağıt imalatı gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.5.1 Deterjan Endüstrisi

Yağları hidrolize edebilme özellikleri sayesinde lipazlar, çamaşır deterjanları ve temizlik malzemelerinin üretiminde çok sık kullanılırlar. Deterjan üretiminde kullanılacak lipazlarda 3 özellik çok önemlidir. Bunlar, düşük subsrat özgüllüğü ile çeşitli bileşimlerdeki yağların hidrolize edilebilmesi, farklı yıkama şartlarında dayanıklı olabilmesi (yüksek veya düşük sıcaklık, pH), deterjan formülasyonu içerisinde bulunan diğer enzimler ve zararlı yüzey aktif maddelere karşı dayanabilmesidir[68]. 1998 yılında Gerritse ve arkadaşları, *Pseudomonas alcaligenes M-1* 'den üretilen ve modern makine yıkama koşullarına uygun bir alkalin lipaz olduğunu bildirmiştir [69]. *Acinetobacter radioresistens* lipazının aktif olduğu en uygun pH değerinin 10, stabil kaldığı pH değer aralığının ise 6-10 olduğu gösterildi [70]. Bu özelliğinden dolayı deterjan endüstrisinde kullanılma potansiyeli yüksek bir lipazdır.

1913 yılında Dr. Otto Röhm, hayvanlardan elde ettiği pankreatik enzimleri çamaşır temizliğinde kullanılabileceğini gösterdi ve patentini aldı. Burnus adı altında satılan bu deterjanın içeriğinde protein parçalayıcı tripsin, proteaz, amilaz ve lipaz enzimleri bulunur. 1998 yılında Novozymes *Mucor miehei, Thermomyces lanuginosus, Candida antarctica* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipaz enzimini ilk kez deterjan endüstrisinde piyasaya sürdü.

2.5.2 Gıda Endüstrisi

Bir trigliseridin besinsel değeri ve fiziksel özellikleri, bulundurduğu yağ asidinin gliserol omurgasındaki konumuna, zincir uzunluğuna ve doymamışlık oranına göre büyük ölçüde değişiklik gösterir. Lipazlar, yağ asidi zincirlerinde değişimler yaparak veya bir ya da birkaç yağ asidinin yerini değiştirerek lipidlerin yapısal özelliklerinde değişiklikler yapılmasını sağlarlar. Böylece daha ucuz ve değersiz bir yağ, daha değerli bir hale dönüştürülebilir[71], [72].

Yüksek değerli bir yağ olan kakao yağı, palmitik ve stearik asitler içerir ve yaklaşık 37^0C erime noktasına sahiptir. Lipaz bazlı teknolojiler, ticari olarak daha değersiz olan yağların, hidroliz ve sentez reaksiyonlarının karıştırılmasıyla kakao yağı yerine kullanılmasını sağlarlar. Buna benzer işlemlerden bir tanesinde, palmitik

asidi stearik asit ile değiştirilmesini sağlayan transesterifikasyon reaksiyonu için *Rhizomucor miehei* lipazı kullanılmıştır.

Bebek mamaları, anne sütü yerine alternatif bir besin türüdür. Anne sütünün temel içeriğinde bulunan palmitik asitin gliserol omurgası üzerindeki sn-2 konumu önemlidir. Sindirim sırasında pankreatik lipazlar, sn-1,3 pozisyonunda bulunan palmitik asidi hidrolize ederek serbest palmitik aistlere ve monoaçilgliserole dönüştürür. Serbest palmitik asitler ise kalsiyumlara bağlanarak bebeklerde kabızlığa sebep olur. Bu nedenle, anne sütü eşiti bebek mamaları üretilirken içeriğinde bulunan palmitik asitin pozisyonu çok önemlidir. Bu pozisyonda bulunan palmitik asit oranının arttırılması için lipaz enzim kullanılır. Bu amaçla spesifik lipaz işlemi gerçekleştiren ilk ticari ürün Betapol™ (Loders Croklaan)'dür [73], [74].

Kakao yağı, palmitik asit, stearik asit ve oleik asit içeren trigliseritlerden oluşur. Kakao yağı, parlaklık, çırpma, erime sıcaklığı ve beyazlaşma direnci gibi özelliklerinden dolayı şekerleme endüstrisinde çok kullanılan ve ticari olarak değeri yüksek bir yağdır. Ancak kakao yağının elde edilmesi güç olduğundan oldukça pahalı ve zor bulunur bir üründür [75]. Bu sebeple, illipe yağı, kokum yağı gibi daha kolay bulunan yağlar interesterifikasyon reaksiyonuyla, kakao yağı eşdeğeri olarak kullanılabilmektedir. Seçici bir lipaz ile, sn-1 ve sn-3 pozisyonlarına palmitik asit ve stearik asit eklenmesi ile bu gibi yağlar, kakao yağı yerine daha az maliyetle üretilerek kullanılabilirler [73]. Fuji Oil Co., 1993'ten beri bu şekilde kakao yağı eşdeğeri üretimi yapmaktadır.

Peynir olgunlaşması sütte bulunan doğal mikrofloranın gerçekleştirdiği proteoliz ve lipoliz gibi bir dizi sürecin gerçekleşmesine bağlıdır. Peynirin dokusu, aroma ve görsel görünümü peynir türlerine karakterizedir. Peynir dokusu yağ içeriğine bağlı iken, aroması, yağın parçalanması ile oluşan birincil ve ikincil ürünlere bağlıdır. Bu işlemler birçok enzimin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Olgunlaşma sürecinin hızlandırılmasında ekzojen lipazlar kullanılır. Ancak serbest lipazların kullanılması lipolize neden olabilir. Bu da üründe istenmeyen doku ve tat bozukluklarına sebebiyet verir. Bu sebeple, lipaz enkapsülasyonu yapılarak enzim-substrat oranı dengede tutulur [76]. Novozyme Palatase®, olgunlaşma süresi daha kısa olan

peynirlerde bu sürenin daha uzun süre olmasını sağlamak için geliştirilen kapsüle edilmiş bir enzim kokteylidir[76].

2.5.3 İlaç Endüstrisi

İlaç endüstrisinde biyokataliz, kimyasal senteze nazaran pek çok avantaj sağlar. Bu sebepten dolayı enzimlerin ilaç endüstrisinde önemli bir yeri vardır. İlaçlarda istenen etkiyi yalnızca bir enantiyomer sağladığı için rasemik karışımların çözülebilmesi önem arz eder. Lipazlar, yalnızca bir enantiyomer sentezi ile rasemik karışımları kolayca çözebilme yeteneğine sahip olduğundan ilaç üretimi için tercih edilen bir enzimdir. *Candida cylindracea, Achromobacter sp., Alcaligenes sp.* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar, alkoller, amidler, karboksilik asitler ve esterler gibi çeşitli enantiyopür moleküllerinin sentezinde kullanılmaya uygundur[75]. Bu moleküller, iburofen, naproxen gibi antiinflamatuvar ilaçlarda, spergualin, Taxol® gibi anti kanser ilaçlarda, lobukavir gibi antiviral, [S]-2-pentanol gibi anti-Alzheimer ilaçlarında kullanılır.[75], [77]. Profens (2-arilpropiyonik asitler), doku hasarına bağlı ağrı ve iltihaplanma tedavisinde çok sık kullanılan ilaçlardır. Ketoprofen, flurbiprofen, ibuprofen ve naproksenin antiinflamatuar etkisi S-enantiyomerine bağlıdır. Bu ilaçların R-enantiyomerinde Siklooksijenaz-2 (COX) inhibisyonuna sebep olur ve gastrointestinal ağrılar gibi yan etkilere sebep olur[78], [79]. Son yıllarda, 2-arilpropiyonik asitlerin enantiyoselektif esterifikasyon sentezi ile kinetik çözünürlüğü geniş çapta incelenmiş ve lipaz enzimlerinin bu süreçte başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir [34], [80]–[82]. Örneğin, *C. antarctica*, *C. rugosa* ve *A. Niger*'den elde edilen lipazlar, profensin kinetik çözünürlüğünde uygulanmış, bu da yüksek enantiyomerik saflığa sahip ilaçların elde edilmesini mümkün kılmıştır [81], [83], [84].

2.6 *Pichia pastoris*

1980'li yılların başında, doğal kaynaklardan protein ekstraksiyonunda yaşanan zorluklar sebebiyle rekombinant protein üretim metotları geliştirilmeye başlandı. Örneğin, ilk ticari farmasötikler olan insan insülini ve büyüme hormonu, başlangıçta konakçı olarak *Escherichia coli* bakterisi kullanılarak üretildi ve daha sonra insan insülini genetik mühendisliği kullanılarak elde edilen ilk protein olarak 1982'de lisans aldı [85].

Son yıllarda, aşı ve ilaç üretimi, tarımsal uygulamalar gibi medikal ve endüstriyel alanlarda biyolojik ekspresyon sistemleri sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [86]. Bakteri, maya, bitki, memeli ve böcekler halihazırda kullanılan ekspresyon sistemleridir. Bakteri ekspresyon sistemlerinde en sık kullanılan sistemlerden biridir. Bakteriyel ekspresyon sisteminin hızlı çoğalma, basit ve ucuz besi yeri içeriği, üst düzey ekspresyon, hızlı ve kolay transformasyon süreci gibi birçok avantajı olmasına rağmen, heterolog proteinlerin yanlış katlanması, lipopolisakkarit üretimi, translasyon sonrası modifikasyon eksikliği ve proteazlara bağlı protein bozulması gibi bazı dezavantajları da vardır [87].

Ekspresyon sistemlerinin diğer önemli parçaları ise ökaryotik olan memeli ve maya hücreleridir. Memeli hücresi olarak ekspresyonda en sık kullanılanlar Çin Hamsterı yumurtalık hücreleridir. Bu hücreler, kendi doğal hallerinde çok az protein salgılarlar. Ancak gen manipülasyon aşamalarından geçtikten sonra, vücudumuzda bulunan hepatositler ve antikor üreten plazma hücreleri kadar, hatta daha fazla protein salgılayabilen hücrelere dönüşebilirler [88]. Günümüzde bu ekspresyon sistemleri, biyofarmasötik bileşikler, monoklonal antikor ve füzyon proteini üretiminde kullanılmaktadır. Aynı zamanda, bebek hamster böbreği, insan embriyonik böbreği gibi hücre hatları da yasal olarak kullanılmaya başlanmıştır [89]. Memeli ekspresyon sistemleri, protein katlanması, translasyon sonrası modifikasyonlar, glikozillenme gibi önemli avantajlar sağlarken, yavaş büyümeleri, maliyetli besiyeri içeriği, kültür ortamının bazı viral kontaminasyonlara açık olması gibi durumlar büyük ölçekli ekspresyonlar için dezavantaj oluşturmaktadır [90], [91].

Mayalar, aşı ve ilaç üretiminde çeşitli proteinlerin ekspresyonu için yaygın olarak kullanılan diğer ökaryotik hücrelerdir. Bu mikroorganizmalardaki protein ekspresyon mekanizması memeli hücrelerindekine yakındır. Bakterilere kıyasla maya hücreleri hücre büyüme hızı, translasyon sonrası modifikasyon, kolay genetik manipülasyon gibi önemli avantajları vardır. Ayrıca doğrusal hale getirilen yabancı bir DNA, maya genomuna homolog rekombinasyon yoluyla entegre edilebilir [92]. Çalışmalarda en sık kullanılan maya hücresi *Saccharomyces cerevisiae'*dir. Hepatit B ve HPV aşılarının geliştirilmesinde kullanılan bir konak

hücredir. Ancak, *Saccharomyces cerevisiae* translasyon sonrası proteinlerde N ve O hiper glikozilleyebilir ve bu da proteinin immünojenisitesini etkileyebilir [93]. Bu gibi sorunların çözülmesi adına son yıllarda *Pichia pastoris, Hansenulla polymorpha* gibi metilotrofik maya hücreleri geliştirilmiştir. *Pichia pastoris*, hem maliyet hem de konak hücre sistemi açısından en popüler ekspresyon sistemi haline gelmiştir [7].Metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris,* ilk olarak Fransa'da kestane ağacından izole edildi ve Alexandre Guilliermond tarafından *Zygosaccharomyces pastoris* olarak tanımlandı [94],[95]. 1950'lerde Herman Phaff, Kaliforniya'da kara meşe ağaçlarından daha fazla suş izole ederek türün adını *Pichia pastoris* olarak değiştirdi[96]. 1995 yılında ise, *Pichia pastoris* suşları yeni bir cins olan Komatagella'ya taşındı ve sonrasında Fransız tipi suşların dahil olduğu *Komatagella pastoris* ve Amerikan suşlarının dahil olduğu *Komatagella phaffi* olmak üzere iki gruba ayrıldı [97], [98].

Pichia pastoris, hem akademide hem de endüstride çok sık kullanılan bir konakçı mikroorganizmadır [99]. Hem temel laboratuvar araştırmaları hem de endüstriyel üretim için, farklı miktarlarda protein ekspresyonu yapılabilen oldukça kullanışlı bir sistemdir [100]. Hücreler uygun şartlarda kolaylıkla büyütülebilir, pH, havalandırma gibi protein ekspresyonunu etkileyen faktörler kolayca kontrol edilip değiştirilebilir. Memeli hücreleriyle karşılaştırıldığında, karmaşık kültür şartları ve yüksek maliyetli büyüme ortamı gerektirmez ve genetik olarak manipülasyonu daha kolaydır. Ayrıca, *Saccharomyces cerevisiae*'de, böcek hücresi ve bakulovirüs sistemlerinde verimli bir şekilde eksprese edilemeyen G proteine bağlı reseptörler gibi proteinlerin verimli bir şekilde ifadelendiği gösterilmiştir [101], [102].

Metilotropik bir maya olan *Pichia pastoris*, karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanır. Metanol metabolizmasında ilk tepkimeler peroksizomda başlar. Peroksizomlar alkol oksidaz, katalaz ve dihidroksi aseton sentaz gibi metanol metabolizmasında kilit rol oynayan enzimleri barındırır. Daha sonra, tepkimeler sitoplazmada devam eder. Metanolün asimilasyon ve disamilasyonu sitozolde gerçekleşir[8], [103]. Metanol kullanımına göre üç farklı *Pichia pastoris* suşu bulunmaktadır. Bunlardan metanol kullanımı pozitif olan fenotip (Mut^+), yabanıl

tiptir ve yüksek miktarlarda metanol indüklemesine gerek duyar. Metanol kullanımı yavaş olan fenotipin (Mut^S), AOX1 promotorunda bir bozulma mevcuttur. Bu sebeple hücre büyümesi ve metanol kullanımı yavaş gerçekleşir. Metanol kullanımı negatif olan fenotipte ise (Mut^-), AOX1 ve AOX2 genleri bulunmadığından metanol varlığında büyüyemez [104]. Günümüzde en sık kullanılan fenotip ise Mut^+ fenotipidir.

Pichia pastoris ekspresyon sisteminin temeli, metanol metabolizması için gerekli olan enzimlerin, hücrelerin metanol varlığında büyütülmesi ile yüksek seviyelere çıkması üstüne dayanmaktadır[105], [106]. Metanol kullanımının ilk aşamasında metanol, alkol oksidazlar tarafından formaldehit ve hidrojen peroksite oksitlenir ve zehirli hidrojen peroksit, katalazın etkisiyle oksijen ve suya parçalanır. Daha sonra bu iki enzim peroksizomda ayrı olarak tutulur. Formaldehit, ya dissimilasyon yolu ile birbirini izleyen iki dehidrojenaz reaksiyonuyla oksitlenir ya da ksilüloz 5-fosfat (Xu5P) ile yoğunlaştırma yoluyla hücre metabolizmasında asimile edilir [107]. Sonraki peroksizomal kondenzasyon reaksiyonu, dihidroksiaseton sentaz adı verilen özel bir transketolaz tarafından katalize edilir ve DAS, Xu5P ve formaldehiti, sitozolde metabolize ederek C_3 bileşikleri dihidroksiaseton (DHA) ve gliseraldehit 3-fosfata (GAP) dönüştürür [107]–[110].

