T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Oryctolagus cuniculus KİMOZİN GENİNİN *Pichia pastoris*'te EKSPRESYONUNUN OPTİMİZASYONU

Selin ALİHANOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN danışmanlığında, Selin ALİHANOĞLU'nun hazırladığı "***Oryctolagus cuniculus*** **Kimozin Geninin** ***Pichia pastoris*****'te Ekspresyonunun Optimizasyonu**" konulu bu çalışma 28/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN ……..

Üye : Prof. Dr. Hasan VARDİN ……..

Üye : Doç. Dr. Ali YILDIRIM ……..

Üye : Doç. Dr. A. Coşkun DALGIÇ ……..

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hidayet SAĞLAM ……..

Bu Tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ÖZBERK
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 17071

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 6
2.1. Sütü Pıhtılaştıran Enzimler 6
2.1.1. Hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcılar 7
2.1.2. Bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcılar 8
2.1.3. Mikrobiyal rennetler 10
2.1.3.1. Mikroorganizmalardan direkt olarak elde edilen süt pıhtılaştırıcı enzimler 10
2.1.3.1.1. Bakteriyel rennetler 10
2.1.3.1.2. Fungal rennetler 11
2.1.3.2. Rekombinant kimozin 12
2.2. Kimozin 12
2.2.1. Kimozinin moleküler ve kimyasal yapısı 12
2.2.2. Kimozinin fizikokimyasal özellikleri 16
2.2.2.1. İzoelektrik noktası 16
2.2.2.2. Optimum pH 17
2.2.2.3. pH stabilitesi 18
2.2.2.4. Optimum sıcaklık 19
2.2.2.5. Isı stabilitesi 19
2.2.3. Kimozinin çalışma mekanizması ve sütün enzimatik pıhtılaşma aşamaları 20
2.2.4. Rekombinant kimozin üretimi 21
2.2.4.1. Rekombinant kimozinin ifadesi için kullanılan konakçılar 22
2.2.4.2. Rekombinant kimozin ile üretilen peynirler 25
2.2.5. Tavşan kimozini 27
3. MATERYAL ve YÖNTEM 30
3.1. Materyal 30
3.2. Yöntem 30
3.2.1. Tavşan midesinden rennet ekstraksiyonu 30
3.2.2. Maya kuvvetinin belirlenmesi 31
3.2.3. Peynir üretimi 31
3.2.4. Peynir kompozisyonun belirlenmesi 32
3.2.5. Duyusal analiz 32
3.2.6. Üre- PAGE analizi 32
3.2.7. Biyoinformatik analizler 32
3.2.8. pPIC9K-Ochy vektör dizaynı 33
3.2.9. *Oryctolagus cuniculus* pro-kimozin genini izole etmek için primer tasarımı 33
3.2.10. pPIC9K-Ochy vektörünün JM109 *E. coli* hücrelerine transformasyonu 34
3.2.11. Polimeraz zincir reakasiyonu (PZR) 35
3.2.12. Agaroz jel elektroforezi 36
3.2.13. DNA saflaştırılması 36
3.2.14. Kompetent *Pichia pastoris* maya hücrelerinin hazırlanması 37
3.2.15. pPIC9K-Ochy vektörünün doğrusal hale getirilmesi 37
3.2.16. pPIC9K-Ochy vektörünün kompetent *Pichia pastoris* maya hücrelerine transformasyonu 38
3.2.17. Transforme His^+ maya hücrelerinin antibiyotik (G418) içeren besiyerinde seçilimi 39

3.2.18. Transformantların fenotiplerinin belirlenmesi 39
3.2.19. Transgenik *Pichia pastoris* maya hücrelerinin ekspresyonu 39
3.2.20. Toplam protein miktarının belirlenmesi 40
3.2.21. Kuru hücre ağırlığı tayini 40
3.2.22. Asit- baz nötralizasyonu 40
3.2.23. Rekombinant kimozinin kısmi saflaştırılması 41
3.2.24. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) 41
3.2.25. Kazeinin hidroliz özelliklerinin belirlenmesi 41
3.2.26. Süt pıhtılaşma testi ve enzim aktivitesi (IMCU) tayini 41
3.2.27. $CaCl_2$ konsantrasyonunun rekombinant tavşan kimozin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi 42
3.2.28. Rekombinant tavşan kimozin enziminin optimum fermentasyon ve substrat pH'ının belirlenmesi 42
3.2.29. Rekombinant tavşan kimozin enziminin pH kararlılığının belirlenmesi 43
3.2.30. Rekombinant tavşan kimozin enziminin optimum fermentasyon ve substrat sıcaklığının belirlenmesi 43
3.2.31. Rekombinant tavşan kimozin enziminin ısı kararlılığının belirlenmesi 43
3.2.32. Rekombinant tavşan kimozin enziminin farklı sütler üzerindeki etkisinin araştırılması 44
3.2.33. İstatistiksel analizler 44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 45
4.1. Tavşan Rennetinin Beyaz Peynir Yapımına Uygunluğunun Belirlenmesi 45
4.1.1. Peynirlerin kompozisyonu ve verimi 45
4.1.2. Üre-page elektroforez yöntemi ile peynirlerin proteolitik özelliklerinin incelenmesi . 47
4.1.3. Duyusal analizler 49
4.2. Rekombinant Tavşan Kimozin Enziminin Üretilmesi 50
4.2.1. Biyoinformatik analizler 50
4.2.2. *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin genini taşıyan ekspresyon vektörünün (pPIC9K_Ochy) dizaynı ve inşa edilmesi 53
4.2.3. pPIC9K-Ochy vektörünün JM109 *E. coli* hücrelerine transformasyonu, çoğaltılması ve transformasyonunun doğrulanması 57
4.2.4. pPIC9K-Ochy vektörünün *P. pastoris* hücrelerine elektroporasyonu ve elektroporasyon işleminin doğrulanması 61
4.2.5. Transforme His^+ maya hücrelerinin antibiyotik (G418) içeren besiyerinde seçilimi ... 64
4.2.6. Transformantların fenotiplerinin belirlenmesi 66
4.2.7. Transgenik *Pichia pastoris* maya hücrelerinin ekspresyonu 68
4.2.8. Asit- baz nötralizasyonu-enzim aktivitesi testi 71
4.2.9. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS page) 72
4.2.10. Kazeinin hidroliz özelliklerinin belirlenmesi 74
4.3. Tavşan Kimozin Enziminin Karakterizasyonu ve Optimizasyonu 76
4.3.1. Optimum fermantasyon sıcaklığının belirlenmesi 76
4.3.2. Optimum fermantasyon pH' ının belirlenmesi 78
4.3.3. Optimum substrat pH'ının belirlenmesi 80
4.3.4. Rekombinant tavşan kimozininin pH stabilitesi 82
4.3.5. Optimum aktivite sıcaklığının belirlenmesi 83
4.3.6. Isı stabilitesi 85
4.3.7. Enzim aktivitesine $CaCl_2$ konsantrasyonunun etkisi 86
4.4. Rekombinant tavşan kimozin enziminin farklı sütler üzerindeki etkisi 87
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 90
KAYNAKLAR 93
ÖZGEÇMİŞ 104
EKLER 106

ÖZET

Doktora Tezi

Oryctolagus cuniculus KİMOZİN GENİNİN _Pichia pastoris_'te EKSPRESYONUNUN OPTİMİZASYONU

Selin ALİHANOĞLU

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN
Yıl: 2018, Sayfa: 118

Rekombinant kimozin üretiminde inek, kuzu, bufalo, keçi, domuz, deve gibi birçok hayvandan klonlanan kimozin genleri kullanılsa da tavşan kimozin geninin rekombinant olarak üretilmesini konu alan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada öncelikle tavşan kimozininin peynir yapımına uygunluğunun belirlenmesi amacı ile tavşan renneti, ticari buzağı ve deve kimozinleri kullanılarak beyaz peynir üretimi yapılmış ve 60 gün depolanmıştır. Yapılan çalışmalarda tavşan renneti ile üretilen peynirlerin buzağı kimozini ile üretilen peynirlerden duyusal ve proteolitik açıdan üstünlük, deve kimozini ile üretilen peynirler ile de benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu ön çalışmalar doğrultusunda rekombinant tavşan kimozini üretimi için tavşanda bulunan kimozin gen diziliminin pre, pro ve aktif bölgeleri biyoinformatik analizler ile belirlenmiş, belirlenen pro-kimozin enzimi kodon optimizasyonu yapıldıktan sonra pPIC9K vektörüne klonlanmıştır. Tavşan kimozin genini içeren pPIC9K vektörü, *Pichia pastoris* GS115 suşuna elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Antibiyotik (0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL genetisin) içeren YPD agarda kademeli olarak geliştirilmiş tek kolonilerden antibiyotiğe en dirençli olan (4.0 mg/mL genetisin içeren besi ortamında gelişebilen) koloniler seçilerek farklı sıcaklıklar (20, 25, 30 °C) altında AOX1 promotörü kontrolünde 96 saat boyunca ekstraselülar protein üretimi yapılmıştır. Belirlenen optimum fermentasyon sıcaklığında farklı pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0) değerlerine sahip BMM besiyerlerinde ekspresyon tekrarlanarak optimum besiyeri pH'ı belirlenmiştir. Maksimum protein verimi 30°C'de ve pH'ı 6.0 olan besiyeri kullanılarak yapılan ekspresyon sonucu elde edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda kimozin (40 kDa) ve glikolize kimozine (45 kDa) ait bantlar elde edilmiştir. Aktif kimozinin 40 °C ve 75 mM $CaCl_2$ konsantrasyonunda %100 aktivite gösterdiği ve pH 3.0- 6.0 arasındaki değerlerde stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca rekombinant tavşan kimozininin eşek, inek, keçi, koyun, deve sütleri üzerlerindeki aktiviteleri sırası ile 40, 10, 5.7, 3.07, 2.66 IMCU/mL olarak belirlenmiştir. Rekombinant tavşan kimozininin kazein üzerindeki proteolitik özellikleri incelendiğinde ise α-kazeini parçalamadığı, β-kazeini az miktarda κ-kazeini ise tamamen parçaladığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak rekombinant kimozinin diğer hayvansal kimozinlere iyi bir alternatif pıhtılaştırıcı ajan olabileceği ve peynir endüstrisinde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Rekombinant kimozin, tavşan kimozini, *Pichia pastoris*, protein ekspresyonu, SDS-PAGE

ABSTRACT

PhD Thesis

OPTIMIZATION of *Oryctolagus cuniculus* CHYMOSIN GENE EXPRESSION in *Pichia pastoris*

Selin ALİHANOĞLU

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARAASLAN
Year: 2018, Page: 118

There is no study about production of recombinant rabbit chymosin, although chymosin genes of many animals as cow, lamb, buffalo, goat, pig and camel are cloned in recombinant enzyme production. In this study firstly the suitability of rabbit chymosin for white cheese production was determined. For this purpose commercial calf and bovine chymosin was used as coagulant besides rabbit rennet in cheese production. During 60 days storage cheeses produced with rabbit rennet displayed superior sensorial and proteolytical properties than cheeses produced with bovine chymosin and similar properties with cheeses produced with camel chymosin. Secondly pre, pro and active regions of rabbit chymosin were determined with bioinformatics studies and rabbit pro- chymosin was cloned in to pPIC9K after codon optimization. Cloned vector was transformed in to *P. pastoris* GS115 strain with electroporation. Single colonies grow on antibiotic (4.0 mg/mL genetisin) containing YPD agars were selected and expressed extracellular at different temperatures under AOX1 promoter during 96 hour fermentation. Fermentation was repeated under optimum temperature at different pHs (3.0, 4.0, 5.0, 6.0) of BMM medium. Maximum protein yield was determined at 30 °C and pH 6.0. SDS-PAGE bands were indicated that chymosin (40 kDa) and the glycolised chymosin (45 kDa). Active chymosin was shown %100 activity at 40 °C and 75 mM $CaCl_2$ concentration and stable between pH 3.0- 6.0. Furthermore, activity of rabbit chymosin on donkey, calf, goat, sheep, camel milks were determined as 40, 10, 5.7, 3.07, 2.66 IMCU/mL respectively. While α-casein was not digested by recombinant rabbit chymosin β- and κ-caseins were digested partially and completely respectively. Consequently rabbit chymosin was determined as an alternative milk couagulant and can be used in cheese industry.

KEY WORDS: Recombinant chymosin, rabbit chymosin, *Pichia pastoris*, protein expression, SDS-PAGE

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimi ve tecrübeleri ile çalışmama ışık tutan, desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN'a, en az bir danışman kadar çalışmamın her aşamasında yanımda olan, karşılaştığım her zorlukta, tecrübeleri ve babacan tavrı ile desteğini hep hissettiğim çok kıymetli hocam Prof. Dr. Hasan Vardin'e, çalışmam süresince anlayışlı ve güleryüzlü tavrı ile desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen bölüm başkanımız Prof. Dr. Ayhan ATLI'ya, lisans, yükseklisans, doktora eğitimlerimin her anında bana yol gösteren, bu mesleği sevdiren ve öğreten, öğrencileri olmaktan gurur duyduğum çok değerli hocalarım Doç. Dr. Ali Coşkun DALGIÇ ve Doç. Dr. Kadir Bülent BELİBAĞLI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen, çalışmamın yükünü hafifleten arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Asliye KARAASLAN'a, Arş. Gör. Bülent BAŞYİĞİT'e, Arş. Gör. Müjgan OKTAY'a, Gıda Yüksek Mühendisi Meral ATLI'ya ve bölümümüz Yüksek Lisans Öğrencisi Demet EKTİREN'e çok teşekkür ederim.

Eğitim öğretim hayatımın her anında yanımda olan maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen değerli aileme, ailem kadar yakın olan arkadaşlarıma ve her zorlukta yanımda olan, en büyük desteğim eşim M. Nuri ALİHANOĞLU'na çok teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kimozin A ve kimozin B'nin şematik gösterimi 14
Şekil 2.2. a) Buzağı kimozininin üç boyutlu yapısı b) Buzağı kimozininin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı 14
Şekil 2.3. Buzağı kimozininin pre, pro ve kimozin kısımları ve protein dizilimi 16
Şekil 2.4. Kimozinin κ-kazein üzerine etkisi 20
Şekil 2.5. a)Tavşan kimozininin üç boyutlu yapısı b)Tavşan kimozinin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı 28
Şekil 2.6. Memeliler sınıfına ait kimozin genine sahip 21 canlı türünün cDNA dizilimleri baz alınarak çizilen filogenetik ağaç. 29
Şekil 3.1.Tavşan pro- kimozin genine karşılık gelen DNA dizilimi ve tasarlanan primerlerin hedef gen üzerindeki yerleşimi 34
Şekil 4.1. TP, BP ve DP'de 60 günlük depolama sürecinde % nem içeriğinde meydana gelen değişim 47
Şekil 4.2. Üre-PAGE analizi sonucu 60 günlük depolama sürecinde TP, BP ve DP'nin kazein fraksiyonlarında meydana gelen değişimler 48
Şekil 4.3. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilmiş *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin gen dizilimi ile NCBI veri tabanından elde edilen (XM_002715787.2) tahmini tavşan kimozin gen diziliminin karşılaştırılması 52
Şekil 4.4. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilmiş *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin gen dizilimi 53
Şekil 4.5. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilmiş *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin gen dizilimi ile kodon optimizasyonu sonrası elde edilen baz diziliminin karşılaştırılması 54
Şekil 4.6. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilmiş *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin gen dizilimi ile kodon optimizasyonu sonrası elde edilen protein diziliminin karşılaştırılması 55
Şekil 4.7. Kodon optimizasyonu yapılmış *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin geninin aminoasit ve protein dizisinin gösterimi. 56
Şekil 4.8. *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin genini içeren pPIC9K vektörünün (pPIC9K_Ochy) şematik gösterimi 56
Şekil 4.9. Transformasyon sonrası elde edilen pPIC9K_Ochy vektörünü içeren JM109 kompetent *E. coli* hücrelerinin ampisilin içeren LB katı besi yerinde seçilimi 57
Şekil 4.10. a) DNA markörü b) Transformasyon sonucu JM109 kompetent *E. coli* hücre kültüründen izole edilen plazmid *Oryctolagus cuniculus* kimozin geninin PZR yöntemiyle çoğaltılması sonucu elde edilen %1.2 lik agaroz jel görüntüsü 58
Şekil 4.11. LB sıvı besiyerinde gelişim göstermiş hücre kültürlerinden izole edilen DNA ve RcF1&RcR1 primer çifti kullanılarak yapılmış PZR analizi sonucu elde edilen %1.2 lik agaroz jel görüntüsü 59
Şekil 4.12. RcF1-RcR1 spesifik primerleri kullanılarak çoğaltılan gen bölgesi ve pPIC9K-Ochy plazmidinde bulunan pPIC9K vektörüne göre optimize edilmiş *Oryctolagus cuniculus* kimozin genine ait dizilimin karşılaştırılması 61
Şekil 4.13. GS115 stab kültürlerinden YPD agara aktarılmış *P. pastoris* maya hücreleri.. 61
Şekil 4.14. *P. pastoris* kompetent hücreleri 62
Şekil 4.15. Elektroporasyon sonrası MD katı besiyerinde gelişim gösteren His^+ koloniler. 63
Şekil 4.16. Elektroporasyon işlemini doğrulamak amacı ile yapılan PZR analizi sonucu %1.2 lik agaroz jel görüntüsü 64
Şekil 4.17. *P. pastoris* hücrelerine transforme olmuş pPIC9K-Ochy vektörünü içeren rekombinant His^+ hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg/mL) G418 içeren YPD besiyerindeki gelişimleri 65
Şekil 4.18. İçerisinde Oryctolagus cuniculus kimozin genini taşıyan, 4 mg/mL antibiyotik içeren besi ortamında gelişim gösterme yeteneklerine göre seçilmiş tek kolonilerin MM ve MD besiyerlerindeki gelişimleri 67
Şekil 4.19. GS115 Albumin (His^+ Mut^S) ve GS115 β-Gal (His^+ Mut^+) suşlarının MM ve

MD besiyerlerinde gelişimleri. 68
Şekil 4.20.BMM besiyerinde 30 °C'de fermente edilen rekombinant mayaların indüksiyon süresi boyunca toplam protein üretim miktarları ve eksprese edilen rekombinant enzimlerin aktiviteleri.. 70
Şekil 4.21.BMM besiyerinde 30 °C'de fermente edilen rekombinant mayaların indüksiyon süresi boyunca kuru hücre ağırlıkları ve OD_{600} değerleri 70
Şekil 4.22. Enzim aktivitesi testi sonucu elde edilen pıhtı görüntüsü. 72
Şekil 4.23.a: Fermantasyon sonrası elde edilen enzimlerin pıhtı oluşumu. b: Fermentasyon sonrası kısmi olarak saflaştırılan tavşan kimozin enziminin %12'lik SDS page jel görüntüsü 74
Şekil 4.24. Rekombinant tavşan kimozininin α, β, κ- kazeinler üzerindeki etkisi 75
Şekil 4.25. Farklı sıcaklıklarda (20 °C, 25 °C, 30 °C) BMM besiyerinde, her 24 saatte bir %1'lik metanol beslemesi ile 96 saat sonunda elde edilen süpernatantların indüksiyon süresince alınan numunelerinin kuru hücre ağırlıkları ve OD_{600} değerleri..... 77
Şekil 4.26. BMM besiyeri içerisinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen (20 °C, 25 °C, 30 °C) fermantasyon süresince her 24 saatte bir alınan örneklerde yapılan enzim aktivitesi testi sonuçları. 77
Şekil 4.27. Farklı pH' lardaki (3.0, 4.0, 5.0, 6.0) BMM besiyerinde, her 24 saatte bir %1'lik metanol beslemesi ile 96 saat sonunda elde edilen süpernatantlardan indüksiyon süresince alınan numunelerin kuru hücre ağırlıkları ve OD_{600} değerleri..... 78
Şekil 4.28. Farklı pH değerlerine sahip BMM besiyeri içerisinde ekspresyonu yapılan enzimlerin enzim aktiviteleri. 80
Şekil 4.29. Farklı substrat pH' larının rekombinant tavşan kimozin enzim aktivitesi üzerine etkisi. 81
Şekil 4.30. Rekombinant tavşan kimozin pH'ının enzim stabilitesine etkisi. 82
Şekil 4.31. Rekombinant tavşan kimozin enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi 84
Şekil 4.32. Sıcaklığın rekombinant tavşan kimozin enzim stabilitesine etkisi 85
Şekil 4.33. $CaCl_2$ konsantrasyonuna bağlı olarak rekombinant tavşan kimozin enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler 87
Şekil 4.34. Rekombinant tavşan kimozininin farklı sütler üzerine etkisi 89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Kaynaklarına göre süt pıhtılaştırıcı enzimler 6
Çizelge 2.2. Bazı koagulantlara ait süt pıhtılaştırma (C) ve proteolitik aktivite (P) oranları 7
Çizelge 2.3. Sütü pıhtılaştırıcı enzim içeren bazı bitkiler..... 9
Çizelge 2.4. Ticari mikrobiyal rennetler 11
Çizelge 2.5. Kimozinin ifadesi için kullanılan farklı mikrobiyal konakçılar 24
Çizelge 2.6. Tavşan ve kimozin geni içeren bazı canlı türlerinin kimozin genine karşılık gelen cDNA dizilimlerinin karşılaştırılması sonucu benzerlik oranları 24
Çizelge 3.1. *Pichia pastoris* ekspresyon sistemine göre optimize edilmiş *Oryctolagus cuniculus* kimozin genini çoğaltması için tasarlanmış primerler 33
Çizelge 3.2. PZR bileşenleri..... 35
Çizelge 3.3. PZR şartları 36
Çizelge 3.4. pPIC9K-Ochy vektörünün doğrusal hale getirilmesi için gerekli bileşenler 37
Çizelge 4.1. Tavşan renneti, ticari buzağı ve deve kimozinleri kullanılarak üretilen beyaz peynirlerin verimleri ve kompozisyonları..... 45
Çizelge 4.2. TP, BP ve DP'nin 60 günlük depolama sürecinde dış görünüş, iç görünüş, yapı, koku ve tat özelliklerindeki değişim 49
Çizelge 4.3. Farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütlerin kuru madde, kül, pH içerikleri 88
Çizelge 4.4. Rekombinant tavşan kimozininin farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütler üzerindeki aktiviteleri 88

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

mL	Mililitre
°C	Derece santigrat
g	Gram
dk	Dakika
nm	Nanometre
M	Molarite
TP	Tavşan renneti ile üretilen peynir
BP	Ticari buzağı kimozini ile üretilen peynir
DP	Ticari deve kimozini ile üretilen peynir
KKF	Kolloidal kalsiyum fosfat
TPA	Tekstür profil analizi
P. pastoris	*Pichia pastoris*
Opt	Optimize
Orj	Orijinal
E. coli	*Escherichia coli*
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
pI	İzoelektrik nokta
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
K. lactis	*Kluyveromyces lactis*
B. subtilis	*Bacillus subtilis*

1. GİRİŞ

Süt sahip olduğu besin maddeleri nedeni ile insanlar için olduğu kadar mikroorganizmalar için de iyi bir besin kaynağıdır. Sağım sonrası çeşitli nedenlerle süte bulaşan mikroorganizmalar hızla çoğalarak kısa zamanda sütün dayanıklılığını azaltır ve sütü tüketilmez bir hale getirirler. İnsanoğlu sütün dayanıklılığını arttırmak, naklini kolaylaştırmak, süte farklı duyusal ve fonksiyonel özellikler katmak amaçları ile sütü peynir, yoğurt, tereyağı, ayran, kefir gibi çeşitli ürünlere işlemiştir. Peynir; uzun raf ömrü, yüksek besin içeriği ve yüksek ekonomik değeri ile çiğ sütün en önemli değerlendirme şekli olarak kabul edilmektedir. Peynir üretimi süte enzim ilavesi, asit ilavesi veya asit ilavesi ile ısıl işlemin bir arada kullanılması gibi üç farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilebilir ancak bunlardan en yaygın olanı süte enzim ilavesidir (Fox 1987; Guinee ve Wilkinson, 1992; Fox ve McSweeney, 1997).

Peynir yapımında kullanılan pıhtılaştırıcı enzimler; papain, bromelin, fisin, risin gibi bitkisel kaynaklardan (*Carica papaya, Ananas sativa, Ricinus communis*), fungal ve bakteriyel proteazlar gibi mikrobiyal kaynaklardan (*Mucor pusillus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis*) ve pepsin A (EC 3.4.23.1), gastriksin (pepsin B (EC 3.4.23.2) veya pepsin C (EC 3.4.23.3)), kimotripsin (EC 3.4.21), tripsin (3.4.21.4) ve kimozin (EC 3.4.23.4) gibi hayvansal kaynaklardan (buzağı, deve, bufalo, koyun, keçi) elde edilebilmektedir (Addis ve ark., 2008). Bunların tümü asit proteazlardır. Optimum aktivitelerini asidik ortamlarda gösteren bu enzimler peynir yapımında pıhtının oluşmasından sorumlu enzimler olmakla beraber elde edilen peynirlerin duyusal özelliklerinde ve olgunlaşmasında da önemli rol oynarlar. Peynir üretiminde kullanılan enzimin κ-kazeinin Phe_{105} ve Met_{106} arasındaki peptid bağını spesifik kırması ve pıhtılaştırma kuvvetinin yüksek olması elde edilen peynirin proteolitik aktivitesinin düşük olmasını sağlamakla beraber peynirde istenmeyen duyusal özelliklerin oluşmasını da engellemektedir. Bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı pıhtılaştırıcı enzimlerin κ-kazein üzerinde spesifik olmayan proteolitik aktiviteye sahip olmaları ve pıhtılaştırıcı kuvvetlerinin düşük olması sebebi ile kullanımları sınırlı kalmıştır. Hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcı enzimler ise yüksek pıhtılaştırma

ve düşük proteolitik aktiviteleri nedeni ile bu amaçla yaygın kullanılan enzimlerdir.

Peynir yapımında kullanılan hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcıların başında rennet gelmektedir. Rennet, hayvan midelerinden özütlenen içerisinde pepsin, kimozin (rennin) az miktarda da kimotripsin, tiripsin ve lipaz enzimlerinin bulunduğu bir enzim kompleksidir (Üçüncü, 2004). Buzağı midesinden özütlenen bir rennet kompleksinin %88-94'ü gibi önemli bir kısmını kimozin oluştururken %6-12'lik kısmını ise pepsin oluşturmaktadır. Bu enzimlerin hayvan midesindeki bulunma oranları hayvanın yaşı, türü ve beslenme şekline göre değişmektedir (Sausa ve ark., 2001). Rennet ekstraksiyonuna buzağı şirdeni ile başlanmış olsa da kuzu (Baudys ve ark., 1988; Pungercar ve ark., 1991), oğlak (Jordan ve ark., 1999), deve (Wangoh ve ark., 1993) gibi geviş getiren memelilerin midelerinden özütlenen rennetler de alternatif pıhtılaştırıcı ajanlar olarak kullanılmıştır.

Kimozin mide mukoza hücreleri tarafından preprokimozin olarak sentezlenir. Preprokimozinden 16 aminoasit uzunluğundaki sinyal peptidinin ayrılması ile prokimozin oluşur. Prokimozin asidik şartlarda N terminal önzincirinden 27 amino asidin ayrılması ile pseudokimozine, 42 amino asitin otokatalitik ayrılması ile aktif kimozine dönüşür (Pedersen ve ark., 1979; Kumar ve ark., 2010). Aktif kimozin, κ-kazeinin Phe_{105} ve Met_{106} arasındaki peptid bağını spesifik olarak kırar ve para-κ-kazein ve glikomakropeptidlere dönüştürür. Daha sonra para-κ-kazein Ca^{+2} iyonları varlığında kalsiyum parakazeinat formuna dönüşür ve pıhtı oluşur. Pepsin ise midenin alt kısmındaki mukoza hücrelerinde inaktif pepsinojen olarak bulunur ve asidik ortamda 42 aminoasit büyüklüğündeki önzincirin otokatalitik ayrılması ile aktif pepsin halini alır (Kumar ve ark., 2010). Pepsin Phe, Tyr, Leu veya Val amino asitlerinin yaptıkları bağları kırarak peynirlerde istenmeyen tat ve kokuya, fazla asit oluşumuna, peynirin verim ve kalitesinde düşüşlere sebep olmaktadır (Agudelo ve ark., 2004). Bu sebeple kimozin peynir yapımında kullanılan en yaygın enzimdir. Kimozin kaynağı olarak öncelikle hayvan midelerinden özütlenen rennet enzimi kullanılsa da bu enzim zaman içerisinde yerini moleküler tekniklerle üretilen rekombinant kimozinlere bırakmıştır. Peynir üretimi 1961'den bu yana 3.5 kat artarken rennet eldesinin zorluğu ve maliyetinin yüksekliği, yeni doğmuş bir canlının

kesilmesinin etik olmaması sebepleri ile rennet kullanımı azalmıştır (Jacob ve ark., 2011). Enzim ihtiyacını karşılamak üzere farklı kaynakların araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Gelişen moleküler ve genetik araştırma teknikleri ile hayvanlardan izole edilen kimozin geni farklı konakçılarda ifade edilmiştir ve böylelikle rekombinant kimozin üretimine başlanmıştır. Rekombinant kimozin; rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen ilk enzimdir. Chr. Hansel A/S firması 1984-1985 yılları arasında buzağı midesinden kimozin enzimini kodlayan genleri izole etmiş ve *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) ve *Aspergillus* spp. cinsi küflere aktararak kimozin üretimini gerçekleştirmiştir (Mohanty ve ark., 1999). *Escherichia coli* (*E. coli*)'ye klonlanmış rekombinant buzağı kimozini FDA tarafından insan tüketimi için onaylanan ilk genetik mühendisliği ürünü olmuştur (Flamm, 1991). Rekombinant DNA tekniğinin pratik uygulamalarıyla gıda endüstrisinin ihtiyaç duyduğu kimozin enzimi saf ve standart olarak üretilmeye başlanmıştır.

Rekombinant buzağı kimozini üretiminde *E. coli* (Emtage ve ark., 1983; Mohanty ve ark., 1999) gibi bakteri, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. Cerevisiae*) (Goff ve ark., 1984; Moller ve ark., 1983), *K. lactis* (Van Den Berg ve ark., 1990) ve *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) (Jiang ve ark., 2012) gibi maya hücreleri konakçı olarak kullanılmıştır. *E. coli* ve *S. cerevisiae*'da üretilen kimozinler çözünmez formda elde edilmiş ve tekrar katlanma aşamalarında aktif protein elde edilmiştir (Mellor ve ark., 1983; Emtage ve ark., 1983). Bunun da ötesinde *S. cerevisiae*'da aktif ekstraselüler kimozin üretimi, düşük miktarda pro-kimozin salgılanması nedeniyle başarılı olamamıştır (Smith ve Gill, 1985). *P. pastoris* ekspresyon sistemi ise rekombinant proteinlerin yüksek miktarda ifadesine olanak sağlamış ve minimal besiyerinde yüksek biyokütle oluşturarak kimozin üretiminde başarılı olmuştur.

Rekombinant buzağı kimozini üretiminin başarılı olması farklı memeli türlerinin de bu amaçla kullanılabileceğini işaret etmiştir. Bunun üzerine domuz (Housen ve ark., 1996), bufalo (Mohanty ve ark., 2003), kuzu (Rogelj ve ark., 2001), keçi (Vega-Hernandez ve ark., 2004) ve son olarak deve (Kappeler ve ark., 2006) gibi memelilerin kimozin genleri üzerine araştırmalar yapılmış, farklı konakçılar kullanılarak bu genlerin ifadeleri sağlanmıştır. Böylelikle bu genlerin

karakterizasyonu yapılmış, gen dizilimleri belirlenmiş ve hatta rekombinant deve ve sığır kimozinlerinin endüstriyel olarak üretimleri sağlanmıştır.

Tavşan midesinden (abomasum) izole edilen rennetin peynir yapımı için önemli bir kaynak olabileceği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Rao ve Dutta, 1981; Dobler ve ark., 2016; Nurliyani ve ark., 2013, Akın, 1996; Alihanoğlu ve ark., 2017). Ülkemizde de Mardin ili Derik ilçesi köylerinde tavşan midesinden ekstrakt edilen rennet ile uzun yıllardır geleneksel peynir üretimi yapıldığı, hatta bu enzim ile yapılan peynirlerin buzağı ve oğlaktan elde edilen enzimler ile yapılan peynirlere göre tat ve aroma olarak daha çok tercih edildiği yöre insanı tarafından dile getirilmektedir. Bu bilgiler ışığında tavşan rennetinin beyaz peynir yapımına uygunluğunun belirlenmesi amacı ile tavşandan ekstrakt edilen rennet enzimi ile beyaz peynir üretimi yapılmış, elde edilen peynirlerin 60 günlük depolama süreci boyunca bazı fizikokimyasal ve duyusal özellikleri, ticari rekombinant deve ve buzağı kimozinleri ile yapılan beyaz peynirler ile karşılaştırılmıştır. Laboratuvarımızda yürüttüğümüz bu ön denemeler sonucunda tavşan renneti ile üretilen peynirlerin ticari rekombinant kimozinler ile üretilen peynirler ile benzer yapısal özellikler gösterdiği, tat ve aroma açısından daha çok beğenildiği tespit edilmiştir. Ayrıca depolama süresinde tavşan renneti ile üretilmiş peynirlerin buzağı kimozini ile üretilen peynirlerden daha düşük proteolitik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Alihanoğlu ve ark., 2017).

Literatüre bakıldığında inek, keçi, koyun, deve gibi hayvanlardan klonlanan kimozin genleri farklı konakçılara aktarılmış ve enzimlerin rekombinant olarak üretimleri sağlanmıştır. Fakat tavşan kimozin geninin klonlanmasını ve kodladığı enziminin rekombinant olarak üretilmesini konu alan bir çalışma bulunmamaktadır. Dahası, ilgili gen bilgi bankaları (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) araştırıldığında tam uzunluklu tavşan kimozin geninin dizilim bilgisi bulunmamakla beraber biyoinformatik teknikleriyle belirlenmiş tek bir adet tahmini *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) kimozin gen diziliminin (Giriş Kodu: XM_002715787) bulunduğu tespit edilmiştir. Bu tahmini dizilim Atlı (2017)'nın yaptığı biyoinformatik çalışmalar sonucu doğrulanmış fakat rekombinant olarak üretimi henüz

yapılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı bioinformatik ve moleküler tekniklerle tavşan genomunda bulunduğu belirlenen kimozin geninin kodon optimizasyonu sonrasında AOX1 promotörü içeren pPIC9K vektörüne klonlanarak *P. pastoris* mayasına aktarılması ve uygun fermentasyon koşullarında rekombinant tavşan kimozin enziminin üretilmesidir. Spesifik hedefler şu şekilde sıralanabilir:

- Tavşanda bulunan kimozin gen diziliminin, pre, pro ve aktif bölgelerinin biyoinformatik analizler ile belirlenmesi
- Belirlenen pro-kimozin enziminin kodon optimizasyonu yapıldıktan sonra pPIC9K vektörüne klonlanması
- Hedef geni içeren vektörün *P. pastoris* GS115 suşuna elektroporasyon yöntemi ile aktarılması
- Transforme hücrelerin ekspresyon koşullarının optimizasyonu
- Rekombinant tavşan kimozini üretimi
- Rekombinant tavşan kimozin enziminin karakterizasyonu

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sütü Pıhtılaştıran Enzimler

Sütün peynire işlenmesi esnasındaki en temel adım sütün pıhtılaştırılmasıdır. Pıhtılaştırma işlemi yaygın olarak süte enzim ilavesi ile meydana gelmektedir. Bu amaçla kullanılan enzimler kaynaklarına göre bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcı enzimler olarak sınıflandırılmaktadırlar (Çizelge 2.1.). Bunların tümü asit proteazlardır. Asidik ortamlarda optimum aktivite gösteren bu enzimler sütün pıhtılaşmasını sağlamalarının yanı sıra peynirin olgunlaşması, kalitesi ve verimi üzerinde de etkiye sahiplerdir.

Çizelge 2.1. Kaynaklarına göre süt pıhtılaştırıcı enzimler (Üçüncü, 2015)

Hayvansal Proteazlar	**Bitkisel Proteazlar**	**Mikrobiyal Proteazlar**
Kimozin (rennin)	Papain	**Küf mantarları**
Pepsin	Fisin	*Mucor pusillus*
Tripsin	Bromelin	*Mucor miehei*
Kimotripsin	Risin	*Endothia parasitica*
Gastriksin		**Bakteriler**
		Bacillus subtilis
		Bacillus polymyxa
		Bacillus cereus

Sütü pıhtılaştıran her enzim peynir yapımında kullanılamaz. Enzimin sütü pıhtılaştırma aktivitesinin yanında proteolitik aktivitesinin de peynir üretimine uygun olması gerekmektedir. Enzimin κ-kazeinin üzerindeki spesifik etkisi ile Phe_{105}-Met_{106} bağını parçalaması sütü pıhtılaştırma aktivitesi (C) olarak; bunun dışındaki aktiviteler ise proteolitik aktivite (P) olarak değerlendirilmektedir. Bir enzimin proteolitik aktivitesinin yüksek olması peynir veriminde azalmaya ve olgun peynirde aroma (acılık) ve tekstür (yumuşama) kusurlarına neden olmaktadır (Fox ve ark; 2000; Low ve ark., 2006). Bazı koagulantların süt pıhtılaştırma ve proteolitik aktiviteleri Çizelge 2.2.'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Tabloda buzağı kimozininin sütü pıhtılaştırma ve proteolitik aktivitesi %100 kabul edilerek bazı pıhtılaştırıcı

enzimlerin aktiviteleri ve C/P oranları buzağı kimozinine oranlanarak belirlenmiştir. Deve kimozini buzağı kimozininden %70 daha fazla pıhtılaştırma aktivitesi göstermesine rağmen %75 daha düşük proteolitik aktivite göstermektedir. Böylelikle buzağı kimozininin C/P oranı 1 iken deve kimozininin 7 olduğu belirlenmiştir. Kimozin dışındaki enzimlerin ise proteolitik aktivitelerinin pıhtılaştırma aktivitelerinden fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı koagulantlara ait süt pıhtılaştırma (C) ve proteolitik aktivite (P) oranları

Koagulant	Süt pıhtılaştırma aktivitesi (Buzağı kimozinine göre %)	Genel proteolitik aktivite (Buzağı kimozinine göre %)	C/P Değeri	Kaynaklar
Buzağı kimozini	100	100	1	
Deve kimozini	170	25	7	Kappeler ve ark., 2006
Domuz kimozini	25	12	2,1	Houen ve ark., 1996
M. pusillus proteaz	33	147	0,22	Martin ve ark., 1980
M. Miehei proteaz	19	149	0,13	Martin ve ark., 1980
Sığır pepsini A	124	2731	0,05	Martin ve ark., 1980

2.1.1. Hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcılar

Hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcılar kimozin (rennin), pepsin, tripsin ve kimotripsindir (Addis ve ark., 2008). Bu pıhtılaştırıcı enzimler hayvan midelerinden ekstraksiyon yolu ile elde edilen zimojen enzimler olup asidik ortamda aktifleşirler. Henüz süt emen hayvanların midelerinin temizlenip, uygun şartlarda kurutulmasından sonra ekstraksiyon işlemi yapılarak rennet elde edilmektedir. Rennet içerisinde pepsin, kimozin az miktarda kimotripsin, tripsin ve lipaz enzimlerinin bulunduğu bir enzim karışımıdır. Peynir yapımında en yaygın buzağı renneti kullanılır ve standart kabul edilir. Buzağı rennetinin içerisinde temel olarak kimozin ve pepsin proteazları bulunur. Bu enzimlerin miktarları hayvanın yaşına, cinsine ve beslenme şekline bağlı olarak farklılık göstermektedir (Sausa ve ark., 2001). Yeni doğan buzağılarda bu oran %88-94 kimozin, %6-12 pepsin iken; yetişkin buzağılarda %90-94 pepsin ve %6-10 kimozin olarak değişmektedir. Rennette bulunan kimozin miktarı hayvanın doğumundan sonra geçen süreye bağlı

olarak azalırken pepsin oranı artış göstermektedir (Guinee ve ark., 1992; Rogelj ve ark., 2001). Bu sebeple yeni doğanların midelerinden özütlenen enzimler peynir yapımında daha çok tercih edilmektedir.

Rennet ekstraksiyonuna buzağı şirdeni ile başlanmış olsa da kuzu (Baudys ve ark., 1988; Pungercar ve ark., 1991), oğlak (Jordan ve ark., 1999), deve (Wangoh ve ark., 1993), domuz (Houen, 1996) , bufalo (Mohanty ve ark., 2003), tavuk (Keilova 1977), tavşan (Rao ve Dutta, 1981; Akın, 1996; Dobler ve ark., 2016; Nurliyani ve ark., 2013; Alihanoğlu ve ark., 2017) gibi canlıların midelerinde de bu enzim kompleksi bulunmaktadır.

Rennetin ana bileşeni olan kimozin κ-kazeinin Phe_{105} ve Met_{106} arasındaki peptid bağına spesifik çalıştığı için yüksek C değerine, pepsin ise belirli bir bölgeyi hedeflemeyen bir proteolitik aktiviteye sahip olduğundan yüksek P değerine sahiptir. Peynir yapımında pepsin kullanılması sütün protein ağının zayıflamasına, peynir veriminde azalmaya ve peynirde acı tat oluşumuna sebep olmaktadır. Buna ek olarak pepsinin optimum çalışma pH'sının 1.7-2.3 arasında olması nedeni ile sütün normal pH değerinde sütü pıhtılaştıramaz ve peynirin olgunlaşması yavaşlar. Bu olumsuzlıkları azalatmak için peynir yapımında pepsinin saf kullanımı yerine farklı oranlarda kimozin ile karıştırılarak kullanılması daha çok tercih edilir. Yapılan çalışmalarda; kullanılan enzim içerisindeki pepsin/kimozin oranı 1/4'ü geçmediği taktirde bu enzim karışımı ile yapılan peynirler ile rennet ile yapılan peynirlerin arasında önemli bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (Walstra ve ark., 2005). Tripsin ve kimotripsin ise proteolitik aktiviteleri çok yüksek olması ve peynirde acı tat oluşturması sebebi ile peynir yapımında tercih edilmemektedirler.

2.1.2. Bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcılar

Bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcı enzimler bitkilerin yaprak, gövde, kök, tohum, çiçek, meyve gibi birçok değişik kısımlarından elde edilebilmektedirler (Üçüncü, 2015). Bitkisel enzimleri diğer enzimlerden ayıran en önemli özellikleri optimum pH ve sıcaklık değerlerinin yüksek oluşu ve yüksek ısıl işlem görmüş sütlerde bile etki

edebilmesidir (Çakmakçı ve ark., 2017). Bu enzimlerin pıhtılaştırma aktiviteleri proteolitik aktivitelerine nazaran oldukça düşüktür. Bu da peynir üretiminde düşük verime, istenmeyen acılık ve yumuşamaya sebep olduğundan bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcıların kullanımları peynir endüstrisinde çok yaygın değildir (Blair, 1961). Çizelge 2.3.'de sütü pıhtılaştırıcı enzim içeren bazı bitkiler ve latince isimleri verilmiştir. Bu enzimlerin kullanımları üretilen peynirlerde kalite ve verim acısından olumsuz sonuçlar doğurduğu için hiçbir zaman endüstriyel boyuta taşınamamış, geleneksel peynir üretimi ile sınırlı kalmıştır. Bunlara ek olarak bitki özütlerinin elde edilmesindeki zorluklar da bu kaynakların peynir yapımında kullanımını olumsuz olarak etkileyen diğer bir faktördür.

