



**ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI KİMOZİN  
ENZİMİNİN ALTERNATİF BİR SİSTEMLE  
REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ,  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Yakup ULUSU**

**Doktora Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. İsa GÖKÇE  
2012**

**Her hakkı saklıdır**

T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI KİMOZİN ENZİMİNİN  
ALTERNATİF BİR SİSTEMLE REKOMBİNANT OLARAK  
ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yakup ULUSU

TOKAT  
2012

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. İsa GÖKÇE danışmanlığında, Yakup ULUSU tarafından hazırlanan bu çalışma 01/10/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile çokluğu ile Kimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Üye : Prof. Dr. Şaban TEKİN

Üye : Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Üye : Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Üye : Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK

*[Handwritten signatures of the jury members]*

Yukarıdaki sonucu onaylarım

*[Handwritten signature of Doç. Dr. Naim ÇAGMEAN]*  
Doç. Dr. Naim ÇAGMEAN  
Enstitü Müdürü  
12/11/2012



## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Yakup ULUSU

## ÖZET

Doktora Tezi

ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI KİMOZİN ENZİMİNİN ALTERNATİF BİR  
SİSTEMLE REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU

Yakup ULUSU

Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Son yıllarda peynir endüstrisinde süt pıhtılaştırıcı enzimlerle alakalı olarak alternatif sistemler oluşturulmaya başlanmıştır. Bu çalışmada kimozi enzimini kodlayan DNA dizisi *Escherichia coli* için nadir kodonlardan arındırılarak pTOLT vektör sistemine klonlanmış ve enzim üretilmiştir. Tol-A-III proteini ile füzyon olarak üretilen enzim aktivite göstermiş, optimum sıcaklığı 40 °C, optimum pH'sı ise 6,5 olarak bulunmuştur. Çalışmanın uzun dönem hedefinde ülkemizin endüstriyel enzimler konusunda genel itibariyle tüketici konumunda olmasından dolayı, rekombinant enzim üretim sistemlerini kullanarak ve bu sistemler üzerinde maliyet/performans oranını en optimal düzeyde tutacak modifikasyonları yaparak, ülkemizin enzim üretimi konusunda tüketicilikten üreticiliğe geçişine katkı sağlamaktır.

**2012, 87 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Kimozi, Rekombinant enzim, *E. coli*

## **ABSTRACT**

Ph. D. Thesis

### **EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT CHYMOSIN FOR INDUSTRIAL USAGE USING AN ALTERNATIVE EXPRESSION SYSTEM**

Yakup ULUSU

Gaziosmanpaşa University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Novadays alternative systems are established about milk clotting enzymes in cheese industry. In this work chymosin gene coding DNA fragment are optimised from rare codons for *Escherichia coli*, cloned to the pTOLT expression systems and chymosin enzyme produced as a fusion protein. Chymosin enzyme that is produced as a fusion to the TolA-III was active, its optimum temperature 40 °C, and optimum pH 6,5. Long term aim of this work is producing industrial enzymes using recombinant expression systems because our country generally is a buyer of these enzymes. I would like to contribute to enzyme production of our country by modifying these systems with optimising cost-performans rate.

**2012, 87 pages**

**Keywords:** Chymosin, Recombinant enzyme, *E. coli*

## ÖNSÖZ

Doktora çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye, tez izleme komitesinde bulunan, öneri ve fikirlerinden yararlandığım değerli hocalarım; Prof. Dr. Şaban TEKİN ve Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a, laboratuvar imkanlarından yararlanma fırsatı verdiği için Sayın Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ'a çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Sema BİLGİN ŞENTÜRK'e ve Arş. Gör. Hülya KUDUĞ'a, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na, tez çalışmalarım sırasında bana yaptıkları her türlü fedakarlıklarla destek olan eşim Funda ve oğlum Efe'ye, ayrıca beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Bu doktora çalışması Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2012/60)

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ÖZET</b> .....                                                             | i   |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                         | ii  |
| <b>ÖNSÖZ</b> .....                                                            | iii |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....                                                      | iv  |
| <b>SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....                                      | vii |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....                                                  | ix  |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....                                                | xi  |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                                         | 1   |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ (KURAMSAL TEMELLER / GENEL BİLGİLER)</b> .....          | 4   |
| 2.1. Hücrede Enzim Aktivitesinin Kontrolü .....                               | 4   |
| 2.1.1. Enzim Üretimi.....                                                     | 4   |
| 2.1.2. Enzimlerin Bölümlendirilmesi.....                                      | 4   |
| 2.1.3. Enzim İnhibitör ve Aktivatörleri.....                                  | 4   |
| 2.1.4. Çevrim Sonrası Değişim .....                                           | 5   |
| 2.1.5. Farklı Ortamda Aktifleşme .....                                        | 5   |
| 2.2. Mikroorganizmaların Ürettikleri Büyük Molekül Ağırlıklı Bileşikler ..... | 5   |
| 2.3. Endüstriyel Enzimler .....                                               | 6   |
| 2.3.1. Proteazlar .....                                                       | 7   |
| 2.3.2. Deterjan Endüstrisinde Enzimler .....                                  | 8   |
| 2.4. Kimozin .....                                                            | 9   |
| 2.5. Süt .....                                                                | 14  |
| 2.6. Dünya’da Süt ve Süt Ürünleri Sektörü .....                               | 15  |
| 2.7. Peyir Üretimi.....                                                       | 16  |
| 2.8. Peyir İhracatçıları.....                                                 | 16  |
| 2.9. Peyirin Kökeni .....                                                     | 17  |
| 2.10. Kişi Başına Yıllık Tüketim .....                                        | 18  |
| 2.11. Peyirin Besin Özellikleri.....                                          | 19  |
| 2.11.1. Süt yağı .....                                                        | 19  |
| 2.11.2. Protein.....                                                          | 19  |
| 2.11.3. Laktoz .....                                                          | 19  |
| 2.11.4. Kalsiyum ve Mineraller .....                                          | 20  |
| 2.12. Peyir Çeşitleri .....                                                   | 20  |
| 2.13. Peyir Nasıl Yapılır ? .....                                             | 21  |
| 2.13.1. Pıhtılaştırma .....                                                   | 21  |
| 2.13.2. Olgunlaştırma.....                                                    | 22  |
| 2.14. Rennet .....                                                            | 23  |
| 2.15. Rennet Çeşitleri.....                                                   | 24  |
| 2.15.1. Dana Mayası .....                                                     | 24  |
| 2.15.2. Domuz Mayası .....                                                    | 24  |
| 2.15.3. Piliç Mayası .....                                                    | 24  |
| 2.15.4. Mikrobik Mayalar .....                                                | 24  |
| 2.15.5. Mantar Mayaları .....                                                 | 25  |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.15.6. Kimyasal Kaynaklı Mayalar .....                                   | 25 |
| 2.15.7. Mayasız Peynir .....                                              | 25 |
| 2.16. Maya İle İlgili Tartışma Konuları .....                             | 25 |
| 2.16.1. Dini Duyarlılık .....                                             | 26 |
| 2.16.2. Hayvan Hakları .....                                              | 26 |
| 2.16.3. Genetik Mühendisliği .....                                        | 26 |
| 2.16.4. Vejetaryenlik .....                                               | 27 |
| 2.17. Endüstriyel Enzimlerin Kullanım Alanları .....                      | 27 |
| 2.18. Enzim Teknolojisi .....                                             | 31 |
| 2.18.1. Mikrobiyal Enzim Üretimi .....                                    | 31 |
| 2.18.2. Koji Prosesi (Solid-State Fermentasyon) .....                     | 32 |
| 2.18.3. Fermentör Kullanımı .....                                         | 33 |
| 2.19. Enzim Saflaştırma Metodları .....                                   | 35 |
| 2.19.1. Enzim Kaynağından Enzimin Çıkarılması .....                       | 35 |
| 2.19.2. Santrifüjleme .....                                               | 35 |
| 2.19.3. Amonyum Sülfatla Çöktürme .....                                   | 36 |
| 2.19.4. Diyaliz .....                                                     | 36 |
| 2.19.5. Isıtma .....                                                      | 36 |
| 2.19.6. İzoelektrik pH'ya Göre Çöktürme .....                             | 36 |
| 2.19.7. Kolon .....                                                       | 36 |
| 2.20. Enzim İmmobilizasyonu .....                                         | 37 |
| 2.20.1. Kovalent Bağlama .....                                            | 37 |
| 2.20.2. Çapraz Bağlama .....                                              | 37 |
| 2.20.3. Adsorbsiyon .....                                                 | 38 |
| 2.20.4. Tutuklama .....                                                   | 38 |
| 2.20.5. Kapsülleme .....                                                  | 39 |
| 2.21. Gen Klonlaması .....                                                | 40 |
| 2.23. Gen DNA'sının Vektör DNA'sı ile Birleştirilmesi .....               | 43 |
| 2.24. Rekombinant Plazmid DNA'sının Alıcı Hücreye Aktarılması .....       | 44 |
| 2.25. Gen Ürününün Kontrolü .....                                         | 45 |
| <b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....                                        | 46 |
| 3.1. Materyal .....                                                       | 46 |
| 3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....                                          | 46 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar .....                                       | 47 |
| 3.1.3. Kullanılan Çözeltiler .....                                        | 48 |
| 3.2. Yöntem .....                                                         | 51 |
| 3.2.1. PCR işlemleri için Primerlerin Tasarımı (pTOLT sistemi için) ..... | 51 |
| 3.2.2. PCR ile Kimozin DNA'sının Amplifikasyonu .....                     | 56 |
| 3.2.3. PCR ürünlerinin Saflaştırılması .....                              | 57 |
| 3.2.4. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim .....                             | 57 |
| 3.2.5. DNA Ligasyonu .....                                                | 58 |
| 3.2.6. Kompetent Hücre Hazırlanması .....                                 | 59 |
| 3.2.7. Transformasyon .....                                               | 60 |
| 3.2.7. Plazmid DNA Saflaştırılması .....                                  | 61 |
| 3.2.8. Plazmid DNA'ların PCR ile analizi .....                            | 62 |
| 3.2.9. DNA Dizileme .....                                                 | 63 |
| 3.2.10. Tol-A-III-Kimozin Füzyon Proteinin Üretilmesi (indüklemeye) ..... | 63 |
| 3.2.11. <i>E. coli</i> BL21 pLysE Hücrelerinin Parçalanması .....         | 64 |