Pichia pastoris'te alkol oksidazı kodlayan AOX1 ve AOX2 olmak üzere iki gen bulunmaktadır. Hücredeki alkol oksidaz aktivitesinde en büyük rolü olan gen AOX1'dir. AOX1 geninin ekspresyonu, transkripsiyon seviyesinde kontrol edilir [111], [112]. Metanol varlığında büyütülen hücrelerde bulunan poliadenillenmiş RNA'nın yaklaşık %5'i AOX1'den gelirken, farklı diğer karbon kaynaklarının varlığında büyütülen hücrelerde AOX1 etkinliği saptanamamıştır [8]. AOX1 geninin düzenlenmesinde iki mekanizma görev alır. Bunlardan biri *Saccharomyces cerevisiae* GAL1 geninin düzenlenmesine benzeyen bir represyon mekanizması, diğeri ise bir indüksiyon mekanizmasıdır [112].

AOX1, *Pichia pastoris* için en sık kullanılan promotor olmasına rağmen, son yıllarda yabancı proteinlerin üretiminde kullanılabilen farklı promotorlar da bulunmaktadır. Bunlardan biri ise konstitütif bir promotor olan GAP promotorudur. AOX1'e nazaran daha az tercih edilmesinin nedenlerinden biri

olarak, proteinlerin konstitütif üretimi sırasında sitotoksik etkiye sebep olacağı görüşüdür [104]. Ancak yapılan bazı çalışmalarda, sitotoksik etkinin yüksek oranda görülmediği ve aynı zamanda GAP kontrolünde ekspresyonu yapılan rekombinant ekso-lenavaz (LsdB) proteininin üretim seviyesinin AOX1 promotoru kullanılanlarla benzer olduğu gözlemlenmiştir [113].

GAP geni, NAD'ye bağlı Gliseraldehit-3-dehidrogenaz enzimini kodlar. Bu promotor, glukoz, gliserol, etanol gibi farklı karbon kaynaklarının varlığında proteinlerin sürekli olarak ifadelenmesini sağlayabilen konstitütif bir promotordur [114].

AOX1 promotörü kontrolü altında protein ekspresyonu yapmanın en önemli noktalarından birisi promotörün çok güçlü olması diğeri ise çok sıkı düzenleniyor olmasıdır. Özellikle toksik veya zararlı heterolog proteinlerin üretiminde metanol ile indükleme sayesinde hem proteinin üretimi hem de hücre yoğunluğu kontrol altında tutulabilir. Ancak bu, daha uzun ve zahmetli bir sürece sebep olur. GAP ise herhangi indüklemeye gerek duymayan bir promotör olması sebebiyle, hücre büyümesine engel olmayan heterolog proteinlerin üretimi için zaman ve harcanan efor açısından daha avantajlıdır [8], [115]. GAP konstitütif olmasına rağmen ortamda karbon kaynağı bulunması protein ifadelenmesini olumlu yönde etkiler. Waterham ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, GAP genine ait mRNA miktarlarının, glukoz varlığında en yüksek, daha sonra sırasıyla gliserol, oleik asit ve metanol varlığında arttığı rapor edildi [116]. Başka bir çalışmada ise oksijen kaynağının da GAP promotoru kontrolündeki protein ekspresyonunu etkilediği rapor edildi. Bauman ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada ifadelenmesi oldukça zor üç protein olan insan monoklonal antikoru olan 3H6 Fab fragment, insan tripsinojen ve domuz tripsinojen genleri GAP promotörünün kontrolünde ve düşük oksijen miktarı altında üretildi ve üç ila alt kat arasında değişen bir üretim artışı olduğu rapor edildi [117].

S. cerevisiae'ye ait alfa faktör (α- MF) salgı sinyali, *Pichia pastoris*'te ifadelenen heterolog proteinlerin hücre dışına yönlendirilmesi için kullanılan bir sinyal peptididir. Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, α- MF sinyali entegre edilen Pichia pastoris'te AOX1 promotörü kontrolünde Ekstraselüler Süper Oksit

Dismutaz geninin ifadelenmesi denenmiş ve kültür ortamında bulunan protein miktarının yaklaşık 440 mg/L olduğu rapor edildi [118]. Bir başka çalışmada ise, α-MF salgı sinyali içeren pPICZαB vektörü kullanılarak, Dang virüsüne ait NS1 geninin *Pichia pastoris*'te ekspresyonu denendi ve metanol indüklemesi varlığında, yaklaşık 80 kDa boyutundaki bu proteinin hücre dışına salgılandığı gösterildi [119]. GAP promotörünün kontrolündeki ekspresyonlarda salgılama faktörünün etkisiyle ilgili çok farklı sonuçlar elde edilen çalışmalar bulunmaktadır. Ding ve arkadaşlarının, vitollogenin genine ait salgı sinyal sekansı ve α- MF salgı sinyalinin birlikte entegre ettiği çalışmada, vitollogeninin hücre dışı sekresyonunun desteklenmediği saptandı [120]. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insan anjiyostatin geni, α- MF salgı sinyal sekansı bulunan ve kontitütif bir vektör olan pGAP9K kullanılarak *Pichia pastoris*'in GS115 suşunun genomuna entegre edildi. Yapılan analizler sonucunda hücre dışı sıvıda 176 mg/L protein olduğu gösterildi [121].

Kodon optimizasyonu, rekombinant protein üretiminde verimi arttırmak için kullanılan bir yöntemdir. Her protein 20 amino asit içerir. Bu 20 amino asidi kodlayan 64 tane üçlü kodon bulunur. Birkaç istisna dışında, bir aminoasidi kodlayan bir ila altı farklı kodon bulunur. [122]. Çoğu amino asit, birden fazla kodon tarafından kodlandığı için kodon optimizasyon programları nadir kodonların kullanımından kaçınmayı amaçlar [123]. Farklı organizmalar, bir amino asidi kodlamak için farklı kodonlar kullanabilir [10]. Bu sebeple, rekombinant protein üretimi çalışmalarında ilgilenilen genin konakçı organizmanın kodon kullanımına göre optimize edilmesi gerekebilir. Hu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, keratinaz-A proteininin *Pichia pastoris* kodon kullanımına göre optimize edilmesi sonucunda, optimize edilmeyen proteinin aktivitesinin 195 U/mL, kodon optimizasyonu yapılan proteininin aktivitesinin ise 324 U/mL olduğu kaydedildi [124]. Chang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Candida rugosa*'ya ait lipaz geninin (CRL) *Pichia pastoris* kodon kullanımına uygun optimize edilerek ekspresyonu çalışıldı. Çalışmalar sonucunda eksprese edilen lipazın, kodon optimizasyonu olmayandan 4-6 kat daha fazla aktivite gösterdiği rapor edildi [125]. Yadava ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıtma hastalığına sebep olan *Plasmodium falciparum*'a ait eritrosit bağlayıcı antijenin (EBA-175) F2 bölgesinin

hem homolog hem de heterolog ekspresyon için kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda *Pichia pastoris*'te protein ekspresyonu veriminin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir [126].

3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Deneyler esnasında kullanılan tampon ve çözeltiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

TB Tamponu pH 6.7	10 mM Pipes, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl eklenip distile su ile çözdürüldü. KOH kullanılarak pH 6.7' ye ayarlandı. En son 55 mM $MnCl_2$ eklenip çözdürüldükten sonra 0.22 µm filtre ile sterilize edildi.
TBE Tamponu (10X)	108 gram Tris, 55 gram borik asit 960 mL distile su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra 40 mL 0.5 M EDTA eklenerek homojenize olması için manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.
SDS-PAGE Yürütme Tamponu (10X) pH 8.3	30,3 gram Tris, 144.4 gram Glisin ve 10 gram SDS 1 L distile su içerisinde çözdürüldü.
SDS-PAGE Boyama Tamponu	100 mL Metanol, 62,5 mg Commasie Brilliant Blue ve 17,5 mL Asetik asit karıştırılıp, toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.
SDS-PAGE Yıkama Tamponu	100 mL Metanol ve 17,5 mL Asetik Asit karıştırılıp, toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.
%10 Amonyum Persülfat (APS)	5 gram amonyum persülfat 50 mL distile suda çözdürüldü.
%10 SDS Çözeltisi	10 gram SDS, 100 mL distile su içerisinde çözdürüldü.

Tablo 3.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler (devamı)

%10 SDS Çözeltisi	10 gram SDS, 100 mL distile su içerisinde çözdürüldü.
1 M Tris Tamponu pH 7	121,14 gram Tris 1 L distile su içerisinde çözdürüldü. HCl kullanılarak pH değeri ayarlandı.
20 mM Tris Tamponu pH 8	1 M Tris tamponundan 10 mL alınıp, distile su ile toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.
50 mM Potasyum Fosfat Tamponu pH 7	30,75 ml K2HPO4, 19,25 ml KH2PO4 karıştırılarak 1 litreye distile su ile tamamlandı. pH 7'ye KOH ile ayarlandı
%20 Dekstroz	20 gram Dekstroz 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 0,22µm şırınga ucu filtre ile steril edildi.
100 mg/mL Ampsilin Stok Çözeltisi	5 gram ampisilin toplam hacim 50 mL olacak şekilde distile su ile çözdürüldü. 0,22µm şırınga ucu filtre ile steril edildi.

3.2 Kullanılan Besiyerleri

Deneyler esnasında kullanılan besiyerleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Kullanılan Besiyerleri

LS LB (Düşük tuz içerikli Luria-Bertani)	10 gram Tripton, 5 gram maya özütü, 5 gram Sodyum Klorür eklendikten sonra distile su ile hacim 1 L'ye tamamlandı. Otoklavda 121^0C 20 dakikada sterilize edildi.
LS LB (Düşük tuz içerikli Luria-Bertani) Agar	10 g Tripton, 5 g Maya özütü, 5 g Sodyum Klorür, 15 g Agar 1 litre distile suya tamamlandı. Otoklavda 121^0C 20 dakikada sterilize edildi.
Süper Optimal Brot (SOB) pH 7	%2 Tripton, %0.5 Maya Özütü, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ içeriği hazırlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlandı
Glukoz İçeren Süper Optimal Brot (SOC)	49 mL SOB'ye 1 mL 1 M Glukoz solüsyonu eklendi.
Maya Özütü Pepton Dekstroz (YPD)	20 gram Pepton, 10 gram maya özütü 900 mL distile su içerisinde çözdürüldü. 121^0C 20 dakika otoklavlandıktan sonra 100 mL %20 Dekstroz eklendi.
Maya Özütü Dekstroz Agar (YPD Agar)	2 gram Pepton, 1 gram maya özütü ve 1,5 gram agar 90 mL distile su ile çözdürüldü. 121^0C 20 dakika otoklavlandı.
Maya özütü Pepton Dekstroz Sorbitol Agar (YPDS Agar)	18,22 gram Sorbitol, 1 gram Maya özütü, 2 gram Pepton ve 2 gram Agar 90 mL distile su içerisinde çözdürüldü. 121^0C 20 dakika otoklavlandıktan sonra 10 mL %20 Dekstroz eklendi.

3.3 Kodon Optimize Lipaz Geninin PGAPZαA Vektörüne Aktarılması ve E.Coli'de Çoğaltılması

Sentetik olarak üretilen kodon optimize lipaz geni, KpnI ve NotI kesim bölgeleri ve HisTag kuyrukları içeren LOF ve LOR primerleri ile çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünü jelden pürifiye edildi. Kodon optimizasyonu yapılmış lipaz geninin PGAPZαA

vektörüne aktarılarak Pichia pastoris'te ekspresyonu hedeflenmiştir. PGAPZαA vektörü ve pürifiye edilen PCR ürünü KpnI ve NotI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi ve Thermo Scientific Rapid Ligation Kit kullanılarak ligasyonları gerçekleştirildi.

Rekombinant plazmid *Pichia pastoris*'e aktarılmadan önce, Inoue metodu kullanılarak kompetent hale getirilen DH5α hücrelerine transformasyonu yapıldı. 50 µL hücre 5 µL ligasyon karıştırılarak 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Daha sonra 42^0C'de 1,5 dakika tutulduktan sonra tekrar buz üstüne alınarak 1,5 dakika bekletildi. Hücre ligasyon karışımı 950 µL SOC medium içerisine alınarak, 1 saat boyunca 37^0C'de 250 rpm hızda inkübasyona bırakıldı. Sıvı kültürde büyütülen hücreler 25 µg/ml Zeocin içeren LB-Agar besi yerine ekilerek, 37 °C'de 16 saat büyütüldü.

Seçilen koloniler, koloni PCR ile tarandı. Kolonilerden kürdanla alınarak 50 µl su içerisinde çözüldü. 100 °C'de 10 dakika tutulduktan sonra 1 µl'si kalıp olarak kullanıldı. Thermo Dreamtaq Green PCR Mix (12,5 µL), geri primer 3'AOX (10 mM), ileri primer PGAPF (10 mM) koyulup, reaksiyonun tamamı 25 µL'ye tamamlanacak şekilde su eklendi. PCR reaksiyonları 95 °C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 95 °C'de 40 saniye denatürasyon, 53 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dakika uzama aşamaları 25 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dk son uzama yapıldı. Daha sonra PCR ürünleri agaroz jel yürütülerek görüntülendi.

Pozitif kolonilerden biri seçilerek plazmit izolasyonu için 25 µg/ml Zeocin içeren 10 ml LB besi yerinde 37 °C'de 220 RPM hızda 16 saat büyütüldü. Plazmid izolasyonu Monarch Miniprep Plazmid İzolasyon Kiti kullanılarak kullanım kılavuzunda önerilen biçimde yapıldı.

3.4 Rekombinant pGAPZαA Vektörün *Pichia pastoris* Genomuna Entegrasyonu

3.4.1 *Pichia pastoris* X-33 Suşlarının Kompetent Hale Getirilmesi

Invitrogen Pichia EasyComp™ Transformation Kit protokolü uygulanarak *Pichia pastoris* X-33 suşu hücreleri kompetent hale getirildi. YPD-Agar besiyerinde büyütülen kolonilerden bir tanesi seçilerek 10 ml YPD besi yerine ekildi ve 28°C'de

gece boyu büyütüldü. Kültür OD'si 0,1-0,2 arasında olacak şekilde 10 ml YPD besiyerinde seyreltildi ve OD 0,6- 1 arasına gelene kadar 4-6 saat büyütüldü. Hücreler 500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 10 ml Solüsyon 1'de çözüldü ve tekrar 500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 1 ml Solüsyon 1'de çözülerek 50 mikrolitre ependorf tüplere paylaştırıldı. Tüpler kâğıt havlulara sarılarak -80°C'ye kaldırıldı.

3.4.2 Plazmitlerin Kompetent X-33 Hücrelerine Kimyasal Yolla Transformasyonu

Transformasyon için rekombinant vektör xMAJI enzimi ile kesilerek lineerize edildi. Kit protokolüne uygun olarak 50 µL X-33 hücresi ile 1 µg lineer vektör karıştırılarak 1 ml Solüsyon 2 eklendi. Karışım 30°C'de 1 saat boyunca 15 dakikada bir vortekslenerek inkübe edildi. Hücrelere 10 dakika 42°C'de ısı şoku verildi. Karışım iki tüpe bölünerek üzerine 1ml YPD besiyeri eklendi ve 1 saat 30°C'de Zeocin direnci gelişmesi için inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 3000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılarak hücreler 500 µL Solüsyon 3 içinde çözdürüldü ve 2 tüp birleştirildi. Hücreler tekrar 3000xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve sıvı uzaklaştırıldı. Son olarak hücreler 150 µL Solüsyon 3 içerisinde çözdürülerek 100 µg /ml Zeocin içeren YPDS-Agar besiyerine ekildi. Petri 28°C'de 5 gün boyunca inkübe edildi.

3.4.3 Pozitif Maya Kolonilerinin Taranması

Transformasyon sonucu aktarılan DNA'nın *Pichia pastoris* genomuna entegrasyonunun kontrolü için kolonilerden genomik DNA izolasyonu yapılarak PCR ile tarandı. Genomik DNA izolasyonu için kolonilerinden steril tip ile alınmış ve 100 µl 200mM LiOAc %1 SDS solüsyonu içerisine çözüldü. 70°C'de ısı bloğunda 5 dakika inkübe edilmiş ve 300 µl %96-100 etanol eklenerek otuz saniye vortekslendi. 15.000 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Hücre pelleti %70 etanol ile yıkanmıştır. 15.000 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlendi. Hücre pelleti %100 etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl H_2O içerisinde pellet homojen hale getirildi. 15.000 x g'de 1 dakika santrifüjlenerek üst faz PCR'da kullanılmak üzere ayrıldı.