Çizelge 2.3. Sütü pıhtılaştırıcı enzim içeren bazı bitkiler (Scott, 1986, Roseiro ve ark., 2003)

Bitki	**Latince ismi**
Enginar	*Cynara cycolymus*
Kenger otu	*Cynara cardunculus*
Dulavrat otu	*Arctium minus*
Yaban yasemini	*Solanum dulcamara*
Ebegümeci	*Malva sylvestris*
Devedikeni	*Cirsium* ve *Carlina* spp.
İncir ağacı	*Ficus carica*
Tavşancıl otu	*Heracleum spondylium*
Peygamber çiçeği	*Centurea* spp.
Yoğurt otu	*Galuni verum*
Yakup otu	*Senecio jacobaea*
Düğün çiçeği	*Ranunculus* spp.
Isırgan otu	*Urtica diocia*
Çoban tarağı	*Dipsacus sylvestris*
Civan perçemi	*Achillea millefolium*
Yalancı güvey feneri	*Withiana coagulans*
Sütleğen otu	*Euphorbia lathyrus*
Ananas	*Ananas sativa, Ananas comosus*
Papaya	*Carica papaya*
Hint yağı tohumu	*Ricinus communis*
Marul	*Lactuca sativa*

2.1.3. Mikrobiyal rennetler

Hayvansal kaynaklı süt pıhtılaştırıcı enzimlerin, artan peynir ihtiyacını karşılayamaması sebebi ile alternatif enzim arayışları günümüze kadar ulaşmış ve birçok araştırmaya konu olmuş bir problemdir. Yapılan çalışmalar sonucunda peynir yapımı için ideal kabul edilen buzağı rennetine en benzer özellikleri sergileyen enzimlerin mikrobiyal rennetler olduğu ortaya konulmuştur. Aynı zamanda bu enzimlerin eldesinin ekonomik olması kullanımlarını daha da cazip hale getirmiştir. Mikrobiyal rennetler; mikroorganizmalardan direkt olarak elde edilen proteolitik enzimlerden oluşan peynir mayaları ve rennin enzimi üretiminde görevli genetik materyelin (kimozin geni) başka uygun konakçılara aktarılması sonucu elde edilen peynir mayaları (rekombinant kimozin) olarak gruplandırılabilirler. Direkt olarak elde edilen enzimler ise bakteriyel ve fungal kaynaklı olmak üzere iki grup altında toplanabilirler.

2.1.3.1. Mikroorganizmalardan direkt olarak elde edilen süt pıhtılaştırıcı enzimler

2.1.3.1.1. Bakteriyel rennetler

Bacillus türleri mikrobiyal rennet üretiminde en yaygın olarak kullanılan gruptur. *Bacillus polymyxa* türünün salgılamış olduğu enzimin buzağı rennetinin yerine kullanılması amacı ile bir Japon firması tarafından patenti alınmış, Milcozyme ticari adı ile piyasaya sunulmuş ancak talep görmemiştir (Karapınar ve Ünlütürk, 1982).

Bacillus türlerinden üzerinde en yaygın çalışılmış diğer bir tür ise *Bacillus subtilis*'tir. *B. subtilis* kullanılarak elde edilen pıhtılaştırıcı enzime ilk olarak İngiltere'de 1944 yılında patent alınmış bunu Amerika Birleşik Devleti'nde (A.B.D) alınan patentler takip etmiştir (Sardinas, 1972). Yapılan çalışmalarda bu bakterinin asidik, bazik ve nötral karakterde proteolitik enzim üretebildiği ve bu enzimlerin oranlarının çalışmada kullanılan suş tipine ve ortam koşullarına göre değişiklik

gösterdiği ortaya konulmuştur. Buna ek olarak *Bacillus subtilis*'ten elde edilen enzimler kullanılarak üretilen peynirlerde çok miktarda yağ ve proteinin peynir altı suyuna geçtiği gözlemlenmiş bu sebeple de enzimin endüstriyel kullanımı söz konusu olmamıştır. *Bacillus cereus* bakterisinden elde edilen enzimin ise peynir yapımında en olumlu sonuç veren bakteriyel rennet olduğu gözlemlenmiş ve A.B.D bu enzimin patentini almıştır (Sardinas, 1969; Sardinas, 1972).

2.1.3.1.2. Fungal rennetler

Dünyada ticari olarak üretilen fungal rennetlerin neredeyse tamamı *Mucor pusillus* var. *Lindt, Mucor miehei, Endothia parasitica* küflerinin değişik suşlarından elde edilmektedir. Birçok firma bu mikroorganizmaları kullanarak ticari proteolitik enzimler üretmiş ve piyasaya sunmuştur (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Ticari mikrobiyal rennetler (Fox ve ark., 2004; Sternberg, 1976)

Kullanılan mikroorganizma	**Ticari ismi**	**Üretici firma**
Mucor miehei	Rennilase	Novo
	Hanilase	Chr. Hansen
	Fromase	Wallerstein
	Marzyme	Miles
Endothia parasitica	Sure-curd	Pfizer
	Suparen	Pfizer
Mucor pusillus var. Lindt	Emporase	Dairyland
	Meito	Meito Sangyo
	Noury	Vitex

Fungal rennet üretiminde genellikle besiyeri olarak soya+arpa unundan veya buğday kepeğinden elde edilmiş steril besi yerleri kullanılır. Fermentasyon sonrası üretilmiş enzim, organik bir çözgen ile kısmi olarak çökeltilir, temizlenir ve kurutulur. Kurutulmuş toz enzim içerisine laktoz katılarak standardize edilir. Sıvı rennet üretiminde ise, bu enzim+laktoz karışımı, tuz çözeltisinde çözülür ve aktivitesi standardize edildikten sonra kullanıma hazır hale gelir. Fungal rennetler süt pıhtılaştırıcı enzimlerin yanı sıra esteraz, lipaz gibi birçok proteolitik enzimi de içerisinde bulundurur ve bu enzimlerin de peynir kalitesi üzerine olumsuz etkisi

bulunmaktadır. Bu sebeple elde edilen enzimlerin saflaştırılması ve bu istenmeyen kısımların enzim karışımından uzaklaştırılması gerekmektedir. Mikrobiyal rennetlerin kullanımı peynir oluşumuna özgül olmayan proteolitik aktiviteleri sebebi ile peynir üretim teknolojisinde köklü değişim zorunluluğunu beraberinde getirmiştir. Buna ek olarak elde edilen peynirlerde meydana gelen kusurlar sebebi ile de kullanımı buzağı renneti kadar yaygınlaşamamıştır.

2.1.3.2. Rekombinant kimozin

Artan peynir üretimi ve hayvansal rennet kaynaklarının bu enzim ihtiyacını karşılayamaması sebebi ile alternatif pıhtılaştırıcı enzim arayışına gidilmiştir. Bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı pıhtılaştırıcı enzimler peynir yapımında denenmiş fakat elde edilen üründeki düşük verim ve ürün kalitesi gibi olumsuzluklar sebebi ile buzağı rennetinin yerini alamamışlardır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile buzağıdan izole edilen kimozin geni başka bir konak hücreye aktarılmış ve bu hücrenin uygun ortamda fermantasyonu sonucunda rekombinant kimozin elde edilmiştir. Rekombinant kimozin üretimi, rekombinant üretiminde kullanılan konakçılar ve rekombinant kimozin kullanılarak üretilen peynirler ile ilgili detaylı bilgi bölüm 2.2.'de verilecektir.

2.2. Kimozin

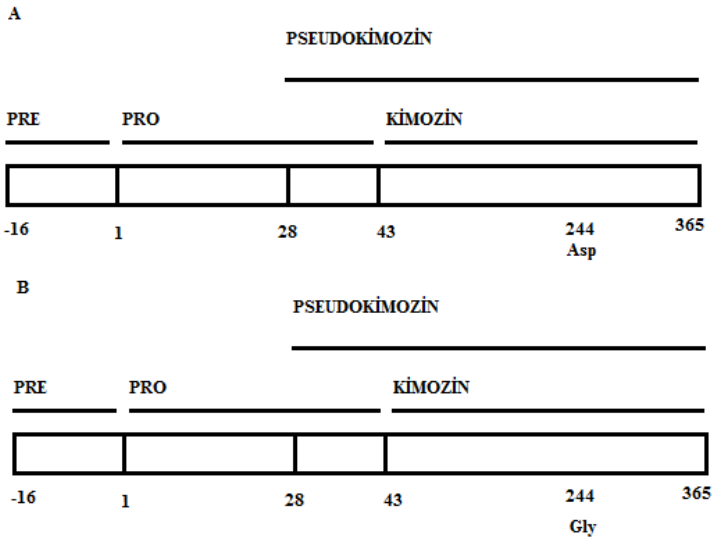
2.2.1. Kimozinin moleküler ve kimyasal yapısı

Kimozin (EC 3.4.23.4) peynir endüstrisinde sütü pıhtılaştırıcı ajan olarak kullanılan bir aspartik proteinazdır. Süt emen memelilerin midelerinden elde edilen bu enzim 323 amino asitten oluşur ve 35.6 kDa ağırlığındadır (Mohanty ve ark., 1999). Kimozin enziminin molekül ağırlığı elde edildiği kaynağa, saflık derecesine, enzimin formuna bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalarda saf buzağı kimozininin moleküler ağırlığı 35.6 kDa olarak belirlenmiştir (Noseda ve ark., 2013; Attallah, 2007; Mohanty ve ark., 2003). Benzer şekilde buzağı kimozininin moleküler ağırlığının 36.3 kDa (Foltman ve ark., 1977), 36.5 kDa (Kleinert ve ark.,

1988) bulunduğu çalışmalar literatürde mevcuttur. Bufalo, inek, deve, domuz gibi farklı hayvansal kaynaklardan izole edilen kimozin enziminin moleküler büyüklükleri ise sırası ile 40 kDa, 40 kDa, 43 kDa, 30 kDa olarak belirlenmiştir (Attallah, 2007). Bu çalışmalara ek olarak kuzu kimozinin moleküler ağırlığı 36 kDa (Baudys ve ark., 1988) ve 37.5 kDa (Rogelj ve ark., 2001) olarak, keçi kimozinin moleküler ağırlığı ise 42 ve 49 kDa (Vega-Hernandez ve ark., 2004) olarak belirlenmiştir.

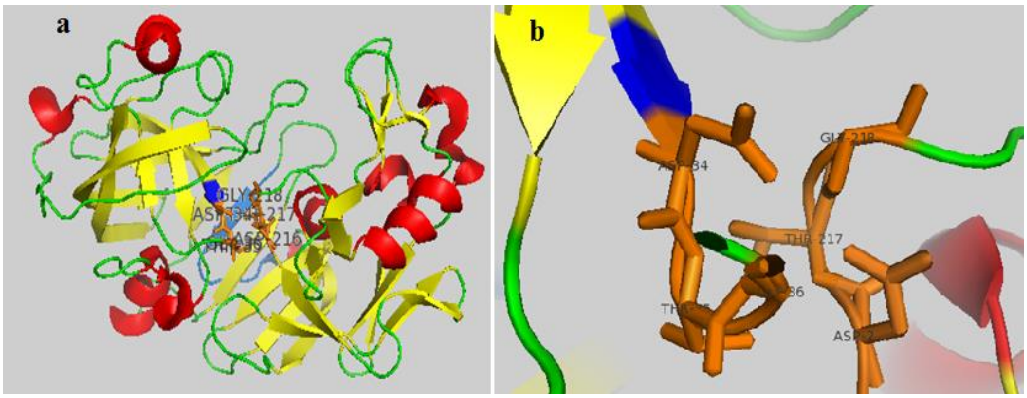
Kimozin mide mukoza hücreleri tarafından preprokimozin olarak sentezlenir. Preprokimozinden 16 aminoasit uzunluğundaki sinyal peptidinin ayrılması ile prokimozin elde edilir (Şekil 2.1.) (Attalah, 2007). Prokimozin 365 amino asitten oluşur ve 40.8 kDa ağırlığındadır. Pro kısmı aktivasyon, hedefleme ve doğru katlanma için önem teşkil etmektedir. Prokimozin ortamın pH değerine bağlı olarak iki forma dönüşebilir. N terminal önzinciriden pH 4.5'de 42 amino asitin otokatalitik ayrılması ile aktif kimozine; pH 2 'de 27 amino asitin ayrılması ile aktif pseudokimozine dönüşebilir (Kumar, 2010).

Sığır kimozininde; kimozin A, kimozin B ve kimozin C olmak üzere üç farklı allel form mevcuttur. A ve B formları arasındaki tek fark polipeptid zincirindeki 244. amino asitin A formunda aspartik asit iken B formunda glisin olmasıdır (Stanley, 1998). C formundaki kimozin ise A formunun bozunma ürünü olarak ortaya çıkar. Bu bozunma Asp_{243}-Glu_{244}-Phe_{245} aminoasitlerinin otolitik ayrılmasıyla gerçekleşir (Danley ve Geoghegan, 1988). Kimozinin C formu ise A formundaki kimozine göre %50 daha düşük proteolitik aktivite ve %25 süt koagülasyon aktivitesi gösterir (Szecsi ve Harboe, 2013). Kimozininin ikincil yapısı ağırlıklı olarak β yaprakları ve birkaç α-helezon (helical) segmentlerinden oluşmaktadır.



Şekil 2.1. Kimozin A ve kimozin B'nin şematik gösterimi

Kimozinin üç boyutlu yapısı X ışını kristalografisi kullanılarak çözülmüştür (Şekil 2.2.). Kimozin kristalleri ilk olarak Bunn ve ark. (1971), tarafından elde edilmiştir. Rekombinant sığır kimozinin yapısı 2.3 Å çözünürlükte (Gilliland ve ark., 1990) ve 2.2 Å çözünürlükte (Newman ve ark., 1991) görüntülenmiştir. Şekil 2.2.'de buzağı kimozinin üç boyutlu yapısı ve aktif bölgesi gösterilmiştir. Şekilde sarı renk ile gösterilen kısımlar beta düzlemsel yapıları, kırmızı ile gösterilen kısımlar ise helezonları göstermektedir. Aktif bölge ise kahverengi renk ile gösterilmektedir.



Şekil 2.2. a) Buzağı kimozininin üç boyutlu yapısı b) Buzağı kimozininin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı(Atlı, 2017)

Kimozinin kristal yapıdaki formu ayrılım renkyazımı kullanılarak incelenmiş ve içerisindeki 19 aminoasit tanımlanmıştır (Moore ve Stein., 1948; Schwander ve

ark., 1952). Saflaştırılmış kimozinin aminoasit içeriği incelendiğinde bu çalışmaları destekler nitelikte sonuçlar bulmuştur (Foltman, 1964). Zaman içerisinde yapılan çalışmalar ışığında buzağı (Harris ve ark., 1982; Hidaka ve ark., 1986) (Şekil 2.3.), kuzu (Pungercar ve ark., 1990), keçi (Vega-Hernandez ve ark., 2004; Kumar ve ark., 2006), deve (Kappeler ve ark., 2006) gibi canlılarda var olan kimozin dizilimi, bu dizilimin hayvanların genomu üzerlerindeki yeri, ekzon ve intron bölgeleri çalışılarak tüm aminoasit dizilimi, pre, pro bölgeleri belirlenmiş ve rekombinant olarak üretimlerine başlanmıştır.

```
                                                    Pre kimozin
  1 agcagcggctggacccagatccaagatgaggtgtctcgtggtgctacttgctgtcttcgc
                                  M  R  C  L  V  V  L  L  A  V  F  A
                                                    Pro kimozin
 61 tctctcccaaggcgctgagatcaccaggatccctctgtacaaaggcaagtctctgaggaa
     L  S  Q  G  A  E  I  T  R  I  P  L  Y  K  G  K  S  L  R  K
121 ggcgctgaaggagcatgggcttctggaggacttcctgcagaaacagcagtatggcatcag
     A  L  K  E  H  G  L  L  E  D  F  L  Q  K  Q  Q  Y  G  I  S
                                                    Kimozin
181 cagcaagtactccggcttcggggaggtggccagcgtgcccctgaccaactacctggatag
     S  K  Y  S  G  F  G  E  V  A  S  V  P  L  T  N  Y  L  D  S
241 tcagtactttgggaagatctacctcgggaccccgccccaggagttcaccgtgctgtttga
      Q  Y  F  G  K  I  Y  L  G  T  P  P  Q  E  F  T  V  L  F  D
301 cactggctcctctgacttctgggtaccctctatctactgcaagagcaatgcctgcaaaaa
      T  G  S  S  D  F  W  V  P  S  I  Y  C  K  S  N  A  C  K  N
361 ccaccagcgcttcgacccgagaaagtcgtccaccttccagaacctgggcaagcccctgtc
      H  Q  R  F  D  P  R  K  S  S  T  F  Q  N  L  G  K  P  L  S
421 tatccactacgggacaggcagcatgcagggcatcctaggctatgacaccgtcactgtctc
      I  H  Y  G  T  G  S  M  Q  G  I  L  G  Y  D  T  V  T  V  S
481 caacattgtggacatccagcagacagtaggcctgagcacccaggagcccggggacgtctt
      N  I  V  D  I  Q  Q  T  V  G  L  S  T  Q  E  P  G  D  V  F
541 cacctatgccgaattcgacgggatcctggggatggcctacccctcgctcgcctcagagta
      T  Y  A  E  F  D  G  I  L  G  M  A  Y  P  S  L  A  S  E  Y
601 ctcgatacccgtgtttgacaacatgatgaacaggcacctggtggcccaagacctgttctc
      S  I  P  V  F  D  N  M  M  N  R  H  L  V  A  Q  D  L  F  S
```

```
 661 ggtttacatggacaggaatggccaggagagcatgctcacgctgggggccatcaacccgtc
       V  Y  M  D  R  N  G  Q  E  S  M  L  T  L  G  A  I  N  P  S
 721 ctactacacagggtccctgcactgggtgcccgtgacagtgcagcagtactggcagttcac
       Y  Y  T  G  S  L  H  W  V  P  V  T  V  Q  Q  Y  W  Q  F  T
 781 tgtggacagtgtcaccatcagcggtgtggttgtggcctgtgagggtggctgtcaggccat
       V  D  S  V  T  I  S  G  V  V  V  A  C  E  G  G  C  Q  A  I
 841 cttggacacgggcacctccaagctggtcgggcccagcagcgacatcctcaacatccagca
       L  D  T  G  T  S  K  L  V  G  P  S  S  D  I  L  N  I  Q  Q
 901 ggccattggagccacacagaaccagtacggtgagtttgacatcgactgcgacaacctgag
       A  I  G  A  T  Q  N  Q  Y  G  E  F  D  I  D  C  D  N  L  S
 961 ctacatgcccactgtggtctttgagatcaatggcaaaatgtacccactgacccccctccgc
       Y  M  P  T  V  V  F  E  I  N  G  K  M  Y  P  L  T  P  S  A
1021 ctataccagccaagaccagggcttctgtaccagtggcttccagagtgaaaatcattccca
       Y  T  S  Q  D  Q  G  F  C  T  S  G  F  Q  S  E  N  H  S  Q
1081 gaaatggatcctgggggatgttttcatccgagagtattacagcgtctttgacagggccaa
       K  W  I  L  G  D  V  F  I  R  E  Y  Y  S  V  F  D  R  A  N
1141 caacctcgtggggctggccaaagccatctgatcacatcgctgaccaagaacctcactgtc
       N  L  V  G  L  A  K  A  I
1201 cccacacacctgcacacacacatgcacacatgtacatgagcacatgtgcacacacacaga

1261 tgaggtttccagacagatgattctcaataaacgttgtctttc
```

Şekil 2.3. Buzağı kimozininin pre, pro ve kimozin kısımları ve protein dizilimi (Harris ve ark., 1982; NCBI erişim numarası: NM_180994 XM_608340 XM_616986)

2.2.2. Kimozinin fizikokimyasal özellikleri

2.2.2.1. İzoelektrik noktası

Proteinler, amino grubu ile birlikte karboksil grubu da taşıdıkları için çözeltilerinde, ortamın pH sına göre hem asit, hem de baz özelliği gösterebilirler. Amino asitlerin COOH grupları bazik ortamlarda H iyonunu vererek COO– (karboksilat anyonu) ve H+ iyonlarına ayrışır. NH_2 grupları ise asidik ortamda H iyonlarını alır ve pozitif yüklü NH_3 gruplarına dönüşür. Belirli bir pH değerinde

pozitif yük ile negatif yükün eşit olur ve bu pH değerinde protein parçacıkları elektriksel alanda hareket etmezler. Anyon ve katyonların eşit olduğu bu durum 'zwitterion' ya da izoelektrik nokta (pI) olarak tanımlanır.

Protein moleküllerinin yüzeyi negatif ve pozitif yüklü gruplar ile kaplıdır. pI değerinin üstünde yüzey negatif yüklüdür. pI değerinin altında ise yüzey pozitif yüklüdür. Bu nedenle bu noktalarda yükler birbirini iterler. İzoelektrik noktada ise protein yüzeyindeki negatif ve pozitif yükler birbirlerine eşit olur. Bu da proteinlerin çökmesine neden olur.

Literatürde kimozinin izoelektrik noktasının belirlenmesi üzerine birçok çalışma mevcuttur. Örneğin Foltman (1970), buzağı kimozinin izoelektrik noktasını 4.6 olarak belirlerken, Righetti ve ark. (1977) 4.7, Martin ve ark. (1982) 4.5-5.0, Kleinert ve ark. (1988) 4.5-4.7, Bines ve ark. (1989) 4.55-5.0 olarak belirlemişlerdir. Amourache ve Vijayalakshmi (1984) yaptıkları çalışmada bu değeri 6.0 olarak bulmuş, Moschopoulou ve ark. (2006) ise 4.6 ile 5.1 değerleri arasında olduğunu gözlemlemişlerdir.

2.2.2.2. Optimum pH

Kimozin enzimi zimojen bir enzimdir ve asidik şartlarda 42 amino asitten oluşan N terminal ön zincirinin otokatalitik ayrılması sonucunda aktifleşir (Foltmann, 1977). Bu sebepten pro-kimozin formunda üretilen rekombinant bir kimozinin aktifleşebilmesi için asidik bir ortama ihtiyaç duyulmaktadır. Bu asidik koşullar ise ya rekombinant kimozin üretimi yapılan fermentasyon ortamının pH' ının ayarlanması ile ya da fermentasyon sonucu elde edilen enzimlerin asit-baz nötralizasyonuna tabi tutulması ile sağlanmaktadır (Wang ve ark., 2015). Noseda ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada farklı fermentasyon ortamının pH' ının düşmesi ile sığır kimozininin aktivitesinin arttığını, pH 3.0'te fermentasyonu yapılan enzimlerin pH 6.0'da fermentasyonu yapılan enzimlerden daha yüksek aktivite gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Wang ve ark., (2015)'te yaptıkları çalışmada ise asit-baz nötralizasyonu yapılan rekombinant deve kimozin enzimlerinin yapılmayan

enzimlerden daha yüksek aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Kimozin enzimi aktif forma dönüşmek için asidik koşullara ihtiyaç duyduğu gibi aktif kimozin enzimi de maksimum aktivitesini asidik koşullarda göstermektedir. Foltman (1959) yaptığı çalışmada kazeinin tümünün kimozin tarafından proteoliz olduğu ortam pH'ını 5.8 olarak belirlemişken, bu aralığın 4.6 ile 6.4 arasında değiştiğini de belirtmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda kimozinin maksimum aktivite gösterdirdiği substrat pH değerleri rekombinant bufalo kimozini için 5.5 (Mohanty ve ark., 2003), deve kimozini için 5.04 (Wang ve ark., 2015), buzağı kimozini için 4.0 (Jian ve ark., 2012) olarak belirlenmiştir.

2.2.2.3. pH stabilitesi

Enzimler protein yapıdadır ve pH'larındaki değişimler stabilitelerini etkiler. Kimozin enzimi stabilitesini kaybettiği pH değerlerinde aktivite gösteremez yani sütü pıhtılaştıramaz. Kimozin enziminin pH stabilitesi, enzimin elde edildiği kaynağa, elde edilme şekline, enzimin asidik ya da bazik şartlarda kalma süresi gibi etmenlere göre farklılık göstermektedir. Foltman (1959)' da yaptığı çalışmada kimozinin kristal halinde bulunduğu çözeltinin optimum stabilite gösterdiği aralığın 5.3 ile 6.3 arasında olduğunu belirlemiştir. Aynı zamanda bu enzimin pH 2.0 değerinde stabilitesini kısmen koruduğunu fakat pH 3.5 civarında ve 6.5'in üzerinde otodegredasyondan dolayı stabilitesini kaybettiğini gözlemlemiştir. Yapılan çalışmalarda rekombinant koyun kimozininin asidik pH aralığında stabil olduğunu fakat pH 7.0'ın üzerinde ise stabilitesini kaybettiği (Mezina ve ark., 2001), rekombinant deve kimozin enziminin 37 °C'de 8 saat inkübe ettikten sonra pH 6.5 değerine kadar stabilitesini koruduğunu fakat 6.5' ten sonra keskin bir şekilde azalma göstererek pH 7.0 değerinde ise aktivitesini kaybettiği gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2015). Benzer şekilde rekombinant buzağı kimozinin pH stabilitesi 37 °C'de 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda ölçülmüş ve stabilitesinin pH 3.6'da bir miktar düştüğünü onun dışında asidik aralıkta stabilitesinin sabit kaldığı, pH 7.0'de ise enzimin aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak enzimin asit ve baz ile muamele edildiği sürenin enzim aktivitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu

tespit edilmiştir (Jiang ve ark., 2012).

2.2.2.4. Optimum sıcaklık

Sıcaklık, enzimlerin hem aktivitesini, hem de stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Ortam koşulları sabit tutulduğunda, sıcaklık arttıkça tepkime hızı belirli bir noktaya kadar yükselir ve maksimum değere ulaştıktan sonra aniden düşmeye başlar. Enzimin tepkime hızının maksimum olduğu bu noktaya optimum sıcaklık denilmektedir. Kimozin enzimi için bu optimum değer 30 °C ile 50 °C arasında değişmekle beraber enzimin elde edildiği kaynağa, kullanılan substrat özelliğine göre farklılıklar göstermektedir (Kumar ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda saflaştırılmış kimozinin aktivite gösterdiği değerin 30-40 °C arasında olduğu gözlemlenmiş iken (Kumar ve ark., 2010), bu değerin buzağı (Shindo ve Arima, 1979), deve (Elegamy, 2000; Wang ve ark., 2015), bufalo (Mohanty ve ark., 2003) ve keçi (Kumar ve ark., 2006) için benzer olduğu gözlemlenmiştir.

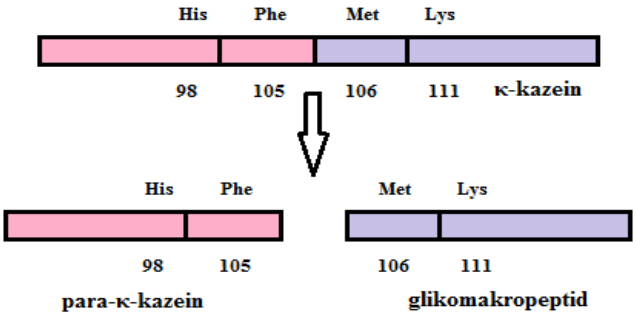
2.2.2.5. Isı stabilitesi

Enzimler optimum çalıştıkları noktalardan uzaklaştıkça aktiviteleri azalır ve çok yüksek ve düşük sıcaklıklarda stabiliteleri bozulur. Bu değerler enzimin cinsine, ısıya maruz bırakıldıkları süreye göre farklılık gösterebilmektedir. Kimozin enzimi ile yapılan çalışmalarda enzim farklı sürelerde yüksek sıcaklıklara maruz bırakılarak enzimin aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda buzağı kimozininin 2 °C'de oda sıcaklığına nazaran daha stabil (Foltman, 1959) olduğu, 50° C' nin altındaki sıcaklıklara maruz kaldığında aktivitesinin devam ettiği (Shindo ve Arima, 1979), sıcaklığın 45 °C den 55 °C 'ye çıkması ile aktivitesinde ciddi bir atış olduğu (Kawaguchi ve ark., 1986) gözlemlenmiştir. Buna ek olarak deve kimozininin buzağı ve bufalo kimozinine nazaran ısıya karşı direncinin daha yüksek olduğu (Elagamy, 2000), bufalo kimozinin 50 °C'ye kadar stabil olduğu, sıcaklığın 60 °C'ye çıkmasıyla aktivitesinin %50 oranında azaldığı, keçi kimozinin 55 °C'ye kadar uygulanan ısıya direnç gösterdiği (Kumar ve ark., 2006) yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir.

2.2.3. Kimozinin çalışma mekanizması ve sütün enzimatik pıhtılaşma aşamaları

Süt proteinlerinin yaklaşık %80'ini kazein oluşturmaktadır. Kazein süt içerisinde misel adı verilen parçacıklar halinde bulunur. Bir kazein miseli α_{s1}-kazein, α_{s2}-kazein, β kazein ve κ- kazein olmak üzere dört temel bileşenden oluşur. Bunların oranları inek sütünde sıra ile %38, %10, %36 ve %12 civarındadır (Fox ve McSweeny, 1997). Bütün kazeinler fosforile haldedir. Özellikle $\alpha_{s1,}$ α_{s2} ve β kazein içeriğindeki yüksek fosfordan dolayı Ca^{+2} ile güçlü bir bağ oluşturarak çöktürür fakat κ- kazein tek fosfat içerdiğinden Ca^{+2} ile güçlü bir bağ oluşturamaz ve yüksek Ca^{+2} konsantrasyonunda çözünebilir haldedir.

Süte enzim ilave edildiğinde süt üç aşamada pıhtılaşır. Bu aşamalar sırası ile enzimatik (proteolitik) aşama, agregasyon aşaması ve jelleşme aşamasıdır. Enzimatik aşamada; süte kimozin eklenmesi ile kazein misellerinin stabilitesini sağlayan κ-kazeinin Phe_{105} ve Met_{106} arasındaki bağ hidroliz olur. κ-kazein para-κ-kazein ve glikomakropeptidlere dönüşür (Şekil 2.4.). Bu bağ, kazeini oluşturan diğer peptid bağlarından çok daha hassastır. HPhe-MetOH arasındaki dipeptid bağı, Phe-Met bağı içeren tetrapeptidler ve tripeptidler hidroliz olmazlar. Ancak bu bağ beşli peptidlerde, HSer-Ser-Phe-Met-Ala-OHze, hidroliz olur (Fox, 1988; Hill, 1968).



Şekil 2.4. Kimozinin κ-kazein üzerine etkisi

Misellerde bulunan κ-kazeinin %85-%90'ı kimozinin etkisi ile parçalandıktan sonra kazein misellerinin stabiliteleri bozulur ve oluşan para-κ-kazeinler kalsiyum iyonlarının varlığında birbirleri ile birleşerek pıhtı oluştururlar. Bu aşama agregasyon yani kümeleşme olarak adlandırılır ve temel olarak misellerin değişik tipteki

elektrostatik ve hidrofobik bağlarla birbirlerine tutunması sonucu oluşur. Bu aşamada kalsiyum iyonları para-κ-kazeinlerin negatif yüklü bölgelerini nötürleyerek elektrostatik itmeleri zayıflatmakta ve kalsiyum-para-kazeinat oluşturmaktadır. Agregasyonun hızını etkileyen faktörler ise sütün sıcaklığı ve ortamda bulunan kalsiyum iyonu konsantrasyonudur (Dervişoğlu ve ark., 2007).

Jelleşme aşamasında ise agregasyon sonucu bir araya gelen kazein miselleri birleşmeye devam ederek mikrometre genişliğinde porlara sahip protein ağını yani jelini oluşturur. Bu aşamada pH önemli bir parametredir. pH' ın belirli bir noktaya kadar düşmesi jel yapısını olumlu yönde etkilemekte fakat pH'ın 6.0'dan fazla olması demineralizasyona ve kalsiyumun misellerden ayrılmasına sebep olmaktadır (Brule ve Lenoir, 1986)

Sütün kimozin enzimi ile pıhtılaşma hızını pH, gördüğü ısıl işlem, kimozinin konsantrasyonu gibi faktörler etkilemektedir (Scott, 1986; Koçak ve Devrim, 1994; Erdem, 1997; Walstra ve ark., 2005).

2.2.4. Rekombinant kimozin üretimi

Peynir endüstrisinde kullanılan hayvansal pıhtılaştırıcı ajanların peynir yapımı için gerekli enzim miktarını karşılayamaması, pıhtılaştırıcı enzimlerin farklı proteolitik özelliklerinden dolayı standart, yüksek kalite ve verime sahip ürün elde edilememesi gibi sebepler peynir yapımında kullanılabilecek yeni enzim kaynakları arayışını başlatmıştır. Bu enzim arayışı gen teknolojisinin ilerlemesi ile rekombinant kimozin üretiminin önünü açmıştır. Bu yeni teknoloji sayesinde hayvan kesmeden büyük miktarlarda enzim üretimi yapılabilmekte, saf, standart ve peynir verimi yüksek enzimler üretilebilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisiyle kimozin üretiminin temel basamakları şu şekilde sıralanabilir: (i) kaynak organizmadan kimozin geninin eldesi, (ii) kimozin geninin uygun bir vektöre klonlanması, (iii) içerisinde kimozin genini taşıyan vektörün seçilen uygun konakçıya aktarılması, (iv) hedef geni taşıyan konakçı

canlının uygun fermentasyon ortamında geliştirilmesi, (v) fermentasyon ürünlerinin saflaştırılması. Bu amaçla kullanılacak olan vektörün seçilmiş olan konakta ifade olabilmesi, hedef kimozin genini taşıması ve vektör içeren ve içermeyen konak hücrelerin birbirlerinden ayırt edilmesini sağlayabilecek seçilim özelliğinde olması gerekir. Uygun seçimler, kimozin üretme yeteneğindeki suşların geliştirilebilmesine olanak sağlar. İlgili karakteristik özelliklerin tespitiyle beraber büyük ölçekli enzim üretimine geçilebilir.

Rekombinant kimozin üretimi farklı konakçı ve kimozin gen kaynakları kullanılarak yapılmış ve üretilen peynirlerin kalitesinin buzağı renneti ile üretilen peynirler ile karşılaştırılabilir olduğu görülmüştür (Houen ve ark., 1996; Rogelj ve ark., 2001; Mohanty ve ark., 2003; Vega-Hernandez ve ark., 2004; Kappeler ve ark., 2006). Rekombinant kimozin düşük proteolitik aktiviteye sahiptir, vejeteryanlar tarafından kullanılabilir ve peynir verimini arttırdığı gibi istenmeyen proteolitik parçalanmalar da oluşturmaz (Kumar ve ark., 2010). Buna ek olarak ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından gıdalarda kullanımına izin verilen ilk rekombinant enzim *E. coli* K-12 ile üretilen rekombinant sığır kimozini olmuştur ve güvenli gıdalar (GRAS) kategorisinde değerlendirilmiştir. (Olempska-Beer ve ark., 2006).

2.2.4.1. Rekombinant kimozinin ifadesi için kullanılan konakçılar

Rekombinant protein üretiminde konakçı organizma, vektör ve promotor seçimi başarılı bir transformasyon için önemli parametrelerdir. Rekombinant kimozin üretimi sürecinde bakteri, maya, küf ve memeli hücre kültürleri gibi çeşitli mikrobiyal konakçılar kullanılmıştır (Çizelge 2.5.).

Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* ucuz bir substrat üzerinde hızlı ve yoğun büyüme kabiliyeti, iyi karakterize edilmiş genetiği, dayanıklı hücresel yapısı nedeniyle heterolog protein üretimi için mevcut birçok sistem arasında, en yaygın kullanılan konakçılardan biridir (Dai ve ark., 2005; Mergulhao, 2005; Sorensen ve Mortensen, 2005; Hunt, 2005). Fakat translasyon sonrası modifikasyonların sınırlı olması, üretilen proteinlerin endotoksinler tarafından kontamine edilebilmesi,

infüzyon cisimciği içermesi sebebi ile ürettiği proteinlerin saflaştırılmasındaki zorluklar da bu sistemin dezavantajlarıdır (Çelik ve Çalık, 2012). Yapılan çalışmalarda *E. coli* kullanılarak elde edilen kimozin enzimlerinin özellikleri doğal buzağı kimozini ile kıyaslandığında ayırt edilemeyecek kadar benzer özellikler gösterdiği belirtilmiştir ancak *E.coli* hedef proteini hücre içi ara maddesi olarak salgıladığından protein eldesinin maliyeti artmıştır (Menzella, 2011). *E. coli* ve *S. cerevisiae*' da üretilen kimozinler çözünmez formda elde edilmiş ve daha sonraki tekrar katlanma aşamalarında aktif protein elde edilebilmiştir (Mellor ve ark., 1983; Emtage ve ark., 1983). Bunun da ötesinde *S. cerevisiae*'da aktif ekstraselüler kimozin üretimi, düşük miktarda pro-kimozin salgılanması nedeni ile başarılı olamamıştır (Smith ve ark., 1985). *K. lactis* mayası da rekombinant kimozin üretimi için kullanılan konakçılar arasında yer almaktadır. Bu konakçı yüksek seviyede enzim üretimi, tamamen sekanslanmış olan genomunun bulunabilirliği, genetik manupülasyonunun kolaylığı gibi sebepler ile kimozin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Mohanty ve ark., 1999). Kimozin ayrıca filamentli funguslardan olan *Aspergillus* spp. (Cullen ve ark., 1987; Tsuchia ve ark., 1993) ve *Trichoderma resei*'de (Harkki ve ark., 1989) üretilmiştir.

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* ise aktif heterolog proteinlerin üretimi için önemli bir ekspresyon (ifade) sistemi haline gelmiştir. Son yıllarda yapılan bir çok çalışmada farklı orjindeki proteinler başarılı bir şekilde bu organizmada klonlanmış ve ifade edilmiştir (Lin-Cereghino ve ark., 2006; Macanley-Patrick ve ark., 2005; Cereghino ve ark., 2002). *P. pastoris* sistemin avantajları arasında (i) basit moleküler manipülasyon (Cregg ve ark., 2000), (ii) rekombinant proteinlerin yüksek miktarda ifadesi (Richter ve ark., 2006, Rodriguez ve ark., 1994), (iii) translasyon sonrası modifikasyonlar, (iv) doğru protein katlanması (Cereghino ve ark., 2002; Cregg ve ark., 2000), (v) ekstraselüler proteinin efektif bir şekilde salgılanması (Peng ve ark., 2004), (vi) minimal besiyerinde yüksek biyokütle oluşturacak şekilde maya gelişiminin sağlanabilmesi sayılabilir. *P. pastoris*'in ekspresyon sisteminin başarısının ardında iki önemli neden vardır. Bunlardan birincisi, güçlü ve efektif olan metanol-indüklenebilir alkol oksidaz gen promotörünün (AOX1) varlığı ve bu promotörün yabancı genlerin ifadesinde

kullanılabilme potansiyelidir (Cregg ve ark., 1988). Ikincisi ise *P. pastoris*'in fermentatif metabolizma yerine aerobik solunumu tercih etmesi ve bu sayede yüksek hücre yoğunluğu bulunan proseslerde etanol ve asetik asit birikiminin meydana gelmemesi olarak ifade edilebilir (Cereghino ve ark., 2002). Bunların da ötesinde *P. pastoris* potansiyel onkojenik özellikteki veya viral genleri içermemekte ve bu da mayanın GRAS statüsünü desteklemektedir (Ciofalo ve ark., 2006; Cregg ve ark., 1993). Bunlardan dolayı *P. pastoris* rekombinant protein üretimini büyük ölçüde gerçekleştirmek için uygun bir ekspresyon sistemi olarak tanımlanır (Baumgartner ve ark., 2002).

Çizelge 2.5. Kimozinin ifadesi için kullanılan farklı mikrobiyal konakçılar

Konakçı organizma	**Kimozin kaynağı**	**Kimozin formu**	**Plasmid**	**Promotor**	**Referans**
E. coli	Buzağı	Pro	pCR301	LacUV5	Nishimori ve ark., 1982
E. coli	Buzağı	Pro	pCT66,67,70	Triptofan	Emtage ve ark., 1983
E. coli	Buzağı	Pro	p501	Triptofan	Nishimori ve ark., 1984
E. coli	Buzağı	Pro	pTaAc	Tac	Zhang ve ark., 1991
E. coli	Kuzu	Met-pro	pKP1500	_	Rogelj ve ark., 2001
E. coli	Keçi	Pro	pET43.1a (+)	T7	Kumar ve ark., 2007
Proteus mirabilis	Sığır	Pro	pKM636, pKM1361, pKM6361,	SpeA	Klessen ve ark., 1989
Bacillus subtilis	Sığır	Pro	pSM316	Nötral proteaz	Parente ve ark., 1991
Kluyveromyces lactis	Keçi	Pro	pQSec1	pGK	Vega-Hernandez ve ark., 2004
Saccharomyces cerevisia	Keçi	Pro	pQFlag	ADH_2	Vega-Hernandez ve ark., 2004
Aspergillus oryzae	Buzağı	Kimozin	_	glaA	Tsuchia ve ark., 1993
Aspergillus awamori	Sığır	Kimozin	-	pdA & pepB	Cardoza ve ark., 2003
Aspergillus niger	Deve	Pro	pGAMpR	glaA	Kappeler ve ark., 2006
Pichia pastoris	Bufalo	Prepro, pro, kimozin	pGAPZαA	pGAP	Vallejo ve ark., 2008
Pichia pastoris	Sığır	pro	pPICZaA	-	Zhang ve ark., 2009

Çizelge 2.5. **(devam)**

Pichia pastoris	Tibet sığırı	Prepro, pro, kimozin	pPICZaA	-	Luo ve ark., 2016
Pichia pastoris	Sığır	Pro	pPICZaA	pGAP	Jiang ve ark., 2012
Pichia pastoris	Deve	Pro	pPICK9K	AOX1	Wang ve ark., 2015

2.2.4.2. Rekombinant kimozin ile üretilen peynirler

Rekombinant yolla üretilen kimozinler, kazein üzerinde buzağı renneti ile benzer bir etki gösterir. Hatta rekombinant kimozin kullanılarak üretilen peynirlerde pepsin ve diğer proteazların sebep olduğu istenmeyen parçalanmalar olmadığından rekombinant kimozin ile üretilen peynirlerin veriminin ve kalitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Fox ve McSweeney, 1997). İlk rekombinant kimozin olan buzağı kimozininin üretilmesinin ardından farklı konakçılarda sentezlenmiş buzağı kimozinleri ile buzağı rennetinin peynir üzerindeki etkileri tartışılmaya başlanmıştır. Bu amaçla *E. coli*'de (Green ve ark., 1985; Kandarakis ve ark., 1999) ve *Kluyveromyces marxianus* var. *Lactis'*de (Bines ve ark., 1989) sentezlenmiş rekombinant buzağı kimozini Cheddar (Green ve ark., 1985; Bines ve ark., 1989) ve Feta (Kandarakis ve ark., 1999) peynirleri üzerinde, *Aspergillus niger* da sentezlenmiş buzağı kimozini, Edam ve Tilsit peynirleri üzerinde (Prokopek ve ark., 1990) buzağı renneti ile beraber denenmiştir. Üretilen peynirlerin duyusal, tekstürel ve proteolitik özellikleri birbirleri ile karşılaştırılmış aralarında anlamlı bir fark gözlemlenmediği tespit edilmiştir.