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.12. Yüksek Hızda Santrifüjle Proteinlerin Ayrımı .....                                 | 64        |
| 3.2.13. Afinite Kromatografisi ile Füzyon Proteinin Saflaştırılması .....                  | 64        |
| 3.2.14. SDS-PAGE ile Tol-A-III-Kimozin Füzyon Proteininin Saflaştırılmasının Analizi ..... | 65        |
| 3.2.15. Saflaştırılan Füzyon Proteinin Kantitatif Analizi .....                            | 65        |
| 3.2.16 Total Proteolitik Aktivite .....                                                    | 66        |
| 3.2.18 Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi .....                                                  | 66        |
| <b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....</b>                                                       | <b>68</b> |
| 4.1. Kimozin DNA dizisinin PCR ile amplifikasyonu.....                                     | 68        |
| 4.2. PCR ürünlerinin Saflaştırılması .....                                                 | 69        |
| 4.3. pTOLT-CHY Plazmid DNA'larının PCR ile Analizi.....                                    | 69        |
| 4.4. Tol-A-III-Kimozin Füzyon Proteinin Ekspresyon Çalışmaları .....                       | 74        |
| 4.5. Saflaştırılan Füzyon Proteinin Kantitatif Analizi .....                               | 76        |
| 4.6. Total Proteolitik Aktivite ve pH ile Sıcaklığın Proteolitik Aktiviteye Etkisi .....   | 76        |
| 4.7. Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi .....                                                    | 77        |
| <b>5. SONUÇ .....</b>                                                                      | <b>79</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                     | <b>81</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                      | <b>85</b> |

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

| <b>Simgeler</b> | <b>Açıklama</b>                               |
|-----------------|-----------------------------------------------|
| Bç              | baz çifti                                     |
| µl              | mikro litre                                   |
| µM              | mikro molar                                   |
| M               | Molar                                         |
| mM              | mili molar                                    |
| nm              | nano metre                                    |
| P               | Fosfat                                        |
| rpm             | Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute) |

| <b>Kısaltmalar</b> | <b>Açıklama</b>                           |
|--------------------|-------------------------------------------|
| Amp                | Ampisilin                                 |
| APS                | Amonyumpersülfat                          |
| BSA                | Sığır (Bovine) Serum Albümini             |
| ddH <sub>2</sub> O | Çift distile su (Double distilled water)  |
| DMSO               | Dimetil sülfoksit                         |
| DNA                | Deoksiribonükleikasit                     |
| dNTP               | Deoksiribonükleosit trifosfat             |
| <i>E. coli</i>     | <i>Escherichia coli</i>                   |
| FSB                | “Frozen Storage Buffer”                   |
| IPTG               | İzopropil β-D-1 tiyogalaktopiranozid      |
| LB                 | Luria-Bertani                             |
| OD                 | Optik dansite                             |
| PCR                | Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu       |
| PIPES              | piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit) |
| PMSF               | Fenil metil sülfonil florit               |
| SDS                | Sodyum dodesil sülfat                     |
| SDS PAGE           | SDS poliakrilamid jel elektroforezi       |
| SOB                | “Super Optimal Broth”                     |

|       |                                         |
|-------|-----------------------------------------|
| TAE   | Tris-asetat-EDTA                        |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin      |
| Tris  | 2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Şekil 1.1. Kimozinin 3 boyutlu yapısı                                                                                                            | 1                   |
| Şekil 1.2. Eduard Buchner                                                                                                                        | 3                   |
| Şekil 2.1. Kimozin reaksiyonu                                                                                                                    | 10                  |
| Şekil 2.2. Kazein proteininin üç boyutlu yapısı                                                                                                  | 11                  |
| Şekil 2.3. Kimozin enzimin şematik yapısı                                                                                                        | 12                  |
| Şekil 2.4. Peynir Çeşitleri                                                                                                                      | 22                  |
| Şekil 2.5. Peynir Üretimi Akış Şeması                                                                                                            | 24                  |
| Şekil 2.6. Solid State Fermentasyon                                                                                                              | 35                  |
| Şekil 2.7. Karıştırıcılı tank tipi fermentör                                                                                                     | 36                  |
| Şekil 2.8. Air Lift Fermentör                                                                                                                    | 37                  |
| Şekil 2.9. Bubble Column Fermentör                                                                                                               | 37                  |
| Şekil 2.10. Packed Bed Fermentör                                                                                                                 | 38                  |
| Şekil 2.11. Kovalent bağlama yöntemiyle immobilizasyon                                                                                           | 40                  |
| Şekil 2.12. Çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyon                                                                                             | 41                  |
| Şekil 2.13. Adsorbsiyon yöntemiyle immobilizasyon                                                                                                | 41                  |
| Şekil 2.14. Tutuklama yöntemiyle immobilizasyon                                                                                                  | 42                  |
| Şekil 2.15. Kapsülleme yöntemiyle immobilizasyon                                                                                                 | 42                  |
| Şekil 2.16. Plazmid kullanarak gen klonlanması ve rekombinant DNA eldesi                                                                         | 43                  |
| Şekil 2.17. Yapışkan uçlu (polindrom dizili) restriksiyon enzim kesim bölgesi                                                                    | 45                  |
| Şekil 2.18. Küt uçlu restriksiyon enzim kesim bölgesi                                                                                            | 45                  |
| Şekil 2.19. Restriksiyon enzimi <i>EcoR</i> I ile kesim                                                                                          | 46                  |
| Şekil 2.20. <i>EcoR</i> I ile kesim sonrası; DNA ligaz enzimi ile uçların bağlanması                                                             | 47                  |
| Şekil 3.1. IDT tarafından sentezlenen kimozin genini taşıyan plazmit                                                                             | 56                  |
| Şekil 3.2. pTOLT ekspresyon vektörü ve çoklu klonlama bölgesi                                                                                    | 57                  |
| Şekil 4.1. Chy NotI tolt sense ve Chy MluI tolt reverse primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen agaroz jelgörüntüsü | 71                  |