Genomik DNA kalıp DNA olarak kullanılarak PCR yapıldı. Thermo Dreamtaq Green PCR Mix (12,5 µl), ileri primer PGAPF (10 mM) ve geri primer 3'AOX1 (10 mM) koyulup 25 µl'ye su ile tamamlandı. PCR reaksiyonları 95 °C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 95 °C'de 40 saniye denatürasyon, 53 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dakika uzama aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dk son uzama yapıldı. Daha sonra PCR ürünleri agaroz jel yürütülerek görüntülendi.

Tribütirin petri aktivite deneyi yapılarak yüksek aktivite gösteren koloniler tarandı. Lipaz tribütirini kullanarak kolonilerin etrafında şeffaf alanlar oluşmasını sağlamaktadır. Bu alanın fazla olması lipaz aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. İçeriğinde %1 Yeast Extract, %2 Peptone, %2 Dekstroz, %1,5 Agar, %1 Tribütirin ve %1 Gum arabic bulunan petrilere, pozitif koloniler spotlama tekniği ile ekildi. 28^0C'de 3 gün inkübasyona bırakıldı. Kolonilerin etrafında oluşan şeffaf bölgenin büyüklüğüne göre aktivitesi fazla olan koloniler seçildi.

3.5 Kodon Optimize Zeytin Lipaz Geninin *Pichia pastoris*'te Küçük Ölçekli Ekspresyonu

Pozitif 3 koloni ve insört içermeyen X-33 hücresi, 10 mL YPD besiyerine aşılandı. 28^0C'de 200 rpm hızda bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 1/50 olacak şekilde dilüe edilerek 50 mL YPD besiyerine aşılandı. 120 saat boyunca, her 24 saatte bir her kültürden 2 mL örnek alındı. Örnekler, 12000 xg' de 5 dakika çöktürülüp süpernatantlar -80'de saklandı.

3 koloni ve boş X-33 hücrelerine ait ekstraselüler sıvılardaki proteinler %80 amonyum sülfat ile 4^0C'de bir gece boyunca inkübe edilerek çöktürüldü. Protein pelleti 300 µL 50 mM Fosfat tamponu içerisinde çözdürüldü.

3.6 SDS-PAGE Analizi

Tampon içerisindeki örnekler SDS-PAGE jeline yüklenmek üzere 4X yükleme tamponu ile karıştırılıp 5 dk kaynatılarak proteinlerin denatüre edilmesi sağlandı. %12 lik ayırıcı jel ve %5 lik yükleme jeli şeklinde hazırlanan jele örnekler yüklendi. Elektroforez işlemi örnekler ayırma jeline ulaşana kadar 80 V, sonrasında boya

jelden çıkana kadar 160 V'ta yürütüldü. Jel, boyama solüsyonunda gece boyu çalkalanarak boyandı. Jel yıkama solüsyonunda 30 dk bekletilerek fazla boya uzaklaştırıldı.

3.7 Enzim Aktivite Analizi

Seçilen örneklerle pNPP substratı kullanılarak aktivite testi yapıldı. %10 pNPP izopropanol içerisinde çözüldü. pNPP solüsyonu, 50 mM fosfat tamponu (pH:8,00) ile 10 kat sulandırılarak deney tamponu hazırlandı.

450 µl deney tamponu ile 50 µl protein çözeltisi karıştırıldı. 1 saat 35°C'de inkübe edildi. 410 nm dalga boyunda absorbanslar ölçüldü.

3.8 Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi. Protein çözeltilerinden alınan 5 µl örneğe 250 µl Bradford çözeltisi eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 595 nm'deki absorbanslar ölçüldü.

3.9 Seçilen Koloninin Küçük Ölçekli Ekspresyonu

10 mL YPD besiyeri içerisine α12 hücreleri inoküle edildi. Kontrol olarak 10 mL YPD besiyeri içerisine rekombinant vektör içermeyen boş X-33 hücreleri inoküle edildi. 28^0C, 220 rpm'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün 50 mL YPD besiyeri içerisine, kültürün 1/1000'i olacak şekilde önkültürden alınıp inoküle edildi. Her 48 saatte bir 1/1000'i olacak şekilde ampsilin eklenerek, 28^0C, 220 rpm'de 96 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

3.10 Protein Saflaştırma

Protein saflaştırma işlemi, pGAPZαA vektörü ile proteine eklenen His kuyruğundan yararlanarak Ni-Agar bulunan kolonlar kullanılarak gerçekleştirildi. 1 mL resin bulunan kolonlara 1,5 mL distile su eklenerek 800 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu aşama üç kez tekrarlandı. Sonrasında 1,5 mL bağlama tamponu eklenerek 800 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. 1,5 mL protein eklendi ve $+4^0$C'de çalkalanarak 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 800 xg'de santrifüj edildi ve alttaki sıvı temiz bir tüpe alınarak +4 C'de saklandı. Kolona 1,5 mL yıkama tamponu eklendi. 800 xg'de 1,5 dakika santrifüj edildi. Alttaki sıvı temiz bir tüpe

alınarak +4^{0}C'de saklandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Daha sonra kolonlara 250 µL elüsyon tamponu eklendi. 800 xg'de 1,5 dakika santrifüj edildi. Alttaki sıvı temiz bir tüpe alınarak +4^{0}C'de saklandı. Bu işlem 4 kez tekrarlandı. Tüm örnekler daha sonra SDS-PAGE jeline yüklendi.

3.11 Enzim Aktivite Analizi

Seçilen örneklerle pNPP substratı kullanılarak aktivite testi yapıldı. %10 pNPP izopropanol içerisinde çözüldü. pNPP solüsyonu, 50 mM fosfat tamponu (pH:8,00) ile 10 kat sulandırılarak deney tamponu hazırlandı.

450 µl deney tamponu ile 50 µl protein çözeltisi karıştırıldı. 1 saat 35°C'de inkübe edildi. 410 nm dalga boyunda absorbanslar ölçüldü.

3.12 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi. Protein çözeltilerinden alınan 5 µl örneğe 250 µl Bradford çözeltisi eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 595 nm'deki absorbanslar ölçüldü.

3.13 SDS-PAGE Analizi

Tampon içerisindeki örnekler SDS-PAGE jeline yüklenmek üzere 4X yükleme tamponu ile karıştırılıp 5 dakika kaynatılarak proteinlerin denatüre edilmesi sağlandı. %12 lik ayırıcı jel ve %5 lik yükleme jeli şeklinde hazırlanan jele örnekler yüklendi. Elektroforez işlemi örnekler ayırma jeline ulaşana kadar 80 V, sonrasında boya jelden çıkana kadar 160 V'ta yürütüldü. Jel, boyama solüsyonunda gece boyu çalkalanarak boyandı. Jel yıkama solüsyonunda 30 dakika bekletilerek fazla boya uzaklaştırıldı.

3.14 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu

Aktivite analizleri için daha yüksek miktarda enzimin üretilmesi amacıyla ekspresyonun optimizasyonu için farklı şartlarda denemeler yapıldı.

3.14.1 Önkültür Basamağının Optimizasyonu

- **Önkültürsüz Büyütme**

Öncelikle önkültür basamağı geçilerek direkt katı besiyerine ekim yapılan hücrelerden tek koloni olacak şekilde alınıp 50 mL YPD besiyerine inoküle edildi. 96 saatlik inkübasyon sonrasında 50 mL kültürün tamamı çöktürüldü. α12 koloni ve boş X-33 hücrelerine ait ekstraselüler sıvılardaki proteinler %80 amonyum sülfat ile 4^0C'de 2 saat boyunca inkübe edilerek çöktürüldü. Protein pelleti 1500 µL 50 mM Fosfat tamponu içerisinde çözdürüldü.

- **6 Saat Ön Kültür ile Büyütme**

Boş X-33 ve rekombinant α12 hücreleri için 10 mL YPD içerisinde önkültür başlatıldı. 6 saatlik inkübasyon sonrasında 50 mL YPD besiyeri içerisinde 1/1000 oranında dilüe edilerek aşılandı ve 96 saat boyunca inkübe edildi.

- **48 Saat Önkültür ile Büyütme**

Boş X-33 ve rekombinant α12 hücreleri 50 mL sıvı YPD içerisine katı besi yerinden inoküle edilip 48 saat boyunca 28^0C' de inkübe edildi. 48. Saatin sonunda tüm kültür 5000 xg' de 5 dakika çöktürüldükten sonra hücre dışı sıvı ayrılıp -80'de saklandı. Hücre pelletleri ise 50 mL taze besiyeri içerisinde çözdürülüp 24 saat boyunca 28^0C' de 220 rpm' de tekrar inkübasyona bırakıldı.

3.14.2 Besi Yerinin Optimizasyonu

- **Farklı Miktarlarda Besiyeri Kullanarak İnkübasyon**

6 saatlik önkültür sonrasında 100 mL ve 50 mL YPD besiyeri içerisinde X-33 ve α12 hücreleri 96 saat boyunca inkübe edildi.

Daha sonra, 6 saatlik önkültür sonrası 200 mL YPD besiyeri içerisinde X-33 ve α12 hücreleri 96 saat boyunca inkübe edildi. 24 saatte bir 3 mL örnek alınarak çöktürülerek süpernatant aktivite analizi için ayrılarak -80'de saklandı.

- **Besi yeri pH Değerinin Değiştirilmesi**

YPD besiyeri içerisine pH değeri 7.5 olan 100 mM TRIS Buffer eklendi. 96 saatin sonunda tüm kültür çöktürülerek süpernatant kısım ayrılarak aktivite analizinde kullanıldı.

- **Dekstroz ve Maya Özütü ile Eş Besleme**

50 mL YPD besiyeri içerisine 48 saatte bir 250 µL %20 dekstroz, 500 µL maya özütü eklendi. Bir set 96 saatte 3 mL örnek alınıp sonlandırılırken, diğer set 120 saat inkübe edilip, her 24 saatte bir 3 mL örnek alındı. Daha sonra X-33 ve α12 hücreleri 50 mL YPD besiyeri içerisinde 23^0C'de inkübe edildi. 24 saatte bir örnek alınarak aktivite analizi için kullanıldı.

3.14.3 Ortam Sıcaklığının Optimizasyonu

- **Ortam Sıcaklığının 23^0C'ye Düşürülmesi**

Kontrol X-33 ve recombinant α12 hücreleri 50 mL YPD besiyeri içerisinde 23^0C'de inkübe edildi. 24 saatte bir örnek alınarak aktivite analizi için kullanıldı.

- **Ortam Sıcaklığının 20^0C'ye Düşürülmesi**

20^0C'de kontrol X-33 ve rekombinant α12 hücreleri 50 mL YPD besiyeri içerisinde 120 saat boyunca inkübe edildi. Her 24 saatte 3 mL örnek alındı.

Sonraki aşamada 50 mL YPD besiyeri içerisinde X-33 ve α12 hücreleri için 2 kültür seti kurularak 96 saat boyunca 20^0C'de inkübe edildi. 96.saatin sonunda tüm kültür çöktürülerek akitivite analizi için kullanıldı.

3.14.4 Aktivite Tampon Çözeltinin Optimizasyonu

- **pH:8, 50 mM Fosfat Buffer ile Aktivite Analizi**

96 saatin sonunda çöktürülen X-33 ve α12 hücreleri %80 amonyum sülfat kullanılarak 2 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında en yüksek hızda 35 dakika çöktürülen proteinler, pH değeri 8 olan 50 mM Fosfat Buffer içerisinde çözdürüldü. Daha sonra bu proteinler aktivite analizi için kullanıldı.

- **pH:8, 50 mM Tris Buffer ile Aktivite Analizi**

Daha sonraki kültür setinde ise, 96 saat sonrasında elde edilen proteinler, pH değeri 8 olan 50 mM TRIS buffer kullanılarak çözdürüldü. Yine pH değeri 8 olan 50 mM TRIS buffer kullanılarak aktivite analizi yapıldı.

- **pH:8 ve pH:6, 20 mM Tris Buffer ile Aktivite Analizi**

Bir başka kültür setinde 96 saat sonrasında elde edilen proteinler, pH değeri 8 olan 20 mM TRIS buffer kullanılarak çözdürüldü. Sonrasında, pH değeri 8 ve pH değeri 6 olan 20 mM TRIS Buffer kullanılarak aktivite analizleri yapıldı.

- **pH:7 ve pH:8 20 mM Tris Buffer ile Aktivite Analizi**

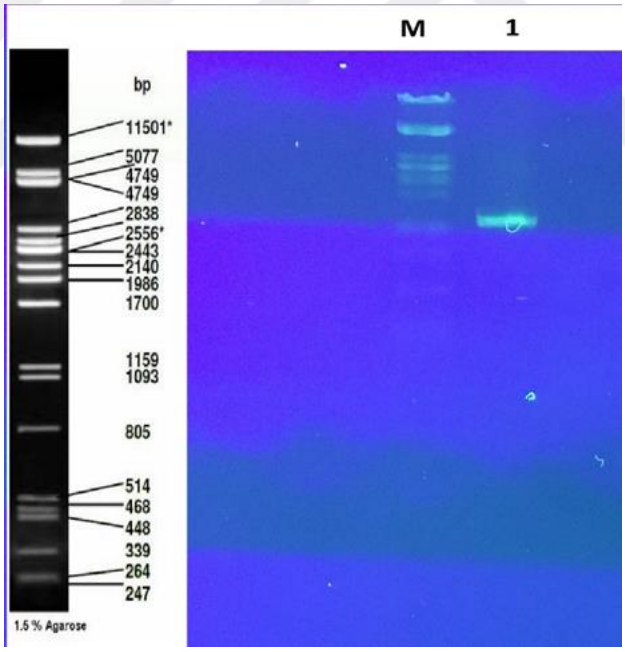
Sonraki kültür setinde, 96 saatin sonunda çöktürülen x33 ve α12 hücreleri %80 amonyum sülfat kullanılarak 2 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında en yüksek hızda 35 dakika çöktürülen proteinler, pH değeri 7 olan 20 mM TRIS Buffer içerisinde çözdürüldü. Çözdürülen proteinler, pH değeri 8 ve 6 olan 20 mM Tris Buffer kullanılarak aktivite analizleri yapıldı.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Kodon Optimize Lipaz Geninin PGAPZαA Vektörüne Aktarılması ve *E.coli'* de Çoğaltılması

4.1.1 PCR Reaksiyonu

Sentetik olarak üretilen kodon optimize lipaz geni, KpnI ve NotI kesim bölgeleri içeren LOF ve LOR primerleri ile çoğaltıldı (Şekil 4.1) Elde edilen PCR ürünü %1'lik agaroz jele yüklenerek analiz edildi.



Şekil 4.1 Kodon optimize lipaz geni PCR ürünü agaroz jel görüntüsü

4.1.2 PCR Ürününün Jelden Kesilerek Saflaştırılması

PCR ürününün tamamı Qiagen MinElute Kiti ile saflaştırıldı. Saf ürün Thermo Nanodrop cihazında ölçülerek konsantrasyonu belirlendi. Konsantrasyonu 264.6

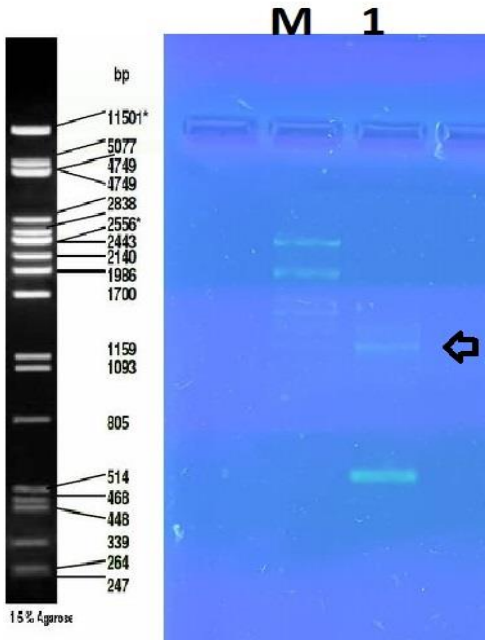
ng/µL olarak ölçüldü.