Rekombinant olarak üretilen kimozinler aynı zamanda farklı pıhtılaştırıcı enzim kaynakları ile kıyaslanarak bu enzimler ile proteolitik farklılıkları ortaya konulmuştur. Saldamlı ve Kaytanlı (1998) yaptıkları çalışmada dört farklı proteaz (fromase, rennilase, maxiren 50 (rekombinant kimozin), buzağı renneti) kullanarak beyaz peynir üretimi yapmışlardır. Olgunlaşmanın 1., 30., 60. ve 90. gününde alınan numunelerde yapılan fiziksel, kimyasal, duyusal ve proteolitik analiz sonuçlarına göre rekombinant kimozin ile üretilen peynirlerin buzağı renneti ile yapılan peynirlerden proteolitik açıdan daha üstün özellikler gösterdiği, duyusal açıdan ise en

az buzağı renneti kadar beğenildiği gözlemlenmiştir. Sheehan ve ark. (2004), rekombinant kimozin, *R. miehei* ve *R. pusillus* proteazlarını kullanarak yağı azaltılmış Mozarella peyniri üretmiş ve bu enzimlerin peynirin birincil proteoliz düzeylerini etkilediklerini gözlemlemişlerdir. Özellikle *R. pusillus* ile üretilen peynirlerde bu oranın diğerlerinden daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Abdel Kader (2003), mikrobiyel rennet ve rekombinant kimozin kullanarak Domiati peyniri üretmiş ve bu peynirlerin proteolitik özelliklerini incelemiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre mikrobiyel rennet ile üretilen peynirlerdeki protein degredasyonunun rekombinant kimozin kullanılarak yapılan peynirlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Broome ve ark. (2006), Cheddar peyniri üretiminde rekombinant kimozin, thermolase (*C. parasitica* proteazı), fromase ve marzyme (*R. miehei* proteazları) gibi farklı koagulantlar deneyerek elde edilen peynirlerin proteolitik özelliklerini birbirleri ile karşılaştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada rekombinant kimozinin α_{s1} kazeinine karşı, termolase'ın ise β kazeine karşı daha yüksek proteolitik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Rogelj ve ark., (2001) yaptıkları çalışmada buzağı renneti, rekombinant kuzu ve buzağı kimozinlerinin aktivitelerini ve bu enzimler ile yapılan peynirlerin proteolitik özelliklerini birbirleri ile kıyaslamışlardır. Yapılan bu çalışmada rekombinant kimozinler ile üretilen peynirler benzer aktivite ve proteolitik özellikler gösterir iken buzağı renneti ile üretilen peynirlerden üstün özellikler göstermişlerdir. Benzer şekilde rekombinant deve kimozininin Cheddar peynirine uygunluğunun belirlenmesi amacı ile rekombinant deve kimozini ve rekombinant buzağı kimozini kullanılarak Cheddar peyniri yapılmış, üretilen peynirler birbirleri ile proteolitik ve duyusal açıdan kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmada rekombinant deve kimozini ile üretilen peynirlerin buzağı kimozini ile üretilen peynirlerden daha düşük proteolitik aktivite gösterdiği ve daha üstün tat özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir (Bansal, 2009).

2.2.5. Tavşan kimozini

Tavşan midesinde kimozin enziminin var olduğu ve peynir yapımında önemli bir enzim kaynağı olabileceği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Rao ve Dutta, 1981; Dobler ve ark., 2016; Nurliyani ve ark., 2013; Atlı, 2017; Alihanoğlu ve ark., 2017).

Bu konudaki deneysel çalışmalar Nurliyani ve ark. (2013)'nın tavşan midesinden ekstrakt edilen enzimlerin soğukta ve dondurarak depolanmasının, enzim kalitesi üzerine etkilerinin araştırılması ile başlanmıştır. Yapılan bu çalışmada farklı şartlarda depolanan ekstraktlar 30 gün boyunca depolanmış ve bu süreçte enzimde meydana gelen değişimler gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 30 gün sonunda enzimlerin aktivitelerinde önemli bir değişim olmadığı fakat soğukta depolanan enzimlerin proteolitik aktivitelerinin dondurarak depolanan enzimlere nazaran daha düşük, pH değerinin ise daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

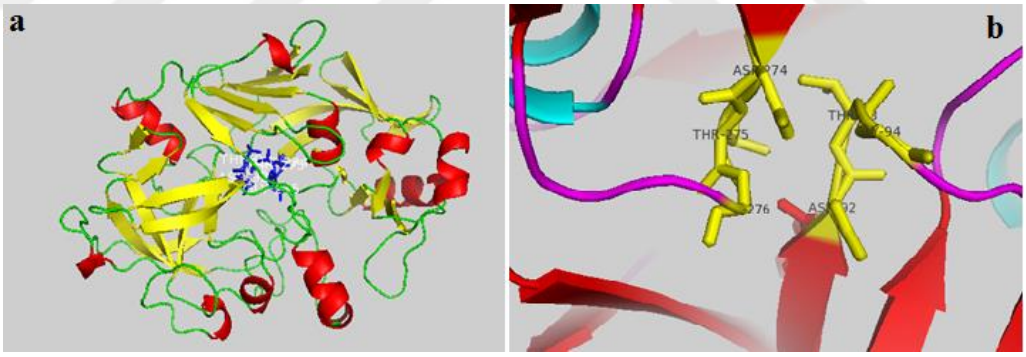
Dobler ve ark. (2016) ise tavşan midelerini tuzlayıp kuruttuktan sonra farklı çözücüler kullanarak kimozin enzimini özütleyip elde edilen enzimin özelliklerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada ekstraksiyon çözeltisine etanol ve tuz eklemenin enzim aktivitesi üzerine bir etkisinin olmadığı belirlenir iken %1 ile %5 arasında tuz içeriğine ve pH 4.0 değerine sahip bir çözeltinin ekstraksiyon için uygun olduğu gözlemlenmiştir. Optimum koşullarda özütlenen kimozin enziminin peynir yapımında kullanılabilecek alternatif bir enzim kaynağı olabileceği belirlenmiştir.

Tavşan rennetinin peynir yapımına uygunluğunun belirlenmesinden sonra bu alanda biyoinformatik çalışmalar başlamıştır. Bu çalışmalar ışığında tavşan kimozin geninin tavşanın 13. kromozomu üzerinde 53708876-53717491 bazları arasında bulunduğu belirlenmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda, diğer canlılarda bulunan kimozin gen dizilimleri ile tavşan genomu karşılaştırılmış ve bu genin 9 ekzon ve 8 intron bölgeden oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca tavşan kimozin dizilimi diğer kimozin genine sahip canlılardaki dizilimler ile kıyaslandığında %75-%80 civarında benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur (Çizelge 2.6.) (Atlı, 2017)

Çizelge 2.6. Tavşan ve kimozin geni içeren bazı canlı türlerinin kimozin genine karşılık gelen cDNA dizilimlerinin karşılaştırılması sonucu benzerlik oranları (Atlı, 2017).

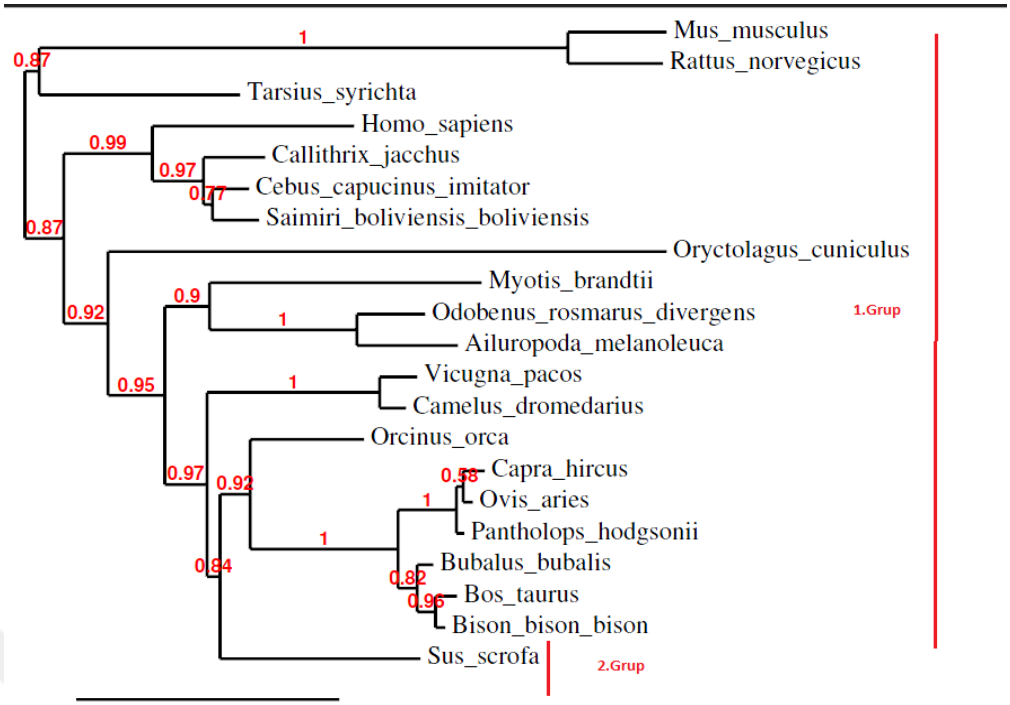
Benzerlik Gösterdiği Canlı Türü	**Benzerlik Oranı**
Bos taurus (Buzağı)	% 79
Homo Sapıens (İnsan)	% 78
Mus musculus (Fare)	% 75
Ovıes arıes (Koyun)	% 80
Rattus norvegıcus (Sıçan)	%75
Sus sucrofa (Yaban Domuzu)	% 80
Bubalus bubalıs (Manda)	% 80
Capra hırcus (Keçi)	% 80
Bos grunıens (Tibet Sığırı)	% 79
Camelus dromedarius (Deve)	% 80

Tavşan kimozininin ve aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı Şekil 2.5.'de verilmiştir.



Şekil 2.5. a)Tavşan kimozininin üç boyutlu yapısı (Atlı, 2017) b)Tavşan kimozinin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı (Atlı, 2017)

Tavşan kimozini ile farklı canlı türlerinin sahip olduğu kimozin genleri arasındaki evrimsel akrabalık kimozin geni filogenetik ağacı (Şekil 2.6.) baz alınarak değerlendirilmiştir. Yapılan bu değerlendirmeye göre tavşan kimozinin deve kimozinine olan yakınlığının koyun, keçi, sığır gibi ruminantlara olan yakınlığından daha fazla olduğu görülmüştür (Atlı, 2017).



Şekil 2.6. Memeliler sınıfına ait kimozin genine sahip 21 canlı türünün cDNA dizilimleri baz alınarak çizilen filogenetik ağaç (Atlı, 2017)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan buzağı ve deve kimozin enzimleri Chr-Hansen A/S (Hoersholm, Danimarka) firmasından, QIAquik DNA saflaştırma kiti Qiagen (Almanya) firmasından; PZR kiti (Magnezyum klorür, dNTP, standart buffer, Taq Polimeraz), Restriksiyon Endonükleaz enzimleri New England Biolabs (İngiltere) firmasından; primerler Sentegen (Türkiye) firmasından; *P. pastoris* mayaları, ekspresyon vektörleri ve besiyerleri Invitrogen (Kaliforniya) firmasından; JM 109 kompetent hücreleri Promega (Amerika) firmasından; Bradford Protein Assay kiti BIO-RAD (Amerika) firmasından; temin edilmişlerdir. Analizler için kullanılan tüm kimyasal materyaller ise Merck (Almanya) firmasından temin edilmiş olup analitik saflık düzeyindedirler. Çalışmada kullanılan tavşan midesi Mardin/Derik'te yerel bir marketten, peynir yapımında kullanılan süt ise Güllüoğlu San.ve Tic.Ltd.Şti.'den (Şanlıurfa) temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tavşan midesinden rennet ekstraksiyonu

Temizlenmiş ve kurutulmuş olarak temin edilen tavşan midesinden rennet ekstraksiyonu Lambert (1988)'e göre yapılmıştır. Özetle, 10 g kurutulmuş mide dokusu ince şeritler halinde bölündükten sonra %12'lik tuzlu su içerisinde (1/10) (ağ/hac) oda sıcaklığında 5 dakika boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra çözeltinin pH' ı 1 M HCl ile 4.3'e ayarlanarak 35°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Ekstrakt filtre edildikten sonra pH'ı 1 M NaOH ile 5.6 ya ayarlanarak 4°C'de peynir yapımına kadar saklanmıştır.

3.2.2. Maya kuvvetinin belirlenmesi

Maya kuvveti mayalanmaya hazır hale gelmiş sütte; bir birim mayanın 35°C'deki sütü 40 dakikada pıhtılaştırdığı miktardır. Maya kuvveti aşağıda verilen formüle göre (Denklem 3.1) hesaplanmıştır ((Hayaloğlu ve Özer, 2011).

$$MK=\frac{2400*V}{T*v} \quad (3.1)$$

MK: Maya kuvveti
V: Süt miktarı(mL)
v: Maya miktarı (mL)
T: Pıhtı oluşma süresi (sn)

3.2.3. Peynir üretimi

Peynir üretiminde tavşan renneti, ticari buzağı (600 IMCU/mL) ve ticari deve kimozini (1000 IMCU/mL) olmak üzere üç farklı enzim kullanılmıştır. Bu enzimler maya kuvvetleri belirlendikten sonra aşağıdaki denklem (Denklem 3.2) kullanılarak 45 litre sütü 60 dakikada pıhtılaştıracak maya miktarları aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır (Hayaloğlu ve Özer, 2011).

$$MM=\frac{2400*V}{\left(\frac{TPS}{4}\right)*\left(\frac{1}{MK}\right)} \quad (3.2)$$

MM: Maya miktarı (mL)
TPS: Toplam mayalanma süresi (sn)
MK: Maya kuvveti
V: Peynire işlenecek süt miktarı (mL)

Peynir yapımında %3 yağ içeriğine sahip standardize süt kullanılmıştır. Temin edilen süt, analizleri yapıldıktan sonra 65°C'de 30 dakika pastörize edilmiş ve sıcaklığı 35°C'ye düşürülerek sitrik asit ilavesi ile pH değeri 5.9'a sabitlenmiştir. $CaCl_2$ (%0.02) eklendikten sonra enzim ilavesi yapılarak pıhtı oluşana kadar 35°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan pıhtı büyük bıçaklar yardımı ile kesilmiş ve süzülen teleme tuzlanarak (2.25 g/L süt) baskıya alınmıştır. Elde edilen peynir vakum ambalajla paketlendikten sonra 4°C'de 60 gün depolanmıştır.

3.2.4. Peynir kompozisyonun belirlenmesi

Üretim sonrası peynir örneklerinin pH'ları O'Mahony ve ark. (2003)'nın uyguladığı metoda göre; protein miktarları IDF (1993)'e göre; tuz miktarı Fox (1963)'un uyguladığı metoda göre; nem miktarları IDF (1982)'e göre; yağ miktarları ise IIRS (1955)'e göre belirlenmiştir.

3.2.5. Duyusal analiz

Peynirlerin duyusal analizleri 10 eğitimli panelist tarafından, depolamanın 0, 15, 30, 60. günlerinde alınan örneklerde yapılmıştır. Yapılan değerlendirmelerde üretilen peynirlerin tat, koku, yapı, iç ve dış görünüş özellikleri puanlandırılmıştır. Puanlamada kullanılan duyusal analiz formu koku özellikleri Drake ve ark. (2001; 2005)'nın tanımladığı şekilde, yapı özellikleri ise Brown ve ark. (2003)'nın tanımladığı şekilde tanımlanarak hazırlanmıştır (EK 1). Hazırlanan formda 1 en düşük 5 ise en yüksek özellikleri temsil etmektedir.

3.2.6. Üre- PAGE analizi

Peynir örneklerinde Üre-PAGE analizi Andrews (1983)'in uyguladığı metoda göre (%12.5 toplam akrilamid, %4 çarpraz bağlayıcı ajan, pH 8.9) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jeller Blakesley ve Boezi (1977)'nin yaptıkları şekilde boyandıktan sonra mini BIS PRO (İsrail) cihazı kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2.7. Biyoinformatik analizler

Bu çalışmada NCBI (National Center for Biotechonology Information), NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) veri tabanları kullanılarak tavşan gen dizilimi ile farklı memeli türlerine ait kimozin genlerinin nükleik asit dizilimlerinin karşılaştırılmış ve tavşana ait tahmini bir pro-kimozin gen dizilimi elde edilmiştir. Elde edilen bu dizilim yapılacak çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.8. pPIC9K-Ochy vektör dizaynı

Biyoinformatik analizlerle gen sekansı belirlenen hedef genimiz *Oryctolagus cuniculus* pro-kimozin genini içeren pPIC9K vektörü GenScript (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Toplamda 1089 bazdan oluşan hedef gen dizisi, kodon optimizasyonu yapıldıktan sonra hedef genimiz pPIC9K vektörüne çoklu klonlanma bölgesinden EcoRI ve NotI kesme enzimleri ile kesilerek klonlanmıştır. Liyofilize olarak temin edilen plazmid hücreler santrifüj edildikten sonra 20 µl steril ultra saf suda çözündürülerek -20 °C de saklanmıştır.

3.2.9. *Oryctolagus cuniculus* pro-kimozin genini izole etmek için primer tasarımı

Yapılacak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) analizlerinde kullanmak üzere hedef genin (Şekil 3.1.) çoğaltmasını amaçlayan aşağıdaki primer çiftleri (Çizelge 3.1.) temin edilmek üzere tasarlanmıştır. Temin edilen primer çiftleri 5 dk santrifüj edildikten sonra gerekli miktarda su eklenip pipetaj yapılarak 200 pikomol stok ve onlardan da seyreltme yolu ile 20 pikomol çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan primerler PZR analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. *Pichia pastoris* ekspresyon sistemine göre optimize edilmiş *Oryctolagus cuniculus* kimozin genini çoğaltması için tasarlanmış primerler

Primer Adı	Baz Uzunluğu	Tm°	%GC	Baz dizilimi (5' 3')
RcF1(İleri)	20	59.24	45.00	GAACATGGTTTGTTGGGTGA
RcR1(Geri)	20	59.20	50.00	GCAGTAGCCAAACCCAATCT
RcF2(İleri)	21	58.66	47.62	AATCGGTACTCCACCTCAAGA
RcR2(Geri)	20	58.34	50.00	AGCAGAAGGAGACAATGGGA
RcF3(İleri)	21	59.98	42.9	ATCCGGTGAAGGTTCTATGTT

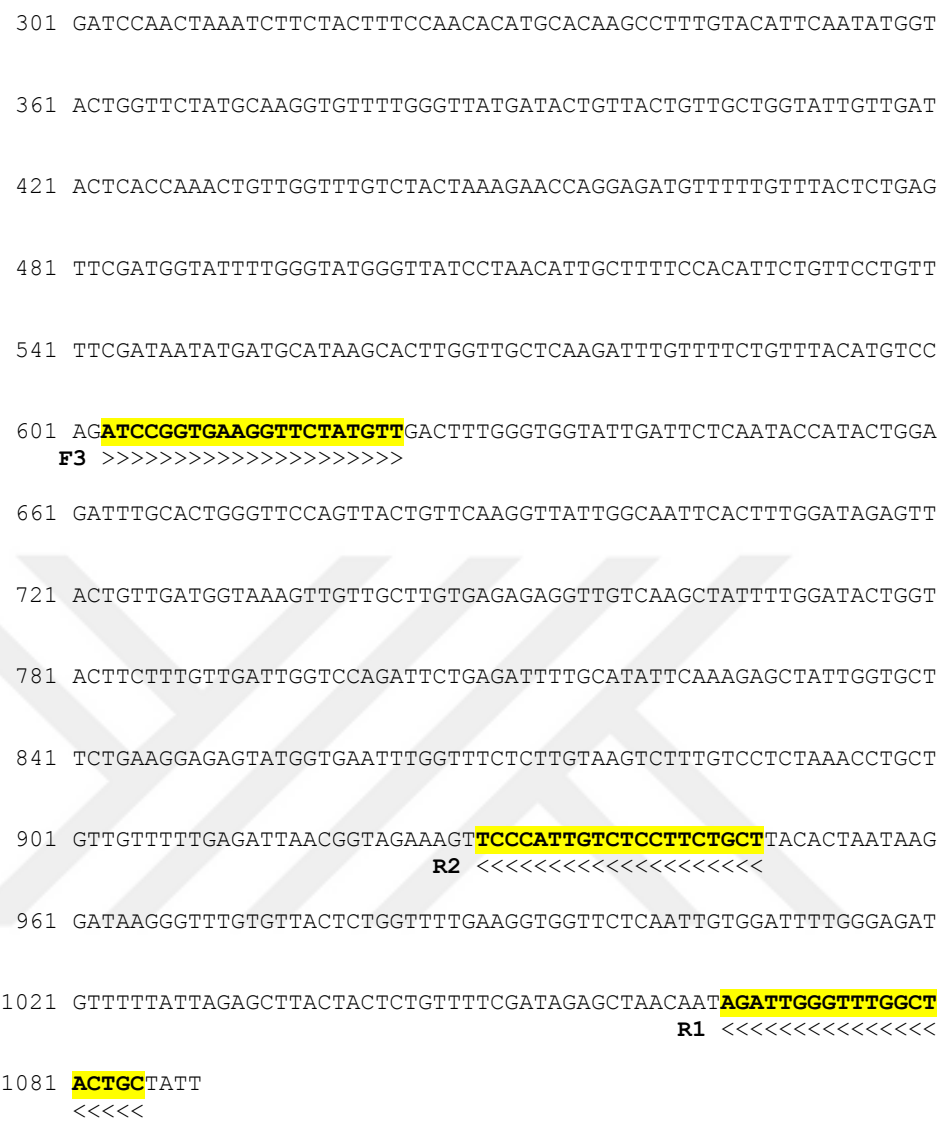
```
   1 GGTGAAATTACTAGAATCCCATTGTACAAGGGTAACACTTTGAGAAAGGCTTTGAAAGAA
                                                          F1 >>>

  61 CATGGTTTGTTGGGTGACTTTTTGAAGAAGCACCAAGTTGAATTGTCCAGAAAAAGATCC
     >>>>>>>>>>>>>>>>>

 121 CATTCTGGTGTTGTTGCTAACGAGGCTTTGACTAACTACTTGGATGTTCAATACTTCGGT

 181 AAAATCCAAATCGGTACTCCACCTCAAGAGTTTACTGTTGTTTTCGATACTGGTTCTTCT
          F2 >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

 241 GATTTGTGGGTTCCTTCTATCTACTGTAAGAACAAGGCTTGTAAGATTCACAGAAGATTC
```



Şekil 3.1. Tavşan pro- kimozin genine karşılık gelen DNA dizilimi ve tasarlanan primerlerin hedef gen üzerindeki yerleşimi

3.2.10. pPIC9K-Ochy vektörünün JM109 *E. coli* hücrelerine transformasyonu

Transformasyon işlemi Promega (Amerika) firmasının kullanıcı el kitabında bulunan "Standart JM109 Competent Cells Transformation" protokolüne bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre steril polipropilen tüpler buz üzerinde 5 dakika soğutulduktan sonra içerisine 100 µl -80°C' de saklanan *E. coli* JM 109 kompetent hücreleri çözündürülerek eklenmiştir. Üzerine 1 µl hedef geni taşıyan plazmid eklenmiştir. Polipropilen tüpler hafifçe karıştırılarak buz üzerince 10 dakika inkübe edildikten hemen sonra 42°C' lik su banyosunda 50 saniye tutulmuş ve tekrar

buz üzerine alınarak iki dakika bekletilmiştir. Böylelikle bakteri hücre membranı porları ani ısı değişikliği ile açılıp kapanırken plazmid DNA' nın *E. coli* hücrelerine geçişi sağlanmıştır. Bakteri hücrelerinin üzerine SOC sıvı besiyeri eklenerek çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 225 devir/dakika'da 60 dk bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra transforme edilmiş bakteri hücresi 100µg/ml ampisilin içeren LB (Luria Bertani) agara ekilerek 37°C'de tek koloni oluşana kadar inkübe edilmiştir. Antibiyotikte gelişen kolonilerin sahip oldukları antibiyotik direncine bağlı olarak pPIC9K_Ochy vektörünü içerdiği değerlendirilmiştir.

Antibiyotik içeren besiyerinde gelişen hücrelerin pPIC9K_Ochy vektörünü içerdiğini doğrulamak için elde edilen LB agarda gelişim göstermiş tek kolonilerden bir tane, ampisilin içeren sıvı LB besiyerine aktarılmış 37°C'de 225 devir/dakika'da bir gece inkübe edildikten sonra Alkali Liziz Metodu ile DNA izolasyonu yapılmış ardından da elde edilen plasmid DNA, PZR analizinde DNA kaynağı olarak kullanılarak istenilen hedef genin varlığı doğrulanmıştır.

3.2.11. Polimeraz zincir reakasiyonu (PZR)

PZR analizi temel moleküler biyoloji kurallarına uyularak yapılmıştır (Maniatis ve ark., 1982). Çizelge 3.1.'de verilen primer çiftleri ve Biorad markalı thermocycler kullanılarak tavşan pro-kimozin geni çoğaltılmıştır. PZR analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.2.'de, PZR analizinin yapıldığı koşullar ise Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. PZR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
Su	16.45
Buffer	2,5
$MgCl_2$	1,5
dNTP	1,25
DNA	1
Primer-F	1
Primer-R	1
Taq enzyme	0,30
Toplam	25 µl

Çizelge 3.3. PZR şartları

Basamaklar	Reaksiyon Şartları	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	94 °C 30 san	1X
Denatürasyon	94 °C 30 san	
Bağlanma	60 °C 45 san	35X
Uzama	72°C 1.30 dak	
Son uzama	72°C 10 dak	1X

3.2.12. Agaroz jel elektroforezi

PZR sonucunda elde edilen reaksiyon ürünlerinin ve elde edilen plazmid DNA'nın boyut analizinin yapılarak doğrulanmasında agaroz jel analizi kullanılmıştır. Bu analiz için 0.846 gr agaroz 70 ml 1X TBE tampon çözeltisi içerisinde çözünene kadar mikrodalgada ısıtılmıştır. Çözelti ~ 55 ºC'ye kadar soğutulduktan sonra 10 mg/mL ethidium bromide stok solüsyonundan 4 µl ilave edilip, iyice karıştırılarak %1.2'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Çözelti soğumadan jel tepsisine dökülmüş, katılaştıktan sonra DNA örneklerine boya eklenerek kuyucuklara yüklenmiştir. Boyut analizi yapılabilmesi için kuyucukların başına 15 µl markör yüklenerek jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tankın yüzeyini kaplayacak kadar 1XTBE tampon çözeltisi eklenmiştir. Advance Mupid-One (Eurogentec, Belçika) markalı elektroforez cihazı 100 voltta 50 dakika çalıştırılmıştır. Yürütülmüş olan jel DNR markalı MiniBIS Pro modelli UV cihazı kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2.13. DNA saflaştırılması

PZR reaksiyonu ürünleri ikinci bir doğrulama aşaması olarak saflaştırılıp, saf DNA dizilemeye gönderilmiştir. DNA'nın saflaştırılması işlemi GE Healthcare GFX PZR DNA and Gel Band Saflaştırma Kiti kullanılarak Quick-Start protokolüne bağlı kalınarak yapılmıştır. Bu protokole göre; PZR pozitif tüplerden toplanan 100 µl PZR ürününün üzerine 500 µl capture buffer type 3 eklenip karıştırılmıştır. GFX Microspin kolonu toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Karışım GFX mikrospin kolonundan 16000xg'de 1 dakika santifürüj edilerek geçirilmiş ve toplama tüpüne aktarılmıştır. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırılarak kolona 500 µl wash buffer type 1 eklenmiş, tüp 1 dakika boyunca 16000xg da santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılmıştır. Kolon temiz bir eppendorfa yerleştirildikten sonra üzerine 50

µl elution buffer type 4 eklenmiştir. Tüp 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 16000xg'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen sıvı faz gen dizilemeye gönderilmiştir.

3.2.14. Kompetent *Pichia pastoris* maya hücrelerinin hazırlanması

E. coli hücrelerinde çoğaltılmış olan hedef *Oryctolagus cuniculus* kimozin genini içerdikleri doğrulanan pPIC9K-Ochy vektörünün elektroporasyon yöntemi ile *P. pastoris* GS115 mayalarına aktarılması amacıyla ilk olarak kompetent *P. pastoris* mayaları hazırlanmıştır. Bu amaçla GS115 stab kültürlerinden alınan hücreler YPD agara çizme metodu ile aktarılmış; 30°C'de tek koloni olana kadar inkübe edilmiştir. Gelişen tek koloniler seçilerek 5 ml YPD besiyerine aktarılmış ve 30°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İçerisinde gelişmiş maya hücreleri olan bu besiyerinden 24 saat sonra 0.4 mL alınıp tekrar 500 mL taze YPD sıvı besiyerine aktarılmış ve OD_{600} değeri 1.3-1.5'e varana kadar gelişimi takip edilmiştir. İstenen yoğunluğa erişmiş besiyerleri *P. pastoris* kullanıcı kitabında belirtilen protokol doğrultusunda santrifüjleme ve sorbitol ile çözülme işlemlerinden sonra elektroporasyon için hazır bir hal almışlardır.

3.2.15. pPIC9K-Ochy vektörünün doğrusal hale getirilmesi

pPIC9K-Ochy vektörü transformasyonun gerçekleştirilebilmesi için Sac I enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilmiştir. Bu amaçla Çizelge 3.4.'de verilen bileşenler bir eppendorf tüpü içerisinde karıştırılarak, 37˚C'de bir gece inkübe edilmiştir. Elde edilen doğrusal DNA transformasyon işleminde kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. pPIC9K-Ochy vektörünün doğrusal hale getirilmesi için gerekli bileşenler

Bileşenler	Miktar (µl)
Su	40
Cut Smart Buffer	5
Sac I (10U/L)	4
DNA (µg/µL)	1
Toplam	50 µl

3.2.16. pPIC9K-Ochy vektörünün kompetent *Pichia pastoris* maya hücrelerine transformasyonu

Elektroporasyon işlemi *Pichia* Expression Kit kullanıcı el kitabına bağlı kalınarak yapılmıştır. Bu protokol doğrultusunda doğrusal hale getirilmiş 10 µg DNA ve 80 µl *Pichia* kompetent hücresi karıştırılarak 0.2 cm'lik steril elektroporasyon küvetine aktarıldıktan sonra buz içerisinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında elektroporasyon cihazının *S. cerevisiae* ayarında elektroporasyon tamamlanmıştır. Elektroporasyon sonrası elde edilen hücreler üzerine hızlı bir şekilde 1 mL 1M soğutulmuş sorbitol eklendikten sonra hücrelerden 200 µl alınarak yayma yöntemi ile MD (Minimal Dextrose) katı besiyerine ekilmiştir. Petriler 30˚C'de tek koloniler oluşana kadar inkübe edilmiştir. Histidin bulunmayan bu ortamda gelişebilen koloniler elektroporasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiş ve bu hücreler His^+ olarak adlandırılmıştır.

Elektroporasyon sonrası elde edilen His^+ maya hücrelerinden *Pichia* Expression Kit kullanıcı el kitabına bağlı kalınarak toplam DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla özetle MD katı besiyerinde gelişmiş tek kolonilerden 5-10 adet alınarak MD sıvı besiyerine, negatif kontrol olarak ta *P. pastoris* GS155 suşundan YPD katı besiyerinde geliştirilmiş petrilerden alınan tek koloniler MDH (Minimal Dextrose+Histidin) sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 30˚ C'de OD_{600} değeri 5-10 aralığına ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Gelişen hücreler santrifüj yapılarak çöktürülmüş, çökelti su ile yıkanarak tekrar çöktürülüp SCED tamponunda çözündürülmüştür. Elde edilen çözelti sırası ile SDS, potasyum asetat, fenol:kloroform:izoamil alkol karışımı, amonyum asetat ile farklı sürelerde muamele edilerek hücre duvarı parçalanmış, DNA nın kolayca ekstraksiyonu sağlanmış ve çöktürüldükten sonra etanol ile yıkanılarak PZR analizinde DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. PZR analizi için gerekli şartlar ve bileşenler Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'de detaylı olarak verilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektoforezi protokolü uygulandıktan sonra görüntülenmiştir.

3.2.17. Transforme His^+ maya hücrelerinin antibiyotik (G418) içeren besiyerinde seçilimi

Bir diğer seleksiyon metodu olarak hedef geni içeren rekombinant maya hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg/mL) antibiyotik içeren YPD katı besiyerindeki gelişimleri incelenmiştir. Kademeli olarak adaptasyonları sağlanan hücrelerden 4 mg/mL antibiyotik içeren ortamda gelişim gösteren hücrelerin hedef geni taşıdığı doğrulanmış ve bu koloniler protein ekspresyonunda kullanılmıştır. İleriki ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere elde edilen 4.0 mg/mL antibiyotik konsantrasyonunda gelişim göstermiş tek kolonilerden stab kültürler hazırlanarak +4°C'de muhafazaya alınmıştır.

3.2.18. Transformantların fenotiplerinin belirlenmesi

Yüksek antibiyotik içeren (4 mg/mL) besi ortamında gelişim gösteren hücrelerden alınmış His^+ tek kolonilerin Mut^+ (Methanol utilization-plus) veya Mut^S (Methanol utilization-slow) fenotipinden hangisi olduğunu belirlemek amacı ile *Pichia* Expression Kit kullanıcı el kitabına bağlı kalınarak 'Screening for Mut^+ and $Mut^{S'}$ protokolü uygulanmıştır. Bu protokole göre tek koloniler önce MM sonra MD katı besiyerine aynı steril kürdan ile inoküle edilmiştir. 30°C'de 3-5 gün inkübe edilen petrilerden her iki besiyerinde gelişen hücreler Mut^+, MD agarda gelişim gösterip MM agarda gelişim göstermeyen hücreler ise Mut^S olarak tanımlanmıştır. GS115 Albumin (His^+ Mut^S) ve GS115 β-Gal (His^+ Mut^+) suşları MM ve MD besiyerinlerine inoküle edilerek yapılan çalışmanın kontrolü sağlanmıştır.

3.2.19. Transgenik *Pichia pastoris* maya hücrelerinin ekspresyonu

Başarılı transformantlardan 5'er tek koloni alınarak önce 25 mL BMG (Buffered Minimal Glycerol) sıvı besiyerine aktarılarak burada OD_{600} değeri 2-6 arasına ulaşıncaya kadar 30°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra hasat edilen peletler BMM (Buffered Minimal Methanol) besiyerinde OD_{600} değeri 1 olana kadar çözündürülüp tekrar 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ortama her 24 saate

konsantrasyonu %1 olacak şekilde metanol eklenmiş ve ekspresyonun kontrolü için maya kültüründen 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144. saatlerde 1'er mL örnekler alınmıştır. Alınan örnekler santrifüj edildikten sonra süpernatant ve peletler farklı analizlerde kullanılmak üzere birbirlerinden ayrılarak -20˚C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.20. Toplam protein miktarının belirlenmesi

Toplam protein miktarı Bradford protein assay kiti ile BIO-RAD firmasının kullanıcı el kitabına göre yapılmıştır. BSA standartı farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek spektrofotometre vasıtasıyla 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen standart serisinden elde edilen absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizilerek (EK 2) ekspresyon süresince alınan numunelerin protein miktarları bu denklem üzerinden hesaplanmıştır.

3.2.21. Kuru hücre ağırlığı tayini

Ekspresyon süresince 0, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144. saat sonunda alınan 1 mL numuneler önceden ağırlıkları ölçülmüş eppendorf tüplerinin içerisinde 10000xg'de 4 °C'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletler 105°C'de kurutularak kuru hücre ağırlıkları Cos ve ark. (2005)'ının çalışmalarında uyguladıkları metot ile belirlenmiştir.

3.2.22. Asit- baz nötralizasyonu

Ekspresyon sonunda elde edilen pro-kimozinlerin, kimozine dönüşmesi amacı ile Wang (2015)'ın uyguladığı metoda göre asit baz nötralizasyonu yapılmıştır. Bu metoda göre ekspresyon sonunda elde edilen süpernatantların pH'ı 1M HCl ile 2.0 ayarlanarak 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında çözeltinin pH'ı 1M NaOH ile 5.5 değerine getirilerek tekrar 2 saat inkübe edilmiş ve yapılacak analizlerde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2.23. Rekombinant kimozinin kısmi saflaştırılması

Elde edilen aktif kimozinlerin kısmi olarak saflaştırılması Jiang ve ark. (2012)'nın yaptıkları çalışma doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre süpernatantlara % 85 doygunluğa erişene kadar amonyum sülfat eklenmiştir. 4˚C'de bir saat bekletildikten sonra 13000×g de 4˚C'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen peletler 50 mM NaH_2PO_4/NaCl (pH 5.5) çözeltisi ile çözülerek SDS-PAGE analizlerde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2.24. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Ekspresyon sonunda elde edilen kısmi olarak saflaştırılmış proteinler SDS-PAGE yöntemiyle %12'lik poliakrilamid jel kullanılarak Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) minijel tankı içerisinde 150 V elektrik akımı altında ayrıştırılmıştır (Laemmli, 1970). Protein jelleri Commessie Blue G-250 ile boyandıktan sonra görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Ayrılan proteinler moleküler büyüklükleri bilinen standart protein markörü ile karşılaştırılarak sahip oldukları moleküler büyüklükleri belirlenmiştir.

3.2.25. Kazeinin hidroliz özelliklerinin belirlenmesi

Rekombinant tavşan kimozinin α, β, κ- kazein üzerindeki etkileri Wang ve ark. (2015)'nın uyguladığı metoda göre belirlenmiştir. Bu amaçla 0.05 mg/mL α, β, κ-kazein 10 mM potasyum fosfat (pH 5.5) çözeltisinin içerisinde çözülmüştür. Daha sonra bu çözeltilerden 10 µl alınarak üzerlerine 10 µl enzim eklenmiş ve 37 ºC'de bir saat inkübe edildikten sonra SDS-PAGE analizi ile enzimlerin hidroliz özellikleri belirlenmiştir.

3.2.26. Süt pıhtılaşma testi ve enzim aktivitesi (IMCU) tayini

Tavşan kimozin enziminin pıhtılaşma ve enzim aktivitesi testi Wang ve ark. (2015) tarafından uygulanan metodda ufak modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir.

Süt pıhtılaşma testi için substrat olarak %26 (w/v) yağsız süt tozu içeren, 50 mM'lık $CaCI_2$ (pH 6.5) çözeltisi kullanılmıştır. Pıhtılaşma testi 96 saatlik fermentasyon sonucu elde edilmiş enzim çözeltisi ile yapılmıştır. Önceden 37°C'de yarım saat inkübasyona bırakılan substratlardan 1 mL alınarak üzerine 1 mL enzim çözeltisi eklenerek 37 °C'de pıhtı oluşumu gözlenmiştir. İlk pıhtının oluştuğu an kaydedilerek enzimin aktivitesi hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi hesaplanırken 1 mL substratı 37 °C'de, 40 dakikada pıhtılaştıran enzim miktarı 1 IMCU olarak kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.27. $CaCl_2$ konsantrasyonunun rekombinant tavşan kimozin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Optimum $CaCl_2$ konsantrasyonu Wang ve ark. (2015)'nın uyguladığı metoda göre belirlenmiştir. Farklı $CaCl_2$ (0-200 mM) konsantrasyonlarında hazırlanan substratlar ile enzim aktivite testi yapılmış ve bağıl aktiviteler belirlenmiştir. Minimum pıhtılaşma süresine sahip olan örneklerdeki bağıl enzim aktiviteleri %100 olarak kabul edilerek, örneklerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarındaki yüzde bağıl aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.28. Rekombinant tavşan kimozin enziminin optimum fermentasyon ve substrat pH'ının belirlenmesi

Optimum substrat pH'ı, Wang ve ark. (2015)'nın uyguladıkları metodda ufak değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla farklı pH aralığındaki (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0) sodyum sitrat tampon çözeltileri içerisinde substratlar hazırlanmış ve bu substratlar ile enzim aktivitesi testi yapılmıştır. Belirlenen pH değerlerinde minimum pıhtılaşma süresine sahip olan örneklerdeki bağıl enzim aktiviteleri %100 olarak kabul edilerek, örneklerin farklı pH değerlerindeki % bağıl aktiviteleri belirlenmiştir.

Optimum ekspresyon pH'ı ise ekspresyonun yapıldığı besi ortamının pH'ının sodyum sitrat tampon çözeltisi ile farklı değerlere (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0) ayarlanması sonucu belirlenmiştir. Bu farklı besi pH'ında yapılan ekspresyon sonucu elde edilen

ürünlerden alınan örneklerin enzim aktivitesi, kuru hücre ağırlığı, OD_{600} değeri, toplam protein miktarı belirlendikten sonra maksimum değerlerin olduğu nokta ekspresyon için optimum pH olarak belirlenmiştir.

3.2.29. Rekombinant tavşan kimozin enziminin pH kararlılığının belirlenmesi

Üretilen rekombinant tavşan kimozin enziminin stabilite gösterdiği pH aralığı Wang ve ark. (2015)'nın uyguladığı metoda göre belirlenmiştir. Belirlenen metoddan farklı olarak üretilen enzimlerin pH'lari 1M HCl ve 1M NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. pH değerleri 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 değerlerine ayarlanmış enzimler 37 °C'de 8 saat inkübe edildikten sonra enzimlerin pH değerlerine göre bağıl aktiviteleri belirlenmiştir. Minimum pıhtılaşma süresine sahip olan örneklerdeki bağıl enzim aktiviteleri %100 olarak kabul edilerek, diğer örneklerin % bağıl aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.30. Rekombinant tavşan kimozin enziminin optimum fermentasyon ve substrat sıcaklığının belirlenmesi

Optimum fermantasyon sıcaklığının belirlenmesi için 20, 25, 30 ˚C'lerde 96 saat yapılan fermentasyon sonucu elde edilen enzimlerin kuru hücre ağırlıkları ve OD_{600} değerleri incelenerek, maksimum değerlerin gözlemlendiği sıcaklık optimum olarak belirlenmiştir.

Optimum substrat sıcaklığının belirlenmesi için ise enzimin 25, 30, 40, 45, 50, 60, 65 °C'deki substratlar üzerinde aktiviteleri belirleniş ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri optimum olarak kabul edilmiştir.

3.2.31. Rekombinant tavşan kimozin enziminin ısı kararlılığının belirlenmesi

Üretilen rekombinant tavşan kimozin enziminin stabilite gösterdiği pH aralığını belirlemek için üretilen enzimler 0-70 ˚C aralığında 8 saat boyunca inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi testine tabi tutulmuş ve bağıl aktiviteleri

belirlenmiştir (Wang ve ark., 2015).

3.2.32. Rekombinant tavşan kimozin enziminin farklı sütler üzerindeki etkisinin araştırılması

Rekombinant tavşan kimozininin inek, koyun, keçi, deve ve eşek sütleri üzerindeki aktivitesinin araştırılması amacı ile bu sütlere 40 mM $CaCl_2$ ilave edilerek enzim aktivitesi testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar IMCU/mL olarak ifade edilerek birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

3.2.33. İstatistiksel analizler

Çalışmada yapılan analizlerin istatiksel değerlendirmesi SPSS 16 paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır**.** Varyans analizi (ANOVA) yapıldıktan sonra önemli olanlar LSD testine tabi tutularak parametreler arasındaki farklar tespit edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Tavşan Rennetinin Beyaz Peynir Yapımına Uygunluğunun Belirlenmesi

4.1.1. Peynirlerin kompozisyonu ve verimi

Tavşan rennetinin peynir yapımına uygunluğunu belirlemek amacı ile tavşan renneti (TP), ticari buzağı (BP) ve deve (DP) kimozinleri ile beyaz peynir üretimi yapılmıştır. Peynirlerin kompozisyonları ve verimleri (Çizelge 4.1.) birbirleri ile kıyaslanarak kullanılan pıhtılaştırıcıların beyaz peynir yapımı için uygunlukları tartışılmıştır.