|             |                                                                                                                      |    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.2.  | pTOLT-CHY plazmitinin kalıp olarak kullanılmasıyla yapılan doğrulama PCR'ı sonucunda elde edilen agaroz jelgörüntüsü | 72 |
| Şekil 4.3.  | pTOLT-CHY plazmitinin restriksiyon enzim haritası (a)                                                                | 73 |
| Şekil 4.3.  | pTOLT-CHY plazmitinin restriksiyon enzim haritası (b)                                                                | 74 |
| Şekil 4.4.  | Elde edilen pTOLT-CHY plazmit DNA'sının şematik görüntüsü                                                            | 75 |
| Şekil 4.5.  | pTOLT-CHY vektörünün DNA dizileme sonucunun kromotogram şeklindeki görüntüsü                                         | 76 |
| Şekil 4.6.  | Tol A-III-Kimozin füzyon proteininin saflaştırılmasının %12'lik SDS PAGE jeline gösterilmesi                         | 77 |
| Şekil 4.7.  | Üretilen Tol-A-III-Kimozin füzyon proteininin şematik gösterimi                                                      | 78 |
| Şekil 4.8.  | pH'nın proteolitik aktivite üzerine etkisi                                                                           | 79 |
| Şekil 4.9.  | Sıcaklığın proteolitik aktivite üzerine etkisi                                                                       | 80 |
| Şekil 4.10. | Tol-A-III-Kimozin füzyon proteininin süt pıhtılaştırma aktivitesi                                                    | 80 |

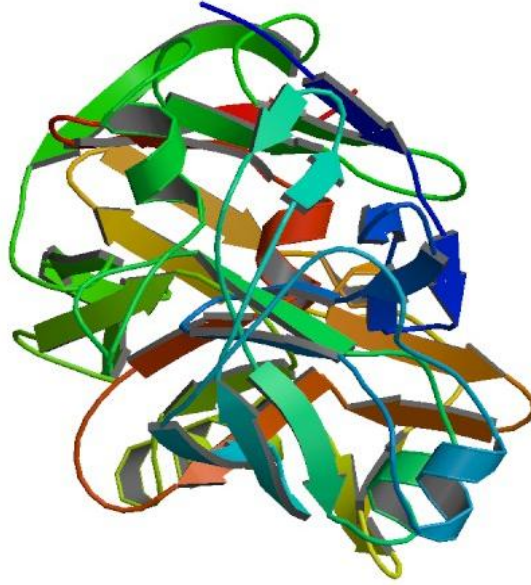
## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                        | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Çizelge 2.1. Çeşitli tür sütlerin ana besin öğeleri                    | 15                  |
| Çizelge 2.2. Başlıca Ürünler İtibariyle Dünyada Süt Ürünleri Üretimi   | 16                  |
| Çizelge 2.3. En üst peynir üreticileri                                 | 17                  |
| Çizelge 2.4. En üst peynir ihracatçıları                               | 18                  |
| Çizelge 2.5. En üst peynir tüketicileri                                | 19                  |
| Çizelge 2.6. Endüstriyel Enzimlerin Kullanım Alanları                  | 29                  |
| Çizelge 2.7. Bazı restriksiyon enzimleri ve izole edildiği bakteriler  | 45                  |
| Çizelge 3.1. Kimozin enzimin <i>Bos taurus</i> 'a ait doğal DNA dizisi | 54                  |
| Çizelge 3.2. Birinci kesim için gereken madde miktarları               | 60                  |
| Çizelge 3.3. İkinci kesim için gereken madde miktarları                | 61                  |
| Çizelge 3.4. Ligasyon için gereken madde miktarları                    | 62                  |
| Çizelge 4.1. Tol-A-II-Kimozin füzyon proteininin amino asit dizisi     | 78                  |

## 1. GİRİŞ

### Enzim Nedir ?

Enzimlerin çoğu amino asitlerin peptid bağlarıyla bağlanması ile oluşan ve biyokimyasal yada fizyolojik pek çok tepkimeyi katalizleyen protein yapısındaki biyopolimerlerdir. Enzim tepkimelerinde, reaksiyona giren moleküllere substrat denir ve enzim bunları farklı moleküllere, ürünlere dönüştürür. Bir canlı hücredeki tepkimelerin hemen tamamı yeterince hızlı olabilmek için enzimlere gerek duyar. Enzimler substratları için son derece seçici oldukları için ve pek çok olası tepkimeden sadece birkaçını hızlandırdıklarından dolayı, bir hücredeki enzimlerin kümesi o hücrede hangi metabolik yolların bulunduğunu belirler (Smith, 1997; Garrett ve Grisham, 1999).



Şekil 1.1. Kimozinin üç boyutlu yapısı (Gilliland ve ark., 1990)

Mikrobiyal hücre, hayvan ve bitki dokuları tarafından üretilen enzimler genellikle endüstride; farmasötik, gıda, tekstil, deri, yem ve deterjan sanayilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Enzimlerin endüstri uygulamalarındaki çok çeşitli alanlarda kullanılması; immobilize edilmesi yoluyla tekrar tekrar kullanılabilmesi ve üretimdeki uygunlukları nedeniyledir. Enzimlerin gıda endüstrisinde bu denli fazla kullanımları doğal olarak üretim maliyetlerini de etkilemektedir. Endüstride kullanılan enzim pazarı iki milyar doları aşmış durumdadır. Bu pazarın yarısından fazlasını ise gıda üretiminde kullanılan enzimler oluşturmaktadır (Spök, 2006).

Enzimler, endüstride istenilen reaksiyonların katalizlenmesinde kullanılırlar. Günümüzde ihtiyaç duyulan enzimlerin az bulunur olmaları ve yüksek maliyetleri söz konusu bu uygulamaları güçleştirmektedir. İşte bu noktada da devreye mikrobiyal enzim kullanımı girmektedir. Proteaz, lipaz, katalaz, laktaz, trans glutaminaz gibi enzimler süt ve süt ürünlerinin üretimi ve kalitelerinin artırılması için kullanılan başlıca mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir. Mikrobiyal enzim kullanımı dünyada gıda endüstrilerinde yeni kalite ve fiziksel özellikte süt ve süt ürünlerinin geliştirilmesi yönünden önem taşımaktadır (Er ve Sarımeahmetoğlu, 2009).