4.2 PCR Ürününün PGAPZαA Vektörüne Aktarılması ve *E.coli*'de Çoğaltılması

1 µg pGAPZαA vektörü ve 3 µg PCR ürünü KpnI ve NotI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi ve ligasyona engel olmaması için kesim enziminin uzaklaştırmak amacıyla Qiagen MinElute Kiti ile saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünlerin konsantrasyonları nanodrop ile belirlendi. İnsert konsantrasyonu 244.1 ng/µL, pGAPZαA vektörünün konsantrasyonu 52.9 ng/ µL olarak ölçüldü.

$$\frac{Vektörün\ ng'ı \times İnsertün\ kb\ büyüklüğü}{Vektörün\ kb\ büyüklüğü} \times İnsert{:}Vektör\ Molar\ Oranı = İnsertün\ ng'ı \qquad (4.1)$$

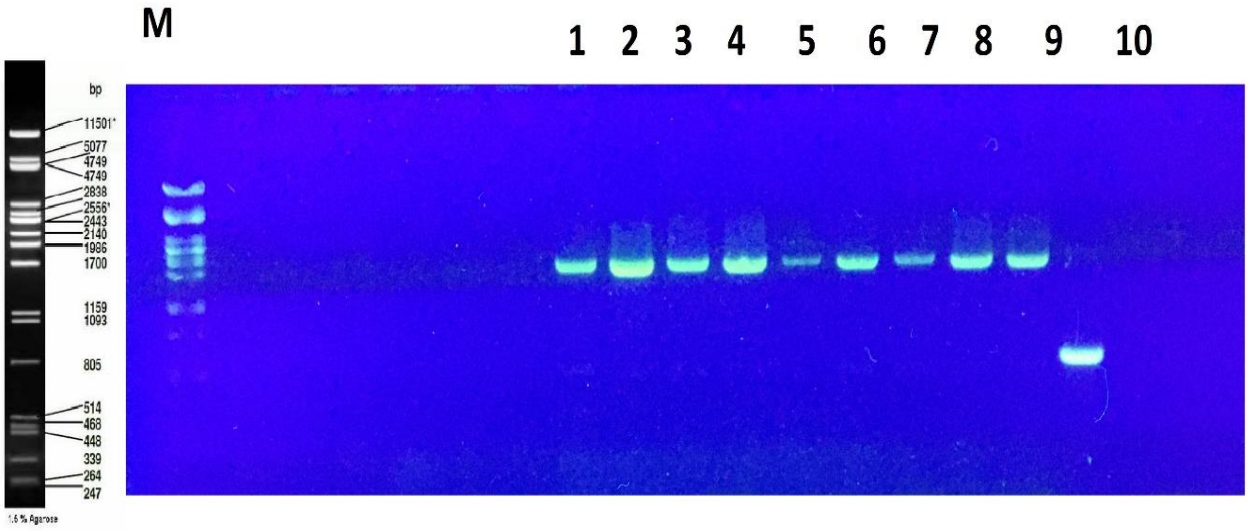
Ligasyon reaksiyonu, insert : vektör oranı 8:1 olacak ligasyon denklemi ile hesaplandı (Eşitlik 4.1). Vektör 50 ng, insert 3 ng olacak şekilde Thermo Scientific Rapid Ligation Kit kullanılarak ligasyonları gerçekleştirildi. Ligasyonun gerçekleştiğini doğrulamak için ligasyon-PCR kuruldu ve PCR ürünü agaroz jele yüklenerek analiz edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Ligasyon PCR ürünü agaroz jel görüntüsü M. lambda Pst marker, 1. ligasyon PCR ürünü

4.3 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Rekombinant plazmit *Pichia pastoris*'e aktarılmadan önce *E. coli* hücrelerinde çoğaltıldı. Seçilen koloniler koloni PCR ile tarandı ve agaroz jel üzerinde görüntülendi (Şekil 4.3). Koloni 10 dışındaki tüm kolonilerin kodon optimize lipaz genini içerdiği görüldü.



Şekil 4.3 Koloni PCR Agaroz Jel Görüntüsü. M. Lambda Pst Marker, 1. Koloni 1 PCR, 2. Koloni 2 PCR, 3. Koloni 3 PCR, 4. Koloni 4 PCR, 5. Koloni 5 PCR, 6. Koloni 6 PCR, 7. Koloni 7 PCR, 8. Koloni 8 PCR, 9. Koloni 9 PCR, 10. Koloni 10 PCR

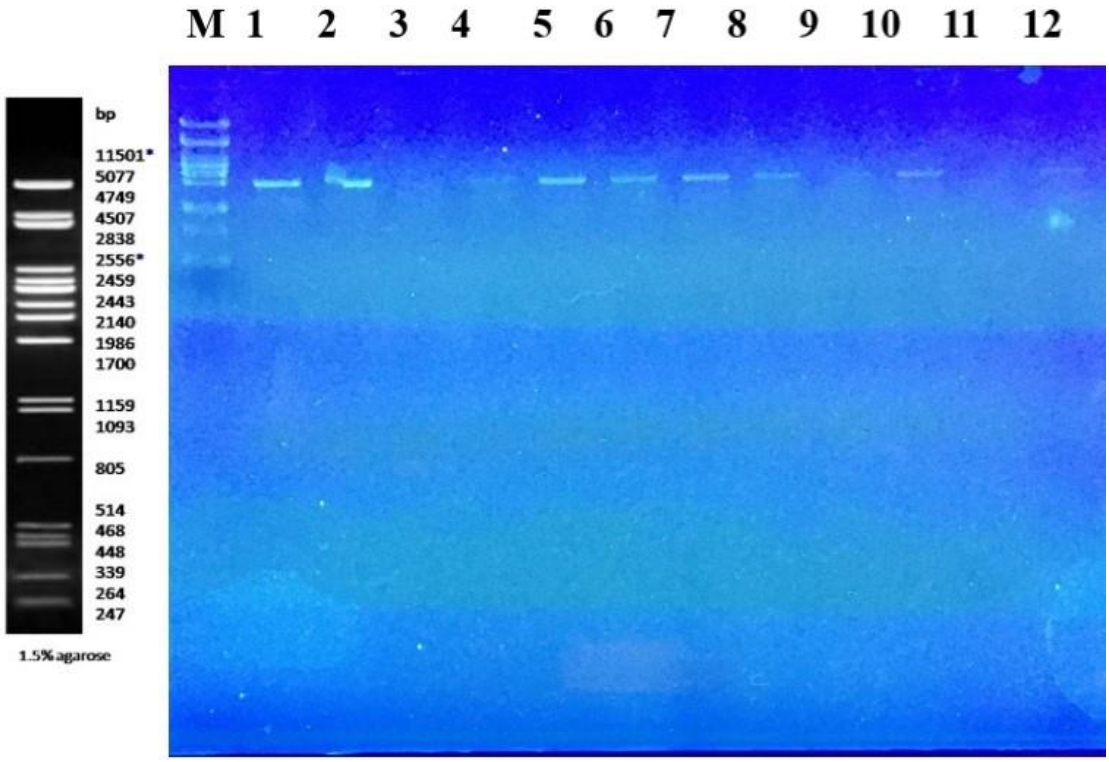
4.4 Rekombinant pGAPZαA Vektörün *Pichia pastoris* Genomuna Entegrasyonu

4.4.1 Plazmitlerin Kompetent X-33 Hücrelerine Kimyasal Yolla Transformasyonu

Koloni PCR sonrası seçilen 8 numaralı koloniden plazmit izole edilerek XmaJI enzimi ile kesilerek lineerize edildi. Lineer plazmit kompetan hale getirilen *Pichia* X-33 hücrelerine transformasyonla aktarıldı. Transformasyon Invitrogen Transformasyon Kitine uygun olarak yapıldı. 4 gün sonunda 12 adet koloni görüldü.

4.4.2 Pozitif Maya Kolonilerinin Belirlenmesi

Rekombinant plazmit *Pichia pastoris*'e aktarılmadan önce *E. coli* hücrelerinde çoğaltıldı. Seçilen koloniler koloni PCR ile tarandı ve agaroz jel üzerinde görüntülendi (Şekil 4.4). Koloni 10 dışındaki tüm kolonilerin kodon optimize lipaz genini içerdiği görüldü.

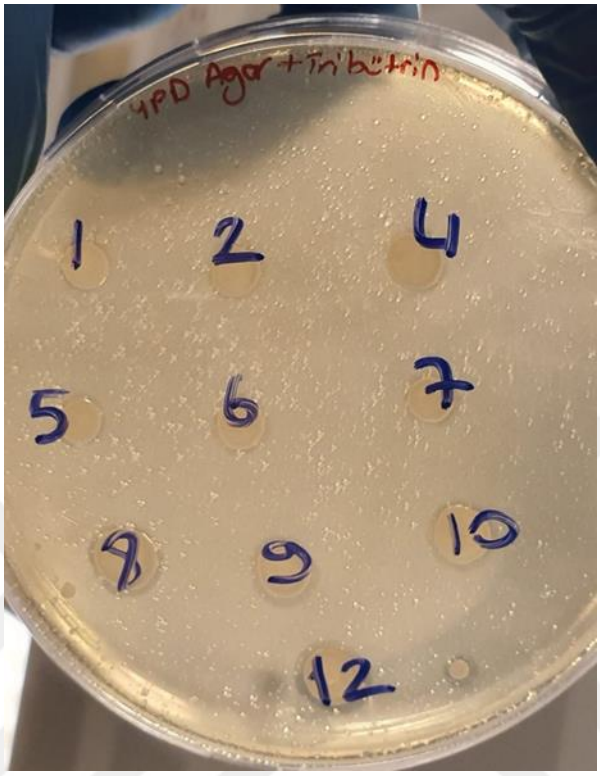


Şekil 4.4 Koloni PCR Agaroz Jel Görüntüsü. M. Lambda Pst Marker, 1. Koloni 1 PCR, 2. Koloni 2 PCR, 3. Koloni 3 PCR, 4. Koloni 4 PCR, 5. Koloni 5 PCR, 6. Koloni 6 PCR, 7. Koloni 7 PCR, 8. Koloni 8 PCR, 9. Koloni 9 PCR, 10. Koloni 10 PCR, 11. Koloni 11 PCR, 12.Koloni 12 PCR

4.5 Tribütirin Petri Deneyi ile Koloni Aktivitelerinin Taranması

Tribütirin petri aktivite deneyi yapılarak yüksek aktivite gösteren koloniler tarandı. Lipaz tribütirini kullanarak kolonilerin etrafında şeffaf alanlar oluşmasını sağlamaktadır. Bu alanın fazla olması lipaz aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. En fazla şeffaf bölge oluşturan kolonilerin koloni 8, 9, 10 ve koloni

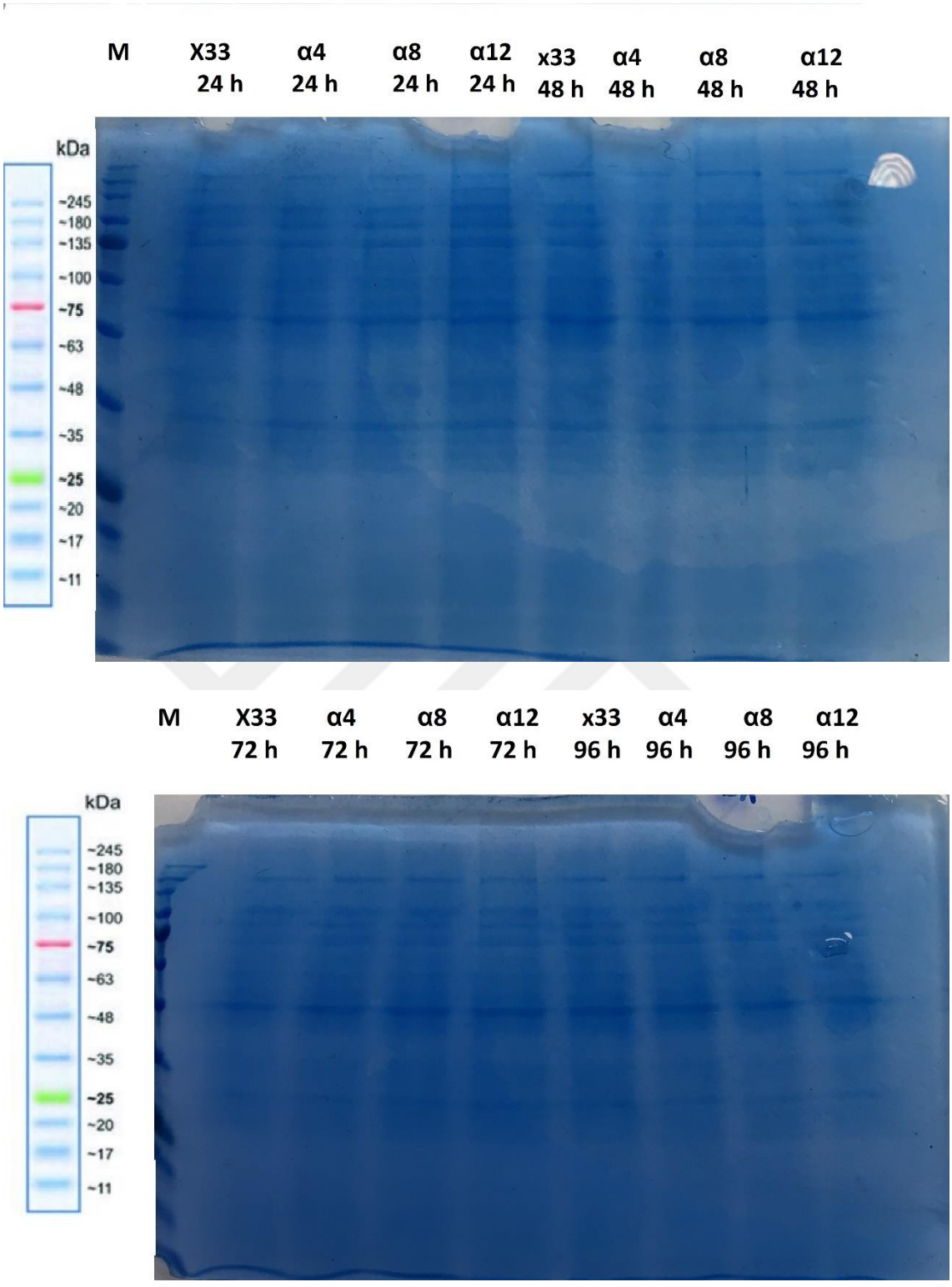
12 olduğu görüldü (Şekil 4.6). Sonraki aşamalar için 8, 12 ve 4 numaralı koloni de kontrol amaçlı seçildi.