Çizelge 4.1. Tavşan renneti, ticari buzağı ve deve kimozinleri kullanılarak üretilen beyaz peynirlerin verimleri ve kompozisyonları

Parametreler[b]	**Pıhtılaştırıcı Kaynağı**		
	Buzağı	**Tavşan**	**Deve**
Nem (%)	59.09±0.01[a]	54.09±0.01[b]	53.11±0.03[b]
Yağ (%)	18.00±0.01[a]	21.66±0.57[b]	23.00±2.00[c]
Protein (%)	16.82±0.01[a]	19.58±0.01[b]	16.92±0.05[a]
Tuz (%)	3.66±0.26[a]	3.58±0.35[a]	3.19±0.13[a]
Verim (kg peynir 100kg^{-1} süt)	14.08±0.01[b]	12.86±0.01[a]	12.71±0.01[a]
pH			
1. gün	5.81±0.01 [a]	5.84±0.01 [a]	5.86±0.01 [a]
15. gün	5.74±0.17 [a]	5.79±0.01 [a]	5.85±0.01 [a]
30. gün	5.68±0.01 [a]	5.51±0.01 [a]	5.33±0.01 [a]
60. gün	5.09±0.01 [a]	4.57±0.01[b]	5.23±0.02 [a]

Tabloda verilen değerler ortalama ± standart sapmalar şeklindedir.
[a,b,c] Aynı satırda bulunan farklı harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır (LSD, $p < 0.05$).

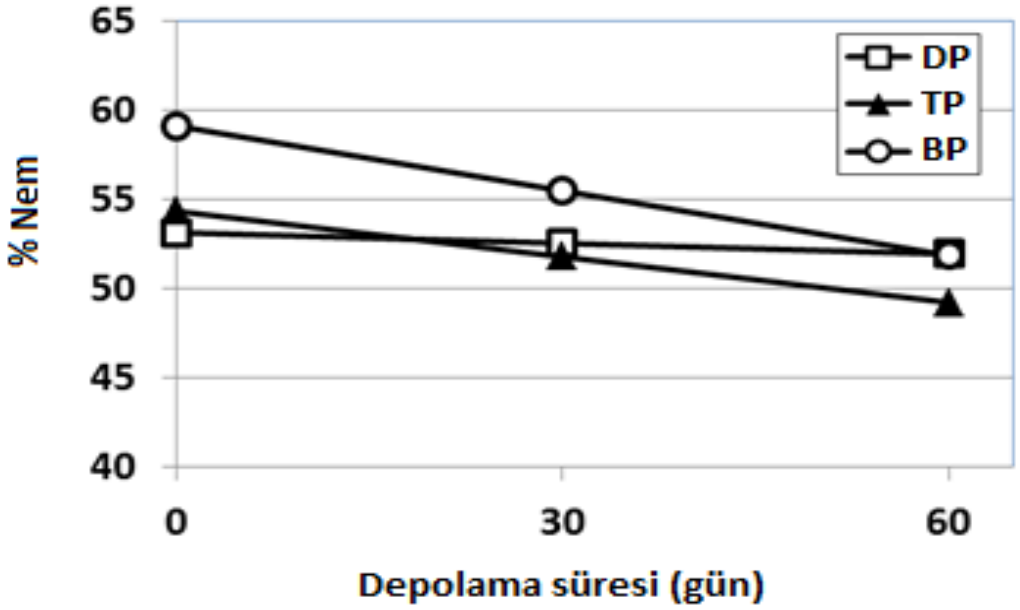
Yapılan çalışmalarda üretimin 1. günü peynirlerin pH değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$), 60 günlük depolama sürecinde bu değerlerin yavaş yavaş düştüğü, 60. gün sonunda BP ile DP arasında anlamlı bir fark olmazken TP'nin pH'ının BP ve DP'ninkinden düşük olduğu gözlemlenmiştir. Romeih ve ark., (2002), yaptıkları çalışmada inek sütü kullanarak ürettikleri beyaz peynir örneklerinin pH değerlerini çalışmamıza benzer şekilde 90 günlük depolama sonunda 4.77 olarak bulmuşlardır. Peynir örneklerinin pH değerlerindeki bu düşüşün sebebi

peynirde depolama süresinde meydana gelen proteoliz ve peynirin içinde varolan suyun bir kısmının serbest kalması ile ilişkilendirilebilir. Çözünmez haldeki Ca^{+} peynirde tampon görevi yapar fakat olgunlaşma sürecinde kolloidal kalsiyum fosfatın (KKF) çözünmesi ile bu tampon etkisi azalmaktadır (Hassan ve ark., 2004). Olgunlaşma sürecinin başında yüksek olan pH değerinin depolama sürecindeki düşmesinin sebebi depolama süresinde proteolizin de artması ile peynir içerisinde bulunan KKF'ın çözünmesi ve kalsiyumun tampon etkisinin azalmasıdır. Örnekler içerisinde en belirgin düşüş tavşan renneti ile üretilen peynirlerde gözlemlenmiştir. Kullanılan rennet saf kimozin olmadığı için içerisinde bir miktar da lipaz içerdiği bilinmektedir. Ticari kimozinler ile üretilen peynirlere nazaran pH değerinin daha düşük olması depolama sürecinde peynir örneklerinde lipoliz sonucu serbest yağ asitlerinin meydana gelmesi ile de ilişkilendirilebilir.

Çizelge 4.1.' de verildiği gibi üretilen peynirlerin protein miktarlarında BP ve DP arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$), fakat TP'nin bu iki peynirden daha fazla protein içerdiği gözlemlenmiştir.

Üretilen peynirlerin verimleri incelendiğinde en yüksek verime sahip olan peynirin yüksek nem içeriğinden dolayı BP olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.1.'de üretilen peynirlerin 60 günlük depolama sürecindeki yüzde nem miktarlarına bakılacak olursa başlangıçta en yüksek nem içeriğine sahip olan BP'nin 30. gün hala en yüksek nem içeriğine sahip olduğu, 60. gün ise bu değerin düşerek DP ile eşitlendiği ve TP'nin başlangıçta neredeyse DP ile eşit olan nem içeriğinin 30. günden sonra düşerek 60. gün sonunda peynirler arasında en düşük değere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Depolama süresince en fazla su kaybı BP'de, en az su kaybı ise DP'de gözlemlenmiştir. Nem içeriği yüksek olan beyaz peynir ve Feta peyniri gibi peynir çeşitlerinde su kaybının çok olduğu bilinmektedir (Bansal ve ark., 2009). Samal ve ark. (1993), yaptıkları çalışmada vakum ambalaj ile depolanan Feta peynirlerinde depolama süresince proteoliz miktarındaki artışa bağlı olarak su açığa çıktığını belirlemiştir. Kılıç ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada 3 farklı starter kullanarak beyaz peynir üretimi yapmışlardır. Yapılan bu çalışmada 120 günlük depolama sonunda toplam kuru madde miktarının belirgin bir şekilde arttığı

gözlemlenmiştir.

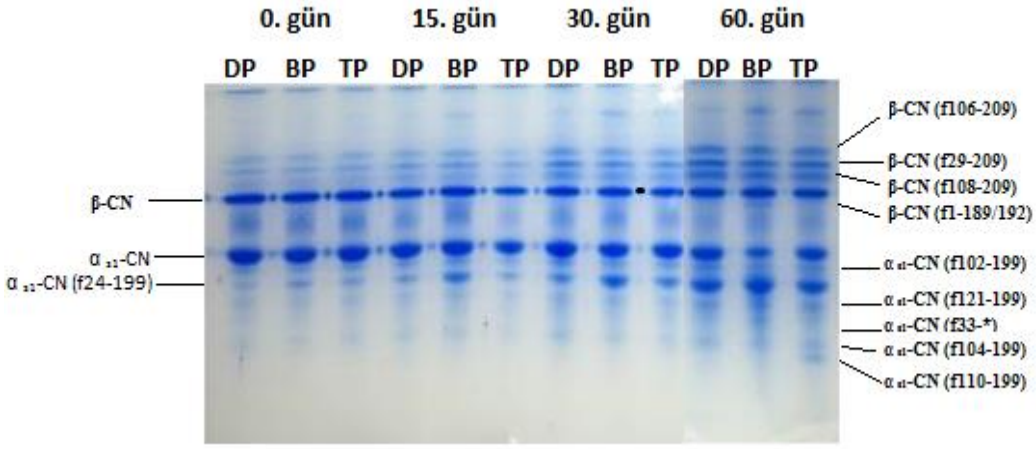


Şekil 4.1. TP, BP ve DP'de 60 günlük depolama sürecinde % nem içeriğinde meydana gelen değişim

4.1.2. Üre-page elektroforez yöntemi ile peynirlerin proteolitik özelliklerinin incelenmesi

Peynirde olgunlaşma sürecinde birçok biyokimyasal reaksiyon meydana gelmekte ve bu reaksiyonlar peynirin sahip olduğu karakteristik tat, aroma, yapı gibi birçok özelliğin oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (Sousa ve ark., 2001; Fox ve ark., 1995; Fox ve McSweeney, 1996). Proteoliz, peynir matriksindeki protein ağını kırarak peynirin yapısal özelliklerini değiştirmekte, bu da peynirde istenmeyen tat (acılık) ve koku özelliklerinin açığa çıkmasına sebep olmaktadır (Sousa ve ark., 2001).

Bu çalışmada üretilen peynirlerde proteoliz analizi Üre-PAGE elektroforezi ile yapılmıştır. Depolama sürecinde meydana gelen proteolitik değişimler Şekil 4.2.'de gösterildiği gibi kazein fraksiyonlarında meydana gelen değişimler ile yorumlanmıştır.



Şekil 4.2. Üre-PAGE analizi sonucu 60 günlük depolama sürecinde TP, BP ve DP'nin kazein fraksiyonlarında meydana gelen değişimler

Yapılan analiz sonucu incelendiğinde depolama süresi uzadıkça kazeinlerde parçalanmanın arttığı net bir şekilde görülmektedir. β-CN'in temelde (f29-209) (ɣ1), (f106-209) (ɣ2), (f108-209) (ɣ3) fraksiyonlarına hidroliz olduğu gözlemlenmiştir. Depolamanın her noktasında β-CN'in hidroliz olduğu fakat depolamanın sonlarına doğru bantlarda meydana gelen kalınlaşmaya dayanarak bu parçalanmanın arttığı kanısına varılmıştır. Depolamanın 30. Gününde BP'de β-CN (f1-189/192) bandının oluşmaya başladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca α_{s1}-CN(f24-199), α_{s1}-CN(f102-199), α_{s1}-CN(f104-199), α_{s1}-CN(f110-199), α_{s1}-CN(f121-199) bantları da parçalanma ürünleri arasında tespit edilmiş ve yapılan birçok çalışmada da bu bantların varlığına rastlanmıştır (Bansal ve ark., 2009; Marcos ve ark., 1979; McSweeney ve ark., 1994; Mooney ve ark., 1994). DP'de α_{s1}-CN (f24-199) proteinine ait bant depolama süresince belirgin bir şekilde kalınlaşmıştır. TP'nin α_{s1}-CN bantlarının ilk 30 günlük süreçteki kalınlığının BP ve DP'den daha ince olduğu ve bu proteinler üzerinde daha düşük bir proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Depolamanın son otuz gününde ise TP'nin DP ile benzer proteolitik etki gösterdiği, bu etkinin ise BP'den daha düşük olduğu saptanmıştır.

4.1.3. Duyusal analizler

Peynirlerin duyusal özellikleri onların tüketici tarafından kabul görmesindeki en önemli parametre olarak kabul edilmektedir (Delahunty ve Drake, 2004). Bu çalışma kapsamında da farklı pıhtılaştırıcı ajanlar kullanılarak üretilen peynirlerin duyusal özellikleri eğitimli panelistler tarafından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. TP, BP ve DP'nin 60 günlük depolama sürecinde dış görünüş, iç görünüş, yapı, koku ve tat özelliklerindeki değişim

Depolama Süresi (g)	Enzim Kaynağı	Duyusal özellikler				
		Dış Görünüş	İç Görünüş	Yapı	Koku	Tat
1	Buzağı	4.25±0.88 ^{b,AB}	4.50±0.53 ^{a,AB}	3.87±0.83 ^{b,A}	4.87±0.35 ^{a,AB}	4.62±0.51 ^{a,A}
	Tavşan	4.87±0.35 ^{ab,A}	4.75±0.46 ^{a,B}	4.25±0.70 ^{ab,AB}	5.00±0.00 ^{a,A}	4.87±0.33 ^{a,A}
	Deve	5.00±0.00 ^{a,A}	4.87±0.35 ^{a,A}	4.62±0.51 ^{a,A}	5.00±0.00 ^{a,A}	4.87±0.35 ^{a,A}
15	Buzağı	4.62±0.74 ^{a,A}	4.75±0.70 ^{a,AB}	4.37±0.74 ^{ab,A}	5.00±0.00 ^{a,A}	4.56±0.49 ^{a,AB}
	Tavşan	4.62±0.51 ^{a,AB}	4.50±0.53 ^{a,AB}	3.87±0.83 ^{b,A}	5.00±0.00 ^{a,A}	4.75±0.46 ^{a,A}
	Deve	4.75±0.70 ^{a,AB}	4.87±0.35 ^{a,A}	4.87±0.35 ^{a,A}	5.00±0.00 ^{a,A}	4.71±0.45 ^{a,AB}
30	Buzağı	3.75±0.70 ^{b,B}	4.50±0.75 ^{a,AB}	3.87±0.99 ^{b,A}	4.62±0.51 ^{a,BC}	4.00±1.06 ^{a,BC}
	Tavşan	4.50±0.53 ^{a,AB}	4.87±0.35 ^{a,A}	4.50±0.53 ^{a,B}	4.75±0.70 ^{a,A}	4.50±0.75 ^{a,A}
	Deve	4.50±0.75 ^{a,ABC}	4.87±0.35 ^{a,A}	4.75±0.46 ^{a,A}	4.75±0.46 ^{a,AB}	4.12±0.83 ^{a,B}
60	Buzağı	4.00±0.75 ^{a,AB}	4.12±0.64 ^{b,CD}	4.25±0.70 ^{b,A}	4.50±0.53 ^{a,CD}	4.12±0.64 ^{a,AB}
	Tavşan	4.25±1.03 ^{a,AB}	4.50±0.75 ^{ab,AB}	4.25±0.70 ^{b,AB}	5.00±0.00 ^{ab,A}	4.50±0.92 ^{a,A}
	Deve	4.25±0.70 ^{a,BC}	4.75±0.46 ^{a,A}	5.00±0.00 ^{a,A}	4.75±0.46 ^{a,AB}	4.50±0.75 ^{a,AB}

Tabloda verilen değerler ortalama ± standart sapmalar şeklindedir.
^{a,b,c} Aynı sütunda bulunan farklı harflendirmeler duyusal özelliklerin depolama süresine göre farklılıklarını göstermektedir (LSD, $p < 0.05$).
^{A,B,C,D} Aynı sütunda bulunan farklı harflendirmeler duyusal özelliklerin enzim kaynağına göre farklılıklarını göstermektedir (LSD, $p < 0.05$).

Yapılan duyusal analiz sonuçlarına göre 1. gün üretilmiş bütün peynirlerin duyusal özellikleri benzerlik gösterse de BP'nin yapı ve dış görünüş özelliklerinin DP ve TP' den daha düşük olduğu belirlenmiştir. Depolama sürecinde TP ve DP'nin görünüşleri arasında istatistiksel anlamda anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Koku ve tat özellikleri bütün peynir çeşitlerinde depolama süresine bağlı olarak azalma göstermiş ve 60 günlük depolama sonunda TP'de bu değerlerin maksimum olduğu gözlemlenmiştir. Peynir yapımında kullanılan ticari buzağı kimozini çok yaygın olarak kullanılsa da yapılan fizikokimyasal analiz sonuçlarına göre TP'nin

yapımında saf kimozin kullanılmamasına rağmen gösterdiği duyusal özellikler BP'den yüksek ve DP ile benzerdir.

4.2. Rekombinant Tavşan Kimozin Enziminin Üretilmesi

4.2.1. Biyoinformatik analizler

Yapılan çalışmalar sonucu, tavşan midesinde bulunan rennet enzim kompleksinin sütü pıhtılaştırıcı bir ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Rao ve Dutta, 1981; Dobler ve ark. 2016; Alihanoğlu ve ark., 2017). Fakat tavşan kimozin geninin karakterizasyonu, klonlanmasını ve bu genin kodladığı kimozin enziminin rekombinant olarak üretilmesini konu alan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu doğrultuda öncelikle NCBI (National Center for Biotechonology Information) veri tabanının NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritması kullanılarak kimozin genine sahip ve karakterizasyonu yapılmış buzağı, kuzu, deve, keçi, domuz, manda gibi birçok canlı ile tavşan genomu karşılaştırmış ve benzerlik oranları belirlenmiştir. Bu benzerlik gösteren kısımlar birbirleri ile ve tavşan genomu ile karşılaştırılarak kimozin geninin tavşan genomu üzerinde yeri, ekzon ve intron bölgeleri belirlenmiştir. Daha sonra tavşanın gen bankasında bulunan tahmini kimozin dizilimi (XM_002715787.2) ile araştırmalarımız sonucu belirlediğimiz tavşan kimozin gen dizilimi karşılaştırılmış ve %100 benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur (Şekil 4.3.). Çalışmamızda belirlenen bu dizilimin pro-kimozin genine karşılık gelen kısmı kullanılmıştır (Şekil 4.4.).

```
Query49   GGGGAGATCACCAGGATCCCGCTGTACAAAGGGAACACGCTGAGAAAGGCCCTCAAGGAG  108
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct1    GGGGAGATCACCAGGATCCCGCTGTACAAAGGGAACACGCTGAGAAAGGCCCTCAAGGAG  60

Query109  CACGGGCTTCTGGGAGACTTCCTGAAGAAGCACCAGGTCGAACTGAGCAGGAAGCGCTCC  168
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct61   CACGGGCTTCTGGGAGACTTCCTGAAGAAGCACCAGGTCGAACTGAGCAGGAAGCGCTCC  120
```

```
Query169  CACTCCGGCGTGGTGGCCAACGAGGCCCTGACCAACTACCTGGATGTTCAGTACTTTGGG  228
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct121  CACTCCGGCGTGGTGGCCAACGAGGCCCTGACCAACTACCTGGATGTTCAGTACTTTGGG  180

Query229  AAGATCCAGATTGGGACACCACCCCAGGAGTTCACCGTCGTGTTTGATACAGGCTCTTCG  288
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct181  AAGATCCAGATTGGGACACCACCCCAGGAGTTCACCGTCGTGTTTGATACAGGCTCTTCG  240

Query289  GACCTCTGGGTGCCCTCCATCTACTGCAAGAACAAGGCCTGCAAAATCCACCGGCGCTTT  348
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct241  GACCTCTGGGTGCCCTCCATCTACTGCAAGAACAAGGCCTGCAAAATCCACCGGCGCTTT  300

Query349  GACCCAACCAAGTCCTCCACCTTCCAGCACATGCACAAGCCCCTGTACATCCAGTATGGC  408
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct301  GACCCAACCAAGTCCTCCACCTTCCAGCACATGCACAAGCCCCTGTACATCCAGTATGGC  360

Query409  ACAGGCAGCATGCAGGGCGTCCTGGGCTACGACACGGTCACCGTCGCTGGCATCGTGGAC  468
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct361  ACAGGCAGCATGCAGGGCGTCCTGGGCTACGACACGGTCACCGTCGCTGGCATCGTGGAC  420

Query469  ACACACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCAAGGAGCCTGGCGATGTCTTCGTCTACTCGGAG  528
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct421  ACACACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCAAGGAGCCTGGCGATGTCTTCGTCTACTCGGAG  480

Query529  TTCGACGGGATCCTGGGCATGGGCTATCCGAACATCGCCTTCCCTCACTCGGTGCCGGTG  588
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct481  TTCGACGGGATCCTGGGCATGGGCTATCCGAACATCGCCTTCCCTCACTCGGTGCCGGTG  540

Query589  TTTGACAACATGATGCACAAGCACCTGGTGGCCCAGGACCTGTTTTCAGTTTACATGAGC  648
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct541  TTTGACAACATGATGCACAAGCACCTGGTGGCCCAGGACCTGTTTTCAGTTTACATGAGC  600

Query649  AGGTCTGGCGAGGGAAGCATGCTCACACTGGGCGGCATCGACTCCCAATACCACACAGGC  708
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct601  AGGTCTGGCGAGGGAAGCATGCTCACACTGGGCGGCATCGACTCCCAATACCACACAGGC  660

Query709  GACCTGCACTGGGTGCCCGTGACTGTGCAGGGATACTGGCAGTTCACCCTGGACAGGGTC  768
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct661  GACCTGCACTGGGTGCCCGTGACTGTGCAGGGATACTGGCAGTTCACCCTGGACAGGGTC  720

Query769  ACCGTGGACGGCAAGGTGGTGGCCTGTGAGCGGGGCTGCCAGGCCATCCTGGACACAGGC  828
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct721  ACCGTGGACGGCAAGGTGGTGGCCTGTGAGCGGGGCTGCCAGGCCATCCTGGACACAGGC  780
```

```
Query829  ACTTCCTTGCTGATCGGTCCCGACAGCGAGATCCTCCACATCCAGAGAGCCATTGGGGCC  888
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct781  ACTTCCTTGCTGATCGGTCCCGACAGCGAGATCCTCCACATCCAGAGAGCCATTGGGGCC  840

Query889  TCAGAGGGGGAGTATGGAGAGTTTGGCTTCAGCTGCAAGAGCCTGAGCAGCAAGCCTGCA  948
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct841  TCAGAGGGGGAGTATGGAGAGTTTGGCTTCAGCTGCAAGAGCCTGAGCAGCAAGCCTGCA  900

Query949  GTGGTCTTTGAGATCAACGGCAGGAAGTTCCCACTGTCGCCTTCTGCCTACACCAACAAG  1008
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct901  GTGGTCTTTGAGATCAACGGCAGGAAGTTCCCACTGTCGCCTTCTGCCTACACCAACAAG  960

Query1009 GACAAGGGCTTGTGCTACAGCGGCTTCGAGGGCGGTTCCCAGCTGTGGATCCTGGGGGAT  1068
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct961  GACAAGGGCTTGTGCTACAGCGGCTTCGAGGGCGGTTCCCAGCTGTGGATCCTGGGGGAT  1020

Query1069 GTCTTCATCCGGGCGTACTACAGTGTCTTCGACAGGGCCAACAACCGCCTGGGACTGGCC  1128
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct1021 GTCTTCATCCGGGCGTACTACAGTGTCTTCGACAGGGCCAACAACCGCCTGGGACTGGCC  1080

Query1129  ACAGCTATC  1137
           |||||||||
Sbjct1081  ACAGCTATC  1089
```

Şekil 4.3. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilmiş *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) prokimozin gen dizilimi ile NCBI veri tabanından elde edilen (XM_002715787.2) tahmini tavşan kimozin gen diziliminin karşılaştırılması

```
GGGGAGATCACCAGGATCCCGCTGTACAAAGGGAACACGCTGAGAAAGGCCCTCAAGGAG
CACGGGCTTCTGGGAGACTTCCTGAAGAAGCACCAGGTCGAACTGAGCAGGAAGCGCTCC
CACTCCGGCGTGGTGGCCAACGAGGCCCTGACCAACTACCTGGATGTTCAGTACTTTGGG
AAGATCCAGATTGGGACACCACCCCAGGAGTTCACCGTCGTGTTTGATACAGGCTCTTCG
GACCTCTGGGTGCCCTCCATCTACTGCAAGAACAAGGCCTGCAAAATCCACCGGCGCTTT
GACCCAACCAAGTCCTCCACCTTCCAGCACATGCACAAGCCCCTGTACATCCAGTATGGC
ACAGGCAGCATGCAGGGCGTCCTGGGCTACGACACGGTCACCGTCGCTGGCATCGTGGAC
ACACACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCAAGGAGCCTGGCGATGTCTTCGTCTACTCGGAG
TTCGACGGGATCCTGGGCATGGGCTATCCGAACATCGCCTTCCCTCACTCGGTGCCGGTG
TTTGACAACATGATGCACAAGCACCTGGTGGCCCAGGACCTGTTTTCAGTTTACATGAGC
AGGTCTGGCGAGGGAAGCATGCTCACACTGGGCGGCATCGACTCCCAATACCACACAGGC
GACCTGCACTGGGTGCCCGTGACTGTGCAGGGATACTGGCAGTTCACCCTGGACAGGGTC
ACCGTGGACGGCAAGGTGGTGGCCTGTGAGCGGGGCTGCCAGGCCATCCTGGACACAGGC
ACTTCCTTGCTGATCGGTCCCGACAGCGAGATCCTCCACATCCAGAGAGCCATTGGGGCC
TCAGAGGGGGAGTATGGAGAGTTTGGCTTCAGCTGCAAGAGCCTGAGCAGCAAGCCTGCA
```

GTGGTCTTTGAGATCAACGGCAGGAAGTTCCCACTGTCGCCTTCTGCCTACACCAACAAG
GACAAGGGCTTGTGCTACAGCGGCTTCGAGGGCGGTTCCCAGCTGTGGATCCTGGGGGAT
GTCTTCATCCGGGCGTACTACAGTGTCTTCGACAGGGCCAACAACCGCCTGGGACTGGCC
ACAGCTATC

Şekil 4.4. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilmiş *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin gen dizilimi

4.2.2. *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin genini taşıyan ekspresyon vektörünün (pPIC9K_Ochy) dizaynı ve inşa edilmesi

Biyoinformatik analizler sonucu elde edilen *Oryctolagus cuniculus* pro-kimozin geni pPIC9K vektörüne kodon optimizasyonu yapıldıktan sonra (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7.) çoklu klonlanma bölgesinden EcoRI ve NotI kesme enzimleri ile kesilerek klonlanmıştır (Şekil 4.8.). Hedef tavşan prokimozin genini içermeyen pPIC9K vektörü 9276 baz büyüklüğündedir ve AOX1 (metanol-indüklenebilir alkol oksidaz gen) promotörüne sahiptir. Çoklu klonlama bölgelerinden kesilen bu vektöre 1089 baz büyüklüğünde olan kodon optimizasyonu yapılmış tavşan pro-kimozin geni klonlanmıştır. Kodon optimizasyonu aminoasit dizilimini değiştirmeden host hücrenin veya organizmanın tercih ettiği tRNA'lara göre hedef gen dizisini optimize etmektir ve bu işlem ekspresyon seviyesini arttırmak için yapılmaktadır.

```
Opt1    GGTGAAATTACTAGAATCCCATTGTACAAGGGTAACACTTTGAGAAAGGCTTTGAAAGAA
Orj1    GGGGAGATCACCAGGATCCCGCTGTACAAAGGGAACACGCTGAGAAAGGCCCTCAAGGAG

Opt61   CATGGTTTGTTGGGTGACTTTTTGAAGAAGCACCAAGTTGAATTGTCCAGAAAAAGATCC
Orj61   CACGGGCTTCTGGGAGACTTCCTGAAGAAGCACCAGGTCGAACTGAGCAGGAAGCGCTCC

Opt121  CATTCTGGTGTTGTTGCTAACGAGGCTTTGACTAACTACTTGGATGTTCAATACTTCGGT
Orj121  CACTCCGGCGTGGTGGCCAACGAGGCCCTGACCAACTACCTGGATGTTCAGTACTTTGGG

Opt181  AAAATCCAAATCGGTACTCCACCTCAAGAGTTTACTGTTGTTTTCGATACTGGTTCTTCT
Orj181  AAGATCCAGATTGGGACACCACCCCAGGAGTTCACCGTCGTGTTTGATACAGGCTCTTCG

Opt241  GATTTGTGGGTTCCTTCTATCTACTGTAAGAACAAGGCTTGTAAGATTCACAGAAGATTC
Orj241  GACCTCTGGGTGCCCTCCATCTACTGCAAGAACAAGGCCTGCAAAATCCACCGGCGCTTT

Opt301  GATCCAACTAAATCTTCTACTTTCCAACACATGCACAAGCCTTTGTACATTCAATATGGT
Orj301  GACCCAACCAAGTCCTCCACCTTCCAGCACATGCACAAGCCCCTGTACATCCAGTATGGC
```

```
Opt361  ACTGGTTCTATGCAAGGTGTTTTGGGTTATGATACTGTTACTGTTGCTGGTATTGTTGAT
Orj361  ACAGGCAGCATGCAGGGCGTCCTGGGCTACGACACGGTCACCGTCGCTGGCATCGTGGAC
Opt421  ACTCACCAAACTGTTGGTTTGTCTACTAAAGAACCAGGAGATGTTTTTGTTTACTCTGAG
Orj421  ACACACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCAAGGAGCCTGGCGATGTCTTCGTCTACTCGGAG

Opt481  TTCGATGGTATTTTGGGTATGGGTTATCCTAACATTGCTTTTCCACATTCTGTTCCTGTT
Orj481  TTCGACGGGATCCTGGGCATGGGCTATCCGAACATCGCCTTCCCTCACTCGGTGCCGGTG

Opt541  TTCGATAATATGATGCATAAGCACTTGGTTGCTCAAGATTTGTTTTCTGTTTACATGTCC
Orj541  TTTGACAACATGATGCACAAGCACCTGGTGGCCCAGGACCTGTTTTCAGTTTACATGAGC

Opt601  AGATCCGGTGAAGGTTCTATGTTGACTTTGGGTGGTATTGATTCTCAATACCATACTGGA
Orj601  AGGTCTGGCGAGGGAAGCATGCTCACACTGGGCGGCATCGACTCCCAATACCACACAGGC

Opt661  GATTTGCACTGGGTTCCAGTTACTGTTCAAGGTTATTGGCAATTCACTTTGGATAGAGTT
Orj661  GACCTGCACTGGGTGCCCGTGACTGTGCAGGGATACTGGCAGTTCACCCTGGACAGGGTC

Opt721  ACTGTTGATGGTAAAGTTGTTGCTTGTGAGAGAGGTTGTCAAGCTATTTTGGATACTGGT
Orj721  ACCGTGGACGGCAAGGTGGTGGCCTGTGAGCGGGGCTGCCAGGCCATCCTGGACACAGGC

Opt781  ACTTCTTTGTTGATTGGTCCAGATTCTGAGATTTTGCATATTCAAAGAGCTATTGGTGCT
Orj781  ACTTCCTTGCTGATCGGTCCCGACAGCGAGATCCTCCACATCCAGAGAGCCATTGGGGCC

Opt841  TCTGAAGGAGAGTATGGTGAATTTGGTTTCTCTTGTAAGTCTTTGTCCTCTAAACCTGCT
Orj841  TCAGAGGGGGAGTATGGAGAGTTTGGCTTCAGCTGCAAGAGCCTGAGCAGCAAGCCTGCA

Opt901  GTTGTTTTTGAGATTAACGGTAGAAAGTTCCCATTGTCTCCTTCTGCTTACACTAATAAG
Orj901  GTGGTCTTTGAGATCAACGGCAGGAAGTTCCCACTGTCGCCTTCTGCCTACACCAACAAG

Opt961  GATAAGGGTTTGTGTTACTCTGGTTTTGAAGGTGGTTCTCAATTGTGGATTTTGGGAGAT
Orj961  GACAAGGGCTTGTGCTACAGCGGCTTCGAGGGCGGTTCCCAGCTGTGGATCCTGGGGGAT

Opt1021 GTTTTTATTAGAGCTTACTACTCTGTTTTCGATAGAGCTAACAATAGATTGGGTTTGGCT
Orj1021 GTCTTCATCCGGGCGTACTACAGTGTCTTCGACAGGGCCAACAACCGCCTGGGACTGGCC

Opt1081 ACTGCTATT
Orj1081 ACAGCTATC
```

Şekil 4.5. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilmiş *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) prokimozin gen dizilimi (orijinal (orj)) ile kodon optimizasyonu sonrası (optimize (opt)) elde edilen baz diziliminin karşılaştırılması

```
Opt1    GEITRIPLYKGNTLRKALKEHGLLGDFLKKHQVELSRKRSHSGVVANEALTNYLDVQYFG
Orj1    GEITRIPLYKGNTLRKALKEHGLLGDFLKKHQVELSRKRSHSGVVANEALTNYLDVQYFG
```

```
Opt61   KIQIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSIYCKNKACKIHRRFDPTKSSTFQHMHKPLYIQYG
Orj61   KIQIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSIYCKNKACKIHRRFDPTKSSTFQHMHKPLYIQYG

Opt121  TGSMQGVLGYDTVTVAGIVDTHQTVGLSTKEPGDVFVYSEFDGILGMGYPNIAFPHSVPV
Orj121  TGSMQGVLGYDTVTVAGIVDTHQTVGLSTKEPGDVFVYSEFDGILGMGYPNIAFPHSVPV

Opt181  FDNMMHKHLVAQDLFSVYMSRSGEGSMLTLGGIDSQYHTGDLHWVPVTVQGYWQFTLDRV
Orj181  FDNMMHKHLVAQDLFSVYMSRSGEGSMLTLGGIDSQYHTGDLHWVPVTVQGYWQFTLDRV

Opt241  TVDGKVVACERGCQAILDTGTSLLIGPDSEILHIQRAIGASEGEYGEFGFSCKSLSSKPA
Orj241  TVDGKVVACERGCQAILDTGTSLLIGPDSEILHIQRAIGASEGEYGEFGFSCKSLSSKPA

Opt301  VVFEINGRKFPLSPSAYTNKDKGLCYSGFEGGSQLWILGDVFIRAYYSVFDRANNRLGLA
Orj301  VVFEINGRKFPLSPSAYTNKDKGLCYSGFEGGSQLWILGDVFIRAYYSVFDRANNRLGLA

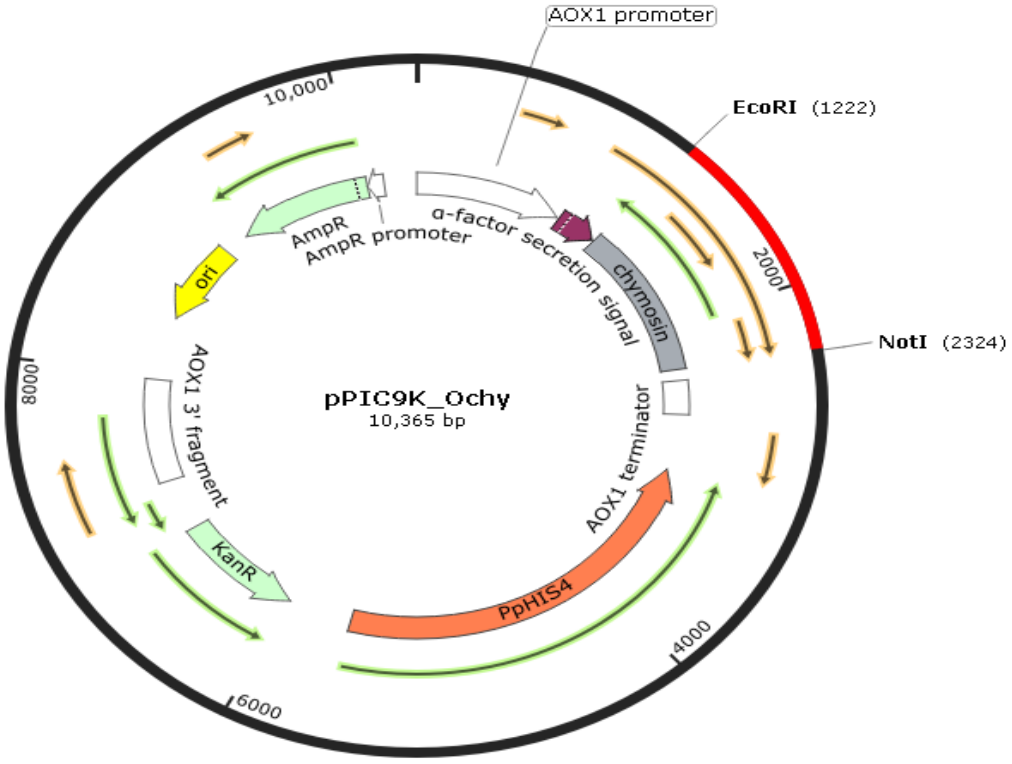
Opt361  TAI
Orj361  TAI
```

Şekil 4.6. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilmiş *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) prokimozin geninin protein dizilimi (orj) ile kodon optimizasyonu sonrası (opt) elde edilen protein diziliminin karşılaştırılması

```
1   GGTGAAATTACTAGAATCCCATTGTACAAGGGTAACACTTTGAGAAAGGCTTTGAAAGAA  60
     G  E  I  T  R  I  P  L  Y  K  G  N  T  L  R  K  A  L  K  E
61  CATGGTTTGTTGGGTGACTTTTTGAAGAAGCACCAAGTTGAATTGTCCAGAAAAAGATCC 120
     H  G  L  L  G  D  F  L  K  K  H  Q  V  E  L  S  R  K  R  S
121 CATTCTGGTGTTGTTGCTAACGAGGCTTTGACTAACTACTTGGATGTTCAATACTTCGGT 180
     H  S  G  V  V  A  N  E  A  L  T  N  Y  L  D  V  Q  Y  F  G
181 AAAATCCAAATCGGTACTCCACCTCAAGAGTTTACTGTTGTTTTCGATACTGGTTCTTCT 240
     K  I  Q  I  G  T  P  P  Q  E  F  T  V  V  F  D  T  G  S  S
241 GATTTGTGGGTTCCTTCTATCTACTGTAAGAACAAGGCTTGTAAGATTCACAGAAGATTC 300
     D  L  W  V  P  S  I  Y  C  K  N  K  A  C  K  I  H  R  R  F
301 GATCCAACTAAATCTTCTACTTTCCAACACATGCACAAGCCTTTGTACATTCAATATGGT 360
     D  P  T  K  S  S  T  F  Q  H  M  H  K  P  L  Y  I  Q  Y  G
361 ACTGGTTCTATGCAAGGTGTTTTGGGTTATGATACTGTTACTGTTGCTGGTATTGTTGAT 420
     T  G  S  M  Q  G  V  L  G  Y  D  T  V  T  V  A  G  I  V  D
421 ACTCACCAAACTGTTGGTTTGTCTACTAAAGAACCAGGAGATGTTTTTGTTTACTCTGAG 480
     T  H  Q  T  V  G  L  S  T  K  E  P  G  D  V  F  V  Y  S  E
481 TTCGATGGTATTTTGGGTATGGGTTATCCTAACATTGCTTTTCCACATTCTGTTCCTGTT 540
     F  D  G  I  L  G  M  G  Y  P  N  I  A  F  P  H  S  V  P  V
541 TTCGATAATATGATGCATAAGCACTTGGTTGCTCAAGATTTGTTTTCTGTTTACATGTCC 600
     F  D  N  M  M  H  K  H  L  V  A  Q  D  L  F  S  V  Y  M  S
601 AGATCCGGTGAAGGTTCTATGTTGACTTTGGGTGGTATTGATTCTCAATACCATACTGGA 660
     R  S  G  E  G  S  M  L  T  L  G  G  I  D  S  Q  Y  H  T  G
661 GATTTGCACTGGGTTCCAGTTACTGTTCAAGGTTATTGGCAATTCACTTTGGATAGAGTT 720
     D  L  H  W  V  P  V  T  V  Q  G  Y  W  Q  F  T  L  D  R  V
721 ACTGTTGATGGTAAAGTTGTTGCTTGTGAGAGAGGTTGTCAAGCTATTTTGGATACTGGT 780
```

```
     T  V  D  G  K  V  V  A  C  E  R  G  C  Q  A  I  L  D  T  G
781 ACTTCTTTGTTGATTGGTCCAGATTCTGAGATTTTGCATATTCAAAGAGCTATTGGTGCT  840
     T  S  L  L  I  G  P  D  S  E  I  L  H  I  Q  R  A  I  G  A
841 TCTGAAGGAGAGTATGGTGAATTTGGTTTCTCTTGTAAGTCTTTGTCCTCTAAACCTGCT  900
     S  E  G  E  Y  G  E  F  G  F  S  C  K  S  L  S  S  K  P  A
901 GTTGTTTTTGAGATTAACGGTAGAAAGTTCCCATTGTCTCCTTCTGCTTACACTAATAAG  960
     V  V  F  E  I  N  G  R  K  F  P  L  S  P  S  A  Y  T  N  K
961 GATAAGGGTTTGTGTTACTCTGGTTTTGAAGGTGGTTCTCAATTGTGGATTTTGGGAGAT  1020
     D  K  G  L  C  Y  S  G  F  E  G  G  S  Q  L  W  I  L  G  D
1021GTTTTTATTAGAGCTTACTACTCTGTTTTCGATAGAGCTAACAATAGATTGGGTTTGGCT  1080
     V  F  I  R  A  Y  Y  S  V  F  D  R  A  N  N  R  L  G  L  A
1081ACTGCTATT  1089
     T  A  I
```

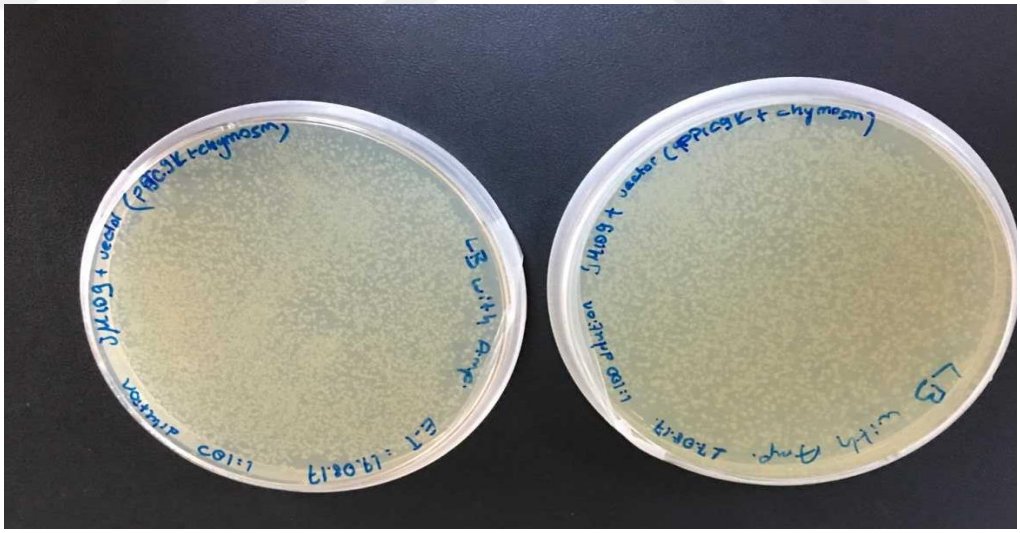
Şekil 4.7. Kodon optimizasyonu yapılmış *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin geninin aminoasit ve protein dizisinin gösterimi. Kodon optimizasyonu sonucu (tavşan) pro-kimozin amino asit dizilimleri, *P. pastoris* mayasında ekspresyonunun daha başarılı olması için protein dizilimleri değişmeyecek şekilde optimize edilmiştir.