### Etimoloji ve Tarihçe

1700'lerin sonlarında mide salgıları tarafından etin sindirildiği, tükürük ve bazı bitki özütlerinin nişastayı şekerlere dönüştürdüğü biliniyordu. Ancak, bunun hangi mekanizmayla olduğu bilinmiyordu. 19. yüzyılda, Louis Pasteur, maya tarafından şekerin alkole dönüşmesini (fermantasyonu) araştırırken, fermentasyonun maya hücrelerinde bulunan bir canlı güç tarafından meydana geldiği sonucuna varmıştır.

1878'de Alman fizyolog Wilhelm Kühne (1837–1900) ilk defa enzim terimini kullandı. Daha sonraları enzim sözcüğü canlı olmayan bileşikler (örneğin pepsin) için kullanılmış, canlılar tarafından üretilen kimyasal aktiviteler için de "ferment" sözcüğü kullanılmaya başlanmıştır (Dubos, 1951).

1897'de Eduard Buchner (Şekil 1.2.) içinde canlı hücre bulunmayan maya ekstresinin şekeri fermente etme yeteneği olduğunu göstermiştir. Sükroz şekerinin fermentasyonuna yol açan enzime "zimnaz" adını vermiştir ve 1907'de "hücresiz

fermantasyonun keşfi'nden" dolayı Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır. Buchner'in örneği izlenerek enzim adları katalizledikleri tepkimelere göre adlandırılır. Tipik olarak substratın veya reaksiyon tipinin adının sonuna -az eklenir. Örneğin, laktaz, laktozu parçalayan enzimdir. DNA polimeraz, DNA polimerleri oluşturan enzimdir.



Şekil 1.2. Eduard Buchner (Anonim 2011g).

## **2. KAYNAK ÖZETLERİ (KURAMSAL TEMELLER / GENEL BİLGİLER)**

### **2.1. Hücrede Enzim Aktivitesinin Kontrolü**

#### **2.1.1. Enzim Üretimi**

Enzim genlerinin yazılımı ve çevirimi hücredeki ortamdaki değişikliklere bağlı olarak hızlandırılabilir veya yavaşlatılabilir. Gen düzenlenmesinin bu şekline enzim induksiyonu ve inhibisyonu denir. Örneğin, bakteriler penisilin gibi antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilir. Çünkü penisilin molekülü için çok önemli olan  $\beta$ -laktam halkasını hidrolizleyen  $\beta$ -laktamaz adlı enzimler indüklenir. Bir diğer örnek, ilaç metabolizmasında önemli yer tutan Sitokrom P450 oksidaz adlı karaciğer enzimleridir. Bu enzimlerin induksiyonu veya inhibisyonu, ilaç etkileşimlerine yol açabilir.

#### **2.1.2. Enzimlerin Bölümlendirilmesi**

Kompartmanlaşma ile farklı metabolik yollar farklı hücresel bölmelerde cereyan eder. Örneğin, yağ asitleri, sitozol, endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtında bir grup enzim tarafından sentezlenir, sonra, mitokondride  $\beta$ -oksidasyon yoluyla enerji kaynağı olarak başka bir grup enzim tarafından kullanılır (Faergeman ve Knudsen, 1997).

#### **2.1.3. Enzim İnhibitör ve Aktivatörleri**

Enzimler, enzim inhibitörleri ve aktivatörleri tarafından düzenlenirler. Örneğin, bir metabolik yolun son ürünü sıkça bu yolun ilk enziminin (genelde ilk tersinmez) inhibitörüdür, böylece yolun son ürününün miktarı düzenlenir. Bu bir negatif geri besleme mekanizmasıdır.

#### **2.1.4. Çevrim Sonrası Değişim**

Enzimler çevrim sonrası değişim (post-translational modification) aracılığıyla düzenlenir. Bu tür değişimler arasında fosforilasyon ve glikozilasyon sayılabilir. Örneğin, vücuttaki insülin tepkisinde, glikojen sentaz gibi çeşitli enzimlerin fosforilasyonu, glikojenin sentez veya yıkımını kontrol eder. Böylece hücrelerin kan şekereine uygun cevap vermesini sağlar. Çevrim sonrası değişime bir diğer örnek, polipeptit zincirin kesilmesidir. Bir sindirim proteazı olan kimotripsin, önce kimotripsinojen olarak inaktif bir şekilde pankreas tarafından üretilir, bu haliyle mideye taşındıktan sonra orada kesilerek etkinleştirilir. Böylece, sindirim yoluna girmeden enzimin pankreas ve diğer dokulara zarar vermesi engellenir. Bir enzimin bu tip inaktif öncül (prekürsör) haline zimojen denir. İnaktif öncül maddelerden aktif enzim üretilmesi işlemine ise zimojen aktifleşmesi adı verilir (Doble ve Woodgett, 2003).

#### **2.1.5. Farklı Ortamda Aktifleşme**

Bazı enzimler farklı bir ortamda yer alınca etkinleşirler. Örneğin sitoplazmanın indirgeyici ortamından periplazmadaki yükseltgen ortamına veya yüksek pH'den düşük pH'ya geldiğinde enzimin aktivitesi değişebilir. Örneğin influenza virüsündeki hemaglutinin, asitli ortamda meydana gelen yapısal bir değişiklik ile etkinleşir, bu değişiklik hücre içindeki lizozomlara girdiğinde meydana gelir (Carr ve Kim, 2003).

### **2.2. Mikroorganizmaların Ürettikleri Büyük Molekül Ağırlıklı Bileşikler**

Mikroorganizmaların mikrobiyal teknoloji açısından önemli olan büyük molekül ağırlıklı makro molekülleri proteinler ve polisakkaritlerdir. Her iki tip makro molekülün de mikroorganizmalarca üretimi günümüzde artan bir şekilde devam etmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi ile normalde az miktarda üretilen proteinlerin miktarları artırılmaktadır. Ticari olarak mikrobiyal üretimi yapılan proteinler iki çeşittir:

- ✓ Enzimler
- ✓ Terapötik proteinler

Enzim uygulaması çok gelişmiştir. 1980'lerin sonundan itibaren Pazar payları 10.000 ton ve 2 milyar dolara ulaşmıştır.

Proteinlerin modifikasyonunu içeren rekombinant DNA teknolojisi uygulamalarının enzim üretiminde önemli payı vardır. Örneğin glukoz izomerazın optimum pH'sının düşürülmesi yüksek fruktoz şurubu eldesinde önemli olan normal enzimin yol açtığı karamelizasyonu (esmerleşme) ortadan kaldırmıştır.

Tedavi edici özellikte olan bazı proteinler ve peptidler insan ve hayvanlardan yeteri kadar saflıkta ve yüksek verimlilikte elde edilemezler. Bu nedenle rekombinant DNA teknolojisi proteinlerin biyolojik fabrikalar olarak nitelenebilecek bakteriler (en sık kullanılanı *E. coli*) ve mayalar (en sık kullanılanı *Saccharomyces cerevisiae*) içinde üretilmelerine olanak vermiştir. Terapötik proteinlerin sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- ✓ %95'den daha fazla saf olmalıdırlar,
- ✓ Kontaminant DNA 10 pg/doz'dan daha az olmalıdır,
- ✓ Endotoksinler belirtilen düzeyin altında olmalıdır,
- ✓ Saflaştırmada kullanılan toksik kimyasallar belirlenen düzeyin altında olmalıdır,
- ✓ Spesifik aktivite minimum düzeyin üstünde, tercihen maksimum olmalıdır,
- ✓ Mikroorganizma içermemelidir.

### 2.3. Endüstriyel Enzimler

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre;

- ✓ katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması,
- ✓ istenmeyen yan ürün oluşturmamaları,
- ✓ daha stabil ve ucuz olmaları,
- ✓ fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır.