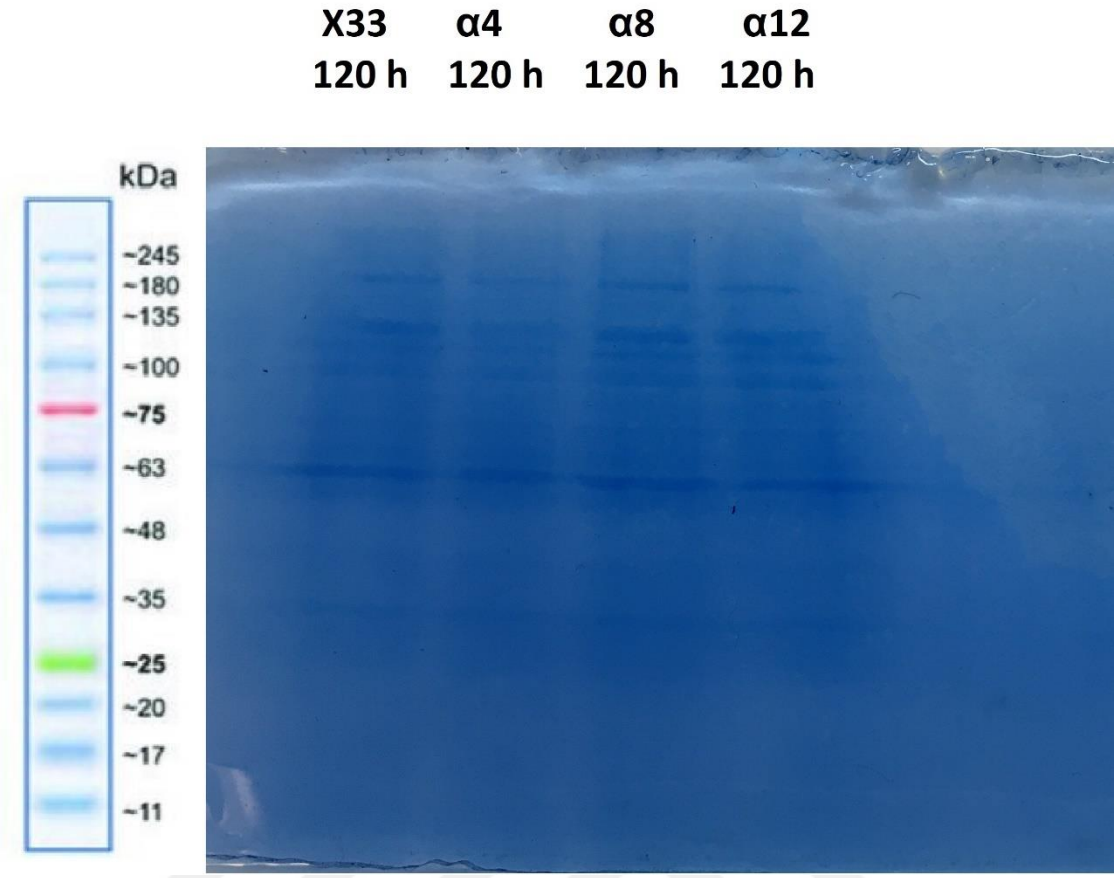
Şekil 4.5 Tribütirin petri deneyi 1. Koloni 1, 2. Koloni 2, 4. Koloni 4, 5. Koloni 5, 6. Koloni 6, 7. Koloni 7, 8. Koloni 8, 9. Koloni 9, 10. Koloni 10, 12. Koloni 12

4.6 Kodon Optimize Zeytin Lipaz Geninin *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu

Seçilen 3 koloni ve insert içermeyen X-33 hücreleri YPD besiyeri içerisinde 120 saat boyunca büyütülüp, her 24 saatte bir 2 mL örnek alındı. Her saat örneği %80 amonyum sülfat ile çöktürüldü ve SDS-PAGE yapılarak yüksek miktarda eksprese olmuş bir bant olup olmadığı analiz edildi (Şekil 4.7). Diğerlerinden farklı yüksek konsantrasyonda bir bant görülmedi.



Şekil 4.6 X-33 ve pozitif kolonilerin ekstraselüler sıvılarındaki proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüleri



Şekil 4.7 X-33 ve pozitif kolonilerin ekstraselüler sıvılarındaki proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüleri (devamı)

4.7 Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Protein miktarları

Miktar mg/ml					
	24 s	**48 s**	**72 s**	**96 s**	**120 s**
Koloni 4	0,075	0,252	0,218	0,223	0,137
Koloni8	0,131	0,185	0,187	0,201	0,139
Koloni 12	0,137	0,322	0,289	0,175	0,112
X-33	0,099	0,192	0,208	0,470	0,111

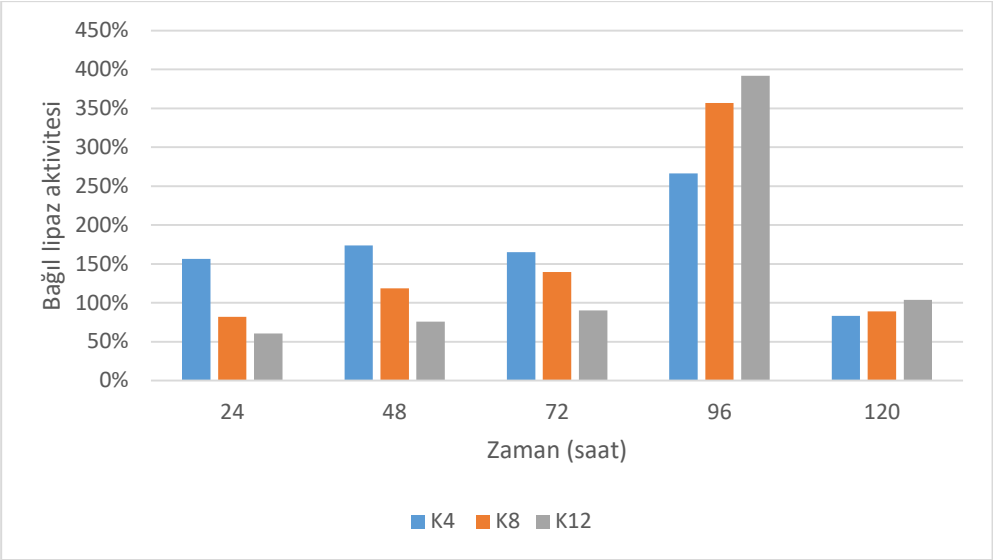
4.8 Enzim Aktivite Analizi

Seçilen örneklerle pNPP substratı kullanılarak aktivite testi yapıldı. 450 µl deney tamponu ile 50 µl protein çözeltisi karıştırıldı. 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 410 nm dalga boyunda absorbanslar ölçüldü ve spesifik aktivite hesaplandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Spesifik enzim aktiviteleri

Spesifik Aktivite (U/mg)					
	24 s	**48 s**	**72 s**	**96 s**	**120 s**
Koloni 4	8,689	4,324	3,475	2,344	3,535
Koloni 8	4,565	2,948	2,937	3,138	3,787
Koloni 12	3,375	1,886	1,897	3,446	4,409
X-33	5,559	2,489	2,103	0,880	4,253

X-33 ekstraselüler proteinleri de pNPP ile esteraz aktivitesi gösterdiği için X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi hesaplandı (Şekil 3.8). Sonuçlara göre en yüksek aktivite 96 saatte 12 numaralı kolonide görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak 12. Koloni büyük ölçekli çalışmalar için seçilmiştir.



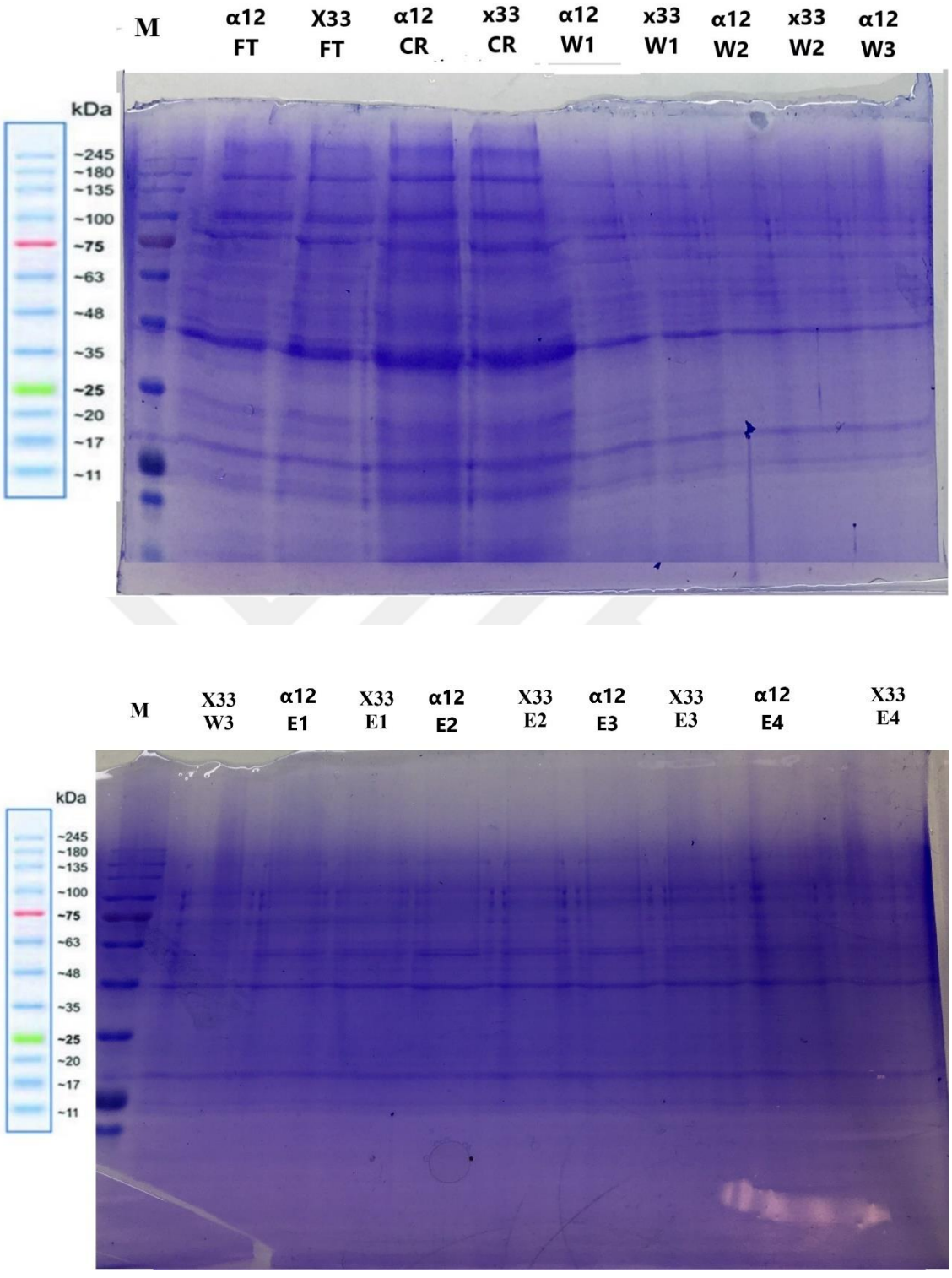
Şekil 4.8 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi

4.9 Seçilen Kolonin *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu

96 saat boyunca büyütülen rekombinant α12 ve kontrol X-33 örnekleri 12000 xg' de 5 dakika çöktürüldü.

4.10 Protein Saflaştırma

Hücre dışı sıvı %80 amonyum sülfat ile 2 saat 4^0C'de inkübe edildi. Sonrasında yüksek hızda 35 dakika çöktürüldükten sonra oluşan pellet fosfat buffer ile çözdürüldü. Proteinler, Ni-NTA Agar bulunan kolonlar kullanılarak saflaştırıldı. Alınan elüsyonlar 30 kDA'lık ultrafiltrasyon tüplerinde birleştirildi. Saflaştırma sonucu yapılan SDS-PAGE sonucunda rekombinant α12 hücrelerinde farklı ve belirgin bir bant gözlemlenmedi (Şekil 3.9).



Şekil 4.9 Kontrol X-33 ve Rekombinant α12'ye ait saflaştırma sonrası proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüleri

4.11 Enzim Aktivite ve Protein Miktar Analizleri

Ultrafiltrasyonla tüm elüsyonlar birleştirilerek elde edilen proteinler ve ham haldeki proteinler pNPP substratı kullanılarak aktivite testi yapıldı. X-33'e bağlı aktivitesi hesaplandığında, elüsyona ait aktivitelerde bu oran 0,96 iken, hücre dışı sıvı total proteine ait oran 0,98 olarak kaydedildi. Protein miktarlarında ise, elüsyonlarda çok düşük bir veri elde edilirken, hücre dışı sıvıya ait total protein miktarı α12'de 0,60 mg/mL, X-33'te ise 0,57 mg/mL olarak kaydedildi.

Tablo 4.3 Spesifik enzim aktiviteleri

Spesifik Aktivite (U/mg)	
X-33 crude	0,04
α12 crude	0,03
X-33 elüsyon	0,02
α12 elüsyon	0,03

4.12 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu

4.12.1 Önkültür Basamağının Optimizasyonu

Önkültür basamağının optimizasyonunda, hücrelerin daha hızlı büyümesi veya hücrelerin daha genç olması gibi durumların ekspresyonu etkileyip etkilemediğini gözlemlemek amaçlanmıştır.

- **Önkültürsüz Büyütme**

Rekombinant α12 ve kontrol X-33 hücreleri, önkültür yapılmadan katı besi yerinden sıvı kültüre inoküle edildi. Ekspresyon sonrası, hücre dışı sıvıya ait total proteinden yapılan aktivite ve protein miktar analizleri sonucunda, rekombinant α12 hücrelerinin protein miktarı 0,25 mg/mL, kontrol X-33 hücrelerinin hücre dışı sıvıdaki total protein miktarı 0,3 mg/mL hesaplanırken, α12'nin X-33'e bağlı

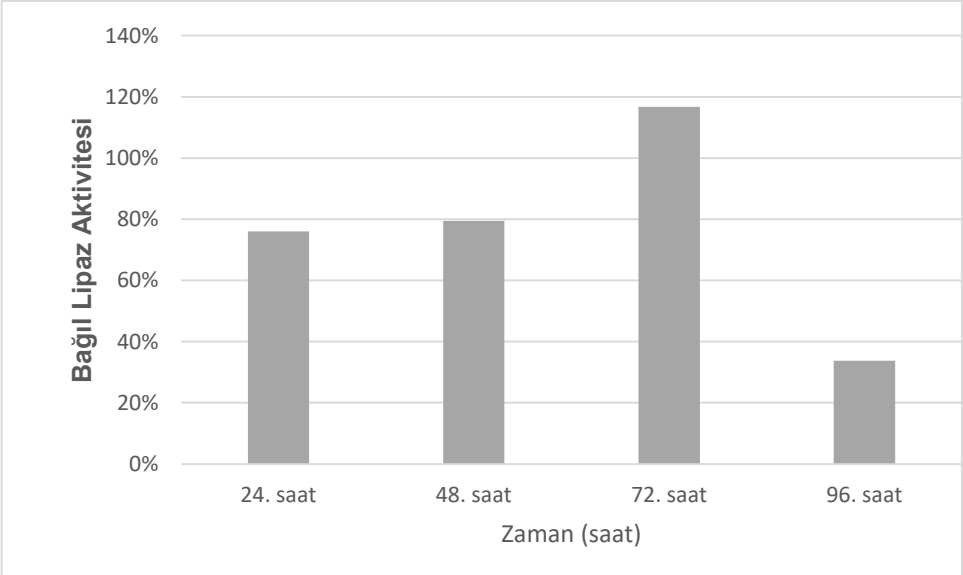
aktivitesi 1,19 olduğu kaydedildi. Rekombinant α12 ve kontrol X-33 hücre dışı total proteinlerine ait spesifik aktiviteleri tablo 3.4'te gösterilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 Spesifik enzim aktiviteleri

Spesifik Aktivite (U/mg)	
α12	3,3
X-33	2,76

- **6 Saatlik Önkültür ile Büyütme**

Ekspresyon sonrası kontrol X-33 ve rekombinant α12 hücrelerinden aktivite ve protein miktar analizleri yapıldı. Hücre dışı total proteinden yapılan aktivite analizleri sonucunda kontrol X-33 ve rekombinant α12 hücrelerine ait spesifik aktivitelerde belirgin fark belirlenemezken, protein miktarlarına ve X-33'e bağlı lipaz aktivite sonuçları şekil 4.10 ve tablo 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.10 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi

Tablo 4.5 Protein miktarları

Miktar (mg/mL)		
	α12	X-33
24. saat	0,09	0,06
48. saat	0,16	0,14
72. saat	0,15	0,14
96. saat	0,19	0,17

- **48 Saatlik Önkültür ile Büyütme**

Kontrol X-33 ve rekombinant α12 hücreleri 48 saat büyütüldükten sonra santrifüj edilerek hücre dışı sıvılar alınıp -80'de saklandı. Hücreler 50 mL besiyerinde tekrar çözdürülerek 24 saat inkübe edildi. Sonrasında tüm kültür çöktürülerek aktivite ve protein analizleri yapıldı. Analizler sonucunda, X-33'e bağlı aktivitelerde belirgin bir fark görülmezken, spesifik aktivite ve protein miktarlarına ait veriler tablo 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.6 Protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri

Miktar (mg/mL)			Spesifik Aktivite (U/mg)		
	α12	X-33		α12	X-33
1.Set	0,38	0,32	1.Set	2,57	3,47
2.Set	0,43	0,42	2.Set	2,21	2,64

4.12.2 Besi yerinin Optimizasyonu

Yüksek ya da düşük miktarda besi yeri ortamının hücrelerin oksijen miktarı ile bağlantılı olması ve bu durumun ekspresyonu ve eksprese olan proteinlerin miktar ve aktivitesi üzerine etkisi olup olmadığı gözlemlemek amaçlandı. Ayrıca,

ekspresyon besi yerine düzenli aralıklarla besin takviyesi yapılması, ekspresyon kültür ortamının pH değerinin değiştirilmesinin eksprese edilen proteinin hücre dışı sıvıda stabil kalıp, aktivitesine etkisi olup olmadığını gözlemlemek amaçlandı.