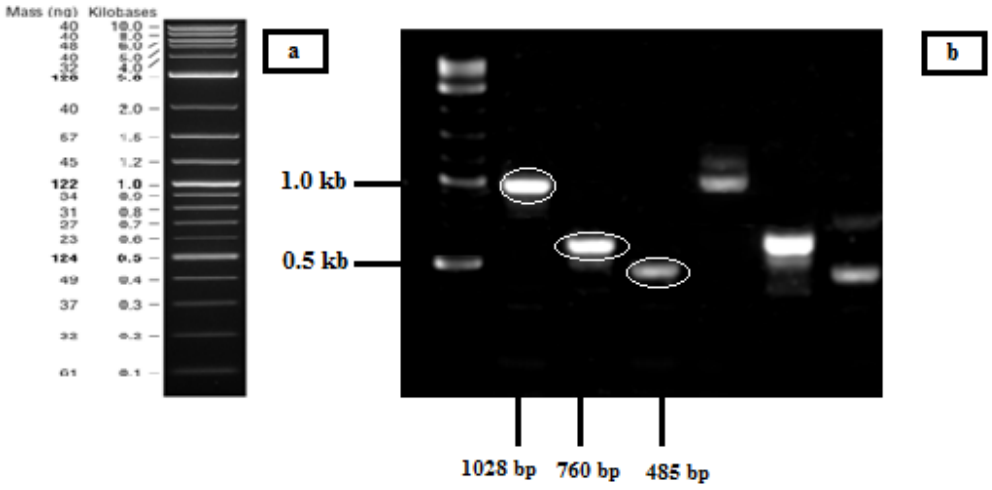
Şekil 4.8. *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin genini içeren pPIC9K vektörünün (pPIC9K_Ochy) şematik gösterimi. pPIC9K vektörü çoklu klonlama bölgesinden EcoRI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kesilerek tavşan pro-kimozin geni vektör içerisine klonlanmıştır. Elde edilen vektör SnabGene programı kullanılarak şematize edilmiştir

4.2.3. pPIC9K-Ochy vektörünün JM109 *E. coli* hücrelerine transformasyonu, çoğaltılması ve transformasyonunun doğrulanması

İçerisinde hedef *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) pro-kimozin genini bulunduran pPIC9K-Ochy vektörü *E.coli* JM109 kompenent hücrelerine ısı şoku ile aktarılmıştır. pPIC9K-Ochy vektörü ampisilin direnç genine sahiptir. Bu sayede içerisinde antibiyotik içeren besi ortamında gelişme özelliği gösterebilen tek kolonilerin tavşan pro-kimozin genini içerdiği düşünülmektedir. pPIC9K-Ochy vektörünün JM109 *E. coli* hücrelerine transformasyonunun doğrulanması amacı ile transforme hücrelerin 100µl/mL ampisilin içeren LB katı besi yerinde gelişim gösterme yeteneklerine göre seçilimleri yapılmış ve gelişim gösteren tek kolonilerin (Şekil 4.9.) tavşan pro-kimozin genini içerdikleri doğrulanmıştır. Bu yönteme ek olarak ikinci bir doğrulama metodu olan PZR analizi yapılmıştır. Yapılan PZR analizinde antibiyotik içeren LB agarda gelişen tek kolonilerden izole edilmiş plasmid DNA ve tavşan pro-kimozinin için tasarlanan primerler kullanılmıştır. PZR sonucunda beklenen baz büyüklüğünde bantlar elde elde edilmiştir (Şekil 4.10.)

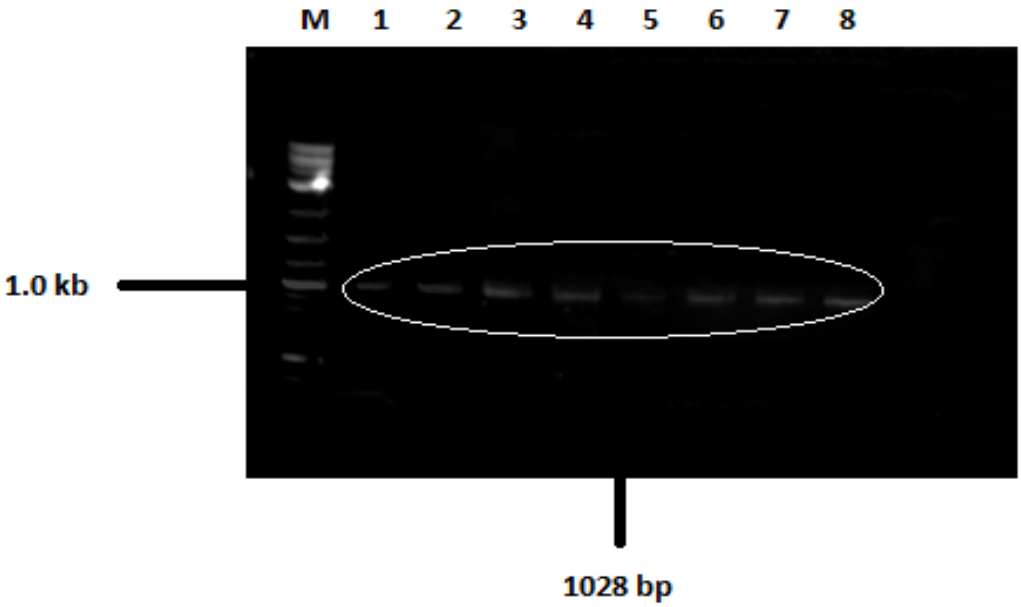


Şekil 4.9. Transformasyon sonrası elde edilen pPIC9K_Ochy vektörünü içeren JM109 kompetent *E. coli* hücrelerinin 100µl/mL ampisilin içeren LB katı besi yerinde seçilimi



Şekil 4.10. a) DNA markörü b) Transformasyon sonucu JM109 kompetent *E. coli* hücre kültüründen izole edilen plazmid *Oryctolagus cuniculus* kimozin geninin PZR yöntemiyle çoğaltılması sonucu elde edilen %1.2 lik agaroz jel görüntüsü (Kuyucuk 1: markör; RcF1&RcR1 primer çifti ile çoğaltılan bölge (1028 bp); Kuyucuk 3: RcF2&RcR2 primer çifti ile çoğaltılan bölge (760 bp); Kuyucuk 4: RcF3&RcR1 primer çifti ile çoğaltılan bölge (485 bp)

Elde edilen plazmid DNA'nın hedef geni içerdiği PZR reaksiyonu sonucunda belirlendikten sonra başka bir doğrulama işlemi olan dizileme işlemi için 1028 bazlık bölgeyi çoğaltan primerler (RcF1&RcR1) kullanılarak yeni bir PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PZR ürünlerinden 5 µl alınıp agaroz jelde yürütüldükten sonra başarılı bir şekilde çoğaltılmış olan PZR ürünlerinin (Şekil 4.11.) reaksiyon sonrası kalan 20 µl'lik kısımları toplanarak saflaştırılmış ve dizilemeye gönderilmiştir. Dizileme sonunda gelen dizilim hedef gen ile %100 benzerlik göstermiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. LB sıvı besiyerinde gelişim göstermiş hücre kültürlerinden izole edilen DNA ve RcF1&RcR1 primer çifti kullanılarak yapılmış PZR analizi sonucu elde edilen %1.2'lik agaroz jel görüntüsü. Yapılan analizde her kuyucuğa yüklenen örnekler, aynı DNA kaynağı kullanılarak yapılmış farklı PZR ürünleridir. Her kuyucuğa 5µl örnek+ 1µl boya çözeltisi karışımı yüklenmiştir.

```
Query  1   GAACATGGTTTGTTGGGTGACTTTTTGAAGAAGCACCAAGTTGAATTGTCCAGAAAAAGA  60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 58   GAACATGGTTTGTTGGGTGACTTTTTGAAGAAGCACCAAGTTGAATTGTCCAGAAAAAGA  117

Query 61   TCCCATTCTGGTGTTGTTGCTAACGAGGCTTTGACTAACTACTTGGATGTTCAATACTTC  120
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 118  TCCCATTCTGGTGTTGTTGCTAACGAGGCTTTGACTAACTACTTGGATGTTCAATACTTC  177

Query 121  GGTAAAATCCAAATCGGTACTCCACCTCAAGAGTTTACTGTTGTTTTCGATACTGGTTCT  180
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 178  GGTAAAATCCAAATCGGTACTCCACCTCAAGAGTTTACTGTTGTTTTCGATACTGGTTCT  237

Query 181  TCTGATTTGTGGGTTCCTTCTATCTACTGTAAGAACAAGGCTTGTAAGATTCACAGAAGA  240
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 238  TCTGATTTGTGGGTTCCTTCTATCTACTGTAAGAACAAGGCTTGTAAGATTCACAGAAGA  297

Query 241  TTCGATCCAACTAAATCTTCTACTTTCCAACACATGCACAAGCCTTTGTACATTCAATAT  300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 298  TTCGATCCAACTAAATCTTCTACTTTCCAACACATGCACAAGCCTTTGTACATTCAATAT  357
```

```
Query 301 GGTACTGGTTCTATGCAAGGTGTTTTGGGTTATGATACTGTTACTGTTGCTGGTATTGTT  360
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 358 GGTACTGGTTCTATGCAAGGTGTTTTGGGTTATGATACTGTTACTGTTGCTGGTATTGTT  417

Query 361 GATACTCACCAAACTGTTGGTTTGTCTACTAAAGAACCAGGAGATGTTTTTGTTTACTCT  420
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 418 GATACTCACCAAACTGTTGGTTTGTCTACTAAAGAACCAGGAGATGTTTTTGTTTACTCT  477

Query 421 GAGTTCGATGGTATTTTGGGTATGGGTTATCCTAACATTGCTTTTCCACATTCTGTTCCT  480
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 478 GAGTTCGATGGTATTTTGGGTATGGGTTATCCTAACATTGCTTTTCCACATTCTGTTCCT  537

Query 481 GTTTTCGATAATATGATGCATAAGCACTTGGTTGCTCAAGATTTGTTTTCTGTTTACATG  540
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 538 GTTTTCGATAATATGATGCATAAGCACTTGGTTGCTCAAGATTTGTTTTCTGTTTACATG  597

Query 541 TCCAGATCCGGTGAAGGTTCTATGTTGACTTTGGGTGGTATTGATTCTCAATACCATACT  600
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 598 TCCAGATCCGGTGAAGGTTCTATGTTGACTTTGGGTGGTATTGATTCTCAATACCATACT  657

Query 601 GGAGATTTGCACTGGGTTCCAGTTACTGTTCAAGGTTATTGGCAATTCACTTTGGATAGA  660
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 658 GGAGATTTGCACTGGGTTCCAGTTACTGTTCAAGGTTATTGGCAATTCACTTTGGATAGA  717

Query 661 GTTACTGTTGATGGTAAAGTTGTTGCTTGTGAGAGAGGTTGTCAAGCTATTTTGGATACT  720
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 718 GTTACTGTTGATGGTAAAGTTGTTGCTTGTGAGAGAGGTTGTCAAGCTATTTTGGATACT  777

Query 721 GGTACTTCTTTGTTGATTGGTCCAGATTCTGAGATTTTGCATATTCAAAGAGCTATTGGT  780
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 778 GGTACTTCTTTGTTGATTGGTCCAGATTCTGAGATTTTGCATATTCAAAGAGCTATTGGT  837

Query 781 GCTTCTGAAGGAGAGTATGGTGAATTTGGTTTCTCTTGTAAGTCTTTGTCCTCTAAACCT  840
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 838 GCTTCTGAAGGAGAGTATGGTGAATTTGGTTTCTCTTGTAAGTCTTTGTCCTCTAAACCT  897

Query 841 GCTGTTGTTTTTGAGATTAACGGTAGAAAGTTCCCATTGTCTCCTTCTGCTTACACTAAT  900
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 898 GCTGTTGTTTTTGAGATTAACGGTAGAAAGTTCCCATTGTCTCCTTCTGCTTACACTAAT  957

Query 901 AAGGATAAGGGTTTGTGTTACTCTGGTTTTGAAGGTGGTTCTCAATTGTGGATTTTGGGA  960
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 958 AAGGATAAGGGTTTGTGTTACTCTGGTTTTGAAGGTGGTTCTCAATTGTGGATTTTGGGA  1017
```

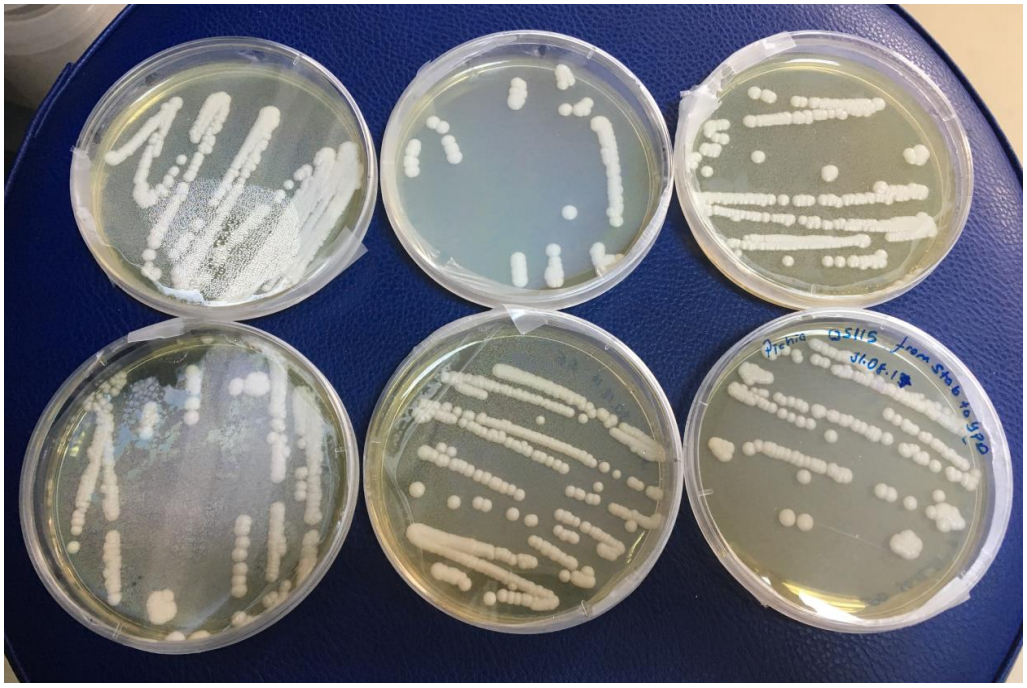
```
Query 961 GATGTTTTTATTAGAGCTTACTACTCTGTTTTCGATAGAGCTAACAATAGATTGGGTTTG  1020
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct1018 GATGTTTTTATTAGAGCTTACTACTCTGTTTTCGATAGAGCTAACAATAGATTGGGTTTG  1077


Query1021 GCTACTGC  1028
          ||||||||
Sbjct1078 GCTACTGC  1085
```

Şekil 4.12. RcF1-RcR1 spesifik primerleri kullanılarak çoğaltılan gen bölgesi ve pPIC9K-Ochy plazmidinde bulunan pPIC9K vektörüne göre optimize edilmiş *Oryctolagus cuniculus* kimozin genine ait dizilimin karşılaştırılması

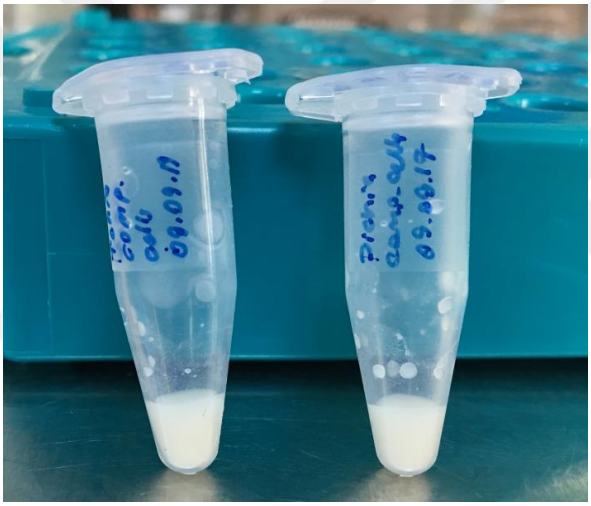
4.2.4. pPIC9K-Ochy vektörünün *P. pastoris* hücrelerine elektroporasyonu ve elektroporasyon işleminin doğrulanması

Rekombinant tavşan kimozin geninin ifadesi için metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* kullanılmıştır. Hedef genin ifadesinin sağlanması için *P. pastoris* hücrelerinden kompetent hücreler hazırlanmış ve pPIC9K-Ochy plazmidi bu kompetent hücrelere aktarılmıştır. Kompetent hücreler hazırlanır iken GS155 suşlarının stablarından YPD katı besiyerine aktarılması ile elde edilen tek koloniler kullanılmıştır (Şekil 4.13.).



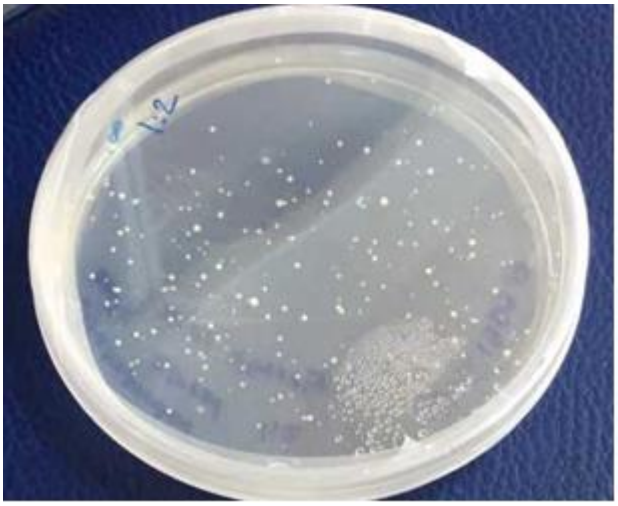
Şekil 4.13. GS115 stab kültürlerinden YPD agara aktarılmış *P. pastoris* maya hücreleri. Aktarım steril öze kullanılarak ve çizme metodu ile yapılmıştır. İnokülasyon yapılmış petriler 30°C'de tek koloniler oluşana kadar inkübasyona bırakılmıştır.

YPD agara aktarılmış *P. pastoris* maya hücrelerinden elde edilen tek kolonilerden kullanıcı el kitabında yer alan protokole bağlı kalınarak kompetent *P. pastoris* hücreleri hazırlanmıştır (Şekil 4.14.). JM109 *E. coli* hücre kültüründen izole edilen plazmid *Oryctolagus cuniculus* kimozin geni *SacI* enzimi ile 37 °C'de gece boyunca bekletilerek doğrusal hale getirildikten sonra elektroporasyon yöntemi ile kompetent *P. pastoris* maya hücrelerine aktarılmışlardır. Elektroporasyon işlemi tamamlandıktan sonra elektropore olmuş hücrelere sorbitol eklenmiş ve bu hücreler yayma metodu ile histidin içermeyen MD (Minimal Dekstroz) katı besiyerine ekilmiştir. İnoküle edilmiş petriler koloni oluşumu gözlenene kadar 30°C'de inkübe edilmiştir (Şekil 4.15.).



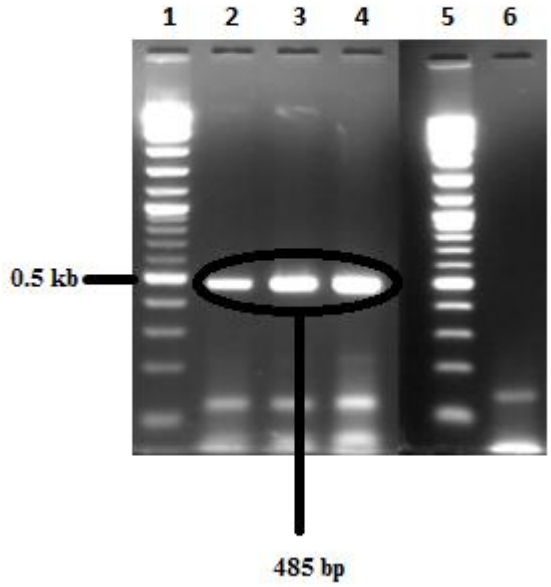
Şekil 4.14. *P. pastoris* kompetent hücreleri. Kompetent hücreler kullanıcı el kitabında yer alan protokole bağlı kalınarak YPD agarda gelişim göstermiş *P. pastoris* maya hücrelerinden elde edilmiştir.

P. pastoris mayasının GS115 suşunun histidini sentezleyen histidinol dehidrojenaz geni (his4) mutasyona uğradığından histidin aminoasidini sentezleyemez bu sebeple GS115 suşu gelişmek için içerisinde histidin bulunan besi ortamına ihtiyaç duyar. Ekspresyonda kullanılan pPIC9K vektörü ise HIS4 genini bulundurduğu için hedef geni içeren vektörün transforme olduğu hücrelerin histidin olmayan ortamda seçilimini sağlar. Bu sebeple histidin bulunmayan besiyerinde tek koloni oluşumunun gözlenmesi elektroporasyonun başarılı bir şekilde yapıldığının göstergesidir. Histidin içermeyen besi ortamında gelişim gösteren bu koloniler His^+ olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.15. Elektroporasyon sonrası MD katı besiyerinde gelişim gösteren His^+ koloniler. JM109 *E. coli* hücre kültüründen izole edilmiş plazmid *Oryctolagus cuniculus* kimozin geni kompetent *P. pastoris* maya hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile aktarılmış ve elde edilen hücre kültürüne sorbitol eklenerek histidin içermeyen MD katı besiyerine inoküle edilmiştir.

Elektroporasyon sonucu elde edilen hücre kültürlerinin histidin içermeyen besi ortamında gelişim göstermeleri, elektroporasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin bir kanıtıdır. Bu yönteme ek olarak ikinci bir doğrulama metodu olan PZR analizi yapılmıştır. Elektroporasyon sonrası MD besiyerinde gelişim gösteren koloniler histidin içermeyen MD sıvı besiyerine aktarılmış ve elde edilen hücre kültüründen DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA ve RcF3&RcR1 primer çifti kullanılarak, daha önce belirlenen şartlarda (Çizelge 3.3.) PZR gerçekleştirilmiştir. Yapılan PZR analizinde pozitif kontrol olarak *E. coli* hücre kültüründen izole edilmiş plazmid *Oryctolagus cuniculus* kimozin geni, negatif kontrol olarak ise içerisinde hedef geni taşımayan GS115 *P. pastoris* maya hücrelerinin MDH sıvı besiyerine inokülasyonu sonucunda elde edilen hücre kültüründen izole edilen DNA kullanılmıştır. Yapılan PZR analizi sonucu elde edilen %1.2 lik agaroz jel görüntüsü Şekil 4.16.'da gösterilmiştir. Yapılan bu PZR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsünde pozitif kontrol ve elektroporasyon sonrası elde edilen bantlar beklenen büyüklükte olup, negatif kontrolün yüklendiği kuyucukta ise herhangi bir bant tespit edilememiştir. Elde edilen sonuçlar elektroporasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır.



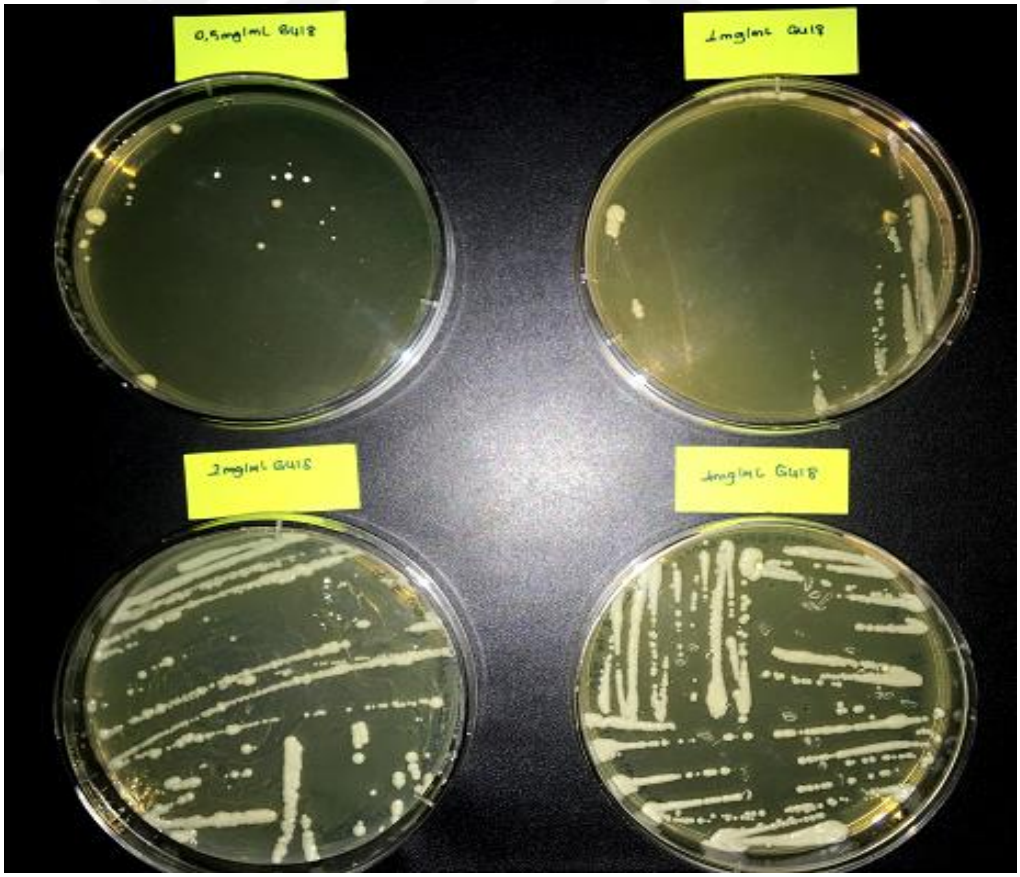
Şekil 4.16. Elektroporasyon işlemini doğrulamak amacı ile yapılan PZR analizi sonucu %1.2 lik agaroz jel görüntüsü (Kuyucuk 1 ve 5: markör; 2: pozitif kontrol; 3 ve 4: Elektroporasyon sonucu elde edilen kolonilerden izole edilen DNA; 6: negatif kontrol. Yapılan analizde pozitif kontrol olarak *E. coli* hücre kültüründen izole edilmiş plazmid *Oryctolagus cuniculus* kimozin geni, negatif kontrol olarak ise YPD agarda gelişim göstermiş GS115 *P. pastoris* maya hücrelerinden elde edilen tek kolonilerin histidin içeren sıvı besi ortamında (MDH) geliştirilmesi sonucu elde edilmiş kültürlerden izole edilen DNA kullanılmıştır

4.2.5. Transforme His^+ maya hücrelerinin antibiyotik (G418) içeren besiyerinde seçilimi

P. pastoris'in konakçı olarak kullanıldığı ekspresyon sistemlerinde, hedef geni içeren vektörlerin çoklu kopya sayılarındaki artış ile ekspresyon veriminin arttığı yapılan çalışmalarda (Brierley ve ark., 1994; Clare ve ark., 1991a; Cregg ve ark., 1993; Romanos ve ark., 1991; Scorer ve ark., 1993; Scorer ve ark., 1994; Thill ve ark., 1990; Vedvick ve ark., 1991) belirlenmiştir. *P. pastoris* maya genomuna hedef genin çoklu kopyasını aktarmak için 'HIS4' ve 'kanR' genini içeren vektörlerin kullanılması gerekmektedir. 'HIS4' geninin varlığı ile vektör histidin bulunmayan besi yerinde seçilim gösterebilecek, 'kanR' geni ile de kanamisin antibiyotiğine direnç kazanarak, antibiyotik içeren besi ortamında gelişim gösterebilecektir. Kanamisin direnç geninin varlığı, genetisin (G418) antibiyotiğine direnç sağlar ve hücrelerin G418'in farklı seviyelerinde gelişim göstermesi çoklu kopya taşıdıklarının

bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Scorer ve ark., 1994).

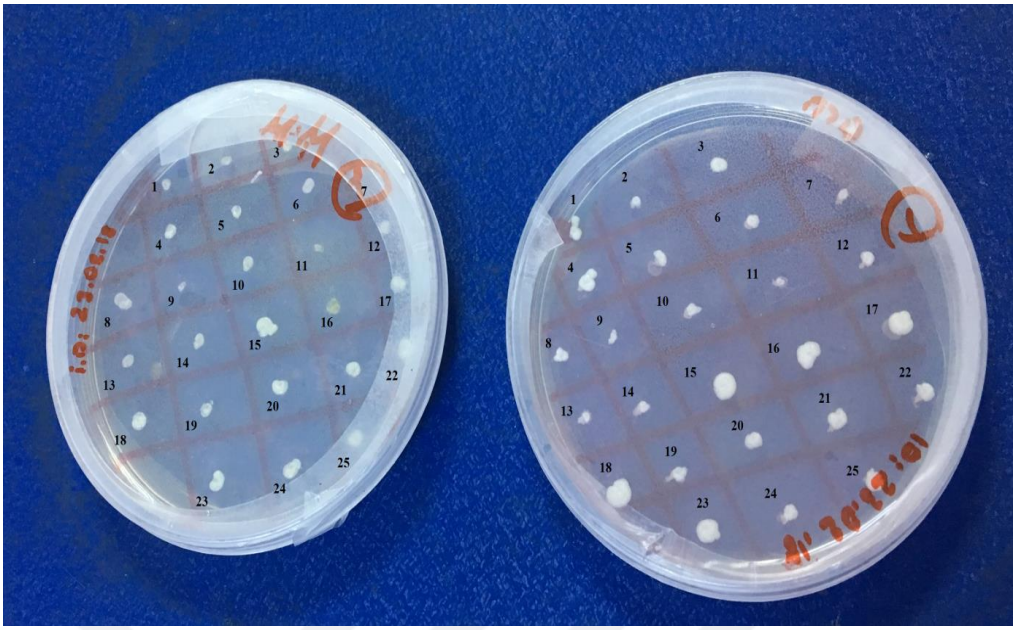
Çalışmada kullanılan pPIC9K vektörü Şekil 4.8.'de verilen şematik gösteriminde de görüldüğü gibi KanR direnç genine sahiptir. Bu gen sayesinde elektroporasyon sonrası *P. pastoris* hücrelerine transforme olmuş His^+ hücreleri antibiyotik içeren besi ortamlarında gelişim gösterme yeteneklerine göre seçilmiştir. Besiyerlerine eklenen antibiyotik miktarları kademeli olarak arttırılarak (0.25, 0.50, 1.00, 2.00 ve 4.00 mg/mL), düşük antibiyotik konsantrasyonunda gelişim gösteren tek koloniler sırası ile daha yüksek konsantrasyonda antibiyotik içeren besiyerlerine inoküle edilmiştir (Şekil 4.17.). En yüksek antibiyotik miktarına (4 mg/mL) sahip besiyerlerinde gelişim gösteren kolonilerin çoklu kopya sayılarının en fazla olduğu bilindiğinden çalışmaya ekspresyonun verimini arttırmak amacı ile bu koloniler ile devam edilmiştir.



Şekil 4.17. *P. pastoris* hücrelerine transforme olmuş pPIC9K-Ochy vektörünü içeren rekombinant His^+ hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg/mL) G418 içeren YPD besiyerindeki gelişimleri

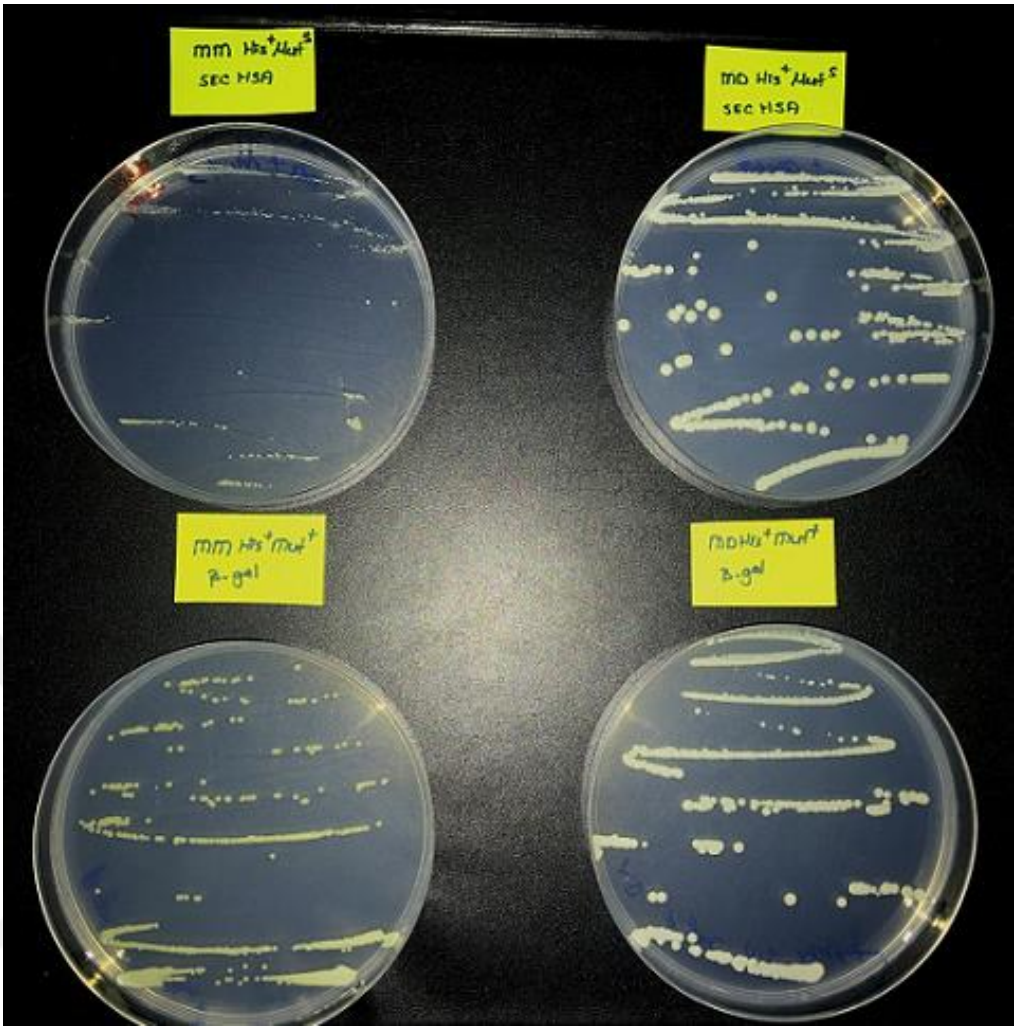
4.2.6. Transformantların fenotiplerinin belirlenmesi

P. pastoris'te rekombinant protein ekspresyonunu sürdürebilen birkaç farklı promotör vardır. Bunlardan en yaygın olanı AOX (alkol oksidaz) promotörüdür. AOX promotörü *P. pastoris*'te protein ekspresyonu sırasında hücrelerin geliştirildiği substratta metanol olmaması halinde hücre gelişimini ciddi bir şekilde baskılar. *P. pastoris* kromozomunda AOX1 ve AOX2 olmak üzere iki AOX kalıt bölge mevcuttur. AOX1 ve AOX2 bölgeleri *P. pastoris*'de alkol oksidaz enzimlerinin enkodlanmasından sorumlu gen dizilimleridir ve bu dizilimlerin varlığına göre *P. pastoris*'in fenotipleri belirlenir. *P. pastoris* bu bölgelerden her ikisini de bulunduruyorsa Mut^+ fenotipi, sadece AOX2'yi bulunduruyorsa Mut^S fenotipi hiçbirini bulundurmuyor ise de Mut^- fenotipi olarak adlandırılır (Pla ve ark., 2006). Mut^+ (Methanol utilization plus) fenotipi karbon kaynağı olarak methanolü aktif bir şekilde kullanabilmekte, Mut^S (Methanol utilization slow) fenotipi ise metanolü düşük miktarda kullanabilmektedir. Bu sebeple metanol varlığında AOX1 geninin ekspresyonu yüksek verimlerde yapılabilmektedir. AOX2 geninin varlığında ise alkol oksidaz aktivitesi yavaşladığından, metanolü kullanabilme aktivitesi de düşmüş olacaktır. Bu çalışmada kullanılan pPIC9K vektörü AOX promotörlerine sahip bir vektördür ve kullanılan bu vektörün lineer hale getirilmesi işlemi *SacI* restriksiyon enzimi ile yapıldığı takdirde elde edilen suşun Mut^+ olması beklenmektedir. Bu şekilde AOX1 promotörü kesilmemekte ve methanolü etkin bir şekilde kullanabilen fenotipler meydana gelmektedir. Yapılan çalışmada kullanılan fenotipin His^+ olması beklense de bunu doğrulamak için antibiyotik direnci kazandırılmış tek hücrelerden alınan koloniler öncelikle MM sonra da öze değiştirilmeden MD besiyerine inoküle edilmişlerdir. Her iki besi yerinde de gelişim gösteren koloniler Mut^+ olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.18. İçerisinde *Oryctolagus cuniculus* kimozin genini taşıyan, 4 mg/mL antibiyotik içeren besi ortamında gelişim gösterme yeteneklerine göre seçilmiş tek kolonilerin MM ve MD besiyerlerindeki gelişimleri. İnokülasyon yapılırken 4 mg/mL antibiyotik içeren YPD besiyerinden alınan tek koloniler MM besiyerine inoküle edildikten sonra aynı öze ile MD besiyerine de inokülasyonu sağlanmıştır. Her tek koloni için ayrı bir öze kullanılmıştır.

Şekil 4.18.'de görüldüğü gibi inokülasyonu yapılan bütün koloniler hem MM hem de MD besiyerinde gelişim göstermişlerdir. Bu veriler de elektropore olmuş transformantların Mut^+ fenotipine ait olduğunun bir kanıtı olmuştur. Yapılan analizin doğrulanması amacı ile GS115 Albumin (His^+ Mut^S) ve GS115 β-Gal (His^+ Mut^+) suşları MM ve MD besiyerinlerine inoküle edilerek çalışmanın kontrolü sağlanmıştır. Şekil 4.19.'da görüldüğü gibi GS115 (His^+ Mut^S) suşu beklendiği gibi MM besiyerinde az, MD besiyerinde ise belirgin bir gelişim gösterirken; GS115 β-Gal (His^+ Mut^+) suşu hem MM, hemde MD besiyerinde gelişim göstermiştir.



Şekil 4.19. GS115 Albumin (His^+ Mut^S) ve GS115 β-Gal (His^+ Mut^+) suşlarının MM ve MD besiyerlerinde gelişimleri. Inokülasyon önce MM sonra MD besiyerine steril öze ile çizilerek yapılmıştır. İnoküle edilen petriler 30°C'de 3-5 gün inkübe edilmiştir

.

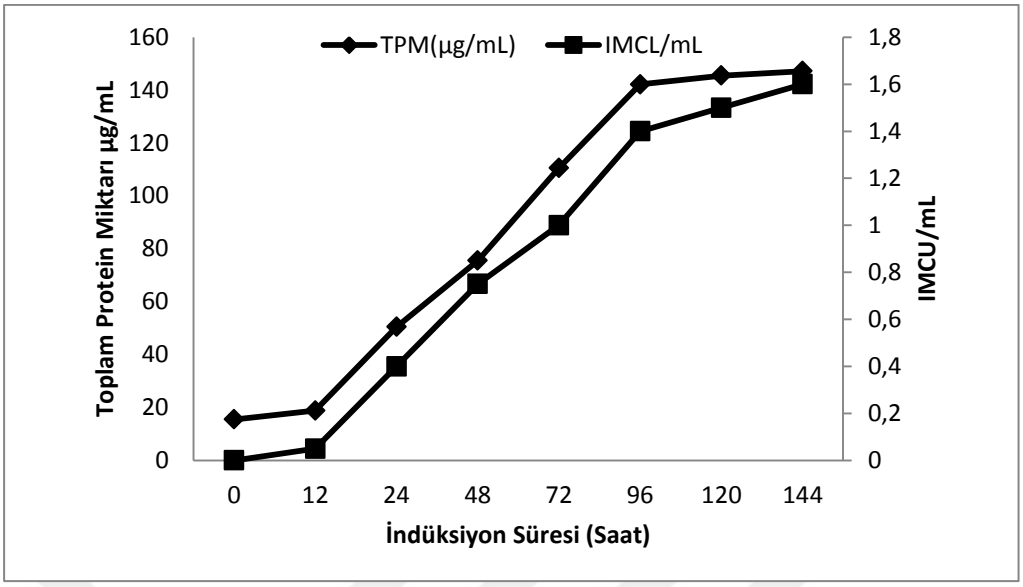
4.2.7. Transgenik *Pichia pastoris* maya hücrelerinin ekspresyonu

Rekombinant tavşan kimozin enziminin ekspresyonu amacıyla 4 mg/mL antibiyotik (G418) içeren besi ortamında gelişebilme yeteneği gösteren ve transgenik karakterleri moleküler yöntemlerle belirlenmiş olan rekombinant mayalar kullanılmıştır. Yüksek antibiyotik (4.00 mg/mL) içeren besiyerlerinde gelişebilen mayaların birden fazla (8-12) hedef gen kopya sayısına sahip oldukları bildirilmektedir (Thill ve ark., 1990; Clare ve ark., 1991). Antibiyotikli besiyerlerinde gelişen tek koloniler steril öze yardımıyla alınarak rekombinant protein ekspresyonu amacıyla fermantasyon ortamına aktarılmışlardır. Ekspresyon

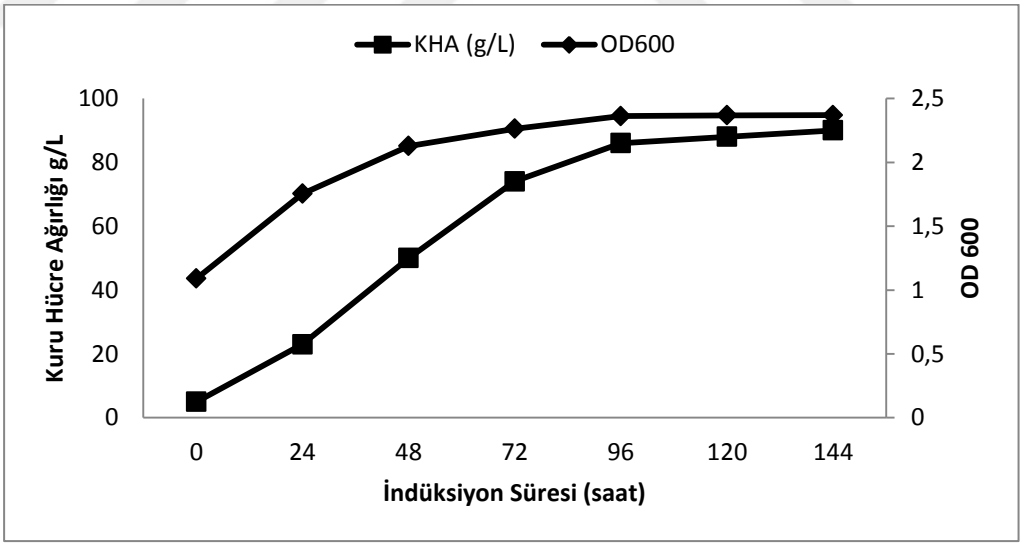
süresince fermantasyon ortamından alınan örneklerdeki toplam protein miktarları, enzim aktiviteleri, kuru hücre ağırlıkları, OD_{600} değerleri belirlenerek ekspresyon için optimum süre belirlenmiş ve fermantasyon esnasında bu değerlerde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda optimum rekombinant protein ekspresyon süresi 96 saat olarak belirlenmiş, 96 saatten sonra alınan örneklerdeki toplam protein miktarında önemli bir değişim gözlenmediğinden tekrarlanan ekspresyonlarda bu optimum süre kullanılmıştır (Şekil 4.20., Şekil 4.21.).

Şekil 4.20. ve Şekil 4.21 'de de görüldüğü gibi indüksiyon süresine bağlı olarak kuru hücre ağırlıklarında, toplam protein miktarlarında ve OD_{600} değerlerinde 96 saat sonuna kadar belirgin bir artış gözlemlenmiş, 96 saat sonrası alınan numunelerde anlamlı bir artış olmadığı belirlenmiştir. Fermantasyon başında kuru hücre ağırlığı 5 g/L olarak belirlenirken 96 saatlik fermantasyon sonunda bu değer 86 g/L' ye yükselmiştir. Bu 96 saatlik fermantasyon sürecinde artan protein miktarına bağlı olarak enzim aktivitesinde de bir artış gözlemlenmiştir. Ekspresyonun başında enzim aktivitesi tespit edilememişken, 96 saat sonunda 1.5 IMCU/mL aktiviteye ulaşmıştır.