Bugüne kadar 2000’den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Fakat günümüzde bunlardan sadece 20 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin;

- ✓ %59’unu proteazlar,
- ✓ %28’ini karbohidrazlar,
- ✓ %3’ünü lipazlar
- ✓ %10’unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır.

Karbohidrazlar grubuna giren  $\alpha$ -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiesman, 1987).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır.

### **2.3.1. Proteazlar**

Proteazlar enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve oldukça farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğrafçılık gibi birçok endüstri dallarında kullanılmaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrilerinde en fazla kullanımı olan enzimlerdir. 30 yıl boyunca deterjanlardaki proteazların önemi, küçük katkı maddesinden anahtar bileşen olma konumuna doğru

değişmiştir. İyi bir deterjan enzimi oksitleme ajanı ve ağartıcılarla beraber stabilitesini koruyabilmelidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı ağartma/oksitleme ajanlarının varlığında stabilitesini koruyamamaktadır. Bu nedenle enzim tabanlı deterjanların daha iyi stabiliteye sahip olması için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bununla birlikte, mikrobiyal çeşitliliği derinlemesine inceleyerek ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların bulunma şansı da daima vardır (Oberoi ve ark., 2001). Klasik olarak deterjanlar yüksek yıkama sıcaklıklarında kullanılmaktadır. Şimdilerde alkalın proteazların tanımlanmasında geniş sıcaklık aralıklarında etkili olması oldukça ilgi çekmektedir. Diğer taraftan günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni alkali proteazlar üzerinde durmaktadır (Jasvir ve ark., 1998).

Proteazların diğer ilginç bir kullanım alanı ise deniz *Crustacea* atıklarının deproteinizasyonudur. Kimyasal işlemlerin üstesinden gelmek için mikroorganizmaların veya proteolitik enzimlerin kullanılması üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Yang ve ark., 1999). Kitin ve türevleri çok yönlü biyolojik aktiviteleri ve zirai kimyasal uygulamalarından dolayı büyük ekonomik değere sahiptir. Deniz *Crustacean*'ları ise kitin bakımından oldukça zengindir. Klasik olarak deniz atık materyallerinden kitinin hazırlanması güçlü asit ve bazları kullanarak demineralizasyon ve deproteinizasyon gerektirmektedir. Bununla beraber kimyasalların kullanılması kitinin deasetilasyonunu kısmi olarak gerçekleştirmektedir. Kimyasal uygulamalar aynı zamanda atık sularda nötralizasyon ve detoksifikasyon yapılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle kimyasal uygulamalardan doğan zararların üstesinden gelmek için alternatif olarak mikroorganizmaların veya proteolitik enzimlerin kullanılması gündemdedir (Oh ve ark., 1999).

### **2.3.2. Deterjan Endüstrisinde Enzimler**

Deterjan endüstrisinde enzimler önemli yer tutarlar. Çamaşır deterjanlarının % 80'i ağırlıklarının % 0.015- 0.025'i kadar proteolitik enzim içerirler.

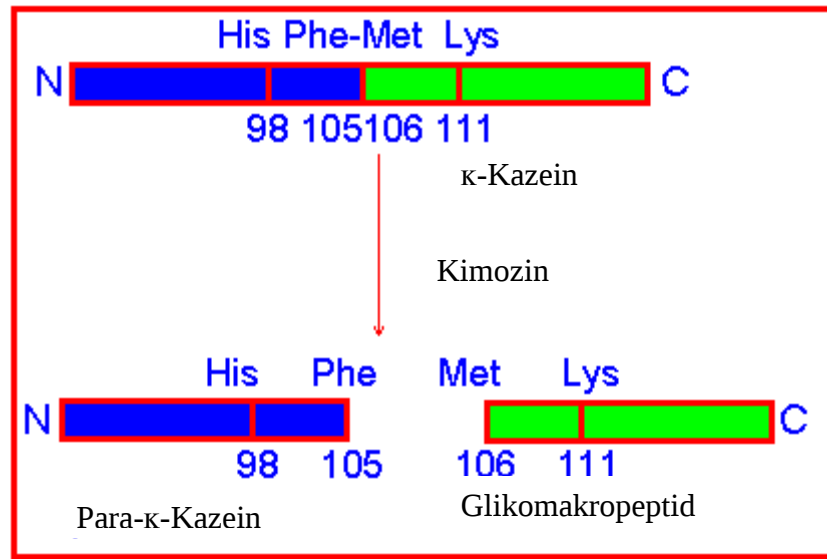
Proteolitik bir enzim olan subtilizin *Bacillus*'tan elde edilir ve 65 °C'ın üzerindeki sıcaklıklarda bile etkindir. Bu enzimin termostabilitesini arttırmak için genetik mühendisliği çalışmaları yapılmış ve protein molekülünün 218. amino asidi olan aspartik asit, serin ile değiştirilmiştir. Yine 104. amino asit olan tirozin, fenil alanine dönüştürülerek pH 11'de aktif olan subtilizin elde edilmiştir.

#### 2.4. Kimozin

Dünya üzerinde süt endüstrisinde, peynir yapımı için yılda 100 milyon dolar değerinde kimozin kullanılmaktadır. Bu geniş kullanımı nedeniyle büyük ölçekte rekombinant kimozin üretimi yoluna gidilmiş ve inek kimozini *E. coli*'de klonlanmıştır. Bu rekombinant kimozin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nin 1990'da insan tüketimi için onayladığı ilk genetik mühendisliği ürünü olmuştur.

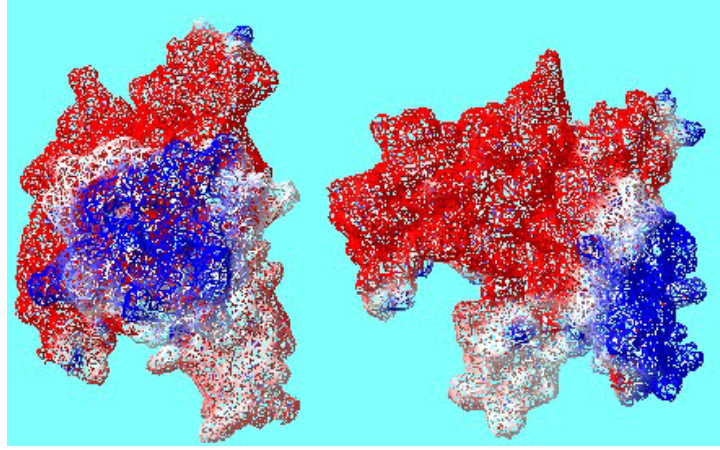
Süt ürünleri teknolojisinde süt ve süt ürünlerinin üretimi ve kalitenin artırılması, laktoz intoleransı olan bireyler için laktozsuz gıdaların geliştirilmesi gibi bazı özel diyet ürünlerinin hazırlanması ve özellikle istenilen kalite ve tekstüre ulaşabilmek için modifiye edilmesi, peynir üretiminde peynir olgunlaşma süresinin azaltılması ve kalite ile beraber besin değerinin artırılması için yapılan uygulamalarda mikrobiyal enzimler kullanılmaktadır (Neelakantan ve ark., 1999). Yeni enzim ve kültürlerin süt ürünlerindeki uygulamalarda artan kullanımı, peynirin raf ömrünün uzatılması, peynirde düzgün tat gelişiminin sağlanması ve olgunlaştırılma aşamalarında yardımcı olmaktadır (Er ve Sarımehtetoğlu, 2009). Peynir yapımında en kompleks işlem sütün pıhtılaştırılmasıdır. Geleneksel olarak süt pıhtılaşmasını sağlayan enzimler, hayvansal kaynaklardan (buzağı abomasumu) elde edilmektedir. Son yıllarda ise süt pıhtılaştırıcı enzimlerle alakalı olarak alternatif sistemler oluşturulmaya başlanmıştır. Diğer hayvanlar, bitkiler ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen pıhtılaştırıcı enzimlerin kullanımı gelişmeye başlamıştır. Bununla birlikte pıhtılaştırıcı enzimin kaynağına göre performansı ve peynirin kalitesi direkt olarak etkilenmektedir (Broome ve Limsowtin, 1998).