- **Farklı Miktarlarda Besiyeri Kullanarak İnkübasyon**

100 mL ve 50 mL YPD besiyeri içerisinde X-33 ve α12 hücreleri 96 saat boyunca inkübe edildi. Ekspresyon sonrası yapılan aktivite ve protein miktarı analizleri (Tablo 4.7) sonucunda spesifik aktivitelerde belirgin bir fark görülmedi (Tablo 4.8).

Tablo 4.7 Protein miktarları

Miktar (mg/mL)-50 mL-			Miktar (mg/mL)-100 mL-		
	α12	X-33		α12	X-33
48 saat	0,11	0,05	48 saat	0,17	0,60
72 saat	0,45	0,07	72 saat	0,40	0,40
96 saat	0,34	0,25	96 saat	0,43	0,37

Tablo 4.8 Spesifik enzim aktiviteleri

Spesifik Aktivite (U/mg)-50 mL-			Spesifik Aktivite (U/mg)-100 mL-		
	α12	X-33		α12	X-33
48 saat	1,59	2,39	48 saat	1,34	1,03
72 saat	1,07	1,93	72 saat	1,09	1,09
96 saat	1,12	1,20	96 saat	1,08	1,10

- **Kültür Ortamının pH Değerini Değiştirme**

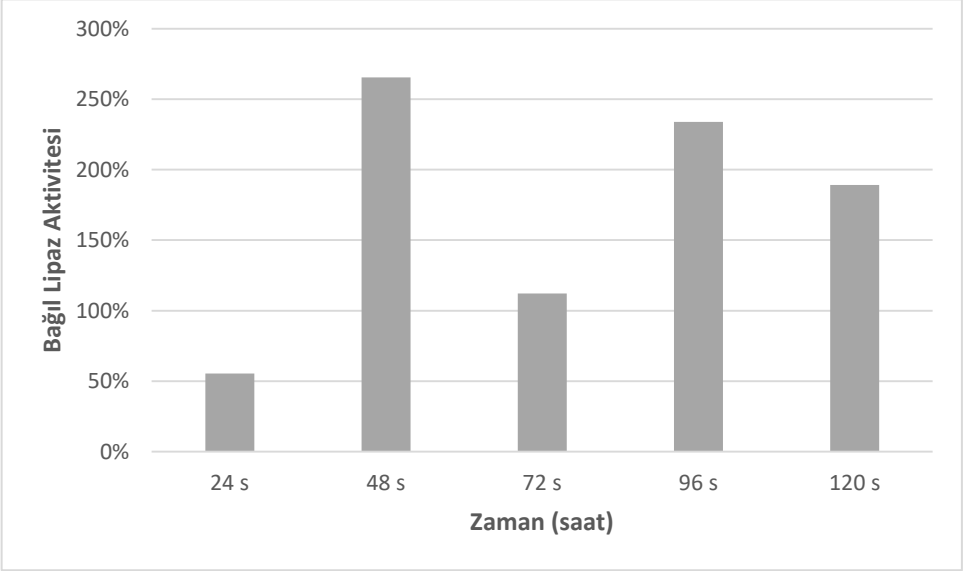
YPD besiyeri içerisine pH değeri 7.5 olan son hali 100 mM olan Tris Buffer eklendi. Kontrol X-33 ve rekombinant α12 hücreleri bu besi yeri içerisinde büyütüldü. 96 saatin sonunda yapılan aktivite ve protein miktar analizleri sonucunda rekombinant α12 hücrelerinin düşük aktivite gösterdiği gözlemlendi.

Tablo 4.9 Protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri

Miktar (mg/mL)		Spesifik Aktivite (U/mg)	
α12	0,58	α12	0,83
X-33	0,46	X-33	1,04

- **Dekstroz ve Maya Özütü ile Eş Besleme**

Ekspresyon kültürü sonrasında yapılan aktivite analizi sonucunda rekombinant α12 hücrelerine ve kontrol X-33 hücre dışı sıvılarına ait protein miktarları arasında belirgin bir fark görülmezken, her iki hücre setinde de oldukça düşük protein konsantrasyonları belirlendi (Tablo 4.10). X-33'e bağlı aktivitelerde diğer saatlere nazaran 48. saatte yüksek aktivite gözlemlendi (Şekil 4.11).



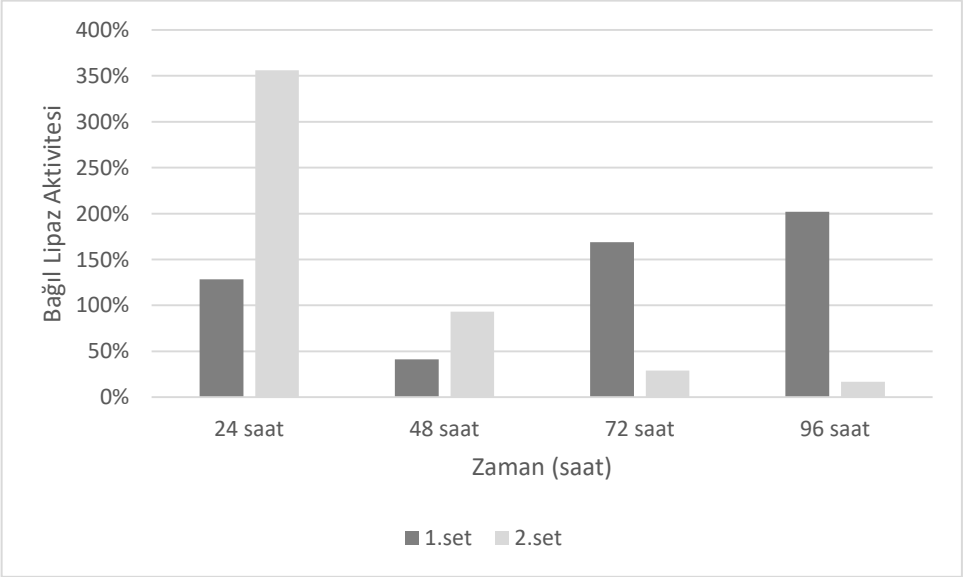
Şekil 4.11 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi

Tablo 4.10 Protein miktarları

Miktar (mg/mL)		
	α12	X-33
24 s	0,09	0,06
48 s	0,10	0,29
72 s	0,23	0,23
96 s	0,28	0,36
120 s	0,34	0,35

- **YNB ve Dekstroz ile Eş Besleme**

İki biyolojik tekrar ile yapılan kültür setlerinden birinde rekombinant α12 hücrelerinin 96 saatte yaklaşık 2 kat aktivite farkı gözlemlenirken, diğer sette 24. Saatte yaklaşık 3 kat fark olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). Protein miktarlarında ise iki set arasında konsantrasyon farklılıkları olduğu görüldü (Tablo 4.11).



Şekil 4.12 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi

Tablo 4.11 Protein miktarları

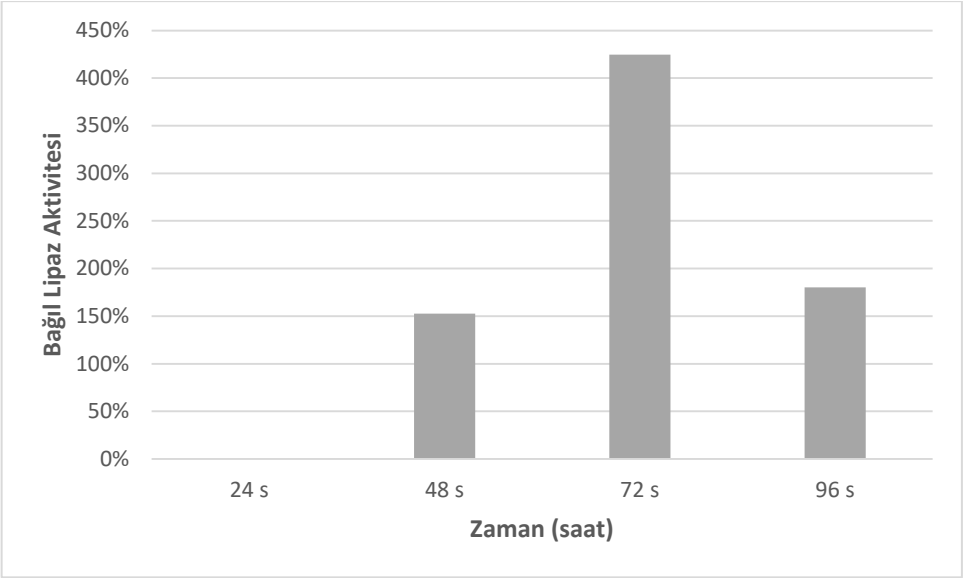
Miktar (mg/mL)			
1.set α12	2.set α12	1.set X-33	2.set X-33
0,08	0,08	0,09	0,15
0,15	0,19	0,16	0,19
0,21	1,75	0,19	0,24
0,16	1,57	0,23	0,13

4.12.3 Ortam Sıcaklığının Optimizasyonu

Ortam sıcaklığının düşürülmesinin, hücre dışı sıvıya salgılanan proteinin aktivitesine etkisi olup olmadığını gözlemlemek amaçlandı.

- **Sıcaklığın 23^0C'ye Düşürülmesi**

X-33 ve α12 hücreleri 50 mL YPD besiyeri içerisinde 23^0C'de 220 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Analizler sonucunda α12 hücrelerinin 72. saatte yaklaşık 4 kat fazla aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.13).



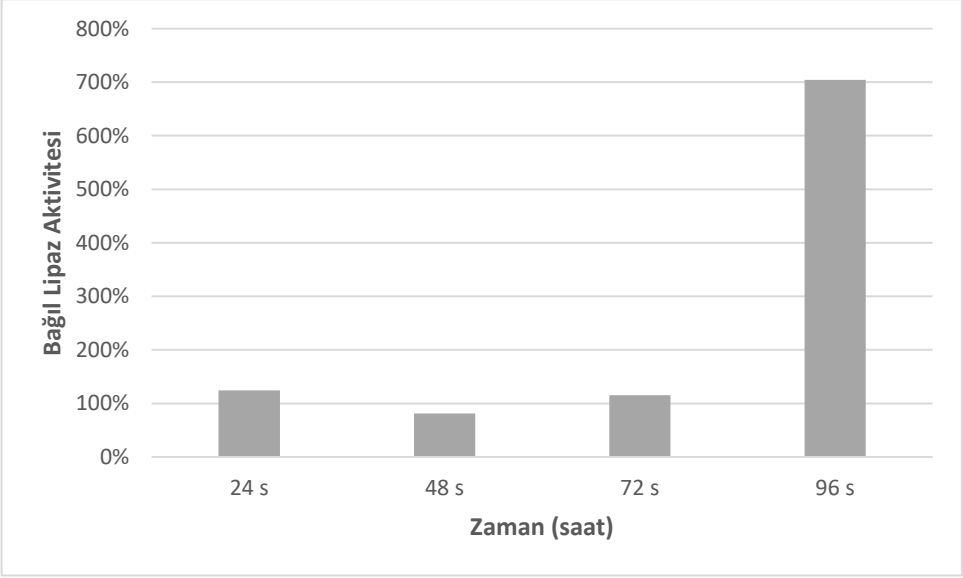
Şekil 4.13 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi

Tablo 4.12 Protein miktarları

Miktar (mg/mL)		
	X-33	α12
24 s	0,27	düşük değer
48 s	1,49	0,17
72 s	1,64	0,06
96 s	1,81	0,28

- **Sıcaklığın 20^0C'ye Düşürülmesi**

Kontrol X-33 ve rekombinant α12 hücrelerine ait hücre dışı proteinlerden yapılan aktivite analizi sonucunda rekombinant α12 hücrelerinin 7 kat daha fazla aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.14). Protein konsantrasyonlarına ait veriler ise Tablo 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14 X-33'e kıyasla % bağıl lipaz aktivitesi

Tablo 4.13 Protein miktarları

Protein Miktarları (mg/mL)				
	24 s	48 s	72 s	96 s
α12	0,17	0,43	0,30	0,20
X-33	0,20	0,42	0,42	0,71

4.12.4 Tampon Çözeltinin Optimizasyonu

Lipaz enziminin hangi pH değerinde en yüksek aktiviteyi gösterdiğini belirlemek amacıyla, aktivite analizleri farklı pH değerlerinde ve farklı molaritelere sahip tampon çözeltiler kullanıldı.

- **50 mM pH:8 Fosfat Buffer ile Aktivite Analizi**

96 saat saat büyütülen kontrol X-33 hücreleri ve rekombinant α12 hücrelerin protein pelletinin çözdürülmesi ve aktivite reaksiyonu için pH değeri 8 olan 50 mM Fosfat tamponu kullanıldı Aktivite ve protein miktar analizleri sonucunda rekombinant α12 hücrelerinin hücre dışı total protein miktarı 0,06 mg/mL iken, X-33'e ait protein miktarı 0,6 mg/mL olarak ölçüldü. X-33'e bağlı lipaz aktivitesinde ise belirgin bir fark belirlenemedi.

- **50 mM pH:8 Tris Buffer ile Aktivite Analizi**

96 saat saat büyütülen kontrol X-33 hücreleri ve rekombinant α12 hücrelerin hücre dışı sıvılarından elde edilen protein pelletinin çözdürülmesi ve aktivite reaksiyonu için pH değeri 8 olan 50 mM Tris tamponu kullanıldı. Rekombinant α12 hücrelerinin spesifik aktivitesi 1,27 U/mg, X-33'e ait spesifik aktivite ise 1,54 U/mg ölçülürken, protein miktarı sırası ile 0,47 mg/mL ve 0,40 mg/mL şeklinde ölçüldü. X-33'e bağlı lipaz aktivitesinde ise belirgin bir fark görülmedi.

- **20 mM pH:6 ve pH:8 Tris Buffer ile Aktivite Analizi**

24 saatin sonunda alınıp aktivite ve protein miktar analizleri için çöktürülen recombinant α12 ve kontrol X-33 hücrelerinin hücre dışı total protein pelletleri öncelikle pH:6 Tris ile çözdürülüp pH değeri 8 olan Tris buffer ve pH değeri 6 olan Tris Buffer ile reaksiyon karışımı hazırlandı. α12'ye ve X-33'e ait spesifik

aktiviteler tablo 4.14 'te gösterilmiştir. X-33'e bağlı lipaz aktivitesinde pH 6'da 2,4 iken pH 8'de 2,1 olarak hesaplandı. X-33 hücrelerine ait protein konsantrasyonu 0,75 mg/mL iken, α12'ye ait protein konsantrasyonu 0,52 mg/mL olarak hesaplandı.

Tablo 4.14 Spesifik enzim aktiviteleri

pH 8		pH 6	
Spesifik Aktivite (U/mg)		Spesifik Aktivite (U/mg)	
α12	2,11	α12	3,3
X-33	0,98	X-33	1,37

- **20 mM pH 7, pH 8 ve pH 6 Tris Buffer ile Aktivite Analizi**

Protein pelletleri pH değeri 7 olan 20 mM Tris Buffer ile çözdürüldü. Aktivite analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı için ise hem pH değeri 6 olan hem de pH değeri 8 olan 20 mM Tris buffer kullanıldı. Analiz sonucunda pH değeri 6 olan reaksiyonda rekombinant α12'nin spesifik aktivitesi 1,31 U/mg, kontrol X-33 spesifik aktivitesi 1,29 U/mg olarak hesaplandı. Protein miktarları ise, rekombinant α12'de 0,35 mg/mL iken kontrol X-33'te 0,38 mg/mL olarak hesaplandı. pH değeri 8 olan reaksiyonda ise rekombinant α12'nin spesifik aktivitesi 1,80 U/mg, kontrol X-33 spesifik aktivitesi 1,49 U/mg olarak hesaplandı. Her iki pH değerinde de X-33'e bağlı lipaz aktivitesinde belirgin bir fark gözlemlenmedi.