Noseda ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *P. pastoris* ekspresyon sistemini kullanarak rekombinant sığır kimozininin ekspresyonunu ve optimizasyonunu yaptıktan sonra biyoreaktör vasıtası ile optimize şartlarda fermantasyonunu sağlamışlardır. Ekspresyon esnasında 120 saatlik metanol beslemesi sonucunda her 24 saatte bir alınan sonuçlara göre bu çalışmaya benzer şekilde 96 saat boyunca kuru hücre ağırlıklarında ve süt pıhtılaştırma aktivitesinde (IMCU/mL) önemli bir artış olduğu, 120. saat sonunda ise elde edilen değerlerin 96. saatte elde edilen değerlere çok yakın olduğu gözlenmiştir. Fermantasyonun 96. saati sonunda elde edilen enzim aktivitesi 3 IMCU/mL olarak belirlenirken kuru hücre ağırlığı 13 g/L seviyelerinde bulunmuştur.



Şekil 4.20. BMM besiyerinde 30 °C'de fermente edilen rekombinant mayaların indüksiyon süresi boyunca toplam protein üretim miktarları ve eksprese edilen rekombinant enzimlerin aktiviteleri. Yüksek miktarlarda antibiyotik içeren besiyerlerinden alınan rekombinant mayalar BMM besiyerine inoküle edilmiş ve protein salgılama yetenekleri Bradford toplam protein tayini yöntemiyle tespit edilmiştir. Besiyerine her 24 saatte bir %1 metanol eklenerek protein ekspresyonu indüklenmiştir. Belirli zaman aralıklarında fermentasyon ortamından alınan örneklerde toplam protein miktarı ve enzim aktivitesindeki değişimler ölçülmüştür.



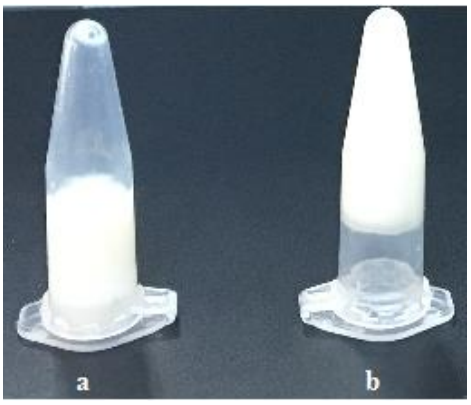
Şekil 4.21. BMM besiyerinde 30 °C'de fermente edilen rekombinant mayaların indüksiyon süresi boyunca kuru hücre ağırlıkları ve OD_{600} değerleri. Yüksek miktarlarda antibiyotik içeren besiyerlerinden alınan rekombinant mayaların her 24 saatte bir %1 metanol eklenerek protein ekspresyonu indüklenmiştir. Bu indüksiyon süresince belirli belirli zaman aralıklarında fermantasyon ortamından alınan örneklerde kuru hücre ağırlığı g/L ve OD_{600} değerlerindeki değişimler ölçülmüştür.

Noseda ve ark. (2016) yaptıkları bir diğer çalışmada çalkalamalı tank bioreaktör kullanılarak *P. pastoris*'e transforme olmuş rekombinant sığır kimozininin üretimi yapılmıştır. Fermantasyon aşamasından önce erlenlerde yapılan ekspresyon süresince 24 saatte bir methanol indüklemesi yapılmış ve alınan örneklerin enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada 144 saat sonunda alınan enzim örneğinin aktivitesinin 72 saat sonunda alınan enzim örneğinden 8 kat yüksek aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Tyagi ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada rekombinant keçi kimozininin erlen ve biyoreaktör içerisinde fermentasyonu sonucu elde edilen hücre kültürlerinin yoğunluklarını karşılaştırmış ve biyoreaktör içerisinde yapılan fermentasyon sonucu elde edilen hücrelerin yoğunluğunun erlen içerisinde gerçekleştirilen fermentasyon sonucu elde edilen hücrelerden 8 kat daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

4.2.8. Asit- baz nötralizasyonu-enzim aktivitesi testi

Kimozin mide mukozası tarafından inaktif prokimozin olarak salgılanan zimojen bir enzimdir. Bu enzimin aktifleşmesi ancak asidik koşullarda 42 amino asitten oluşan N terminal ön zincirinin otokatalitik ayrılması ile gerçekleşir (Foltmann, 1977). Fermantasyon sonucu üretilen rekombinant kimozinlerin aktifleşmesi için asit- nötralizasyonu işlemine tabi tutulması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda keçi ve koyun kimozinlerinin *E.coli*'ye, sığır kimozinin *P. pastoris*'e transformasyonu sonucu elde edilen rekombinant kimozinlerin aktifleşmesi için asit-nötralizasyonu yapıldığı (Kumar ve ark., 2007; Rogelj ve ark., 2001; Jiang ve ark., 2012) belirlenmiştir. Benzer şekilde rekombinant deve kimozininin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde ekspresyonu sonucu elde edilen hücre kültürlerinin asit baz nötralizasyonu öncesi ve sonrasında yapılan enzim aktivitesi testinde asit- baz nötralizasyonu yapılmayan hücrelerin sütü pıhtılaştırmadığını yani enzimin aktif forma dönüşmediğini gözlemlemiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda da fermentasyon sonrası elde edilen enzimler aktifleştirildikten sonra enzim aktivitesi testine tabi tutulmuştur ve aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. Enzim aktivitesi testi sonucu elde edilen pıhtı görüntüsü. Tüp A: Negatif kontrol, Tüp B: BMM sıvı besiyerinde erlen içerisinde transforme olmuş rekombinant tavşan kimozin geninin 96 saatlik fermentasyon sonucu elde edilen süpernatantın asit baz nötralizasyon sonucu elde edilen hücre kültürü. Çalışmamızda negatif kontrol olarak içerisinde tavşan pro-kimozin geni bulunmayan pPIC9K vektörü ile yapılan transformasyon sonucu elde edilen hücre kültürleri kullanılmıştır. Yapılan transformasyon, içerisinde pPIC9K_Ochy vektörü bulunan hücreler ile aynı şartlarda yapılmış ve elde edilen ürünler asit-baz nötralizasyonuna tabi tutulduktan sonra kullanılmıştır.

Yapılan enzim aktivitesi testinde negatif kontrol olarak içerisinde tavşan pro-kimozin geni bulunmayan pPIC9K vektörü ile yapılan transformasyon sonucu elde edilen hücre kültürleri kullanılmıştır. Bu hücre kültürleri de aynı şekilde asit baz nötralizasyonuna tabi tutulmuş ve sütü pıhtılaştırıp pıhtılaştırmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda negatif kontrolün içerisinde kimozin geni bulunmadığı için substrat üzerinde aktivite göstermediği, çalışma sonucu elde edilen rekombinant tavşan kimozin enziminin ise substratı pıhtılaştırdığı yani prokimozinin aktif kimozine başarılı bir şekilde dönüştüğü gözlemlenmiştir.

4.2.9. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS page)

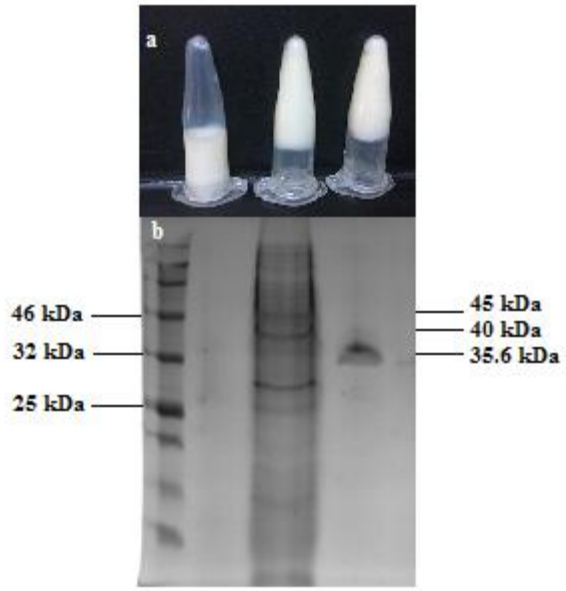
Kimozin enziminin moleküler ağırlığını enzimin kaynağı, saflık derecesi ve formu gibi etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar sonunda saf rekombinant buzağı kimozininin moleküler ağırlığı 35.6 kDa olarak belirlenmiştir (Noseda ve ark., 2013; Attallah, 2007; Mohanty ve ark., 2003). Attallah (2007) yaptığı çalışmada bufalo, inek, deve, domuz gibi farklı hayvansal kaynaklardan izole edilen kimozin kaynaklarının moleküler seviyede karakterizasyonunu yapmış ve sırası ile baz büyüklüklerini 40, 40, 43, 30 kDa olarak belirlemiştir. Kumar ve ark.

(2006) yaptıkları çalışmada keçiden elde ettikleri renneti farklı metotlarla saflaştırarak prokimozin elde etmiş ve bu elde ettikleri saf enzimin moleküler ağırlığını 36 kDa olarak belirlemişlerdir. Rogelj ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada ise elde ettikleri rekombinant kuzu kimozininin moleküler ağırlığını 40 kDa olarak belirlemişlerdir.

Proteinler yapısal ve işlevsel özelliklerini kazanması için translasyon sonrası bazı modifikasyonlara uğrarlar. Mayaların konakçı olarak kullanıldığı rekombinant kimozin ekspresyon sistemlerinde de yaygın olarak bu translasyon sonrası modifikasyonlardan biri olan glikolizasyon meydana gelmektedir (Wang ve ark., 2015; Vallejo ve ark., 2012; Brink ve ark., 2006). Glikolizasyon sonrası elde edilen SDS page jellerinde iki belirgin bant gözlemlenmektedir (Wang ve ark., 2015; Vallejo ve ark., 2012; Brink ve ark., 2006). Bu bantlardan molekül ağırlığı küçük olan kimozine ait olan bant, molekül ağırlığı büyük olan bant ise gilikolizasyon sonucu oluşan banttır (Wang ve ark., 2015; Vallejo ve ark., 2012; Brink ve ark., 2006; Noseda ve ark., 2016). Yapılan başka bir çalışmada ise glikolizasyon sonu elde edilen kimozin enzimlerinin saf kimozinlerden daha yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır (Brink ve ark., 2006).

Bu çalışmada ise fermantasyon sonucu elde edilen enzimler asit baz nötralizasyonu ve kısmi saflaştırma işlemlerine tabi tutulduktan sonra SDS-PAGE elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen jel görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.23b.) ilk kuyucukta kullanılan enzim kaynağı kimozin genini içermediği için beklenildiği gibi bant gözlenmemiştir. İkinci kuyucukta ise ekspresyon sonucu aktifleştirilmiş ve kısmi olarak saflaştırılmış kimozin enzimi kullanılmıştır ve bu kısımda kimozinin beklenen aralığı olan 32-45 kDa değerleri arasında iki adet bant gözlemlenmektedir. Bunlardan yaklaşık 40 kDa büyüklüğünde olan bant kimozin enzimine aittir. 45 kDa büyüklüğünde olan ikinci bant ise glikolizasyon sonucu oluşan bir banttır. Son kuyucuğa ise pozitif kontrol olarak moleküler büyüklüğü bilinen saf buzağı kimozini yüklenmiştir ve beklendiği üzere 35.6 kDa büyüklüğünde bir bant elde edilmiştir. SDS-PAGE jel görüntüsüne paralel olarak bu enzimler kullanılarak yapılan enzim aktivitesi testi sonuçları da Şekil 4.23a.'da verilmiştir.

Negatif kontrol ile yapılan analizde pıhtı oluşmaz iken fermentasyon sonucu elde edilen hücre kültürleri ve sığır kimozini substrat üzerinde aktivite göstererek pıhtı oluşturmuşlardır.

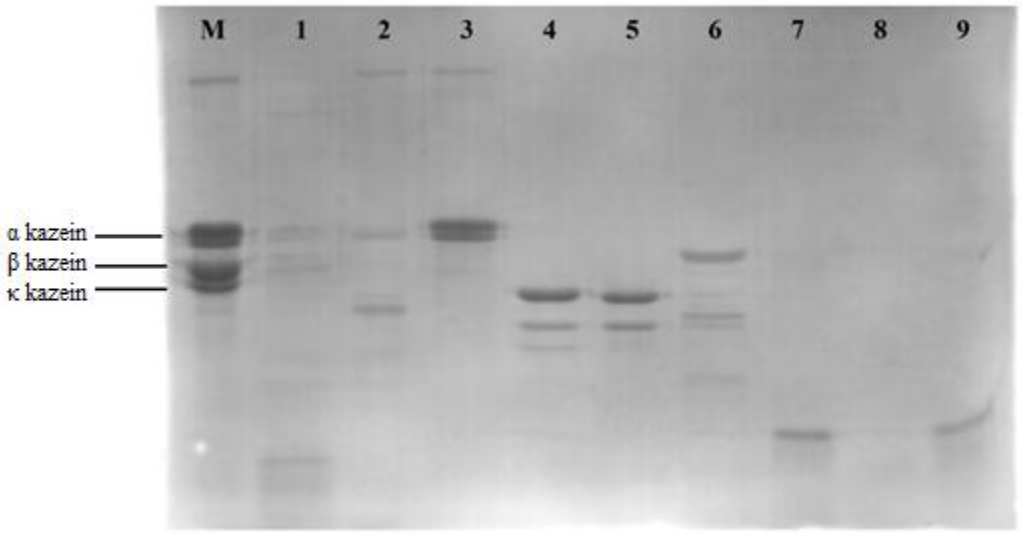


Şekil 4.23. a: Fermantasyon sonrası elde edilen enzimlerin pıhtı oluşumu. b: Fermentasyon sonrası kısmi olarak saflaştırılan tavşan kimozin enziminin %12'lik SDS page jel görüntüsü. Tüp 1- Kuyucuk 1: İçerisinde tavşan pro-kimozin geni bulunmayan pPIC9K vektörü ile yapılan transformasyon sonucu elde edilen, asit baz nötralizasyonuna tabi tutulmuş ve kısmi olarak saflaştırılmış hücre kültürleri (Negatif kontrol) ; Tüp 2, Kuyucuk 2: BMM sıvı besiyerinde, erlen içerisinde transforme olmuş rekombinant tavşan kimozin geninin 96 saatlik fermentasyon sonucu elde edilen asit baz nötralizasyonuna tabi tutulmuş ve kısmi olarak saflaştırılmış hücre kültürleri; Tüp 3, Kuyucuk 3: Rekombinant sığır kimozini (Pozitif kontrol)

4.2.10. Kazeinin hidroliz özelliklerinin belirlenmesi

Kimozinin peynir yapımında öncelikli görevi κ-kazeinin Phe_{105}-Met_{106} bağını spesifik olarak hidrolize ederek sütü pıhtılaştırmasıdır. Fakat kimozinin κ-kazein dışında diğer kazeinleri de parçaladığı bilinmektedir. Kimozin çözelti içerisindeki β kazeini 7 bölgeden parçalar ve bu oluşan peptidler acılığa sebep olurlar. Bu bölgelerin çoğu hidrofobik C-terminaline yakın bölgelerdir. β kazeinin C-terminal bölgesinin çok hidrofobik olması ve peynirde hidrofobik olarak devam eden etkileşimlere uğraması sebebi ile peynirde çok sınırlı olarak hidrolize olur ya da hiç olmaz. Çözelti içerisindeki α_{s1}-kazein kimozine hassas pek çok bağ içerir. α_{s2}-kazein ise α_{s1}-kazeine göre kimozine karşı daha dirençlidir. (Dervişoğlu ve ark., 2007).

Yapılan bu çalışmada rekombinant tavşan kimozini, ticari deve ve buzağı kimozinlerinin α,β,κ-kazeinler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hazırlanan çözeltiler enzim ile muamele edildikten sonra SDS-PAGE analizi ile proteinlerin hidroliz olup olmadıkları belirlenmiştir (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. Rekombinant deve, tavşan, buzağı kimozinlerinin α,β,κ- kazeinler üzerindeki etkisi. Kuyucuk 1:markör; 2:α-kazein+rekombinant deve kimozini; 3:α-kazein+rekombinant buzağı kimozini; 4:α-kazein+rekombinant tavşan kimozini; 5:β-kazein+rekombinant deve kimozini; 6:β-kazein+rekombinant buzağı kimozini; 7:β-kazein+ rekombinant tavşan kimozini; 8:κ-kazein+rekombinant deve kimozini 9:κ-kazein+rekombinant buzağı kimozini; 10:κ-kazein+rekombinant tavşan kimozini

Şekil 4.24.'te görüldüğü gibi rekombinant tavşan ve deve kimozinlerinin α-kazeini parçalamadığı, β kazeini az miktarda parçaladığı, κ-kazeini ise spesifik olarak parçaladığı gözlemlenmiştir. Deve kimozininin ise genel olarak tavşan kimozinine benzer özellikler gösterdiği fakat buzağı kimozinin α, β, κ enzimlerinin hepsini tamamen parçaladığı gözlemlenmiştir. Peynir yapımında κ-kazeinin spesifik olarak Phe_{105}-Met_{106} bağının parçalanması istenmektedir. Bunun dışındaki parçalanmalar peynirin yapısını ve duyusal özelliklerini olumsuz etkilediğinden istenmemektedir (Kumar ve ark., 2010). Kazein çözeltilerinin kimozinden etkilendiği ancak peynir üretiminde ortamdaki protein konformasyonu sebebi ile kazeinlerin parçalanmadığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Fox ve ark., 1993). Bu çalışmada kullanılan kazeinler çözelti halinde olmalarına rağmen tavşan kimozini, buzağı ve deve kimozininden üstün proteolitik özellik göstermiştir. Bu da tavşan kimozininin

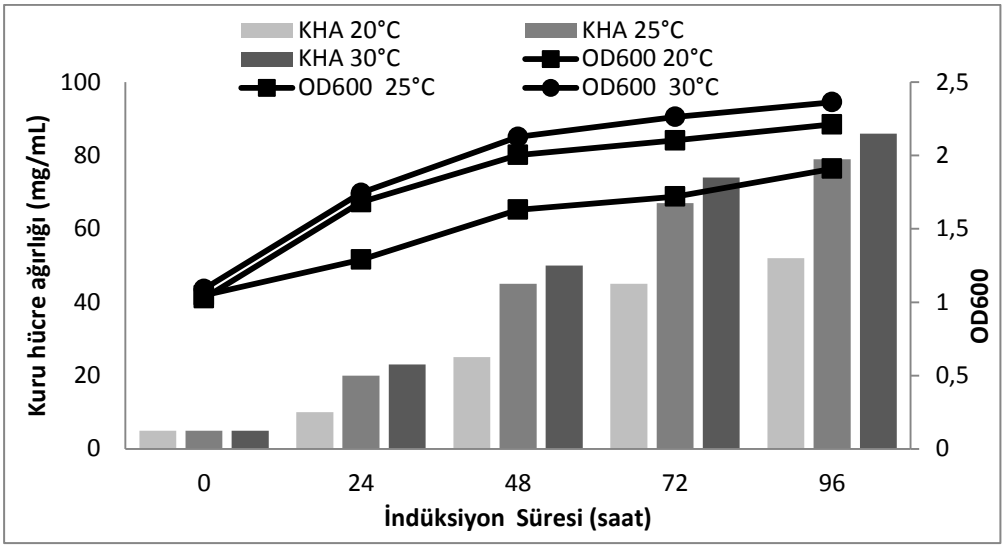
peynir yapımına deve ve buzağı peynirlerinden daha uygun olduğunun ve bu enzimler yapılan peynirlerin duyusal ve proteolitik özelliklerinin daha üstün olacağının bir göstergesidir. Rekombinant buzağı ve deve kimozinleri ile yapılan diğer çalışmalarda, tavşan kimozinin gösterdiği gibi, κ-kazeine spesifik bir parçalanma gözlenmiş, α ve β-kazeinler üzerinde enzimlerin etki etmediği gözlemlenmiştir (Jiang ve ark., 2012; Wang ve ark., 2015).

4.3. Tavşan Kimozin Enziminin Karakterizasyonu ve Optimizasyonu

4.3.1. Optimum fermantasyon sıcaklığının belirlenmesi

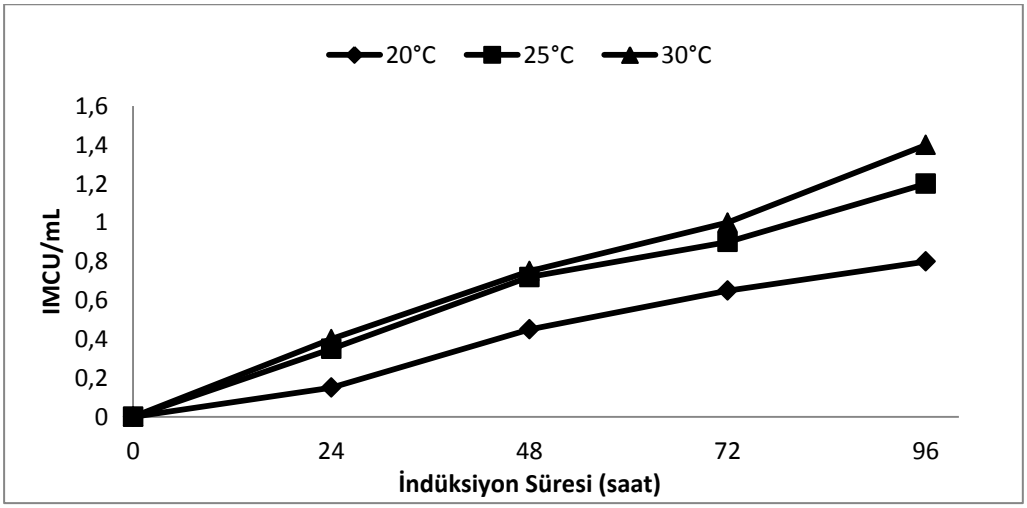
Her mikroorganizmanın maksimum gelişim gösterdiği bir sıcaklık değeri vardır. Bu çalışmada konakçı olarak *P. pastoris* mayası kullanıldığı için optimum fermentasyon sıcaklığı bu mayanın gelişim gösterdiği sıcaklık aralığına göre belirlenmiştir. Transgenik mayalar sıcaklığı 20 °C, 25 °C, 30 °C'ye ayarlanan BMM besi ortamlarında 96 saat geliştirilmiştir. Her 24 saatte bir alınan numunelerde OD_{600} değerleri, kuru hücre ağırlıkları ve enzim aktivitesi değerleri ölçülmüş ve optimum fermentasyon sıcaklığı belirlenmiştir (Şekil 4.25. ve Şekil 4.26.).

Şekil. 4.25. ve Şekil. 4.26. 'de görüldüğü gibi rekombinant kimozin enziminin fermantasyonunun yapıldığı sıcaklığın artması ile elde edilen hücre kültürlerinin kuru hücre ağırlığında ve OD_{600} değerlerinde indüksiyon süresine bağlı olarak bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Maksimum kuru hücre ağırlığı, OD_{600} değeri ve enzim aktivitesi 30 °C'de yapılan ekspresyon sonucunda elde edilmiştir. En düşük değerler ise 20 °C'de yapılan fermentasyon sonunda elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile optimum ekspresyon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiş ve çalışmaya bu sıcaklık ile devam edilmiştir.



Şekil 4.25. Farklı sıcaklıklarda (20 °C, 25 °C, 30 °C) BMM besiyerinde, her 24 saatte bir %1' lik metanol beslemesi ile 96 saat sonunda elde edilen süpernatantların indüksiyon süresince alınan numunelerinin kuru hücre ağırlıkları ve OD_{600} değerleri.

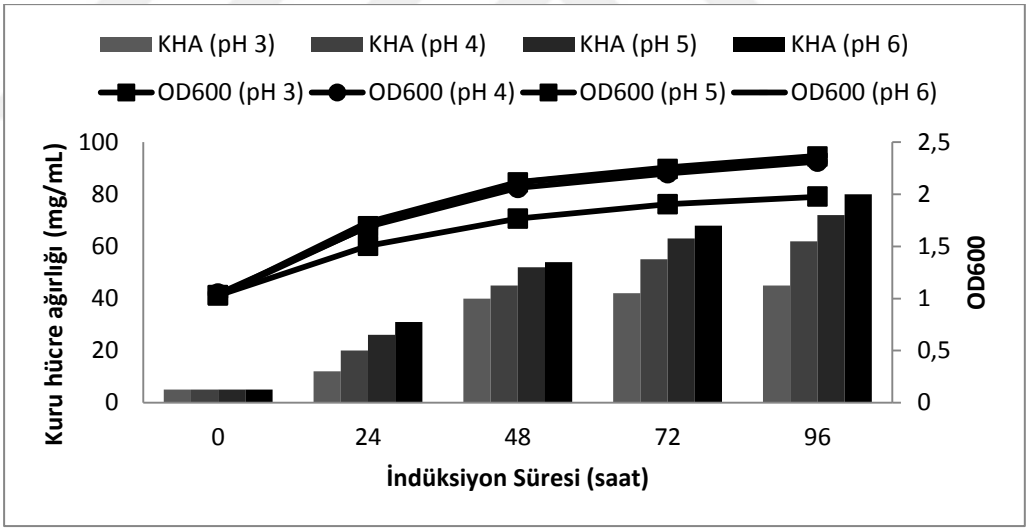
Noseda ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada *P. pastoris*' de ekspresyonu yapılan buzağı kimozininin optimum fermentasyon sıcaklığını 25 °C olarak belirler iken Wang ve ark. (2015) deve kimozininin *P. pastoris*'te ekspresyonunu 28 °C'de gerçekleştirmişlerdir. Tyagi ve ark. (2016) ise keçi kimozininin *P. pastoris*' de ekspresyonunu 30 °C'de gerçekleştirmişlerdir.



Şekil 4.26. BMM besiyeri içerisinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen (20 °C, 25 °C, 30 °C) fermantasyon süresince her 24 saatte bir alınan örneklerde yapılan enzim aktivitesi testi sonuçları

4.3.2. Optimum fermantasyon pH' ının belirlenmesi

Rekombinant *Oryctolagus cuniculus* kimozin enzimini eksprese etme yeteneğinde olan transgenik mayaların fermantasyon ortamında gelişebilmesi için ihtiyaç duydukları pH değerini belirlemek amacıyla optimizasyon çalışması yapılmıştır. BMM besiyerinin pH'ı 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 değerlerinde ayarlanarak transgenik mayalar fermentasyon ortamında geliştirilmiştir. Kullanılan besiyerlerinin pH'ları her 24 saatte bir farklı pH'larda sodyum sitrat tampon çözeltileri ile belirlenen değerlerde sabit tutulmuştur Farklı pH değerlerinde geliştirilen mayaların toplam protein miktarları, OD_{600} değerleri, kuru hücre ağırlıkları ve enzim aktivitesi değerleri ölçülmüştür (Şekil 4.27.). Elde edilen sonuçlar ekspresyonun yapıldığı BMM besiyerinde herhangi bir pH ayarlaması yapmadan fermantasyonu yapılan hücre kültürleri ile karşılaştırılarak fermantasyon için optimum pH değeri belirlenmiştir.

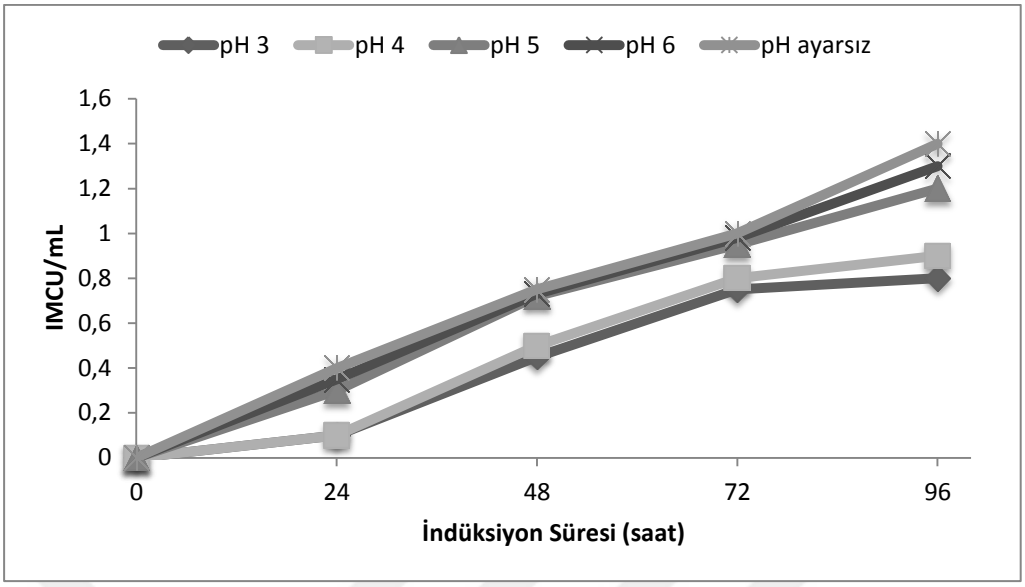


Şekil 4.27. Farklı pH'lardaki (3.0, 4.0, 5.0, 6.0) BMM besiyerinde, her 24 saatte bir %1'lik metanol beslemesi ile 96 saat sonunda elde edilen süpernatantlardan indüksiyon süresince alınan numunelerin kuru hücre ağırlıkları ve OD_{600} değerleri. Kullanılan besiyerlerinin pH'ları her 24 saatte bir sodyum sitrat tampon çözeltisi ile belirlenen değerlerde sabit tutulmuştur

Şekil 4.27.'de görüldüğü gibi rekombinant kimozin enziminin fermantasyonunun yapıldığı besiyerinin pH'ının artması ile elde edilen hücre kültürlerinin kuru hücre ağırlığında ve OD_{600} değerlerinde indüksiyon süresine bağlı

olarak bir artış olduğu gözlemlenmiştir. OD_{600} değerleri incelendiğinde pH 4.0, 5.0, 6.0'da yapılan ekspresyonlardan alınan numunelerde neredeyse hiç fark olmadığı ve bu değerlerin pH 3.0'de alınan değerlerden yaklaşık %20 daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Kuru hücre ağırlıkları değerlendirildiğinde ise pH değerindeki artış ile kuru hücre ağırlıklarında da bir artış gözlemlenmiştir. En yüksek kuru hücre ağırlığı 96 saatlik fermantasyon sonunda 80 mg/mL ile pH 6.0'da yapılan fermantasyon sonucu elde edilirken, en düşük kuru hücre ağırlığı 45 mg/mL ile pH 3.0'de yapılan fermantasyon sonunda elde edilmiştir.

Fermantasyon sonunda elde edilen hücre kültürlerinin enzim aktiviteleri kıyaslandığında ise pH 5.0 ve pH 6.0'ya ayarlanan besi ortamında ekspresyonu yapılmış enzimler ile pH ayarlaması yapılmamış besi ortamında ekspresyonu yapılmış enzimlerin aktiviteleri arasında önemli bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.28.). pH 3.0 ve pH 4.0'e ayarlanan besi ortamında ekspresyonu yapılmış enzimlerin ise enzim aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olmadığı ancak diğer ekspresyon ürünlerinden yaklaşık %40 oranında düşük olduğu tespit edilmiştir. Yapılacak endüstriyel boyuttaki üretimlerde pH ayarlamanın maliyeti ve gerekli iş gücü dikkate alındığında pH ayarlamanın bu çalışma için gerekli bir aşama olmadığı pH 6.0'da hazırlanan besi ortamında yapılan fermantasyon sonucu üretilmiş enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği gözlemlenmiştir.



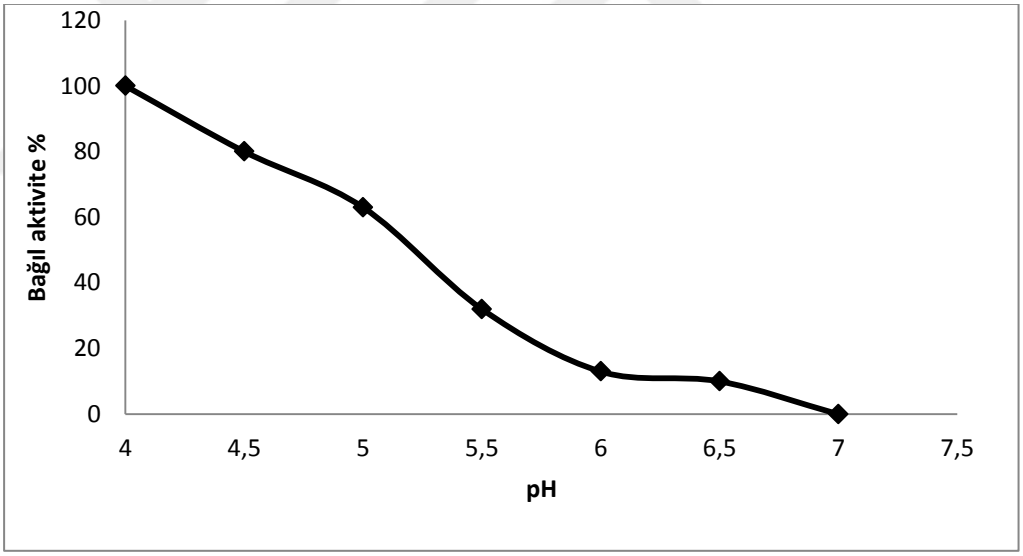
Şekil 4.28. Farklı pH değerlerine sahip BMM besiyeri içerisinde ekspresyonu yapılan enzimlerin enzim aktiviteleri. Çalışmada indüksiyon süresince her 24 saatte bir örnekler alındıktan sonra farklı pH aralıklarındaki sodyum sitrat tampon çözeltileri ile besiyeri pH değerleri 3.0, 4.0, 5.0, 6.0'ya ayarlanarak %1'lik methanol beslemesi yapılmıştır. Bir ekspresyon ise 6.0 pH değerine sahip BMM besiyerinde herhangi bir ayarlama yapmadan 96 saat boyunca her 24 saatte bir %1' lik methanol beslemesi yapılarak sürdürülmüştür.

Noseda ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada *P. pastoris*'de ekspresyonu yapılan buzağı kimozininin pH 3.0 ve 4.0'da yapılan ekspresyonunda pH 5.0 ve pH 6.0' da yapılan ekspresyona göre yüksek aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmayı, bu çalışmadan ayıran özellik, elde edilen enzimlere asit baz nötralizasyonu yapmadan ürünlerde enzim aktivitesi testi yapılmasıdır. Asidik ortamda fermantasyonu yapılan enzimler daha yüksek aktivite göstermelerine karşın yüksek pH'a sahip fermantasyon ortamında aktif olmasa da daha fazla kimozin üretilmiştir. Bu çalışmada ise elde edilen bütün fermantasyon ürünleri asit baz nötralizasyonuna tabi tuttulduğundan artan besiyeri pH'ına bağlı olarak enzim aktivite değerleri de artış göstermiştir.

4.3.3. Optimum substrat pH'ının belirlenmesi

Ekspresyon sonucu elde edilen enzimlerin aktivite gösterdiği substrat pH'ı da enzim aktivitesini etkileyen bir diğer parametre olarak bu çalışmanın konusu olmuştur. Bu amaç ile farklı pH aralıklarındaki sodyum sitrat tampon çözeltileri

kullanılarak 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 pH aralıklarında %26 süt tozu içeren substratlar hazırlanarak enzim aktivitesi testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda substrat pH'ındaki artış enzimin bağıl aktivitesini olumsuz olarak etkilemiştir (Şekil 4.29.). pH 4.0'de %100 aktivite gösteren enzimin aktivitesi pH 5.5'e yükseldiğinde %32'ye; pH 7.0'ye yükseldiğinde ise % 0'a düşmüştür. Wang ve ark. (2015), deve kimozininin aktivitesine substrat pH'ının etkisini araştırmış ve çalışmamıza benzer şekilde substrat pH'ının artması ile enzim aktivitesinin azaldığını; pH 6.5'te ise enzim aktivitesinin yaklaşık %10 civarına düştüğünü gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak Jiang ve ark. (2012), *P. pastoris* kullanarak yaptıkları buzağı kimozini ekspresyonu sonucu elde ettikleri enzimlerin aktiviteleri üzerine substrat pH'larının etkisini gözlemlemiş ve çalışmamıza uyumlu olarak substrat pH'ı 4.0 iken enzimin %100 aktivite gösterdiğini, pH 6.5 iken ise bu aktivitenin %10 civarına düştüğünü gözlemlemişlerdir.



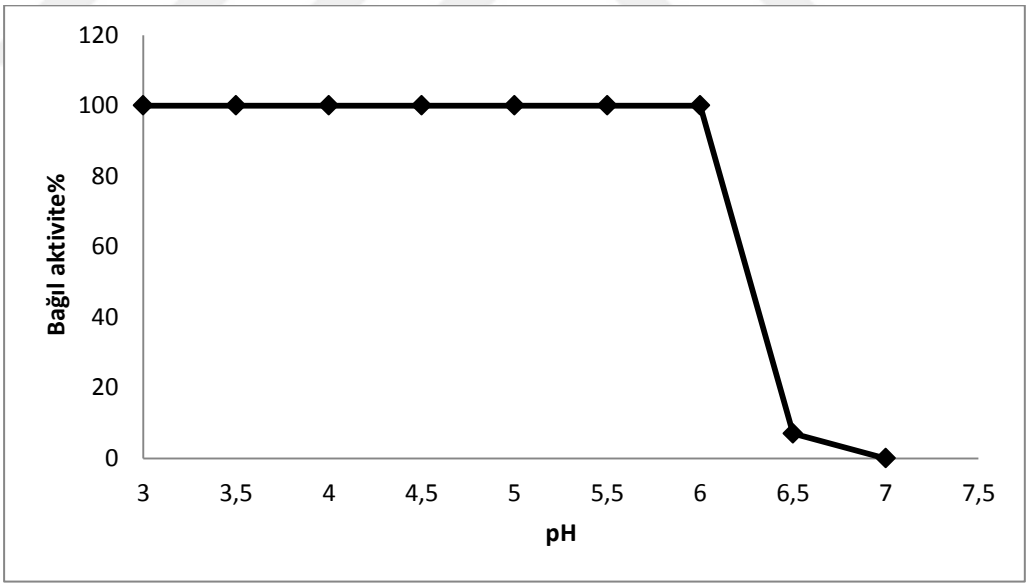
Şekil 4.29. Farklı substrat pH' larının rekombinant tavşan kimozin enzim aktivitesi üzerine etkisi. Çalışmada substrat pH'ları farklı pH değerlerindeki sodyum sitrat tampon çözeltileri kullanılarak 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 değerlerine ayarlanmıştır.

Adıgüzel (2016), çalışmasında *P. pastoris* mayasında rekombinant tibet öküzü kimozininin ekspresyonu ve karakterizasyonunu araştırmıştır. Bu kapsamda elde ettiği kimozin enziminin çalıştığı optimum substrat çalışmamıza benzer şekilde pH'ını 4.0 olarak belirlemiş ve enzimin pH 5.0'da %25, pH 6.0'da %14 ve pH 7'de %0 aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Mohanty ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada

saflaştırılmış bufalo kimozininin pH 5.5 değerinde % 100 aktivite gösterdiği fakat pH 7.0'dan sonra aktivite göstermediğini belirler iken; Tyagi ve ark. (2016) ve Vallejo ve ark. (2008, 2012) yaptıkları çalışmalarda keçi ve bufalo kimozinlerinin aktivite gösterdiği optimum pH'ı 5.5 olarak belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar ışığında rekombinant tavşan kimozininin optimum pH değerinin bufalo ve keçi kimozininden daha düşük oldup tibet öküzü ile benzerlik gösterdiği, artan substrat pH'ının ise tüm kimozin örneklerinde aktivite düşüşüne sebep olduğu belirlenmiştir.

4.3.4. Rekombinant tavşan kimozininin pH stabilitesi

Bu çalışmada ekspresyon sonucu elde edilen enzimlerin pH stabiltesi ölçülmüş yapılan analizler sonucu Şekil 4.30.'daki verilen grafik elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre üretilen rekombinant tavşan kimozin enzimi pH 3.0 - 6.0 değerleri arasında aktivite göstermiş, pH 6.0' dan sonra artan pH ile azalarak pH 7.0' da aktivitesini kaybetmiştir.



Şekil 4.30. Rekombinant tavşan kimozin pH'ının enzim stabilitesine etkisi. Çalışmada substrat pH'ları farklı pH değerlerindeki sodyum sitrat tampon çözeltileri kullanılarak 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 değerlerine ayarlanmıştır.

Foltman (1959) yaptığı çalışmada kimozin enziminin pH 2.0 ile 6.5 arasında kararlılık gösterdiğini bu kararlılığın 2.0'de düşük, 5.3-6.3 arasında maksimum

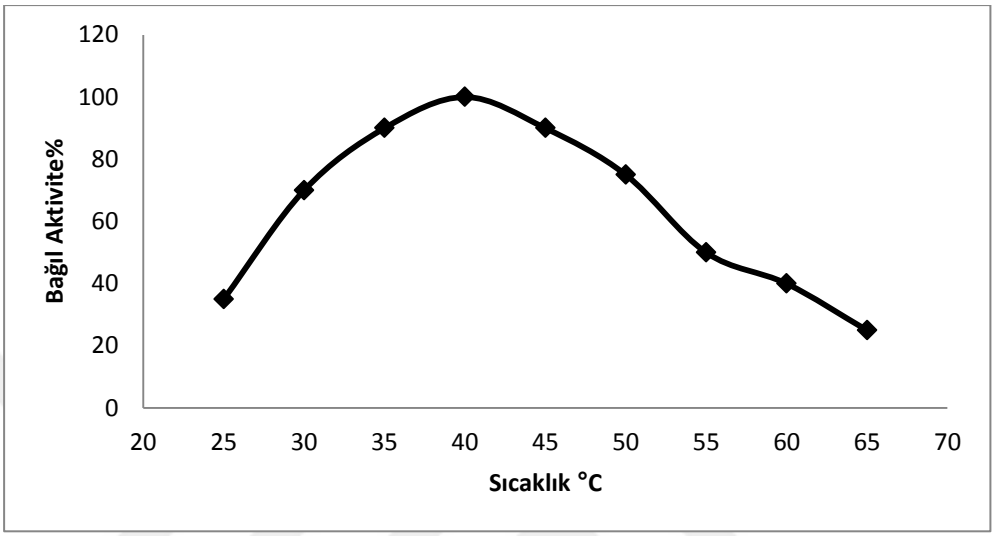
olduğunu, 6.5'ten sonra otokatalitik parçalanmadan dolayı stabilitesini kaybettiğini gözlemlemiştir. Shindo ve Arima (1979), kimozinin +4 °C'de 3 gün saklandıktan sonra, maksimum stabiliteye pH 3.0 ve 6.2'de sahip olduğunu gözlemlemiştir. Foltman (1970) ve Mezina ve ark. (2001) yaptıkları çalışmalarda sırası ile sığır ve rekombinant kuzu kimozini kullanmış; asidik pH'ta enzimin aktivite gösterdiğini fakat pH 7.0'da pıhtılaşmanın olmadığını gözlemlemişlerdir. Wang ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada ise rekombinant deve kimozininin pH 2.5 ile 6 arasında aktivite gösterdiğini 6.5'ten sonra ise keskin bir şekilde aktivitesinin azalarak 7.5'te tamamen sonlandığını gözlemlemişlerdir. Adıgüzel (2016) yaptığı çalışmada ise rekombinant tibet öküzü kimozin enziminin pH 4.0-8.0 arasında stabilitesini koruduğu fakat 9.0'da aktivitesinin %20'ye kadar düştüğünü tespit etmiştir. Enzimler protein yapıda oldukları için aşırı asidik veya alkali şartlarda protein yapılarının bozulduğu bilinmektedir. Kimozin enzimi asidik şartlarda aktifleşen bir enzim olduğu için asidik koşullar stabilitesini çok fazla etkilememekte fakat alkali koşullarda otokatalitik parçalanma sebebi ile stabilitesini kaybetmektedir. Yapılan çalışmalara paralel olarak, rekombinant tavşan kimozin enziminin asidik şartlar altında stabilitesini koruduğu, alkali şartlar altında ise aktivitesini kaybettiği saptanmıştır.