Endüstriyel kullanım amaçlı kimozen genellikle rennet veya rennin olarak adlandırılır. Rennet temel olarak peynir yapım endüstrisinde kullanılan bir aspartik proteaz çeşididir (Ustunol ve Hicks, 1990). Bu proteazlar aktif bölgelerinde Asp-32 ve Asp-215 olmak üzere iki tane aspartik asit rezidüsü taşırlar (Vallejo ve ark., 2008). Enzim kazein proteinini Phe-105 ve Met-106 arasında bulunan peptid bağını kırarak, çözünmeyen para- $\kappa$ -kazeini oluşturur ve bu da sonuçta sütün pıhtı oluşturmalarını sağlar (McMahon ve Brown, 1984).



Şekil 2.1. Kimozen reaksiyonu (Anonim, 2012a)

Sığır sütündeki azotun yaklaşık % 80'ini kazein proteini oluşturur. Kazein alfa S1, alfa S2,  $\beta$  ve kappa ( $\kappa$ ) olarak başlıca 4 farklı proteinin, sırasıyla 40:10:35:12 oranlarında bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Bütün kazein türleri fosfor içermektedir. Alfa S1, Alfa S2 ve  $\beta$  alt grupları yüksek fosfat içerikleri sayesinde  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarını güçlü bir şekilde bağlayarak presipitat (çökelek) oluşturur (Foltman, 1987).



Şekil 2.2. Kazein proteininin üç boyutlu yapısı (Anonim 2012b)

Sütün koagülasyonu iki aşamada gerçekleşir.

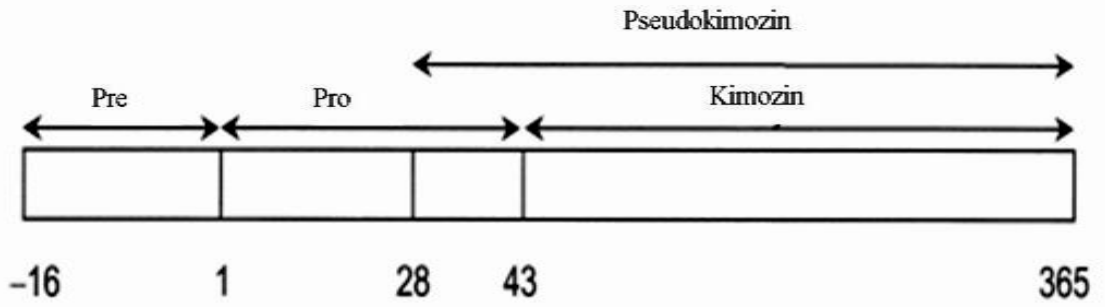
- ✓ Birinci safha proteolitik basamaktır. Bu safhada enzimatik parakazein (insoluble) ve TCA'da çözünebilen glikomakropeptidler üretilir.
- ✓ İkinci safha ise koagülasyon basamağıdır ki, bu da parakazeinin 20 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda  $\text{Ca}^{2+}$  iyonları tarafından çökeltilmesi veya pelteleştirilmesini kapsar (Fox, 1988).

Renin' in kazeinat sistemine etkisi boyunca öncelikli olarak  $\kappa$ -kazein saldırıya uğrarken diğer kazein fraksiyonları daha az etkilenir.  $\kappa$ -kazein fraksiyonlarının pH 6.7'de renin ile enzimolizi sırasında  $\text{Ca}^{++}$  iyonlarının yokluğu, para-  $\kappa$ -kazein fraksiyonlarının presipitasyonuna neden olur. Reninin aktivite göstermesi sisteme  $\text{Ca}^{++}$  iyonlarının eklenmesi ile mümkündür. Para-  $\kappa$ -kazein kalsiyum yokluğunda kalsiyuma hassas olan kazeinlerle etkileşerek onların çökmesini önler. Kalsiyum iyonlarının varlığında ise, kalsiyuma hassas kazein fraksiyonları çözünmeyen para- $\kappa$ -kazein fraksiyonlarıyla pıhtı oluştururlar. Kimozin,  $\kappa$ -kazeindeki  $\text{Phe}^{105}$  ile  $\text{Met}^{106}$  arasındaki bağı kırarak süt pıhtılaşmasını başlatır. Bu bağ sütteki diğer peptid bağlarına nazaran asit proteinazlara karşı çok daha hassastır. Bu tekil hassasiyet çok ciddi ilgi uyandırmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda bu iki amino asit arasındaki dipeptid bağı (HPhe-MetOH) hidrolize edilememiştir. Aynı şekilde Phe-Met bağına içeren üçlü ve dörtlü peptidlerde de bu bağ kırılamamıştır. Fakat bu bağı içeren bir pentapeptiddeki (HSer-Ser-Phe-Met-

AlaOH) bağ hidrolize edilmiştir. Bu ise enzim substrat ilişkisinin peptid uzunluğuyla olan ilişkisini belirlemektedir (Hill, 1968; Hill, 1969).

Bu proteazlar geleneksel olarak süt pıhtısı (çökelek) oluşturmak ve farklı tiplerde peynir üretimi için sıklıkla kullanılırlar. Peynir endüstrisinde kullanılan bu enzimlerin en etkili olanı kimoindir (Rao ve ark., 1998). Peynir endüstrisinde kimozin dışında kullanılan diğer bazı spesifik olmayan aspartik proteazlar peynirde tat acılaşmasına, protein içeriğinde azalmaya ve hatta peynir yapımı sırasında çok ciddi verim kayıplarına yol açabilmektedir (Beppu, 1983).

Kimozin canlılarda 16 amino asitten oluşan bir sinyal peptidinin de dahil olduğu preprokimozin olarak sentezlenir. Bu sinyal peptidi kısmı prokimozin oluşturulurken degege olarak ortadan kaybolur. Prokimozin 40.777 Da moleköl ağırlığına sahip bir propeptiddir. Prokimozin asidik pH ortamı bulunan midede amino terminal ucunda bulunan 42 aminoasitlik propeptid kısmını kaybederek aktif kimozin molekölünü oluşturur. Aktif kimozin 35.600 Da moleköl ağırlığına sahiptir ve 323 amino asitten oluşmuştur (Pedersen ve ark., 1979). Sentetik substratlarla yapılan çalışmalar sonucunda kimozinin pH 4.2'den 3.7'ye kadar uzanan geniş bir optimum pH aralığına sahip olduğu belirlenmiştir (Mohanty ve ark., 1999).



Şekil 2.3. Kimozin enzimin şematik yapısı (Mohanty ve ark., 1999)

Rekombinant kimozinin avantajları şöyle sıralanabilir: Artan peynir mayası ihtiyacı buzağı kesmeden karşılanabilir, çok daha büyük miktarlarda üretim yapılabilir, standart kalite ve maksimum verim sağlanır, enzimin saflığı yüksek olduğu ve pepsin içermediği için peynirin olgunlaşma süreci kusursuz gerçekleşebilir, kalitesiz şirden kullanımından dolayı kaynaklanan peynir kusurlarına rastlanmaz (Dervişoğlu ve ark., 2007).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda; Kim ve Kim (1986), Cheddar peynirinin olgunlaşması üzerine *Mucor* kaynaklı enzimin etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda *Mucor miehei* enzimiyle üretilen peynirini buzağı kimozen enzimi ile üretilen peynire göre peynir suyuna geçen yağ ve protein oranının daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Şahan ve Konar (1990) yaptıkları çalışmada mikrobiyal kaynaklı enzimlerin (*Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica*) genellikle asit proteaz olduğunu ve abomasum kaynaklı peynir mayasına göre daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduklarını belirlemiştir. Ancak bu mikrobiyal kaynaklı kimozenin peynirin tat ve tekstüründe çeşitli bozulmalara yol açtığını belirlemişlerdir.