4.13 Tartışma ve Öneriler

Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada zeytin yaprak lipazına ait tam uzunlukta cDNA dizisi klonlandı [127] ve farklı ekspresyon vektörü kullanılarak, çeşitli ekspresyon denemeleri yapıldı. Tübitak 217Z71 numaralı 1002 projesi kapsamında yapılan bu çalışmalar sonucunda tekrarlanabilir ve tutarlı sonuçlar elde edilemedi. Daha sonraki çalışmalarda ise yine rekombinant lipaz enziminin aktivite ve protein miktarlarında belirgin bir fark ve artış görülemezken, yapılan

tüm aktivite analizlerinde, zeytin yaprak lipazının pH 8-9 aralığında ve 35^0C de nispeten daha fazla aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Proteinin, konakçı organizmanın kodon kullanımına uygun şekilde modifiye edilmesi, eksprese edilen proteinin hücre dışına salgılanabilmesi için gereken salgı sinyal faktörlerinin eklenmesi gibi optimizasyonların protein ekspresyonunda artışı etkilediği literatürdeki çalışmalarda rapor edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, zeytin yaprak lipazının *Pichia pastoris*'te ekspresyon miktar ve verimini arttırmak amacıyla, lipaza ait doğal salgı sinyal dizisi çıkarılmadan Pichia kodon kullanımına uygun optimizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan ilk denemede, rekombinant koloniye ait spesifik aktivitenin kontrol hücrelere ait spesifik aktiviteden 4 kat daha fazla olduğu görüldü. Ancak aynı şartlar altında yapılan bir sonraki deney setinde benzer ve tutarlı sonuçlara ulaşılamadı. Ortam sıcaklığının düşürülmesi üzerine yapılan optimizasyonlarda, 20^0C'de 7 kat aktivite farkı görülürken, 23^0C'de yapılan kültür setinde rekombinant hücrelere ait spesifik aktivitede kontrol X-33 hücrelerine göre yaklaşık 4 kat fark olduğu görüldü. Ancak aynı şartlar altında deneyler yinelendiğinde, aynı sonuçlar elde edilemedi.

Daha sonraki deneylerde, hücrelerin daha hızlı büyümesini ve ekspresyon verimini arttırmak amacıyla, besi yerine glukoz ve maya özütü eklenerek eş besleme yapıldı. Bu deney setinde 48. saatte daha yüksek aktivite gösterdiği görülürken, YNB ve glukoz ile eş besleme yapılan iki tekrarlı deney setinde, 24, 72 ve 96. saatlerde aktivite farkı olduğu gözlemlendi. Yapılan bu optimizasyon denemeleri sonucunda, tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemezken, tüm deney sonuçlarına bakıldığında, 96. saatte elde edilen örneklerde nispeten daha fazla ve tutarlı aktivite farkı olduğu görülmektedir.

Yapılan ekspresyon denemeleri sonucunda hücre dışı sıvıya ait proteinlerde hem aktivitede hem de miktarlarında belirgin artış olmadığı gözlemlendi. Doğal sinyal dizisinin, lipaz enziminin transkripsyon ve ekspresyon verimini düşürmesi, proteinin translokasyonunun yanlış gerçekleştirilmesine neden olduğu, ayrıca hücre dışına sentezlenen proteinlerin, proteazlar tarafından degrede edildiği ihtimali düşünülmektedir. Bu faktörler göz önünde bulundurularak, lipaz doğal sinyal dizisi çıkartılarak yeni primer tasarlandı. α-sinyal faktörü bulunan vektör ile

hücre dışı ekspresyon denemeleri yapılmak üzere *Pichia pastoris* genomuna entegre edildi. Sonraki çalışmalarda ekspresyon ve aktivite analizlerine devam edilecektir.

KAYNAKÇA

[1] A. C. de Romo, "Tallow and the Time Capsule: Claude Bernard's Discovery of the Pancreatic Digestion of Fat," *History and Philosophy of the Life Sciences*, vol. 11, no. 2, pp. 253–274, 1989, [Online]. Available: http://www.jstor.org/stable/23330351

[2] L. Casas-Godoy, S. Duquesne, F. Bordes, G. Sandoval, and A. Marty, "Lipases: An overview," *Methods in Molecular Biology*, vol. 861. pp. 3–30, 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-600-5_1.

[3] N. Sarmah *et al.*, "Recent advances on sources and industrial applications of lipases," *Biotechnology Progress*, vol. 34, no. 1, pp. 5–28, Jan. 2018, doi: 10.1002/BTPR.2581.

[4] M. Kapoor and M. N. Gupta, "Lipase promiscuity and its biochemical applications," *Process Biochemistry*, vol. 47, no. 4. pp. 555–569, Apr. 2012. doi: 10.1016/j.procbio.2012.01.011.

[5] K. C. Santos *et al.*, "Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils," *Industrial Crops and Products*, vol. 49, pp. 462–470, 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.05.035.

[6] N. B. Melani, E. B. Tambourgi, and E. Silveira, "Lipases: From Production to Applications," *Separation and Purification Reviews*, vol. 49, no. 2. Taylor and Francis Inc., pp. 143–158, Apr. 02, 2020. doi: 10.1080/15422119.2018.1564328.

[7] M. Karbalaei, S. A. Rezaee, and H. Farsiani, "Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 235, no. 9. Wiley-Liss Inc., pp. 5867–5881, Sep. 01, 2020. doi: 10.1002/jcp.29583.

[8] J. L. Cereghino and J. M. Cregg, "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris," 1999, Accessed: May 19, 2022. [Online]. Available: www.fems-microbiology.org

[9] Ö. Ata *et al.*, "Recombinant protein production in Pichia pastoris under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 95, pp. 20–36, 2015, doi: 10.1016/j.bej.2014.12.003.

[10] R. Hershberg and D. A. Petrov, "Selection on codon bias," *Annual Review of Genetics*, vol. 42, pp. 287–299, 2008, doi: 10.1146/ANNUREV.GENET.42.110807.091442.

[11] N. N. Gandhi, "Applications of lipase," *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 74, no. 6. American Oil Chemists' Society, pp. 621–634, 1997. doi: 10.1007/s11746-997-0194-x.

[12] Z. Amini, H. C. Ong, M. D. Harrison, F. Kusumo, H. Mazaheri, and Z. Ilham, "Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of Ocimum

basilicum L. (sweet basil) seed oil," *Energy Conversion and Management*, vol. 132, pp. 82–90, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.enconman.2016.11.017.

[13] S. Rani and S. Jagtap, "Acceleration of Swiss cheese ripening by microbial lipase without affecting its quality characteristics," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 56, no. 1, pp. 497–506, Jan. 2019, doi: 10.1007/s13197-018-3482-6.

[14] G. J. Moskowitz, R. Cassaigne, I. R. West, T. Shen, and L. I. Feldman, "Hydrolysis of Animal Fat and Vegetable Oil with Mucor miehei Esterase. Properties of the Enzyme," 1977.

[15] Q. Peng *et al.*, "Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production," 2014. [Online]. Available: http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/1

[16] F. J. Contesini *et al.*, "Advances in recombinant lipases: Production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry," *Catalysts*, vol. 10, no. 9, pp. 1–33, Sep. 2020, doi: 10.3390/catal10091032.

[17] P. Helistö and T. Korpela, "Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method," 1998.

[18] R. Verger, "Interfacial activation of lipases facts and artifacts," 1997.

[19] G. Angajala, P. Pavan, and R. Subashini, "Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 7. Elsevier Ltd, pp. 257–270, Jul. 01, 2016. doi: 10.1016/j.bcab.2016.07.001.

[20] F. I. Khan, D. Lan, R. Durrani, W. Huan, Z. Zhao, and Y. Wang, "The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, no. MAR, Mar. 2017, doi: 10.3389/FBIOE.2017.00016.

[21] A. Mehta, U. Bodh, and R. Gupta, "Fungal lipases: a review," *Journal of Biotech Research*, vol. 8, pp. 58–77, 2017, Accessed: Jan. 09, 2022. [Online]. Available: http://www.led.uni-stuttgart.de

[22] K. C. Santos *et al.*, "Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils," *Industrial Crops and Products*, vol. 49, pp. 462–470, 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.05.035.

[23] S. Seth, D. Chakravorty, V. K. Dubey, and S. Patra, "An insight into plant lipase research - Challenges encountered," *Protein Expression and Purification*, vol. 95. pp. 13–21, Mar. 2014. doi: 10.1016/j.pep.2013.11.006.

[24] A. R. Macrae and R. C. Hammond, "Present and future applications of lipases," *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 3, no. 1, pp. 193–217, 1985, doi: 10.1080/02648725.1985.10647813.

[25] L. Sarda and P. Desnuelle, “Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion,” *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 30, no. 3, pp. 513–521, 1958, doi: 10.1016/0006-3002(58)90097-0.

[26] B. Fritz Schbnheyder and K. Volqvartz, “On the Affinity of Pig Pancreas Lipase for Tricaproin in Heterogeneous Solution,” 1944.

[27] K. Holwerda, P. E. Verkade, and A. H. A. de Willigen, “Vergleichende Untersuchungen über die Verseifungsgeschwindigkeit einiger Einsäuriger Triglyceride unter Einfluss von Pankreasextrakt. I. Der Einfluss des Verteilungszustandes der Triglyceride auf die Verseifungsgeschwindigkeit,” *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, vol. 55, no. 1, pp. 43–57, Jan. 1936, doi: 10.1002/RECL.19360550108.

[28] P. Fojan, P. H. Jonson, M. T. N. Petersen, and S. B. Petersen, “What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach,” 2000. [Online]. Available: http://www.rcsb.org.

[29] B. Vasel, H.-J. Hecht, R. D. Schmid, and D. Schomburg, “3D-Structures of the lipase from Rhizomucor miehei at different temperatures and computer modelling of a complex of the lipase with trilaurylglycerol,” 1993.

[30] A. R. Macrae and R. C. Hammond, “Present and Future Applications of Lipases,” *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 3, no. 1, pp. 193–218, 1985, doi: 10.1080/02648725.1985.10647813.

[31] F. K. Winkler, A. D’Arcy, and W. Hunziker, “Structure of human pancreatic lipase,” *Nature 1990 343:6260*, vol. 343, no. 6260, pp. 771–774, 1990, doi: 10.1038/343771a0.

[32] S. Brocca, F. Secundo, M. Ossola, L. Alberghina, G. Carrea, and M. Lotti, “Sequence of the lid affects activity and specificity of Candida rugosa lipase isoenzymes,” 2003, doi: 10.1110/ps.0304003.

[33] F. I. Khan, D. Lan, R. Durrani, W. Huan, Z. Zhao, and Y. Wang, “The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, no. MAR. Frontiers Media S.A., Mar. 09, 2017. doi: 10.3389/fbioe.2017.00016.

[34] F. J. Contesini *et al.*, “Advances in recombinant lipases: Production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry,” *Catalysts*, vol. 10, no. 9, pp. 1–33, Sep. 2020, doi: 10.3390/catal10091032.

[35] G. M. Borrelli and D. Trono, “Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications,” *International Journal of Molecular Sciences 2015, Vol. 16, Pages 20774-20840*, vol. 16, no. 9, pp. 20774–20840, Sep. 2015, doi: 10.3390/IJMS160920774.

[36] D. L. Ollis and P. D. Carr, “α/βHydrolase Fold: An Update,” *Protein & Peptide Letters*, vol. 16, no. 10, pp. 1137–1148, Aug. 2009, doi: 10.2174/092986609789071298.

[37] C. D. Anobom *et al.*, "Review Article From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases," 2014, doi: 10.1155/2014/684506.

[38] C. C. Akoh, G. C. Lee, Y. C. Liaw, T. H. Huang, and J. F. Shaw, "GDSL family of serine esterases/lipases," *Progress in Lipid Research*, vol. 43, no. 6. pp. 534–552, Nov. 2004. doi: 10.1016/j.plipres.2004.09.002.

[39] R. Gupta, A. Kumari, P. Syal, and Y. Singh, "Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology," *Progress in Lipid Research*, vol. 57, pp. 40–54, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2014.12.001.

[40] D. Sharma, B. Sharma, and A. K. Shukla, "Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review," *Biotechnology*, 2011, doi: 10.3923/biotech.2011.23.40.

[41] J. S. White and D. Chong. White, "Source book of enzymes," p. 1306, 1997, Accessed: Jan. 30, 2022. [Online]. Available: https://www.routledge.com/Source-Book-of-Enzymes/White-White/p/book/9780849394706

[42] S. Thakur, "Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review," *International Journal of Scientific & Engineering Research*, vol. 3, no. 7, 2012, Accessed: Jan. 30, 2022. [Online]. Available: http://www.ijser.org

[43] Y. v. Samoylova, K. N. Sorokina, A. v. Piligaev, and V. N. Parmon, "Application of Bacterial Thermostable Lipolytic Enzymes in the Modern Biotechnological Processes: A Review," *Catalysis in Industry*, vol. 11, no. 2, pp. 168–178, Apr. 2019, doi: 10.1134/S2070050419020107/TABLES/1.

[44] P. Kanmani, K. Kumaresan, and J. Aravind, "Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in Staphylococcus pasteuri," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 18, no. 1, pp. 20–28, 2015, doi: 10.1016/J.EJBT.2014.11.003.

[45] J. Atalah, P. Cáceres-Moreno, G. Espina, and J. M. Blamey, "Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts," *Bioresource Technology*, vol. 280, pp. 478–488, May 2019, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2019.02.008.

[46] A. Navvabi, M. Razzaghi, P. Fernandes, L. Karami, and A. Homaei, "Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications," *Process Biochemistry*, vol. 70, pp. 61–70, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2018.04.018.

[47] C. Zhang and S. K. Kim, "Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects," *Marine Drugs*, vol. 8, no. 6, p. 1920, 2010, doi: 10.3390/MD8061920.

[48] S. M. Basheer, S. Chellappan, P. S. Beena, R. K. Sukumaran, K. K. Elyas, and M. Chandrasekaran, "Lipase from marine Aspergillus awamori BTMFW032:

Production, partial purification and application in oil effluent treatment," *New Biotechnology*, vol. 28, no. 6, 2011, doi: 10.1016/j.nbt.2011.04.007.

[49] E. J. Herrera-López, "Lipase and phospholipase biosensors: a review," *Methods Mol Biol*, vol. 861, pp. 525–543, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-600-5_30.

[50] A. ben Bacha, A. Karray, E. Bouchaala, Y. Gargouri, and Y. ben Ali, "Purification and biochemical characterization of pancreatic phospholipase A2 from the common stingray Dasyatis pastinaca," *Lipids in Health and Disease*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2011, doi: 10.1186/1476-511X-10-32/TABLES/4.

[51] H. Kishimura, "Enzymatic Properties of Starfish Phospholipase A2 and Its Application," 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-416003-3.00029-9.

[52] V. M. Pahoja and M. A. Sethar, "A review of enzymatic properities of lipases," *Journal of Applied Sciences*, vol. 2, no. 4, pp. 474–484, 2002, doi: 10.3923/jas.2002.474.484.

[53] K. C. Santos *et al.*, "Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils," *Industrial Crops and Products*, vol. 49, pp. 462–470, 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.05.035.

[54] P. You, E. Su, X. Yang, D. Mao, and D. Wei, "Carica papaya lipase-catalyzed synthesis of terpene esters," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 71, no. 3–4, pp. 152–158, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.molcatb.2011.04.012.

[55] J. S. de Sousa, E. d. A. Cavalcanti-Oliveira, D. A. G. Aranda, and D. M. G. Freire, "Application of lipase from the physic nut (Jatropha curcas L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 65, no. 1–4, pp. 133–137, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.molcatb.2010.01.003.

[56] V. N. Enujiugha, F. A. Thani, T. M. Sanni, and R. D. Abigor, "Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (Pentaclethra macrophylla Benth)," *Food Chemistry*, vol. 88, no. 3, pp. 405–410, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.01.052.