4.3.5. Optimum aktivite sıcaklığının belirlenmesi

Enzim aktivitesini etkileyen en önemli parametrelerden bir tanesi sıcaklıktır. Her enzimin kendisine özgü optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık aralığı mevcuttur. Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz rekombinant tavşan kimozininin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için enzim aktivitesi testi farklı sıcaklıklarda yapılmış ve Şekil 4.31.'de verilen grafik elde edilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi tavşan kimozin enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiş ve bu aktivitenin 40 °C'den sonra sıcaklıktaki artışa bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Çalışılan bu aralıkta minimum enzim aktivitesi 65 °C'de % 25 olarak gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda kimozin enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın genellikle 30-50 °C arasında olduğu gözlemlenmiştir (Kumar ve ark., 2010).

Berridge (1952), saflaştırılmış kimozin için optimum sıcaklığın 30-40°C arasında olduğunu gözlemlemişken, Shindo ve Arima (1979), Elegami (2000), Mohanty ve ark. (2003) ve Kumar ve ark. (2006) yaptıkları çalışmalarda sırası ile buzağı, deve, bufalo ve keçi kimozini için aynı aralığı optimum olarak belirlemişlerdir.

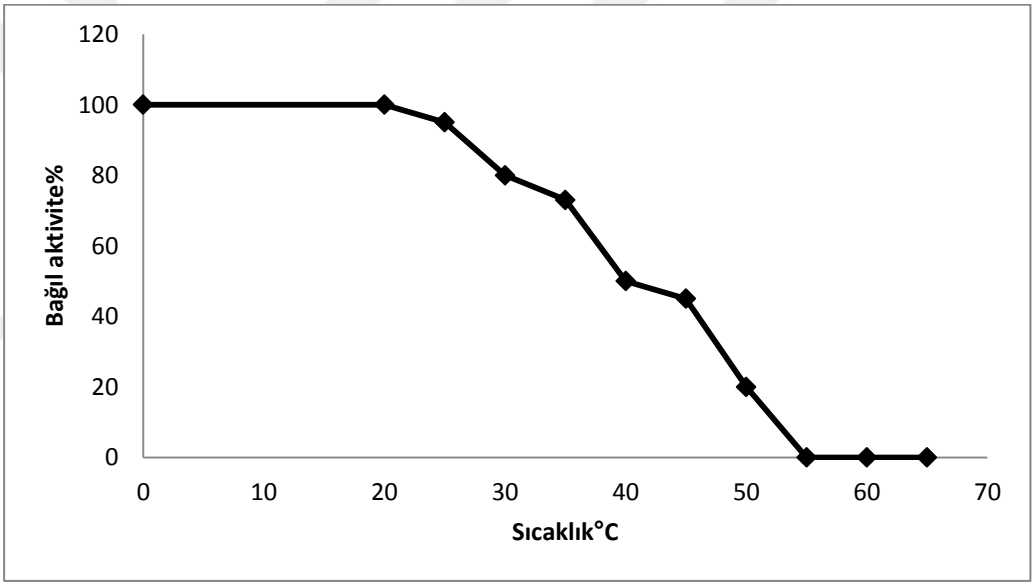


Şekil 4.31. Rekombinant tavşan kimozin enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

Tyagi ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak elde edilen rekombinant keçi kimozininin maksimum aktiviteyi 35-40 °C arasında gösterdiğini, 60 °C'de %42 aktiviteye sahip iken, sıcaklığın 65-70 °C'ye çıkması ile de aktivitesini tamamen kaybettiğini belirlemişlerdir. Kumar ve ark. (2006), benzer şekilde keçi kimozininin aktivitesinin 35 °C'de %85, 60 °C 'de ise %40 civarinda olduğunu gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışmalarda enzim aktiviteleri benzer bir trend gösterse de farklı sıcaklıklarda kimozin aktiviteleri değişkenlik göstermiştir. Tavşan kimozininin 40 °C'deki aktivitesi diğer kimozin kaynakları ile benzerlik göstermekte, 60 °C'deki aktivitesi ise keçiden düşük, deve ile benzer özellik göstermektedir (Wang ve ark., 2015; Tyagi ve ark., 2016, Kumar ve ark., 2006).

4.3.6. Isı stabilitesi

Bir enzimin ısı stabilitesi belirlenen bir sıcaklık değerinde aktivitesini ne oranda koruduğu ile ölçülmektedir. Bu değer enzim cinsine, enzimin maruz kaldığı sıcaklığa ve süreye bağlı olarak değişir. Bu çalışmada elde edilen rekombinant tavşan kimozin enziminin ısı stabilitesine ait grafik Şekil 4.32.'de verilmiştir. Enzimin 0 °C-20 °C arasında aktivitesinin maksimum olduğu, enzimin maruz kaldığı sıcaklığın artması ile stabilitede azalmanın meydana geldiği gözlemlenmiştir. Enzimin maruz bırakıldığı sıcaklığın 55 °C' ye varması ile aktivitesini yitirdiği, bu sıcaklık değerinden yüksek sıcaklıklarda da aktivite göstermediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.32. Sıcaklığın rekombinant tavşan kimozin enzim stabilitesine etkisi

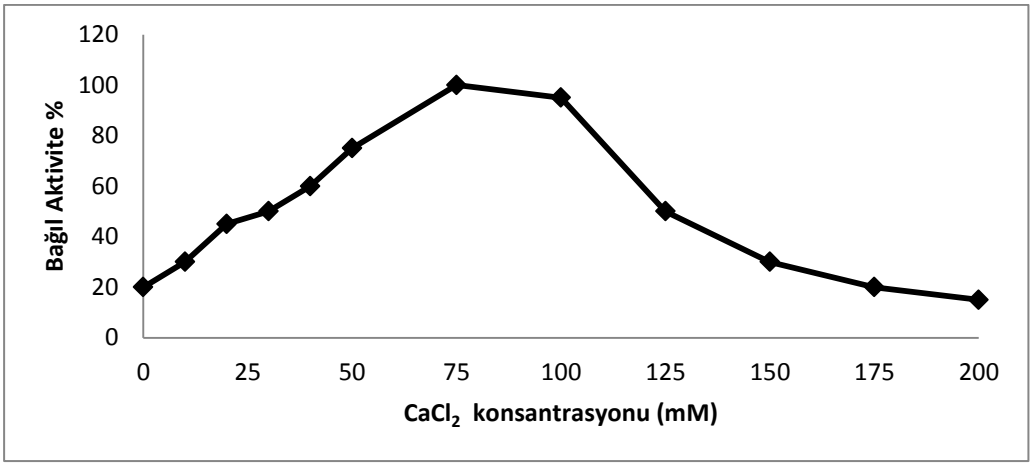
Shindo ve Arima (1979), 50 °C'nin altında buzağı kimozin enziminin aktivitesinin sabit olduğunu, Kawaguchi ve ark. (1986) ise 45-55 °C arasında enzim stabilitesinde ciddi bir düşüş meydana geldiğini belirlemişlerdir. Elegamy (2000), yapmış olduğu çalışmada deve kimozinini bufalo ve sığır kimozini ile karşılaştırdığında deve kimozininin daha yüksek ısı stabilitesine sahip olduğunu belirlemiştir. Kumar ve ark. (2006)'da yaptıkları çalışmada ise keçi kimozininin 50 °C'ye kadar stabilitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir. Jiang ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada ise rekombinant sığır kimozininin ısı stabilitesini araştırmış,

enzimin 60 °C'de stabilitesinde çok ciddi bir azalma, 65 °C'de ise aktivitesinin tamamen kaybolduğunu gözlemlemiştir. Wang ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada ise rekombinant deve kimozininin 8 saat boyunca farklı ısılara maruz kaldıktan sonra enzim stabilitesini ölçmüş ve 50 °C'den yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybettiğini gözlemlemiştir. Adıgüzel (2016) , yaptığı çalışmada ise rekombinant tibet öküzünün ısı stabilitesinin 60 °C'den sonra keskin bir şekilde azalarak 65 °C'de stabilitesini kaybettiğini belirlemiştir.

4.3.7. Enzim aktivitesine $CaCl_2$ konsantrasyonunun etkisi

Kalsiyum iyonlarının, kimozin enzim aktivitesi üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Sütün enzimatik yolla pıhtılaşması sürecinde kimozin enzimi κ-kazeini parçalayarak para-κ-kazein ve glikomakropeptitlere dönüştürür. Kalsiyum iyonları varlığında ise para-κ-kazein jelleşerek pıhtıyı oluşturur. Sütte halihazırda kalsiyum iyonları mevcuttur fakat süte uygulanan ısıl işlem, kazein ile serum proteinleri arasında bir kompleks oluşumuna ve süt serumundaki iyonik kalsiyum miktarında bir azalmaya neden olmaktadır. Buna ek olarak çözünmüş kalsiyumun bir miktarı çözünmez bileşiklere dönüşmektedir. Sütte meydana gelen bu olumsuzlukların peynir kalitesini etkilememesi amacı ile peynir yapılacak süte bir miktar laksiyum ilavesi yapılmaktadır. Böylelikle pıhtılaşma daha hızlı ve kolay gerçekleşmekte, daha kaliteli ve verimi yüksek pıhtı meydana gelmektedir (McMahon ve ark.,1984).

Bu çalışmada da farklı kalsiyum konsantrasyonlarında hazırlanan substratlar ile rekombinant tavşan kimozin enziminin aktivitesinde meydana gelen değişimler gözlenerek, enzimin maksimum aktivite gösterdiği kalsiyum konsantrasyonu belirlenmiştir (Şekil 4.33.).



Şekil 4.33. $CaCl_2$ konsantrasyonuna bağlı olarak rekombinant tavşan kimozin enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

Şekil 4.33.'de görüldüğü gibi artan kalsiyum konsantrasyonu bir süre enzim aktivitesini arttırmış daha sonra tekrar azaltmıştır. Maksimum enzim aktivitesi, 75 mM kalsiyum konsantrasyonuna sahip substrat ile yapılan enzim aktivitesi testinden elde edilmiştir. Kalsiyum elde edilmeden de aktivite görüldüğü fakat kalsiyum eklendiğinde bu aktivitenin 5 kata kadar arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda rekombinant deve kimozini için maksimum aktivite 40-50 mM $CaCl_2$ konsantrasyonunda (Wang ve ark., 2015), rekombinant sığır kimozini için ise 50mM $CaCl_2$ konsantrasyonunda (Jiang ve ark., 2012) gözlemlenmiştir. McMahon ve ark., (1984) yaptıkları çalışmada 40 mM $CaCl_2$ konsantrasyonunun enzim aktivitesindeki artışa bağlı olarak pıhtılaşma süresini kısalttığını, 40 mM'dan yüksek konsantrasyonlarda tekrar uzattığını gözlemlemiştir. Rekombinant tavşan kimozini yapılan çalışmalara benzer şekilde substrata eklenen kalsiyum miktarına bağlı olarak enzim aktivitesinde bir süre artış, optimum nokta elde edildikten sonra ise tekrar pıhtılaşma süresinde ve bağıl aktivitede düşüş göstermiştir. Diğer enzimler ile tek farkı maksimum aktivite gösterdiği kalsiyum mikarının diğerlerine göre daha fazla olmasıdır.

4.4. Rekombinant tavşan kimozin enziminin farklı sütler üzerindeki etkisi

Üretilen rekombinant tavşan kimozini farklı hayvansal kaynaklardan temin edilen sütler üzerinde denenerek aktivitesi belirlenmiştir. Enzim aktivitesi testi

materyal ve yöntem kısmında (3.2.26) belirtildiği gibi yapılarak hesaplamalar benzer şeklide yapılmıştır. Yapılan analizin tek farkı substrat olarak farklı hayvansal kaynaklardan (inek, keçi, koyun, eşek, deve) elde edilen sütlerin kullanılmasıdır. Analizlerde kullanılan sütlerin pH, kuru madde, kül içerikleri Çizelge 4.3.'de belirtildiği gibidir. Bu sütler kullanılarak yapılan enzim aktivitesi sonuçları da Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

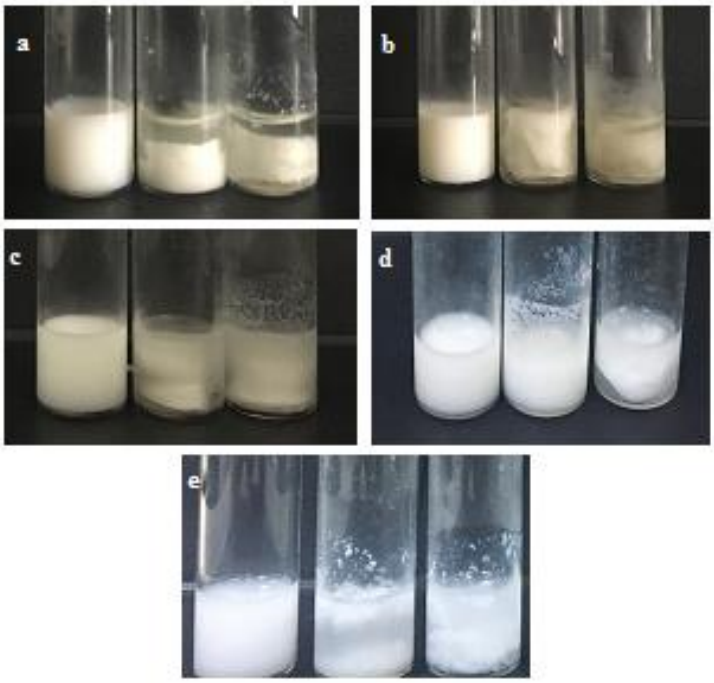
Çizelge 4.3. Farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütlerin kuru madde, kül, pH içerikleri

Parametreler	**Süt Kaynağı**				
	İnek	**Keçi**	**Koyun**	**Eşek**	**Deve**
Kurumadde (%)	10.5	13.1	18.3	10.3	13.2
Kül (%)	0.3	0.9	1.2	0.6	0.8
pH	6.7	6.2	5.7	7.1	6.7

Çizelge 4.4. Rekombinant tavşan kimozininin farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütler üzerindeki aktiviteleri

	Süt Kaynağı				
	İnek	**Keçi**	**Koyun**	**Eşek**	**Deve**
Enzim Aktivitesi (IMCU/mL)	10	5,7	3,07	40	2,66

Yapılan enzim aktivitesi testinde pozitif kontrol olarak buzağı kimozini, negatif kontrol olarak ta içerisinde tavşan pro-kimozin geni bulunmayan pPIC9K vektörü ile yapılan transformasyon sonucu elde edilen, asit baz nötralizasyonuna tabi tutulmuş hücre kültürleri kullanılmıştır. Yapılan enzim aktivitesi testi sonucu elde edilen pıhtı görüntüleri Şekil 4.34'de verildiği gibidir.



Şekil 4.34. Rekombinant tavşan kimozininin farklı sütler üzerindeki etkisi a) inek sütü b) koyun sütü c) keçi sütü d) deve sütü e) eşek sütü ile yapılmış enzim aktivitesi testleri. Analizlerde kullanılan her bir süt için tüplerde sırası ile negatif kontrol (içerisinde tavşan pro-kimozin geni bulunmayan pPIC9K vektörü ile yapılan transformasyon sonucu elde edilen, asit baz nötralizasyonuna tabi tutulmuş hücre kültürleri), rekombinant tavşan kimozini ve pozitif kontrol (ticari rekombinant buzağı kimozini) kullanılmıştır.

Yapılan analiz sonuçları ve pıhtı görüntüleri incelendiğinde rekombinant tavşan kimozininin inek, deve, koyun, keçi ve eşek sütlerinin tümünü pıhtılaştırdığı belirlenmiştir. Aktiviteleri karşılaştırılacak olur ise rekombinant tavşan kimozini en yüksek aktiviteyi eşek sütü üzerinde göstermekte, onu sırası ile inek, keçi, koyun ve deve sütleri takip etmektedir. Buna ek olarak süt tozunun substrat olarak kullanıldığı analizle ile kıyaslandığında enzimin süt üzerinde aktivitesinin yaklaşık 7 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında öncelikle tavşan rennetinin peynir yapımına uygun bir pıhtılaştırıcı ajan olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaç ile tavşan midesinden rennet ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen bu enzim, ticari deve ve ticari buzağı kimozin enzimleri ile beyaz peynir üretiminde kullanılmıştır. Elde edilen peynirlerin fiziksel, kimyasal, proteolitik ve duyusal bazı özellikleri karşılaştırılarak tavşan rennetinin peynir yapımına uygunluğu değerlendirilmiştir. Elde edilen peynirler karşılaştırıldığında buzağı kimozini ile yapılan peynirlerin veriminin daha fazla olduğu fakat bunun yapısındaki fazla su miktarından ileri geldiği, duyusal ve proteolitik özelliklerine bakıldığında ise peynirler arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen peynirlerin 60 günlük depolama sırasında alınan numunelerinde yapılan proteolitik aktiviteleri incelendiğinde tavşan renneti ile üretilen peynirlerin kısa süreli depolamalarda diğer peynirlerden daha üstün proteolitik özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir. Uzun süreli depolamada ise tavşan renenti ile üretilen peynirlerin duyusal ve proteolitik özelliklerinin deve kimozini ile üretilen peynirlere benzer, buzağı kimozini ile üretilen peynirlerden ise üstün özellikler gösterdikleri gözlemlenmiştir.

Buzağı kimozini peynir yapımında standart olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda deve kimozininin de ticarileşmesi ile bu alanda yapılan çalışmalar ivme kazanmıştır. Bu çalışmanın ön deneme kısmını oluşturan çalışmalar ise tavşan rennetinin bile rekombinant olarak üretilmiş deve kimozini ile yarıştığını ve buzağı kimozininden ise daha üstün özellikler gösterdiğini ıspatlamaktadır. Bu sebeple yapılan ön çalışmalar, çalışmamızın asıl amacı olan rekombinant tavşan kimozini üretiminin gerekliliğini destekler nitelikte bulunmuştur.

Çalışmamızın ikinci kısmındaki temel amacımız ise rekombinant tavşan kimozini üretimidir. Bu amaç ile önce biyoinformatik analizler yapılarak tavşan kimozin geninin tavşan genomundaki yeri, ekzon ve intron bölgeleri belirlenerek hedef gen kodon optimizasyonu yapıldıktan sonra pPIC9K vektörü içerisine

yerleştirilmiş olarak temin edilmiştir. Vektörün hedef geni taşıdığı yapılan birçok analizler sonucunda doğrulanmış ve sonrasında hedef geni taşıyan bu vektör *P. pastoris* mayasına elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Aktarımın sağlıklı bir şekilde yapılıp yapılmadığı da yapılan analizler ile doğrulandıktan sonra hedef geni içerisinde bulunduran konakçının uygun şartlar altında fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sonucu başarılı bir şekilde üretilen rekombinant tavşan kimozini asit baz nötralizasyonuna tabi tutulduktan sonra aktifleşmiş ve sütü pıhtılaştırıp pıhtılaştırmadığı gözlemlenerek enzim aktivitesi test edilmiştir.

Çalışmamızın üçüncü ve son aşamasında ise üretilmiş rekombinant tavşan kimozinin karakterizasyonu yapılarak optimum çalıştığı koşullar belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışmalar ışığında rekombinant tavşan kimozini başarılı bir şekilde üretilmiş ve üretilen bu enzimin aktivitesi 96 saatlik fermantasyon sonunda 1.4 IMCU/mL olarak belirlenmiştir. Yapılan fermantasyon için optimum besi ortamı pH'ı ise 6.0 olarak gözlemlenmiştir. Süt tozu kullanılarak hazırlanan substratlar enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 4.0, sıcaklık değeri ise 35°C olarak belirlenmiştir. Enzime farklı asit ve baz uygulamaları yapıldığında ise pH 3.0 ile 6.0 arasında stabilitesini koruduğu, 7.0'de ise tamamen kaybettiği gözlemlenmiştir. Farklı sıcaklıklara maruz bırakılan enzimde aktivite testi yapıldığında ise 55 °C'den sonra enzimlerin aktivitelerini kaybettiği gözlemlenmiştir.

Rekombinant tavşan kimozinin aktivitesi inek, deve, koyun, keçi, eşek gibi farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütler üzerinde denenmiş ve hepsinde aktivite göstermiştir. Ayrıca tavşan kimozin enziminin inek sütü üzerinde, standart olarak kullanılan süt tozundan 7 kat fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Buna ek olarak yapılan kazein hidroliz testinde α ve β kazeinleri parçalamayıp sadece κ-kazein üzerinde etki göstermesi de enzimin sağladığı bir başka avantaj olarak ortaya konmuştur. Böylelikle bu enzim kullanılarak proteolitik özellikleri daha üstün peynir üretimi mümkün olacaktır.

Bu çalışma ile tavşan kimozininin peynir yapımına uygunluğu ortaya koyularak rekombinant tavşan kimozin üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sallamalı inkübatör kullanılarak erlen içerisinde gerçekleştirilmiştir ve süpernatantlara herhangi bir saflaştırma protokolü uygulanmamıştır. İleriki çalışmalarda fermantasyon bioreaktör içerisinde tekrarlanıp elde edilen hücre kültürleri uygun bir saflaştırma işlemine tabi tutulduktan sonra kullanılır ise verimi ve aktivitesi çok daha yüksek bir enzim elde edilebileceği ve ülkemizin yurtdışına bağımlı olduğu gıda üretim bileşenlerinden bir tanesi olan rekombinant kimozinlere alternatif olabilecek potansiyeldeki tavşan kaynaklı kimozin genine bağlı olarak yerli rekombinant kimozin üretiminin endüstriyel boyuta taşınabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

ABDEL-KADER, Y. I., 2003. Changes in the nitrogen fractions of Domiati cheese made with microbial and recombinant rennets during ripening. Egyptian Journal of Dairy Science, 31(1): 111-124.

ADIGÜZEL, Ö., 2016. *Pichia pastoris* Mayasında Rekombinant Tibet Öküzü Kimozini Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Antalya, 68s.

ADDIS, M., PIREDDA, G., and Pirisi, A., 2008. The Use of Lamb Rennet Paste in Traditional Sheep Milk Cheese Production. Small Ruminant Research, 79(1): 2-10.

AKIN, N., 1996. Peynir Yapımında Kullanılan Süt Pıhtılaştırıcı Enzimler ve Bunların Bazı Özellikleri. Gıda/The Journal of Food, 21(6).

ALİHANOĞLU, S., EKTİREN, D., AKBULUT ÇAKIR, Ç., VARDİN, H., KARAASLAN, A., ve KARAASLAN, M., 2018. Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese. Food Science & Nutrition, 6(4): 1100-1108.

AMOURACHE, L. and VIJAYALAKSHMI M.A., 1984. Affinity Chromatography of Kid Chymosin on Histidyl-Sepharose. Journal of Chromatography A, 303: 285–290.

ANDREWS, A. T., 1983. Proteinases in Normal Bovine Milk and Their Action on Caseins. Journal of Dairy Research, 50(1): 45-55.

ATLI, M., 2017. *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) genomundan kimozin geninin izolasyonu ve karakterizasyonu, Harran üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Şanlıurfa, 108s

ATTALLAH, A., 2007. Characters of Chymosin Gene İsolated From Different Animal Sources at Molecular Level. Journal of Applied Sciences Research, 3: 904-907.

BANSAL, N., DRAKE, M. A., PIRAINO, P., BROE, M. L., HARBOE, M., FOX, P. F. and MCSWEENEY, P. L. H., 2009. Suitability of Recombinant Camel (*Camelus dromedarius*) Chymosin as a Coagulant for Cheddar Cheese. International Dairy Journal, 19(9): 510-517.

BARKHOLT, P.V., CHRISTENSEN, K.A., and FOLTMANN B., 1979. Investigations on the Activation of Bovine Prochymosin. European Journal of Biochemistry, 94: 573-580.

BAUDYŠ, M., ERDENE, T. G., KOSTKA, V., PAVLIK, M. and FOLTMANN, B., 1988. Comparison Between Prochymosin and Pepsinogen from Lamb and Calf. Comparative Biochemistry and Physiology Part B:Comparative Biochemistry, 89(2):385-391.

BAUMGARTNER, P., RAEMAEKERS, R.J.M., DURIEUX, A., GATEHOUSE, A., DAVIES, H. and TAYLOR, M., 2002. Large-Scale Production, Purification, and Characterisation of Recombinant *Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin* E–form Expressed in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris.* Protein Expression and Purification, 26: 394-405.

BERRIDGE, N. J., 1952. An İmproved Method of Observing the Clotting of Milk Containing Rennin. Journal of Dairy Research, 19(3): 328-329.

BINES V. E., YOUNG P. and LAW B.A., 1989. Comparison of Cheddar Cheese

Made with a Recombinant Calf Chymosin and with Standard Calf Rennet. Journal of Dairy Research, 56: 657–664.

BLAIR, G. S. and OOSTHUIZEN, J. C., 1961. A Viscometric Study of the Breakdown of Casein in Milk by Rennin and Rennet. Journal of Dairy Research, 28(2): 165-173.

BLAKESLEY, R. W. and BOEZI, J. A., 1977. A New Staining Technique for Proteins in Polyacrylamide Gels Using Coomassie Brilliant Blue G250. Analytical biochemistry, 82(2): 580-582.

BRIERLEY, R. A., DAVIS, G. R., and HOLTZ, G. C., 1994. Production of Insulin-Like Growth Factor-1 in Methylotrophic Yeast Cells. United States Patent 5,324,639

BROOME, M. C., XU, X. and MAYES, J. J., 2006. Proteolysis in Cheddar Cheese Made with Alternative Coagulants. Australian Journal of Dairy Technology, 61(2): 85.

BROWN, J.A., FOEGEDING, E.A., DAUBERT, C.R., DRAKE, M.A. and GOMPERTZ, M., 2003. Relationships Among Rheological and Sensorial Properties of Young Cheeses. Journal of Dairy Science, 86: 3054 – 3067.

BRULÉ, G. and LENOIR, J., 1986. The Coagulation of Milk. In Cheesemaking: Science and Technology (Ed. Eck, A.), Lavoisier Publishing Inc., New York, 13p.

BUNN, C. W., MOEWS, P. C., and BAUMBER, M. E., 1971. The Crystallography of Calf Rennin (Chymosin). Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 178(1052): 245-258.

CARDOZA RE, GUTIÉRREZ S, ORTEGA N, COLINA A, CASQUEIRO J. and MARTÍN, J.F., 2003. Expression of a Synthetic Copy of the Bovine Chymosin Gene in *Aspergillus awamori* from Constitutive and pH-Regulated Promoters and Secretion Using Two Different Pre-Pro Sequences. Biotechnology and Bioengineering, 83: 249–259.

CELİK, E., ve CALIK, P., 2012. Production of Recombinant Proteins by Yeast Cells. Biotechnol Advances, 30: 1108–1118.

CEREGHINO, G.P.L., CEREGHINO J.L., ILGEN, C. and CREGG, J.M., 2002. Production of Recombinant Proteins in Fermenter Cultures of the Yeast *Pichia pastoris*. Current Opinion in Biotechnology, 13: 329-332.

CHEESEMAN, G. C., 1965. Denaturation of Rennin: Effect on Activity and Molecular Configuration. Nature, 205: 1011-1012.

CIOFALO, V., BARTON, N., KREPS, J., COATS, I. and SHANAHAN, D., 2006. Safety Evaluation of a Lipase Enzyme Preparation, Expressed in *Pichia pastoris*, Inteded for Use in the Degumming of Edible Vegetable Oil. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 45: 1-8.

CLARE, J. J., RAYMENT, F. B., BALLANTINE, S. P., SREEKRISHNA, K., and ROMANOS, M. A., 1991. High-level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of the Gene. Nature Biotechnology, 9: 455-460.

COS, O., SERRANO, A., MONTESINOS, J. L., FERRER, P., CREGG, J. M., and VALERO, F., 2005. Combined Effect of the Methanol Utilization (Mut) Phenotype and Gene Dosage on Recombinant Protein Production in *Pichia pastoris* Fed-Batch Cultures. Journal of Biotechnology, 116(4): 321-335.

CREGG, J.M., CEREGHINO, J.L., SHI, J. and HIGGINS, D.R., 2000. Recombinant

Protein Expression in *Pichia pastoris*, Molecular Biotechnology, 16: 23-52.
CREGG, J.M. and MADDEN, K.R., 1988. Development of the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris* as a Host System for the Production of Foreign Proteins. Developments in Industrial Microbiology, 29: 33-41.
CREGG, J.M., VEDVICK, T.S. and RASCHKE, W.C., 1993. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*, Nature Biotechnology, 11: 905-910.
CULLEN, D., GRAY, G.L., WILSON L.J., HAYENGA,K.J., LAMSA, M.H., REY, M.W., NORTON, S. and BERKA, R.M., 1987. Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in *Aspergillus nidulans*, Nature Biotechnology, 5: 369-376.
ÇAKMAKÇI, S., CANTÜRK, A. ve ÇAKIR, Y., 2017. Peynir Üretimi İçin Sütü Pıhtılaştıran Enzimlere Genel Bir Bakış ve Güncel Gelişmeler. Akademik Gıda, 15(4), 396-408.
DAI X., CHEN Q., LIAN M., ZHOU Y., ZHOU M., LU S., CHEN Y., LUO J., GU X., JIANG Y., LUO M. and ZHENG X., 2005. Systematic High-Yield Production of Human Secreted Proteins in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 332: 593–601.
DANLEY, D.E., and GEOGHEAN, K. F., 1988. Structure and Mechanism of Formation of Chymosin C Derived from Recombinant Chymosin A. The Journal of Biological Chemistry, 263: 9785-9789.
DELAHUNTY, C. A., and DRAKE, M. A., 2004. Sensory Character of Cheese and Its Evaluation. Cheese: Chemistry, physics and microbiology, 1(3):455–487.
DERVİŞOĞLU, M., ve AYDEMİR, O., 2007. Peynir Yapımında Kullanılan Pıhtılaştırıcı Enzimler ve Kazein Fraksiyonları Üzerine Etkileri. Gıda Dergisi, 32(5).
DOBLER-LÓPEZ, J., ESPINOSA-AYALA, E., HERNÁNDEZ-GARCIA P.A., LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.X., and MÁRQUEZ-MOLİNA O., 2016 Mılk Coagulant Extract from Stomach of Rabbıt (*Oryctolagus cuniculu*s sp.) Agrociencia, 50: 583-593.
DRAKE, M.A., KEZIAH, M.D., GERARD, P.D., DELAHUNTY, C.M., SHEEHAN, C., TURNBULL, R.P., and DODDS, T.M., 2005. Comparison of Differences Between Lexicons for Descriptive Analysis of Cheddar Cheese Flavor in Ireland, New Zealand, and the United States. International Dairy Journal, 15: 473–483.
DRAKE, M.A., MCINGVALE, S.C., CADWALLADER, K.R., and CIVILLE, G.V. 2001. Development of a Descriptive Sensory Language for Cheddar Cheese. Journal of Food Science, 66: 1422–1427.
ELAGAMY, E. I., 2000. Effect of Heat Treatment on Camel Milk Proteins with Respect to Antimicrobial Factors: a Comparison with Cows' and Buffalo Milk Proteins. Food Chemistry, 68(2): 227-232.
EMTAGE, J.S., ANGAL S., DOEL M.T., HARRİS T.J., JENKINS B., LILLEY G. and LOWE, P.A., 1983. Synthesis of Calf Prochymosin (Prorennin) in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 80: 3671-3675.
ERDEM, Y. K., 1997. The Affect of Calcium Chloride Concentration and pH on the Clotting Time During the Renneting of Milk. Gida, 22: 449-455.
FLAMM, E.L., 1991. How FDA Approved Chymosin: A Case History. Nature

Biotechnology, 9: 349–351.
FOLTMANN, B., 1964. Studies on Rennin. VII. On the Amino Acid Composition of Prorennin, Rennin and of Peptides Liberated During the Activation of Prorennin. Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, 34: 275–280.
FOLTMANN, B., 1970. Prochymosin and Chymosin (Prorennin and Rennin). Methods in Enzymology, 19: 421–436.
FOLTMANN, B., 1992., Chymosin: a Short Review on Foetal and Neonatal Gastric Proteases. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 52: 65–79
FOLTMANN, B., 1959. Studies on Rennin II. On the Crystallisation, Stability and Proteolytic Activity of Rennin. Acta Chemica Scandinavica, 13: 1927-1935.
FOLTMANN, B., 1966. A Review on Prorennin and Rennin. Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, 35: 143–231.
FOLTMANN, B., PEDERSEN, V. B., JACOBSEN, H., KAUFFMAN, D. and WYBRANDT, G., 1977. The Complete Amino Acid Sequence of Prochymosin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(6): 2321-2324.
FOX, P. F., 1963. Potentiometric Determination of Salt in Cheese. Journal of Dairy Science 46: 744–745.
FOX, P. F., COGAN T. M. and GUINEE T. P., 2004. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology Vol-1 General Aspects. Elsevıer Academic Press, Ireland, 617p
FOX, P.F., McSWEENEY P., COGAN T.M. and GUINEE T.P., 2000. Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers Inc., USA, 587 p.
FOX, P. F., and McSWEENEY, P. L. H., 1996. Proteolysis in Cheese During Ripening. Food Reviews International, 12(4): 457-509.
FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. and SINGH, T. K., 1995. Methods for Assessing Proteolysis in Cheese During Maturation. In Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese Springer, Boston, MA, 161-194p
FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H., 1997. Rennets: Their Role in Milk Coagulation and Cheese Ripening. In: Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Springer US, 1-49p.
FOX, P. F., 1987. Cheese: An overview. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (Ed: P.F. Fox). Volume I. Elsevier Applied Science, London and New York, 1-32.
FOX, P. F., 1988. Rennets and Their Action in Cheese Manufacture and Ripening. Biotechnology and Applied Biochemistry, 10: 522–35.
FOX, P. F., 1993. Exogenous Enzymes ın Dairy Technology. A Revıew 1. Journal of Food Biochemistry, 17(3): 173-199.
GILLILAND, G. L, WINBORNE, E. L, NACHMAN, J. and WLODAWER, A., 1990. The Tree Dimensional Structure of Recombinat Bovine Chymosin at 2,3 °A Resolution. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 8(1): 82-101.
GOFF, C. G., MOIR, D. T., KOHNO, T., GRAVIUS, T. C., SMITH, R. A., YAMASAKI, E., ve TAUNTON-RIGBY, A., 1984. Expression of Calf Prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 27(1), 35-46.
GOVINDASAMY-LUCEY, S., JAEGGI, J. J., JOHNSON, M. E., WANG, T. and LUCEY, J. A., 2005. Use of Cold Ultrafiltered Retentates for Standardization

of Milks for Pizza Cheese: Impact on Yield and Functionality. International Dairy Journal, 15(6-9): 941-955.

GREEN, M. L., 1985. Cheddar Cheesemaking with Recombinant Calf Chymosin Synthesized in *Escherichia coli*. Journal of Dairy Research, 52(2): 281-286.

GUINEE, T. P. and WILKINSON, M. G., 1992. Rennet Coagulation and Coagulants in cheese manufacture. International Journal of Dairy Technology, 45(4): 94-104.

GUNASEKARAN, S. and AK, M.M., 2003. Cheese Rheology and Texture, CRC Press, Florida, USA, 437p.

HARKKI, A., UUSITAIO, J., BAILEY, M., PENTTILA, M. and KNOWLES, J.K.C., 1989. A Novel Fungal Expression System: Secretion of Active Calf Chymosin from the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*, Nature Biotechnology, 7: 596-603.

HARRIS, T. J., LOWE, P. A., LYONS, A., THOMAS, P. G., EATON, M. A., MILLICAN, T. A., PATEL, T. P., BOSE, C.C., CAREY, N. H. ve DOEL M. T., 1982. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of cDNA Coding for Calf Preprochymosin. Nucleic Acids Research, 10: 2177–2187.

HASSAN, A., JOHNSON, M. E. and LUCEY, J. A., 2004. Changes in the Proportions of Soluble and Insoluble Calcium During the Ripening of Cheddar Cheese. Journal of Dairy Science, 87(4): 854-862.

HAYALOĞLU, A. A., ve ÖZER, B., 2011. Peynir Biliminin Temelleri. İzmir, 643s.

HIDAKA, M., SASAKI, K., UOZUMI, T. and BEPPU, T., 1986. Cloning and Structural Analysis of the Calf Prochymosin Gene. Gene 43: 197–203.

HILL, R. D., 1968. The nature of the Rennin Sensitive Bond in Casein and Its Possible Relation to Sensitive Bonds in Other Proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 33(4): 659-663.

HOUEN, G., MADSEN, M.T., HARLOW, K.W., LØNBLAD, P. and FOLTMANN, B., 1996. The Primary Structure and Enzymic Properties of Porcine Prochymosin and Chymosin. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 28(6): 667-675.

HUNT, I., 2005. From Gene to Protein: A Review of New and Enabling Technologies for Multi-Parallel Protein Expression. Protein Expression Purification, 40: 1–22.

IDF, 1993. Milk Determination of Nitrogen Content. IDF: 20B, International Dairy Federation: 41, Brussels, 12p.

IDF, 1982 Cheese and Processed Cheese. Determination of the Total Solids Content. Reference Method 4A. Brussels: International Dairy Federation.

IIRS, 1955 Irish Standard 69. Determination of the Percentage of Fat in Cheese. Dublin: Institute for Industrial Research and Standards.

JACOB, M., JAROS, D., and ROHM, H. 2011. Recent Advances in Milk Clotting Enzymes. International Journal of Dairy Technology, 64(1): 14-33.

JIANG, X. P., YIN, M. L., CHEN, P., and YANG, Q., 2012. Constitutive Expression, Purification and Characterization of Bovine Prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(5): 2087-2093.

JORDAN, M. J., HELLIN, P., CASTILLO, M., LAENCINA, J., and LOPEZ, M. B., 1999. Characterization and Comparative Study of Animal Rennets from Different Ruminants Applied to Goat Milk. Milchwissenschaft, 54: 144-146.

KANDARAKIS, I., MOSCHOPOULOU, E., and ANIFANTAKIS, E., 1999. Use of Fermentation Produced Chymosin from *E. coli* in the Manufacture of Feta Cheese.

KAPPELER, S. R., VAN DEN BRINK, H. J., RAHBEK-NIELSEN, M., FARAH, Z., PUHAN, Z., HANSEN, E., JOHANSEN, E., 2006. Characterization of Recombinant Camel Chymosin Reveals Superior Properties for the Coagulation of Bovine and Camel Milk. Biochemical and Biophysical Research Communications, 342: 647−654.

KARAPINAR, M., ve ÜNLÜTÜRK, A., 1982. Peynir Yapımında Mikrobiyal Rennet Kullanımı. Gıda Dergisi, 7(2).

KAWAGUCHI, Y., YANAGIDA, N., UOZUMI, T., and BEPPU, T., 1986. Improved Direct Expression of Prochymosin cDNA Through Changing the SD-ATG Codon Length. Agricultural and Biological Chemistry, 50(2):499-500.

KEILOVA, H., KOSTKA, V., and KAY, J., 1977. The First Step in the Activation of Chicken Pepsinogen is Similar to that of Prochymosin. Biochemical Journal, 167(3): 855-858.

KILIÇ, G. B., KULEASAN, H., ERALP, I., ve KARAHAN, A. G., 2009. Manufacture of Turkish Beyaz Cheese Added with Probiotic Strains. LWT – Food Science and Technology, 42, 1003–1008.

KLEINERT, T. H., LANGE, I., RÖSICKE, B., HONIG, A., and SCHLEUSENER, R., 1988. Characterization and Preparation of Chymosin from Calf Rennet Samples by Means of İsoelectric Focusing. Engineering in Life Sciences, 8(4), 367-375.

KLESSEN, C., SCHMIDT, K. H., GUMPERT, J., GROSSE, H. H. and MALKE, H., 1989. Complete Secretion of Activable Bovine Prochymosin by Genetically Engineered L Forms of *Proteus mirabilis*. Applied and Environmental Microbiology, 55: 1009–1015.

KOÇAK, C. ve DEVRİM, H. 1994. Isıl İşlemin İnek ve Keçi Sütlerinin Pıhtılaşma Yeteneği Üzerine Etkisi. Gıda Dergisi, 19(2).

KUMAR, A., SHARMA, J., GROVER, S., MOHANTY, A. K. and BATISH, V. K., 2007. Molecular Cloning and Expression of Goat (*Capra hircus*) Prochymosin in *E. coli*. Food Biotechnology, 21: 57–69.

KUMAR, A., GROVER, S., SHARMA, J. and BATISH, V., 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. Critical Reviews in Biotechnology, 30(4): 243-258.

KUMAR, A., SHARMA, J., MOHANTY, A. K., GROVER, S. and BATISH, V. K., 2006. Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Goat (*Capra hircus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 145(1): 108-113.

KURT, A., ÇAKMAKÇI, S. ve ÇAĞLAR A., 2007. Süt ve Mamülleri Muayene Analiz Metotları Rehberi. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 257, Erzurum, 398s.

LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. nature, 227(5259), 680.

LAMBERT, J. C., 1988. Village milk processing. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 104p

LANGHOLM, J. J., MØLGAARD, A., NAVARRO P., JENS, C., HARBOE, M. K.,

SIMONSEN, J. B., LORENTZEN, A. M., ...and LARSEN, S., 2013. Camel and Bovine Chymosin: The Relationship Between Their Structures and Cheese-Making Properties. Acta Crystallographica Section D:Biological Crystallography, 69(5): 901-913.

LIN-CEREGHINO, G. P., GODFREY, L., BERNARD, J., JOHNSON, S., KHUONGSATHIENE, S., TOLSTORUKOV, I., ... and CREGG, J. M., 2006. Mxr1p, a Key Regulator of the Methanol Utilization Pathway and Peroxisomal Genes in *Pichia pastoris*. Molecular and Cellular biology, 26(3): 883-897.

LOW, Y.H., AGBOOLA, S., ZHAO, J. and LIM, M.Y., 2006. Clotting and Proteolytic Properties of Plant Coagulants in Regular and Ultrafiltered Bovine Skim Milk. International Dairy Journal, 16(4): 335–343.

LUO, F., JIANG, W. H., YANG, Y. X., LI, J., and JIANG, M. F., 2016. Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in *Pichia pastoris*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 29(9): 1363.

MACANLEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B. and HARVEY, L.M., 2005. Heterologous Protein Protuction Using the *Pichia pastoris* Expression System, Yeast, 22: 249-270.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., and SAMBROOK, J., 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Vol. 545). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

MARTIN, P., RAYMOND, M. N., BRICAS, E. and DUMAS, B. R., 1980. Kinetic Studies on the Action of *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* Acid Proteases and Chymosins A and B on a Synthetic Chromophoric Hexapeptide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 612(2): 410-420.

MARTIN, P., TRIEU-CUOT, P., COLLIN, J.C. AND RIBADEAU D. B., 1982. Purification and Characterization of Bovine Gastricsin. European Journal of Biochemistry, 122: 31–39.

MCSWEENEY, P. L., POCHET, S., FOX, P. F., and HEALY, A., 1994. Partial İdentification of Peptides from the Water-Insoluble Fraction of Cheddar Cheese. Journal of Dairy Research, 61(4), 587-590.

MELLOR, J., DOBSON, M.J., ROBERTS, N.A., TUITE, M.F., EMTAGE, J.S., WHITE, S., LOWE, P.A., PATEL, T., KINGSMAN, A.J. and KINGSMAN, S.M., 1983. Efficient Synthesis of Enzymatically Active Calf Chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 24: 1-14.

MENZELLA, H.G., 2011. Comparison of Two Codon Optimization Strategies to Enhance Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, 10(1): 1475-2859.

MERGULHÃO, F.J., SUMMERS, D.K. and MONTEIRO, G.A., 2005. Recombinant Protein Secretion in *Escherichia coli*. Biotechnology Advances, 23: 177–202.

MEZINA, M. N., LAVRENOVA, G. I., PROKOF'EV, M. I., STAROVOITOVA, V. V., ERMOLAEV, V. I., CHERNYH, V. Y., ... and DEMIDOVICH, S. S., 2001. Isolation of Milk-Clotting Enzyme from Transgenic Sheep Milk and Its Comparison with Calf Chymosin. Biochemistry (Moscow), 66(4):378-383.