Yun ve ark., (1993) mozerella peynirini *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* ve hayvansal kaynaklı kimozen olmak üzere 3 farklı pıhtılaştırıcı ile üretmişlerdir. *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* ve hayvansal kimozen ile yapılan mozerella peynirindeki pH, rutubet, yağ, protein, tuz ve Ca parametrelerinde önemli bir farklılık olmadığını belirlemişlerdir.

Eraz (1996), *Mucor miehei* ve abomasumdan elde edilen pıhtılaştırıcı enzimler yardımıyla üretilen beyaz peynirin özelliklerini belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, abomasum kimozenini ile üretilen peynirin protein olmayan azot içeriğinin % 0,185, *Mucor miehei* ile yapılan peynirin ise % 0,217 oranında protein dışı azot içerdiğini bildirmiştir.

Vallejo ve ark., (2008) *Pichia pastoris* süpernatat kültüründe rekombinant kimozen enzimini üretmişlerdir. Bu mikroorganizmayı seçme nedenleri, mikroorganizmanın kendine yabancı rekombinant proteinlerin üretiminde ve sekresyonunda çok kullanışlı olmasıdır. Vallejo ve ark., buzağı abomasumundan RNA izole etmişler ve daha sonra preprokimozen, prokimozen ve kimozenin DNA sekanslarını izole ederek bunları *Pichia pastoris*'e ekspresse ettirmişlerdir. Bu çalışma ile Vallejo ve ark., aktif rekombinant kimozen enziminin üretimini *Pichia pastoris*'te ilk kez gerçekleştirmişlerdir. Fakat

Üretim aşamasında rekombinant *E. coli* ve *Pichia pastoris* suşlarının seçimi iēin zeosin antibiyotiğinin kullanmaları maliyeti artırmıştır. Ayrıca bu şekilde zeosin antibiyotiğini kullanarak yapılan bu üretim sistemi büyük ēapta kültür uygulamalarını (Fermentör ve bioreaktör) ekonomik olmamasından dolayı mümkün kılmamaktadır.

Vega-Hernández ve ark., (2004) emzikli keēi abomasumundan preprokimozin cDNA'sını karakterize ederek klonlamışlardır. Daha sonra üretmiş oldukları rekombinant plazmitleri *Kluyveromyces lactis* ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine transforme etmişlerdir. Her iki transformant organizmanın da kültür süpernatantları asit pH'daki aktivasyonlarından sonra süt phtılaştırıcı aktivite göstermişlerdir. Üretmiř oldukları rekombinant keēi kimozinin kazein fraksiyonlarına karşı proteolitik aktivitesini lēmřler ve enzimin özellikle κ-kazeini hidrolize ettiğini belirlemişlerdir.

El-Sohaimy ve ark., (2010) buzağı abomasumundan RNA izolasyonu yapmışlar ve bu saflaştırdıkları RNA'lardan da RT-PCR yöntemiyle kimozinin cDNA'sını üretmişlerdir. Daha sonra el ettikleri cDNA'yı kullanarak *E. coli*'de rekombinant kimozin üretmeyi başarmışlardır. Araştırıcılar ürettikleri kimozin ile yaygın olarak kullanılan emsallerini karşılaştırdıklarında rekombinant kimozinin diğerlerine göre %105 oranında daha fazla phtılaştırıcı aktiviteye sahip olduğunu görmüşlerdir.

## 2.5. Süt

Süt; iēerdięi protein, laktoz, mineral maddeler, vitamin ve yağ yönünden oldukēa zengin bir besin maddesidir. Süt proteini olan kazein ile süt karbonhidratı olan laktozun doğada sadece sütte bulunması sütün değerini daha da arttırmaktadır (Bykkılıē ve Arpacioğlu, 1990).

Sütün bileşimi birēok faktörün etkisiyle değişir. ēizelge 2.1'de görüldüğü gibi elde edildiği hayvan türlerine göre kurumadde miktarı % 11-38 arasında, yağ miktarı %1.8-22.0 arasında, protein miktarı %2.5-15.5 arasında, laktoz miktarı %1.3-7.0 arasında, kül

miktarı ise %0.5-2.6 arasında değişmektedir. Teknolojik ve ekonomik açıdan incelendiğinde , sütün kurumaddesi büyük önem taşır.

Çizelge 2.1. Çeşitli tür sütlerin ana besin öğeleri (Metin, 2003).

| Süt Türü           | Kuru Madde (%) | Süt Yağı (%) | Protein (%) | Laktoz (%) | Kül (%) |
|--------------------|----------------|--------------|-------------|------------|---------|
| <b>İnsan</b>       | 12.4           | 3.8          | 1.0         | 7.0        | 0.2     |
| <b>İnek</b>        | 12.6           | 3.7          | 3.4         | 4.7        | 0.7     |
| <b>Manda</b>       | 17.2           | 7.4          | 3.5         | 5.4        | 0.8     |
| <b>Koyun</b>       | 19.3           | 7.4          | 5.5         | 4.8        | 1.0     |
| <b>Keçi</b>        | 13.2           | 4.5          | 3.2         | 4.1        | 0.8     |
| <b>Kısırak</b>     | 11.2           | 1.9          | 2.5         | 6.2        | 0.5     |
| <b>Fil</b>         | 23.4           | 14.3         | 4.9         | 3.4        | 0.8     |
| <b>Eşek</b>        | 12.0           | 1.8          | 2.5         | 6.1        | 0.5     |
| <b>Köpek</b>       | 24.9           | 10.5         | 12.2        | 1.3        | 0.9     |
| <b>Deve</b>        | 13.6           | 4.5          | 3.6         | 5.0        | 0.7     |
| <b>Ada Tavşanı</b> | 30.6           | 10.5         | 15.5        | 2.0        | 2.6     |
| <b>Kedi</b>        | 17.9           | 3.3          | 9.1         | 4.9        | 0.6     |
| <b>Fare</b>        | 30.9           | 14.8         | 11.8        | 2.8        | 1.5     |
| <b>Domuz</b>       | 20.5           | 8.8          | 7.3         | 3.3        | 1.1     |
| <b>Ren Geyiği</b>  | 33.3           | 16.9         | 11.5        | 2.8        | 1.4     |
| <b>Balina</b>      | 37.5           | 22.0         | 12.0        | 1.8        | 1.7     |

## 2.6. Dünya’da Süt ve Süt Ürünleri Sektörü

Dünya süt ürünleri üretimi son 30 yılda özellikle de 1980’li yılların ilk yarısından sonra bazı değişiklikler göstermiş, bu değişiklik dünya tüketimi ve ticaretini de etkilemiş dünya ticaretine konu olan ürün çeşidi artmıştır. 1980’li yıllara kadar süt ürünleri dünya ticaretinde tereyağı ve peynirin bir hâkimiyeti söz konusu iken, son yıllarda peynirin yanı sıra, süt, dondurma ve yoğurt gibi süt ürünlerinin de dünya ticaretinde giderek önem kazandığı görülmektedir. Peynir ve tereyağının dünya ticaretindeki önemlerini korumakla birlikte miktar olarak sütün gerisine düştükleri bildirilmektedir.