[57] P. P. Polizelli, M. J. Tiera, and G. O. Bonilla-Rodriguez, "Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of pachira aquatica," *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 85, no. 8, pp. 749–753, Aug. 2008, doi: 10.1007/s11746-008-1259-1.

[58] K. C. Santos *et al.*, "Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils," *Industrial Crops and Products*, vol. 49, pp. 462–470, 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.05.035.

[59] C. H. Okino-Delgado and L. F. Fleuri, "Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing," *Food Chemistry*, vol. 163, pp. 103–107, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2014.04.090.

[60] D. ABIGOR, F. OPUTE, A. OPOKU, and A. OSAGIE, "Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (Elaeis guineensis) mesocarp," 1985. https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301458272 (accessed Feb. 17, 2022).

[61] Kapranchikov VS, Zherebtsov NA, and Popova TN, "Purification and characterization of lipases from wheat germ," *Prikl Biokhim Mikrobiol*, pp. 98–103, 2004.

[62] P. Domínguez de María, J. v. Sinisterra, S. W. Tsai, and A. R. Alcántara, "Carica papaya lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst," *Biotechnology Advances*, vol. 24, no. 5, pp. 493–499, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2006.04.002.

[63] N. N. Gandhi and K. D. Mukherjee, "Specificity of Papaya Lipase in Esterification with Respect to the Chemical Structure of Substrates," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 566–570, Feb. 2000, doi: 10.1021/JF991069X.

[64] R. W. Moussavou Mounguengui, C. Brunschwig, B. Baréa, P. Villeneuve, and J. Blin, "Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production?," *Progress in Energy and Combustion Science*, vol. 39, no. 5. pp. 441–456, Oct. 2013. doi: 10.1016/j.pecs.2013.05.003.

[65] L. Salwoom *et al.*, "New Recombinant Cold-Adapted and Organic Solvent Tolerant Lipase from Psychrophilic Pseudomonas sp. LSK25, Isolated from Signy Island Antarctica," 2019, doi: 10.3390/ijms20061264.

[66] Z. Li, X. Li, Y. Wang, Y. Wang, F. Wang, and J. Jiang, "Expression and characterization of recombinant Rhizopus oryzae lipase for enzymatic biodiesel production," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 20, pp. 9810–9813, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2011.07.070.

[67] J. M. Robert *et al.*, "Production of recombinant lipase B from Candida antarctica in Pichia pastoris under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 118, pp. 123–131, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.BEJ.2016.11.018.

[68] R. Sharma, Y. Chisti, and U. Chand Banerjee, "Production, purification, characterization, and applications of lipases," 2001.

[69] G. Gerritse, R. W. J. Hommes, and W. J. Quax, "Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant Pseudomonas alcaligenes strain," *Appl Environ Microbiol*, vol. 64, no. 7, pp. 2644–2451, 1998, doi: 10.1128/AEM.64.7.2644-2651.1998.

[70] S.-J. Chen, C.-Y. Cheng, and T.-L. Chen, "Production of an Alkaline Lipase by Achetobacter radioresistens," 1998.

[71] F. Pabai, • S Kermasha, • A Morin, and A. Morin, "Lipase from Pseudomonas fragi CRDA 323: Partial purification, characterization and interesterification of butter fat," 1995.

[72] D. Undurraga, A. Markovits, and S. Erazo, “Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction,” *Process Biochemistry*, vol. 36, no. 10, pp. 933–939, 2001, doi: 10.1016/S0032-9592(00)00260-0.

[73] H. T. Osborn and C. C. Akoh, “Structured Lipids-Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications,” 2002.

[74] T. Yang, X. Xu, C. He, and L. Li, “Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes,” 2002. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/foodchem

[75] A. Houde, A. Kademi, and D. Leblanc, “Lipases and Their Industrial Applications,” 2004.

[76] E. E. Kheadr, J. C. Vuillemard, and S. A. El-Deeb, “Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening,” 2002. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/foodres

[77] W. Bonrath, R. Karge, and T. Netscher, “Lipase-catalyzed transformations as key-steps in the large-scale preparation of vitamins,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 19–20, pp. 67–72, Dec. 2002, doi: 10.1016/S1381-1177(02)00152-2.

[78] A. Sikora, T. Siódmiak, and M. P. Marszałł, “Kinetic Resolution of Profens by Enantioselective Esterification Catalyzed by Candida antarctica and Candida rugosa Lipases,” *Chirality*, vol. 26, no. 10, pp. 663–669, Oct. 2014, doi: 10.1002/CHIR.22362.

[79] M. G. Kim, E. G. Lee, and B. H. Chung, “Improved enantioselectivity of Candida rugosa lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment,” *Process Biochemistry*, vol. 35, no. 9, pp. 977–982, May 2000, doi: 10.1016/S0032-9592(00)00129-1.

[80] J. Ceynowa and M. Rauchfleisz, “High enantioselective resolution of racemic 2-arylpropionic acids in an enzyme membrane reactor,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 23, no. 1, pp. 43–51, Aug. 2003, doi: 10.1016/S1381-1177(03)00066-3.

[81] A. Sikora, T. Siódmiak, and M. P. Marszałł, “Kinetic Resolution of Profens by Enantioselective Esterification Catalyzed by Candida antarctica and Candida rugosa Lipases,” *Chirality*, vol. 26, no. 10, pp. 663–669, Oct. 2014, doi: 10.1002/CHIR.22362.

[82] P. D. O. Carvalho, F. J. Contesini, and M. Ikegaki, “Enzymatic resolution of (R,S)-ibuprofen and (R,S)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 37, no. 3, pp. 329–337, Jul. 2006, doi: 10.1590/S1517-83822006000300024.

[83] T. Siódmiak, D. Mangelings, Y. vander Heyden, M. Ziegler-Borowska, and M. P. Marszałł, “High Enantioselective Novozym 435-Catalyzed Esterification of (R,S)-Flurbiprofen Monitored with a Chiral Stationary Phase,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 175, no. 5, pp. 2769–2785, Mar. 2015, doi: 10.1007/S12010-014-1455-4/TABLES/4.

[84] V. C. F. da Silva, F. J. Contesini, and P. de Oliveira Carvalho, "Enantioselective behavior of lipases from Aspergillus niger immobilized in different supports," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 36, no. 7, pp. 949–954, Jul. 2009, doi: 10.1007/S10295-009-0573-4.

[85] N. A. Baeshen *et al.*, "Cell factories for insulin production," *Microbial Cell Factories*, vol. 13, no. 1, pp. 1–9, Oct. 2014, doi: 10.1186/S12934-014-0141-0/TABLES/3.

[86] A. R. Gomes, S. M. Byregowda, B. M. Veeregowda, and V. Balamurugan, "An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins," *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, vol. 4, no. 7, pp. 346–356, 2016, doi: Http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356.

[87] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, "Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, no. APR, p. 172, 2014, doi: 10.3389/FMICB.2014.00172/BIBTEX.

[88] F. M. Wurm, "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells," *Nature Biotechnology*, vol. 22, no. 11, pp. 1393–1398, Nov. 2004, doi: 10.1038/NBT1026.

[89] V. Picanco-Castro, M. Freitas, A. Bomfim, and E. Russo, "Patents in therapeutic recombinant protein production using mammalian cells," *Recent Pat Biotechnol*, vol. 8, no. 2, pp. 165–171, Sep. 2014, doi: 10.2174/1872208309666140904120404.

[90] J. Yin, G. Li, X. Ren, and G. Herrler, "Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes," *Journal of Biotechnology*, vol. 127, no. 3, pp. 335–347, Jan. 2007, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2006.07.012.

[91] K. Hayat Khan, "Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications," *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 3, no. 2, pp. 257–263, 2013, doi: 10.5681/apb.2013.042.

[92] R. Daly and M. T. W. Hearn, "Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production," *J Mol Recognit*, vol. 18, no. 2, pp. 119–138, Mar. 2005, doi: 10.1002/JMR.687.

[93] B. A. Rasala and S. P. Mayfield, "Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses," 2015, doi: 10.1007/s11120-014-9994-7.

[94] R. J. Zahrl, D. A. Peña, D. Mattanovich, and B. Gasser, "Systems biotechnology for protein production in Pichia pastoris," *FEMS Yeast Res*, vol. 17, no. 7, Nov. 2017, doi: 10.1093/FEMSYR/FOX068.

[95] A. Guilliermond, "Zygosaccharomyces Pastori, nouvelle espèce de levures à copulation hétérogamique - Alexandre Guilliermond - Google Kitaplar," 1920. https://books.google.com.tr/books/about/Zygosaccharomyces_Pastori_nou

velle_esp%C3%A8.html?id=SQU-MwEACAAJ&redir_esc=y (accessed Jun. 14, 2022).

[96] H. J. Phaff, M. W. Miller, and M. Shifrine, "THE TAXONOMY OF YEASTS ISOLATED FROM DROSOPHILA IN THE YOSEMITE REGION OF CALIFORNIA by," 1956.

[97] C. P. Kurtzman, "Description of Komagataella phaffii sp. nov. and the transfer of Pichia pseudopastoris to the methylotrophic yeast genus Komagataella," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, pp. 973–976, 2005, doi: 10.1099/ijs.0.63491-0.

[98] Y. Yamada, M. Matsuda, K. Maeda, and K. Mikata, "The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of Komagataella gen. nov. (Saccharomycetaceae)," 1995. doi: 10.1271/bbb.59.439.

[99] D. Dikicioglu, V. Wood, K. M. Rutherford, M. D. McDowall, and S. G. Oliver, "Improving functional annotation for industrial microbes: a case study with Pichia pastoris," *Trends in Biotechnology*, vol. 32, no. 8, pp. 396–399, Aug. 2014, doi: 10.1016/J.TIBTECH.2014.05.003.

[100] D. R. Higgins and J. Cregg, "Pichia Protocols," *Pichia Protocols*, May 1998, doi: 10.1385/0896034216.

[101] G. P. L. Cereghino, J. L. Cereghino, C. Ilgen, and J. M. Cregg, "Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, no. 4, pp. 329–332, Aug. 2002, doi: 10.1016/S0958-1669(02)00330-0.

[102] G. P. L. Cereghino, A. J. Sunga, J. L. Cereghino, and J. M. Cregg, "Expression of foreign genes in the yeast Pichia pastoris," *Genet Eng (N Y)*, vol. 23, pp. 157–169, Jan. 2001, doi: 10.1007/0-306-47572-3_9.

[103] G. Gellissen, "Heterologous protein production in methylotrophic yeasts," 2000.

[104] S. Macauley-Patrick, M. L. Fazenda, B. McNeil, and L. M. Harvey, "Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system," *Yeast*, vol. 22, no. 4. pp. 249–270, Mar. 2005. doi: 10.1002/yea.1208.

[105] A. H. Rose, J. Gareth. Morris, and D. W. Tempest, *Advances in microbial physiology. Volume 24*. Academic Press, 1983.

[106] M. Veenhuis, J. P. V. Dijken, and W. Harder, "The Significance of Peroxisomes in the Metabolism of One-Carbon Compounds in Yeasts," *Advances in Microbial Physiology*, vol. 24, no. C, pp. 1–82, Jan. 1983, doi: 10.1016/S0065-2911(08)60384-7.

[107] F. S. Hartner and A. Glieder, "Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts," *Microbial Cell Factories*, vol. 5. 2006. doi: 10.1186/1475-2859-5-39.

[108] Gerd. Gellissen, “Hansenula polymorpha : biology and applications,” p. 347, 2002.

[109] R. Roggenkamp, Z. Janowiez, B. Stanikowski, and C. P. Hollenberg, “Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha,” 1984.

[110] M. Q. Stewart, R. D. Esposito, J. Gowani, and J. M. Goodman, “Alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase, the abundant peroxisomal proteins of methylotrophic yeasts, assemble in different cellular compartments,” *J Cell Sci*, vol. 114, no. Pt 15, pp. 2863–2868, 2001, doi: 10.1242/JCS.114.15.2863.

[111] J. M. Cregg, K. R. Madden, K. J. Barringer, G. P. Thill, and C. A. Stillman, “Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast Pichia pastoris,” 1989.

[112] J. F. Tschopp, P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman, and T. R. Gingeras, “Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in Pichia pastons,” *Nucleic Acids Research*, vol. 15, 1987.

[113] C. Menéndez, L. Hernández, A. Banguela, and J. País, “Functional production and secretion of the Gluconacetobacter diazotrophicus fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in Pichia pastoris,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 34, no. 5, pp. 446–452, Apr. 2004, doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2003.11.018.

[114] V. Uturuand and J. C. Wu, “Heterologous Protein Expression in Pichia pastoris:L atest Research Progress and Applications,” 2018. [Online]. Available: www.chembiochem.org

[115] T. Vogl and A. Glieder, “Regulation of Pichia pastoris promoters and its consequences for protein production,” *New Biotechnology*, vol. 30, no. 4. pp. 385–404, May 25, 2013. doi: 10.1016/j.nbt.2012.11.010.

[116] H. R. Waterham, M. E. Digan, P. J. Koutz, S. v. Lair, and J. M. Cregg, “Isolation of the Pichia pastoris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter,” *Gene*, vol. 186, no. 1, pp. 37–44, Feb. 1997, doi: 10.1016/S0378-1119(96)00675-0.

[117] K. Baumann, M. Maurer, M. Dragosits, O. Cos, P. Ferrer, and D. Mattanovich, “Hypoxic fed-batch cultivation of Pichia pastoris increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 100, no. 1, pp. 177–183, May 2008, doi: 10.1002/bit.21763.

[118] H. L. Chen *et al.*, “Production and Characterization of Human Extracellular Superoxide Dismutase in the Methylotrophic Yeast Pichia pastoris,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 21, pp. 8041–8047, Oct. 2006, doi: 10.1021/JF061379X.

[119] J. M. Zhou *et al.*, “Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in Pichia. pastoris,” *Virus Genes*, vol. 33, no. 1, pp. 27–32, Aug. 2006, doi: 10.1007/S11262-005-0036-6/FIGURES/4.

[120] J. L. Ding, E. H. Lim, H. F. Li, J. K. Kumar, S. L. Lee, and T. J. Lam, "Expression of Recombinant Vitellogenin in the Yeast Pichia pastoris," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 85, no. 3, pp. 330–339, Feb. 2004, doi: 10.1002/BIT.10800.

[121] A. L. Zhang *et al.*, "Constitutive expression of human angiostatin in Pichia pastoris by high-density cell culture," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 34, no. 2, pp. 117–122, Feb. 2007, doi: 10.1007/S10295-006-0175-3.

[122] F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, and R. J. Watts-Tobin, "General Nature of the Genetic Code for Proteins," *Nature 1961 192:4809*, vol. 192, no. 4809, pp. 1227–1232, 1961, doi: 10.1038/1921227a0.

[123] D. Raab, M. Graf, F. Notka, T. Schödl, and R. Wagner, "The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization," 2010, doi: 10.1007/s11693-010-9062-3.

[124] H. Hu *et al.*, "Codon optimization Significiantly Improves The Expression Level Of a Keratinase Gene in Pichia pastoris," 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0058393.

[125] S.-W. Chang, G.-C. Lee, and J.-F. Shaw, "Codon Optimization of Candida rugosa lip1 Gene for Improving Expression in Pichia pastoris and Biochemical Characterization of the Purified Recombinant Lip1 Gene," 2006.

[126] A. Yadava and C. F. Ockenhouse, "Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 9, pp. 4961–4969, Sep. 2003, doi: 10.1128/IAI.71.9.4961-4969.2003.

[127] M. Yurtsever and Ş. Vural Korkut, "Cloning of lipase cDNA from olea europaea cv. Gemlik leaves and expression analysis in response to cold stress," *Turkish Journal of Botany*, vol. 43, no. 3, pp. 290–297, 2019, doi: 10.3906/bot-1810-7.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. ÖZTEKİN, S.P., YURTSEVER M., KORKUT, Ş.V., "Recombinant Production and Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Lipase Enzyme", 10th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 4-7 Ekim 2021, s.29

Projeler

1. Yürütücü: M. YURTSEVER, "Zeytin (Olea europae L) Lipaz Enziminin Kodon Optimizasyonu Yapılarak Rekombinant Üretimi" YTÜ BAP Genel Araştırma Projesi, 15-04-2021- FBA-2021-4169