MOHANTY, A. K., MUKHOPADHYAY, U. K., GROVER, S., BATISH, V. K., 1999. Bovine Chymosin: Production by rDNA Technology and Application in Cheese Manufacture. Biotechnology Advances, 17(2): 205-217.

MOHANTY, A. K., MUKHOPADHYAY, U. K., KAUSHIK, J. K., GROVER, S., and BATISH, V. K., 2003. Isolation, Purification and Characterization of

Chymosin from Riverine Buffalo (*Bubalus bubalis*). Journal of Dairy Research, 70(01): 37-43.

MOONEY, J. S., FOX, P. F., HEALY, A. and LEAVER, J. 1998. Identification of the Principal Water-Insoluble Peptides in Cheddar Cheese. International Dairy Journal, *8*(9): 813-818.

MOORE, S. and STEIN, W.H., 1948. Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids. The Journal of Biological Chemistry, 176: 367–388.

MOSCHOPOULOU, E.E., KANDARAKIS, I.G., ALICHANIDIS, E. and ANIFANTAKIS, E.M., 2006. Purification and Characterization of Chymosin and Pepsin from Kid. Journal of Dairy Research, 73: 49–57.

NEWMAN, M., SAFRO, M., FRAZAO, C., KHAN, G., ZDANOV, A., TICKLE, I. J., ... and ANDREEVA, S., 1991. X-ray Analyses of Aspartic Proteinases IV: Structure and Refinement at 2.2 Åresolution of Bovine Chymosin. Journal of Molecular Biology, 221(4): 1295-1309.

NISHIMORI, K., KAWAGUCHI, Y., HIDAKA, M., UOZUMI, T. and BEPPU, T., 1982. Expression of Cloned Calf Prochymosin Gene Sequence in *Escherichia coli*. Gene 19: 337–344.

NISHIMORI, K., SHIMIZU, N., KAWAGUCHI Y, HIDAKA, M., UOZUMI, T. and BEPPU, T., 1984. Expression of Cloned Calf Prochymosin cDNA Under Control of The Tryptophan Promoter. Gene 29: 41–49.

NOSEDA, D. G., RECÚPERO, M. N., BLASCO, M., ORTIZ, G. E., and GALVAGNO, M. A., 2013. Cloning, Expression and Optimized Production in a Bioreactor of Bovine Chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* Under AOX1 Promoter. Protein Expression and Purification, 92(2): 235-244.

NURLIYANI, N., INDRATININGSIH, I. and MUFTI TRI, M., 2013. Qualıty of Rennet from Rabbıt Stomach Durıng Cold and Frozen Storage. 3rd International Seminar and 9th Biennial Meeting of AINI 24-25 September 2013, Padang, p.304-310

OLEMPSKA-BEER, Z.S., MERKER, R.I., DITTO, M.D. and DINOVI, M. J., 2006. Food Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 45(2): 144-158.

O'MAHONY, J. A., SOUSA, M. J., and MCSWEENEY, P. L. H., 2003. Proteolysis in Miniature Cheddar- Type Cheeses Made Using Blends of Chymosin and *Cynara cardunculus* Proteinases as Coagulant. International Journal of Dairy Technology, 56, 52–58.

PARENTE, D., DE FERRA, F., GALLI, G. and GRANDI G. 1991. Prochymosin Expression in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Letters, 61: 243–249.

PENG, L., ZHONG, X., OU, J., ZHENG, Z., LIAO, J., WANG, L. and XU, A., 2004. High-level Secretory Production of Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain by *Pichia pastoris*, Journal of Biotechnology, 108: 185-192.

PROKOPEK, D., MEISEL, H., KRUSCH, U., TEUBER, M., and SCHLIMME, E., 1990. Production of Edam and Tilsit Cheese with Recombinant Chymosin. Kieler milchwirtschaftliche Forschungsberichte, 42(4): 597-606.

P UNGERCAR, J., STRUKELJ, B., GUBENSEK, F., TURK, V. and KREGAR, I., 1990. Complete Primary Structure of Lamb Preprochymosin Deduced from cDNA. Nucleic Acids Research, 18: 4602.

PUNGERČAR, J., ŠTRUKELJ, B., GUBENŠEK, F., TURK, V., and KREGAR, I.

1991. Amino Acid Sequence of Lamb Preprochymosin and Its Comparison to other Chymosins. In Structure and Function of the Aspartic Proteinases, Springer, Boston, p. 127-131.

RICHTER, S., NIEVELER, J., SCHULZE, H., BACHMANN, T.T. and SCHMID, R.D., 2006. High Yield Production of a Mutant Nippostrongylus Brasiliensis Acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* and İts Purification, Biotechnology and Bioengineering, 93, 1017-1022.

RIGHETTI, P.G., MOLINARI, B. M. and MOLINARI, G. 1977. Isoelectric Focusing of Milk-Clotting Enzymes. Journal of Dairy Research, 44: 69–72.

RODRIGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHET, M., MONTESINOS, R., CREMATA, J., FALCON, V., SANCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVES, C. and VALDES, M., 1994. High Level Expression of the B.Microplus Bm86 Antigen in the Yeast *Pichia pastoris* Forming Highly İmmunogenic Particles for Cattle, Journal of Biotechnology, 33: 135-146.

ROGELJ, I., PERKO, B., FRANCKY, A., PENCA, V., and PUNGERČAR, J., 2001. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production. Journal of Dairy Science, 84(5): 1020-1026.

ROMANOS, M. A., CLARE, J. J., BEESLEY, K. M., RAYMENT, F. B., BALLANTINE, S. P., MAKOFF, A. J., DOUGAN, G., FAİRWEATHER, N. F., and CHARLES, I. G., 1991 Recombinant Bordetella Pertussis Pertactin p69 from the Yeast *Pichia pastoris* High Level Production and Immunological Properties. Vaccine, 9: 901-906.

ROMEIH, E. A., MICHAELIDOU, A., BILIADERIS, C. G., and ZERFIRIDIS, G. K. 2002. Low-fat White-Brined Cheese Made from Bovine Milk and Two Commercial Fat Mimetics: Chemical, Physical and Sensory Attributes. International Dairy Journal, 12(6): 525-540.

ROSEIRO, L. B., BARBOSA, M., AMES, J. M., and WILBEY, R. A., 2003. Cheesemaking with Vegetable Coagulants—the Use of Cynara L. for the Production of Ovine Milk Cheeses. International Journal of Dairy Technology, 56(2): 76-85.

SALDAMLI, İ., ve KAYTANLI, M., 1998. Utilisation of Fromase, Maxiren and Rennilase as Alternative Coagulating Enzymes to Rennet in Turkish White Cheese Production. Milchwissenschaft, 53(1): 22-25.

SAMAL, P. K., PEARCE, K. N., BENNETT, R. J. and DUNLOP, F. P., 1993. Influence of Residual Rennet and Proteolysis on the Exudation of Whey from Feta Cheese During Storage. International Dairy Journal, *3*(8): 729-745.

SARDINAS, J. L., 1969. New sources of rennet. Process Biochemistry.

SARDINAS, J. L., 1972. Microbial rennets. In Advances in Applied Microbiology, Academic Press. 15: 39-73.

SCHWANDER, H., ZAHLER, P. and NITCHMANN, H., 1952. Analytische Unter Suchungen an Kristallisiertem Lab. Helvetica Chimica Acta, 35: 553.

SCORER, C. A., BUCKHOLZ, R. G., CLARE, J. J., and ROMANOS, M. A., 1993. The Intracellular Production and Secretion of HIV-1 Envelope Protein in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. Gene, 136:111-119

SCORER, C. A., CLARE, J. J., MCCOMBİE, W. R., ROMANOS, M. A., and SREEKRİSHNA, K., 1994. Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. Nature Biotechnology, 12: 181-184

SCOTT, R., 1986. Cheesemaking Practice. Second edition. Elsevier Applied Science Publishers, London and Newyork, 529p

SCOTT, R., ROBINSON, R. K. and WILBEY, R. A., 1998. Cheesemaking Practice. Springer Science & Business Media, New York, 449p

SHEEHAN, J. J., O'SULLIVAN, K., and GUINEE, T. P., 2004. Effect of Coagulant Type and Storage Temperature on the Functionality of Reduced-Fat Mozzarella Cheese. Le Lait, 84(6): 551-566.

SHINDO, K., ve ARIMA, S., 1979. Studies on the Immobilized Chymosin Part Ⅱ: Preparation and Properties of Immobilized Chymosin by DEAE-Sephadex A-25, Amberlite IR-45, Controlled Pore Glass (CPG-10) and Polyacrylamide Gel. Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University 59(3): 284-293.

SMITH, R. A., ve GILL, T., 1985. Yeast Mutants that have Improved Secretion Efficiency for Calf Prochymosin. Journal of Cellular Biochemistry, 9: 157.

SØRENSEN, H. P. And MORTENSEN, K. K., 2005. Advanced Genetic Strategies for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 115: 113–128.

SOUSA, M. J., ARDÖ, Y., and MCSWEENEY, P. L. H., 2001. Advances in the Study of Proteolysis During Cheese Ripening. International Dairy Journal, 11(4-7): 327-345.

STANLEY, G. 1998. Cheeses. In Microbiology of fermented foods. Springer, Boston, 263-307p.

STERNBERG, M., 1976. Microbial Rennets. In Advances in Applied Microbiology Academic Press, 20: 135-157).

SZECSI, P. B., and HARBOE, M., 2013. Handbook of Proteolytic Enzymes Academic Press (3rd Edition), London, 4104p.

THILL, G. P., DAVIS, G. R., STILLMAN, C., HOLTZ, G., BRIERLEY, R., ENGEL, M., BUCKHOLZ, R., KINNEY, J., PROVOW, S., VEDVICK, T., and SIEGEL, R. S., 1990. Positive and Negative Effects of Multi-Copy İntegrated Expression Vectors on Protein Expression in *Pichia pastoris*. In Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Microorganisms, Paris, 2: 477-490.

TIYAGI, A., KUMAR, A., KUMAR, Y. A., SAKLANI A. C., and GROVER, S., BATISH V. K., 2016. Functional Expreesion of Goat Chymosin in *Pichia pastoris* Bioreactor Cultures: A Commercially Viable Alternate. LWT – Food Science and Technology, 42: 1003–1008.

TSUCHIYA, K., GOMI, K., KITAMOTO, K., KUMAGAI, C. and TAMURA, G., 1993. Secretion of Calf Chymosin from the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 40: 327–332.

ÜÇÜNCÜ M., 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi-Cilt 1. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 543s,

ÜÇÜNCÜ, M., 2015. Süt ve Mamulleri Teknolojisi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, İzmir, 192s

VALLEJO, J.A., AGEITOS, J.M., POZA, M. and VILLA, T. G., 2008. Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 10606–10610.

VAN DEN BERG, J. A., VAN DER LAKEN, K. J., VAN OOYEN, A. J., RENNIERS, T. C., RIETVELD, K., SCHAAP, A., ...and RICHMAN, M.

1990. *Kluyveromyces* as a Host for Heterologous Gene Expression: Expression and Secretion of Prochymosin. Nature Biotechnology, 8(2): 135.

VEDVICK, T., BUCKHOLZ, R. G., ENGEL, M., URCAN, M., KINNEY, J., PROVOW, S., SIEGEL, R. S., and THILL, G. P. 1991. High-level Secretion of Biologically Active Aprotonin from the Yeast *Pichia pastoris*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 7:197-201.

VEGA-HERNÁNDEZ, M. C., GÓMEZ-COELLO, A., VILLAR, J., and CLAVERIE-MARTÍN, F., 2004. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. Journal of Biotechnology, 114(1): 69-79.

WALSTRA, P., GEURTS, T. J., WALSTRA, P. and WOUTERS, J. T., 2005. Dairy Science and Technology. CRC press, Florida, 808p.

WANG, N., WANG, K. Y., LI, G., GUO, W., and LIU, D., 2015. Expression and Characterization of Camel Chymosin in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 111: 75-81.

WANGOH, J., FARAH, Z. and PUHAN, Z., 1993. Extraction of Camel Rennet and its Comparison with Calf Rennet Extract. Milchwissenschaft, 48, 322-322.

ZHANG, L., JIANG, Y., ZHANG, J. and YANG, Z., 2009. Recombinant Expression of Bovine Chymosin in *Pichia pastoris*. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 25: 1160–1165.

ZHANG, Y., ZHOU, W., LIU N. and YANG K., 1991. Expression of Calf Prochymosin Gene in *Escherichia coli*. Chinese Journal of Biotechnology, 7: 169–175.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Selin ALİHANOĞLU
Uyruğu	**:**	T.C
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	ELAZIĞ 31/08/1986
Telefon	**:**	04143183000-3661
Fax	**:**	
e-mail	**:**	selinengin@harran.edu.tr

EĞİTİM

Derece	**Adı, İl, İlçe**	**Bitirme Yılı**
Lise	Elazığ Anadolu Lisesi, Elazığ	2004
Üniversite	Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep	2010
Yüksek Lisans	Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep	2012
Doktora	Harran Üniversitesi, Şanlıurfa	-

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2014-…	Harran Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2013-2014	Keban alabalık A.Ş	İhracaat Sorumlusu
2012-2013	Tetra Pak	Gıda Yüksek Mühendisi
2011-2012	Pınar Bulgur San. Tic A.Ş	Arge Mühendisi
2010-2011	Akanlar Çikolata İçecek Gıda San.	Gıda Mühendisi

UZMANLIK ALANI

Gıda Biyoteknolojisi, Moleküler Biyoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

- ALİHANOĞLU, S., EKTİREN, D., AKBULUT ÇAKIR, Ç., VARDİN, H., KARAASLAN, A., and KARAASLAN, M. 2018. Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) Rennet on the Texture, Rheology, and Sensory Properties of White Cheese. Food Science & Nutrition (Doktora tezinden yapılmıştır).

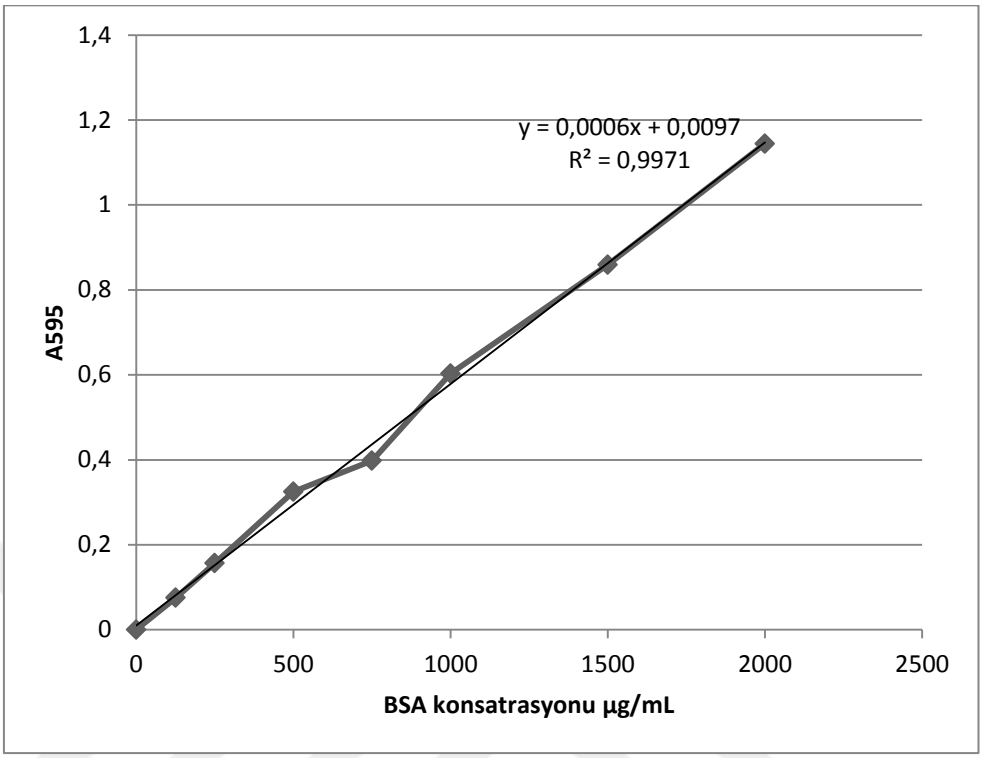
- ALİHANOĞLU, S., ATLI M, VARDİN, H., ve KARAASLAN, M. 2018. *Oryctolagus cuniculus* Kimozin Enzimini *Pichia pastoris* Mayasında İfade Edecek Vektörün Dizayn ve Jenerasyonu. Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi, 3(2), 26-34 (Doktora tezinden yapılmıştır).
- AKBABA, M. A., KARAASLAN, A., ALİHANOĞLU, S., VARDİN, H., ve KARAASLAN, M. 2018. Farklı pH ve Sıcaklık Değerlerinin *Pichia pastoris'* de Rekombinant Ekspanzin Üretimi Üzerine Etkisi.
- ALİHANOĞLU, S., KARAASLAN, M., and VARDİN, H. 2017. Novel Nutritive Garlic Product "Black Garlic": A Critical Review of Its Composition, Production and Bioactivity. Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi, 2(3), 57-63.

EKLER

EK 1 Beyaz peynir duyusal analiz formu

Panelistin Adı ve Soyadı:		Tarih: / /		
PEYNİR ÖZELLİKLERİ	**PUAN**	**PEYNİR ÖRNEKLERİ**		
DIŞ GÖRÜNÜŞ	Puan	**DEVE**	**İNEK**	**TAVŞAN**
Temiz, parlak ve sert, beyaz renkte	**5**			
Sertçe veya yumuşakça, donuk görünüşlü, açık sarı veya krem renkte	**4**			
Fazla sert veya fazla yumuşak, donuk görünüşlü, sarı renkte	**3**			
Aşırı sert veya aşırı yumuşak, çatlak küflü görünümde	**1-2**			
İÇ GÖRÜNÜŞ				
Parlak, homojen görünüşte, porselen beyazı renkte	**5**			
Hafif donuk, homojen olmayan görünüm, beyazımsı ya da açık sarı renkte	**4**			
Donuk, homojen olmayan görünüm, çatlak ve gözenekli, koyu sarı ya da beyaz renkte	**3**			
Donuk, homojen olmayan görünümde, homojen olmayan beyaz ya da koyu sarı renkte	**1-2**			
YAPI				
Düzgün kesitli, pürüzsüz ve homojen, fazla sert ya da yumuşak olmayan, ufalanmayan yapı	**5**			
Düzgün kesiti, hafif çatlak veya az delikli, sertçe veya yumuşakça	**4**			
Homojen olmayan yapı, çatlak ve delikli, sert veya yumuşak yapı	**3**			
Homojen olmayan, çok çatlak ve gözenekli, kaba bir yapı, çok sert veya çok yumuşak, aşırı elastiki yapı	**1-2**			
KOKU				
Kendine has hoş kokuda	**5**			
Normal koku veya çok hafif yavan ya da ekşi koku	**4**			
Hafif ekşimsi, sabunumsu veya küfümsü kokuda	**3**			
Aşırı ekşi, küfümsü ya da sabunumsu	**1-2**			
TAT				
Kendine has hoş tatta	**5**			
Çok hafif yabancı tatta olan, hafif tuzlu	**4**			
Yavan ya da hafif yabancı tatta, ekşi veya acı, tuzlu	**3**			
Aşırı yavanlık, tuzluluk, ekşilik, acılık veya sabunumsu olan, kapsüller ağıza geliyor ve tadı olumsuz etkiliyor	**1-2**			

EK 2. Bradford Denemesi BSA Protein Standardı



EK 3 İstatistik Analiz Sonuçları

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	zaman	(I) enzim	(J) enzim	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[a]	95% Confidence Interval for Difference[a]	
							Lower Bound	Upper Bound
DIS_G	1	1	2	,750*	,327	,024	,102	1,398
			3	,125	,327	,703	-,523	,773
		2	1	-,750*	,327	,024	-1,398	-,102
			3	-,625	,327	,059	-1,273	,023
		3	1	-,125	,327	,703	-,773	,523
			2	,625	,327	,059	-,023	1,273
	2	1	2	,125	,327	,703	-,523	,773
			3	,125	,327	,703	-,523	,773
		2	1	-,125	,327	,703	-,773	,523
			3	9,992E-16	,327	1,000	-,648	,648
		3	1	-,125	,327	,703	-,773	,523
			2	-9,992E-16	,327	1,000	-,648	,648
	3	1	2	,750*	,327	,024	,102	1,398
			3	1,052E-15	,327	1,000	-,648	,648
		2	1	-,750*	,327	,024	-1,398	-,102
			3	-,750*	,327	,024	-1,398	-,102
		3	1	-1,052E-15	,327	1,000	-,648	,648
			2	,750*	,327	,024	,102	1,398
	4	1	2	,250	,327	,446	-,398	,898
			3	9,354E-16	,327	1,000	-,648	,648
		2	1	-,250	,327	,446	-,898	,398
			3	-,250	,327	,446	-,898	,398
		3	1	-9,354E-16	,327	1,000	-,648	,648
			2	,250	,327	,446	-,398	,898
	5	1	2	-,200	,327	,542	-,848	,448
			3	7,463E-15	,327	1,000	-,648	,648
		2	1	,200	,327	,542	-,448	,848
			3	,200	,327	,542	-,448	,848
		3	1	-7,463E-15	,327	1,000	-,648	,648
			2	-,200	,327	,542	-,848	,448
IC_G	1	1	2	,375	,271	,170	-,163	,913
			3	,125	,271	,646	-,413	,663
		2	1	-,375	,271	,170	-,913	,163
			3	-,250	,271	,359	-,788	,288
		3	1	-,125	,271	,646	-,663	,413
			2	,250	,271	,359	-,288	,788
	2	1	2	,125	,271	,646	-,413	,663
			3	,375	,271	,170	-,163	,913
		2	1	-,125	,271	,646	-,663	,413

			3	,250	,271	,359	-,288	,788	
		3	1	-,375	,271	,170	-,913	,163	
			2	-,250	,271	,359	-,788	,288	
	3	1	2	,375	,271	,170	-,163	,913	
			3	9,992E-16	,271	1,000	-,538	,538	
		2	1	-,375	,271	,170	-,913	,163	
			3	-,375	,271	,170	-,913	,163	
		3	1	-9,992E-16	,271	1,000	-,538	,538	
			2	,375	,271	,170	-,163	,913	
	4	1	2	,625*	,271	,023	,087		1,163
			3	,250	,271	,359	-,288	,788	
		2	1	-,625*	,271	,023	-1,163		-,087
			3	-,375	,271	,170	-,913	,163	
		3	1	-,250	,271	,359	-,788	,288	
			2	,375	,271	,170	-,163	,913	
	5	1	2	,400	,271	,143	-,138	,938	
			3	,200	,271	,462	-,338	,738	
		2	1	-,400	,271	,143	-,938	,138	
			3	-,200	,271	,462	-,738	,338	
		3	1	-,200	,271	,462	-,738	,338	
			2	,200	,271	,462	-,338	,738	
YAPI	1	1	2	,750*	,312	,018	,132		1,368
			3	,375	,312	,232	-,243	,993	
		2	1	-,750*	,312	,018	-1,368		-,132
			3	-,375	,312	,232	-,993	,243	
		3	1	-,375	,312	,232	-,993	,243	
			2	,375	,312	,232	-,243	,993	
	2	1	2	,500	,312	,112	-,118		1,118
			3	1,000*	,312	,002	,382		1,618
		2	1	-,500	,312	,112	-1,118	,118	
			3	,500	,312	,112	-,118		1,118
		3	1	-1,000*	,312	,002	-1,618		-,382
			2	-,500	,312	,112	-1,118	,118	
	3	1	2	,875*	,312	,006	,257		1,493
			3	,250	,312	,425	-,368	,868	
		2	1	-,875*	,312	,006	-1,493		-,257
			3	-,625*	,312	,048	-1,243		-,007
		3	1	-,250	,312	,425	-,868	,368	
			2	,625*	,312	,048	,007		1,243
	4	1	2	,750*	,312	,018	,132		1,368
			3	,750*	,312	,018	,132		1,368
		2	1	-,750*	,312	,018	-1,368		-,132
			3	9,714E-16	,312	1,000	-,618	,618	
		3	1	-,750*	,312	,018	-1,368		-,132
			2	-9,714E-16	,312	1,000	-,618	,618	
	5	1	2	,600	,312	,057	-,018		1,218

			3	,800*	,312	,012	,182		1,418
		2	1	-,600	,312	,057	-1,218	,018	
			3	,200	,312	,523	-,418	,818	
		3	1	-,800*	,312	,012	-1,418		-,182
			2	-,200	,312	,523	-,818	,418	
KOKU	1	1	2	,125	,183	,496	-,238	,488	
			3	9,992E-16	,183	1,000	-,363	,363	
		2	1	-,125	,183	,496	-,488	,238	
			3	-,125	,183	,496	-,488	,238	
		3	1	-9,992E-16	,183	1,000	-,363	,363	
			2	,125	,183	,496	-,238	,488	
	2	1	2	-1,110E-16	,183	1,000	-,363	,363	
			3	9,992E-16	,183	1,000	-,363	,363	
		2	1	1,110E-16	,183	1,000	-,363	,363	
			3	1,110E-15	,183	1,000	-,363	,363	
		3	1	-9,992E-16	,183	1,000	-,363	,363	
			2	-1,110E-15	,183	1,000	-,363	,363	
	3	1	2	,125	,183	,496	-,238	,488	
			3	8,327E-16	,183	1,000	-,363	,363	
		2	1	-,125	,183	,496	-,488	,238	
			3	-,125	,183	,496	-,488	,238	
		3	1	-8,327E-16	,183	1,000	-,363	,363	
			2	,125	,183	,496	-,238	,488	
	4	1	2	,250	,183	,175	-,113	,613	
			3	-,250	,183	,175	-,613	,113	
		2	1	-,250	,183	,175	-,613	,113	
			3	-,500*	,183	,007	-,863		-,137
		3	1	,250	,183	,175	-,113	,613	
			2	,500*	,183	,007	,137	,863	
	5	1	2	,200	,183	,277	-,163	,563	
			3	-,400*	,183	,031	-,763		-,037
		2	1	-,200	,183	,277	-,563	,163	
			3	-,600*	,183	,001	-,963		-,237
		3	1	,400*	,183	,031	,037	,763	
			2	,600*	,183	,001	,237	,963	
TAT	1	1	2	,250	,313	,427	-,371	,871	
			3	8,882E-16	,313	1,000	-,621	,621	
		2	1	-,250	,313	,427	-,871	,371	
			3	-,250	,313	,427	-,871	,371	
		3	1	-8,882E-16	,313	1,000	-,621	,621	
			2	,250	,313	,427	-,371	,871	
	2	1	2	,156	,313	,619	-,465	,777	
			3	-,031	,313	,921	-,652	,590	
		2	1	-,156	,313	,619	-,777	,465	
			3	-,187	,313	,551	-,809	,434	
		3	1	,031	,313	,921	-,590	,652	

			2	,187	,313	,551	-,434	,809	
	3	1	2	,125	,313	,691	-,496	,746	
			3	-,375	,313	,234	-,996	,246	
		2	1	-,125	,313	,691	-,746	,496	
			3	-,500	,313	,114	-1,121	,121	
		3	1	,375	,313	,234	-,246	,996	
			2	,500	,313	,114	-,121		1,121
	4	1	2	,375	,313	,234	-,246	,996	
			3	7,216E-16	,313	1,000	-,621	,621	
		2	1	-,375	,313	,234	-,996	,246	
			3	-,375	,313	,234	-,996	,246	
		3	1	-7,216E-16	,313	1,000	-,621	,621	
			2	,375	,313	,234	-,246	,996	
	5	1	2	,800*	,313	,012	,179		1,421
			3	-,400	,313	,205	-1,021	,221	
		2	1	-,800*	,313	,012	-1,421		-,179
			3	-1,200*	,313	,000	-1,821		-,579
		3	1	,400	,313	,205	-,221		1,021
			2	1,200*	,313	,000	,579		1,821

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	enzim	(I) zaman	(J) zaman	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[a]	95% Confidence Interval for Difference[a]	
							Lower Bound	Upper Bound
DIS_G	1	1	2	,250	,327	,446	-,398	,898
			3	,500	,327	,129	-,148	1,148
			4	,750*	,327	,024	,102	1,398
			5	1,000*	,327	,003	,352	1,648
		2	1	-,250	,327	,446	-,898	,398
			3	,250	,327	,446	-,398	,898
			4	,500	,327	,129	-,148	1,148
			5	,750*	,327	,024	,102	1,398
		3	1	-,500	,327	,129	-1,148	,148
			2	-,250	,327	,446	-,898	,398
			4	,250	,327	,446	-,398	,898
			5	,500	,327	,129	-,148	1,148
		4	1	-,750*	,327	,024	-1,398	-,102
			2	-,500	,327	,129	-1,148	,148
			3	-,250	,327	,446	-,898	,398
			5	,250	,327	,446	-,398	,898
		5	1	-1,000*	,327	,003	-1,648	-,352
			2	-,750*	,327	,024	-1,398	-,102
			3	-,500	,327	,129	-1,148	,148
			4	-,250	,327	,446	-,898	,398
	2	1	2	-,375	,327	,254	-1,023	,273
			3	,500	,327	,129	-,148	1,148
			4	,250	,327	,446	-,398	,898
			5	,050	,327	,879	-,598	,698
		2	1	,375	,327	,254	-,273	1,023
			3	,875*	,327	,009	,227	1,523
			4	,625	,327	,059	-,023	1,273
			5	,425	,327	,197	-,223	1,073
		3	1	-,500	,327	,129	-1,148	,148
			2	-,875*	,327	,009	-1,523	-,227
			4	-,250	,327	,446	-,898	,398
			5	-,450	,327	,172	-1,098	,198
		4	1	-,250	,327	,446	-,898	,398
			2	-,625	,327	,059	-1,273	,023
			3	,250	,327	,446	-,398	,898
			5	-,200	,327	,542	-,848	,448
		5	1	-,050	,327	,879	-,698	,598
			2	-,425	,327	,197	-1,073	,223
			3	,450	,327	,172	-,198	1,098

			4	,200	,327	,542	-,448	,848	
	3	1	2	,250	,327	,446	-,398	,898	
			3	,375	,327	,254	-,273		1,023
			4	,625	,327	,059	-,023		1,273
			5	,875*	,327	,009	,227		1,523
		2	1	-,250	,327	,446	-,898	,398	
			3	,125	,327	,703	-,523	,773	
			4	,375	,327	,254	-,273		1,023
			5	,625	,327	,059	-,023		1,273
		3	1	-,375	,327	,254	-1,023	,273	
			2	-,125	,327	,703	-,773	,523	
			4	,250	,327	,446	-,398	,898	
			5	,500	,327	,129	-,148		1,148
		4	1	-,625	,327	,059	-1,273	,023	
			2	-,375	,327	,254	-1,023	,273	
			3	-,250	,327	,446	-,898	,398	
			5	,250	,327	,446	-,398	,898	
		5	1	-,875*	,327	,009	-1,523		-,227
			2	-,625	,327	,059	-1,273	,023	
			3	-,500	,327	,129	-1,148	,148	
			4	-,250	,327	,446	-,898	,398	
IC_G	1	1	2	1,665E-16	,271	1,000	-,538	,538	
			3	5,551E-17	,271	1,000	-,538	,538	
			4	,125	,271	,646	-,413	,663	
			5	,475	,271	,083	-,063		1,013
		2	1	-1,665E-16	,271	1,000	-,538	,538	
			3	-1,110E-16	,271	1,000	-,538	,538	
			4	,125	,271	,646	-,413	,663	
			5	,475	,271	,083	-,063		1,013
		3	1	-5,551E-17	,271	1,000	-,538	,538	
			2	1,110E-16	,271	1,000	-,538	,538	
			4	,125	,271	,646	-,413	,663	
			5	,475	,271	,083	-,063		1,013
		4	1	-,125	,271	,646	-,663	,413	
			2	-,125	,271	,646	-,663	,413	
			3	-,125	,271	,646	-,663	,413	
			5	,350	,271	,200	-,188	,888	
		5	1	-,475	,271	,083	-1,013	,063	
			2	-,475	,271	,083	-1,013	,063	
			3	-,475	,271	,083	-1,013	,063	
			4	-,350	,271	,200	-,888	,188	
	2	1	2	-,250	,271	,359	-,788	,288	
			3	9,021E-17	,271	1,000	-,538	,538	
			4	,375	,271	,170	-,163	,913	
			5	,500	,271	,068	-,038		1,038

		2	1	,250	,271	,359	-,288	,788	
			3	,250	,271	,359	-,288	,788	
			4	,625*	,271	,023	,087		1,163
			5	,750*	,271	,007	,212		1,288
		3	1	-9,021E-17	,271	1,000	-,538	,538	
			2	-,250	,271	,359	-,788	,288	
			4	,375	,271	,170	-,163	,913	
			5	,500	,271	,068	-,038		1,038
		4	1	-,375	,271	,170	-,913	,163	
			2	-,625*	,271	,023	-1,163		-,087
			3	-,375	,271	,170	-,913	,163	
			5	,125	,271	,646	-,413	,663	
		5	1	-,500	,271	,068	-1,038	,038	
			2	-,750*	,271	,007	-1,288		-,212
			3	-,500	,271	,068	-1,038	,038	
			4	-,125	,271	,646	-,663	,413	
	3	1	2	,250	,271	,359	-,288	,788	
			3	-,125	,271	,646	-,663	,413	
			4	,250	,271	,359	-,288	,788	
			5	,550*	,271	,045	,012		1,088
		2	1	-,250	,271	,359	-,788	,288	
			3	-,375	,271	,170	-,913	,163	
			4	5,551E-17	,271	1,000	-,538	,538	
			5	,300	,271	,271	-,238	,838	
		3	1	,125	,271	,646	-,413	,663	
			2	,375	,271	,170	-,163	,913	
			4	,375	,271	,170	-,163	,913	
			5	,675*	,271	,014	,137		1,213
		4	1	-,250	,271	,359	-,788	,288	
			2	-5,551E-17	,271	1,000	-,538	,538	
			3	-,375	,271	,170	-,913	,163	
			5	,300	,271	,271	-,238	,838	
		5	1	-,550*	,271	,045	-1,088		-,012
			2	-,300	,271	,271	-,838	,238	
			3	-,675*	,271	,014	-1,213		-,137
			4	-,300	,271	,271	-,838	,238	
YAPI	1	1	2	-,250	,312	,425	-,868	,368	
			3	-,125	,312	,689	-,743	,493	
			4	-,375	,312	,232	-,993	,243	
			5	-,175	,312	,576	-,793	,443	
		2	1	,250	,312	,425	-,368	,868	
			3	,125	,312	,689	-,493	,743	
			4	-,125	,312	,689	-,743	,493	
			5	,075	,312	,810	-,543	,693	
		3	1	,125	,312	,689	-,493	,743	
			2	-,125	,312	,689	-,743	,493	

		4	-,250	,312	,425	-,868	,368	
		5	-,050	,312	,873	-,668	,568	
	4	1	,375	,312	,232	-,243	,993	
		2	,125	,312	,689	-,493	,743	
		3	,250	,312	,425	-,368	,868	
		5	,200	,312	,523	-,418	,818	
	5	1	,175	,312	,576	-,443	,793	
		2	-,075	,312	,810	-,693	,543	
		3	,050	,312	,873	-,568	,668	
		4	-,200	,312	,523	-,818	,418	
2	1	2	-,500	,312	,112	-1,118	,118	
		3	-1,388E-16	,312	1,000	-,618	,618	
		4	-,375	,312	,232	-,993	,243	
		5	-,325	,312	,300	-,943	,293	
	2	1	,500	,312	,112	-,118	1,118	
		3	,500	,312	,112	-,118	1,118	
		4	,125	,312	,689	-,493	,743	
		5	,175	,312	,576	-,443	,793	
	3	1	1,388E-16	,312	1,000	-,618	,618	
		2	-,500	,312	,112	-1,118	,118	
		4	-,375	,312	,232	-,993	,243	
		5	-,325	,312	,300	-,943	,293	
	4	1	,375	,312	,232	-,243	,993	
		2	-,125	,312	,689	-,743	,493	
		3	,375	,312	,232	-,243	,993	
		5	,050	,312	,873	-,568	,668	
	5	1	,325	,312	,300	-,293	,943	
		2	-,175	,312	,576	-,793	,443	
		3	,325	,312	,300	-,293	,943	
		4	-,050	,312	,873	-,668	,568	
3	1	2	,375	,312	,232	-,243	,993	
		3	-,250	,312	,425	-,868	,368	
		4	8,327E-17	,312	1,000	-,618	,618	
		5	,250	,312	,425	-,368	,868	
	2	1	-,375	,312	,232	-,993	,243	
		3	-,625*	,312	,048	-1,243	-,007	
		4	-,375	,312	,232	-,993	,243	
		5	-,125	,312	,689	-,743	,493	
	3	1	,250	,312	,425	-,368	,868	
		2	,625*	,312	,048	,007	1,243	
		4	,250	,312	,425	-,368	,868	
		5	,500	,312	,112	-,118	1,118	
	4	1	-8,327E-17	,312	1,000	-,618	,618	
		2	,375	,312	,232	-,243	,993	
		3	-,250	,312	,425	-,868	,368	
		5	,250	,312	,425	-,368	,868	

		5	1	-,250	,312	,425	-,868	,368	
			2	,125	,312	,689	-,493	,743	
			3	-,500	,312	,112	-1,118	,118	
			4	-,250	,312	,425	-,868	,368	
KOKU	1	1	2	2,776E-17	,183	1,000	-,363	,363	
			3	,250	,183	,175	-,113	,613	
			4	,250	,183	,175	-,113	,613	
			5	,600*	,183	,001	,237	,963	
		2	1	-2,776E-17	,183	1,000	-,363	,363	
			3	,250	,183	,175	-,113	,613	
			4	,250	,183	,175	-,113	,613	
			5	,600*	,183	,001	,237	,963	
		3	1	-,250	,183	,175	-,613	,113	
			2	-,250	,183	,175	-,613	,113	
			4	-4,163E-17	,183	1,000	-,363	,363	
			5	,350	,183	,058	-,013	,713	
		4	1	-,250	,183	,175	-,613	,113	
			2	-,250	,183	,175	-,613	,113	
			3	4,163E-17	,183	1,000	-,363	,363	
			5	,350	,183	,058	-,013	,713	
		5	1	-,600*	,183	,001	-,963	-,237	
			2	-,600*	,183	,001	-,963	-,237	
			3	-,350	,183	,058	-,713	,013	
			4	-,350	,183	,058	-,713	,013	
	2	1	2	-,125	,183	,496	-,488	,238	
			3	,250	,183	,175	-,113	,613	
			4	,375*	,183	,043	,012	,738	
			5	,675*	,183	,000	,312	1,038	
		2	1	,125	,183	,496	-,238	,488	
			3	,375*	,183	,043	,012	,738	
			4	,500*	,183	,007	,137	,863	
			5	,800*	,183	,000	,437	1,163	
		3	1	-,250	,183	,175	-,613	,113	
			2	-,375*	,183	,043	-,738	-,012	
			4	,125	,183	,496	-,238	,488	
			5	,425*	,183	,022	,062	,788	
		4	1	-,375*	,183	,043	-,738	-,012	
			2	-,500*	,183	,007	-,863	-,137	
			3	-,125	,183	,496	-,488	,238	
			5	,300	,183	,104	-,063	,663	
		5	1	-,675*	,183	,000	-1,038	-,312	
			2	-,800*	,183	,000	-1,163	-,437	
			3	-,425*	,183	,022	-,788	-,062	
			4	-,300	,183	,104	-,663	,063	
	3	1	2	2,776E-17	,183	1,000	-,363	,363	
			3	,250	,183	,175	-,113	,613	

			4	-5,551E-17	,183	1,000	-,363	,363			
			5	,200	,183	,277	-,163	,563			
		2	1	-2,776E-17	,183	1,000	-,363	,363			
			3	,250	,183	,175	-,113	,613			
			4	-8,327E-17	,183	1,000	-,363	,363			
			5	,200	,183	,277	-,163	,563			
		3	1	-,250	,183	,175	-,613	,113			
			2	-,250	,183	,175	-,613	,113			
			4	-,250	,183	,175	-,613	,113			
			5	-,050	,183	,785	-,413	,313			
		4	1	5,551E-17	,183	1,000	-,363	,363			
			2	8,327E-17	,183	1,000	-,363	,363			
			3	,250	,183	,175	-,113	,613			
			5	,200	,183	,277	-,163	,563			
		5	1	-,200	,183	,277	-,563	,163			
			2	-,200	,183	,277	-,563	,163			
			3	,050	,183	,785	-,313	,413			
			4	-,200	,183	,277	-,563	,163			
TAT	1	1	2	,156	,313	,619	-,465	,777			
			3	,750*	,313	,018	,129	1,371			
			4	,375	,313	,234	-,246	,996			
			5	,675*	,313	,033	,054	1,296			
		2	1	-,156	,313	,619	-,777	,465			
			3	,594	,313	,061	-,027	1,215			
			4	,219	,313	,487	-,402	,840			
			5	,519	,313	,101	-,102	1,140			
		3	1	-,750*	,313	,018	-1,371	-,129			
			2	-,594	,313	,061	-1,215	,027			
			4	-,375	,313	,234	-,996	,246			
			5	-,075	,313	,811	-,696	,546			
		4	1	-,375	,313	,234	-,996	,246			
			2	-,219	,313	,487	-,840	,402			
			3	,375	,313	,234	-,246	,996			
			5	,300	,313	,340	-,321	,921			
		5	1	-,675*	,313	,033	-1,296	-,054			
			2	-,519	,313	,101	-1,140	,102			
			3	,075	,313	,811	-,546	,696			
			4	-,300	,313	,340	-,921	,321			
	2	1	2	,062	,313	,842	-,559	,684			
			3	,625*	,313	,049	,004	1,246			
			4	,500	,313	,114	-,121	1,121			
			5	1,225*	,313	,000	,604	1,846			
		2	1	-,062	,313	,842	-,684	,559			
			3	,563	,313	,075	-,059	1,184			
			4	,438	,313	,166	-,184	1,059			
			5	1,162*	,313	,000	,541	1,784			

		3	1	-,625*	,313	,049	-1,246	-,004	
			2	-,563	,313	,075	-1,184	,059	
			4	-,125	,313	,691	-,746	,496	
			5	,600	,313	,058	-,021	1,221	
		4	1	-,500	,313	,114	-1,121	,121	
			2	-,438	,313	,166	-1,059	,184	
			3	,125	,313	,691	-,496	,746	
			5	,725*	,313	,023	,104	1,346	
		5	1	-1,225*	,313	,000	-1,846	-,604	
			2	-1,162*	,313	,000	-1,784	-,541	
			3	-,600	,313	,058	-1,221	,021	
			4	-,725*	,313	,023	-1,346	-,104	
	3	1	2	,125	,313	,691	-,496	,746	
			3	,375	,313	,234	-,246	,996	
			4	,375	,313	,234	-,246	,996	
			5	,275	,313	,382	-,346	,896	
		2	1	-,125	,313	,691	-,746	,496	
			3	,250	,313	,427	-,371	,871	
			4	,250	,313	,427	-,371	,871	
			5	,150	,313	,633	-,471	,771	
		3	1	-,375	,313	,234	-,996	,246	
			2	-,250	,313	,427	-,871	,371	
			4	1,388E-17	,313	1,000	-,621	,621	
			5	-,100	,313	,750	-,721	,521	
		4	1	-,375	,313	,234	-,996	,246	
			2	-,250	,313	,427	-,871	,371	
			3	-1,388E-17	,313	1,000	-,621	,621	
			5	-,100	,313	,750	-,721	,521	
		5	1	-,275	,313	,382	-,896	,346	
			2	-,150	,313	,633	-,771	,471	
			3	,100	,313	,750	-,521	,721	
			4	,100	,313	,750	-,521	,721	

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

*. The mean difference is significant at the ,05 level.