Çizelge 2.2’ de görüldüğü gibi dünya peynir üretimi 1970-2003 yılları arasında %120, tereyağı üretimi %40,6, süt tozu üretimi ise %300 oranında artış göstermiştir. Söz konusu yıllar arasında üretim artışları miktar olarak değerlendirildiğinde üretim artışının peynirde 9.360.131 ton, tereyağında 2.326.925 ton olduğu ve inek sütünden yapılan süt tozu üretimindeki artışın ise 1.880.652 ton olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.2. Başlıca Ürünler İtibariyle Dünyada Süt Ürünleri Üretimi (Değerler ton olarak ifade edilmiştir) (Metin, 2003)

| Yıl<br>Ürün               | 1970      | 1972      | 1999       | 2000       | 2001       | 2002       | 2003       |
|---------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Peynir</b>             | 7.737.067 | 8.514.161 | 15.893.816 | 16.841.524 | 17.321.133 | 17.321.133 | 17.097.198 |
| <b>Tereyağı</b>           | 5.725.771 | 6.047.429 | 7.066.246  | 7.298.110  | 7.622.614  | 7.963.967  | 8.052.696  |
| <b>Süttozu<br/>(İnek)</b> | 940.182   | 1.132.238 | 2.423.282  | 2.507.179  | 2.635.540  | 2.719.494  | 2.820.834  |

## 2.7. Peyir Üretimi

Peynir üretimi, Dünya çapında büyük bir tarımsal üretimdir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre 2004 yılı dünya üzerindeki peynir üretimi 18 milyon ton dur. Bu kahve tanesi, çay yaprağı kakao tanesi ve tütün yıllık üretiminden daha fazladır. Peynir üretiminin en büyük ülkesi Amerika Birleşik Devletleri'dir. Dünya üretiminin yüzde 30'unu temin eder, bunu Almanya ve Fransa takip eder.

Çizelge 2.3. En üst peynir üreticileri (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) (Anonim 2012c)

| <b>En Üst Peynir Üreticileri – 2006 (1,000 metrik ton)</b> |       |
|------------------------------------------------------------|-------|
| ABD                                                        | 4,275 |
| Almanya                                                    | 1,994 |
| Fransa                                                     | 1,858 |
| İtalya                                                     | 1,154 |
| Hollanda                                                   | 714   |
| Polonya                                                    | 579   |
| Brezilya                                                   | 495   |
| Mısır                                                      | 462   |
| Arjantin                                                   | 425   |
| Avustralya                                                 | 395   |

## 2.8. Peynir İhracatçıları

En büyük peynir ihracatçısı (parasal değere göre), Fransa olup, ikinci Almanya (miktar bakımından birinci olmasına rağmen). En üst on ihracatçı içinde sadece İrlanda, Yeni Zelanda, Hollanda ve Avustralya ihracat amaçlı peynir üretir. Üretimlerinin ihracat

yüzdeleri sırasıyla: %95, %90, %72 ve %65 dir. Fransa'nın peynir üretiminin sadece %30 u ihraç edilir ki bu da onu en büyük ihracatçı yapar. Dünya'nın en büyük peynir üreticisi Amerika Birleşik Devletleri marjinal bir ihracatçıdır, çünkü onun üretiminin büyük çoğunluğu iç tüketimde kullanılır.

Çizelge 2.4. En üst peynir ihracatçıları (2004) (UN Gıda & Tarım Organizasyonu- (FAO))

| <b>En üst peynir ihracatçıları</b> | <b>(.000 US \$ değeriyle)</b> |
|------------------------------------|-------------------------------|
| Fransa                             | 2,658,441                     |
| Almanya                            | 2,416,973                     |
| Hollanda                           | 2,099,353                     |
| İtalya                             | 1,253,580                     |
| Danimarka                          | 1,122,761                     |
| Avustralya                         | 643,575                       |
| Yeni Zelanda                       | 631,963                       |
| Belçika                            | 567,590                       |
| İrlanda                            | 445,240                       |
| Birleşik Krallık                   | 374,156                       |

Almanya en büyük peynir ithalatçısıdır. Birleşik Krallık ve İtalya ise ikinci ve üçüncü en büyük ithalatçılardır (FAO).

## 2.9. Peynirin Kökeni

Peynir kökenleri insanlık kadar eskiye dayanan bir yiyecektir. Ne kadar eskiye dayandığına dair kesin bilgi olmasa da, olası çıkış noktaları Orta Asya, Orta Doğu ya da Avrupa olarak tahmin edilmektedir. Yaygınlaşmasının Roma İmparatorluğu zamanlarında olduğu düşünülür. İlk üretimi için önerilen tarih M.Ö. 8. binyıl (koyunun evcilleştirildiği tarih) ile 9. binyıla kadar değişir. İlk peynirin Orta Doğu insanları ve Orta Asya göçebe Türk'leri tarafından yapıldığı düşünülmektedir. O zamanlar yiyecekleri saklayıcı özelliği nedeniyle hayvanın derisi ya da iç organları kullanılmaktaydı. Bu iç organlardan olan midede (işkembe) saklanan sütün buradaki enzimlerle (kültürle) mayalanması üzerine lor haline gelmesi peynirin ilk oluşumu hakkındaki teorilerden biridir (Ridgwell, 1986; Reich, 2002).

## 2.10. Kişi Başına Yıllık Tüketim

Yunanistan, Dünya'da kişi başına ortalama 31,1 kg peynirin tüketildiği en büyük tüketici ülkedir. Fransa, 26,1 kg tüketimle en büyük ikinci peynir tüketen ülkedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde peynir tüketimi çabuk bir şekilde artmıştır ve 1970-2003 yılları arası üç katına çıkmıştır. 2009 yılında peynir tüketimi kişi başına 14,8 kilografa ulaşmıştır. Bunun da ana unsurlarından biri pizza tüketiminin son yıllarda giderek artış göstermesidir. Türkiye ise 19,4 kg/kişi oranıyla listenin dokuzuncu sırasında yer almaktadır (USDA-US Dairy Agency).

Çizelge 2.5. En üst peynir tüketicileri (Canadian Dairy Information Centre)

| <b>En Üst Peynir Tüketicileri<br/>(2009)</b> | <b>Kişi Başına Yıllık<br/>Toplam Peynir<br/>Tüketimi (kg)</b> |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Yunanistan                                   | 31.1                                                          |
| Fransa                                       | 26.1                                                          |
| İzlanda                                      | 25.4                                                          |
| Almanya                                      | 22.6                                                          |
| İsviçre                                      | 21.4                                                          |
| Hollanda                                     | 21.0                                                          |
| İtalya                                       | 20.9                                                          |
| Finlandiya                                   | 20.7                                                          |
| Türkiye                                      | 19.4                                                          |
| İsveç                                        | 18.9                                                          |
| Avusturya                                    | 17.4                                                          |
| Çek Cumhuriyeti                              | 16.7                                                          |
| İsrail                                       | 16.4                                                          |
| Norveç                                       | 15.3                                                          |
| Amerika                                      | 14.8                                                          |
| Kanada                                       | 12.3                                                          |
| Avusturalya                                  | 12.0                                                          |
| Arjantin                                     | 11.3                                                          |
| Macaristan                                   | 11.0                                                          |
| İngiltere                                    | 10.9                                                          |

## **2.11. Peynirin Besin Özellikleri**

Tüm dünyada sevilerek tüketilen ve yüzlerce çeşidi bulunan peynir, yeterli ve dengeli beslenme düşünüldüğünde, önemi inkar edilemeyecek temel bir fermente süt ürünüdür. Peynirin beslenmedeki yeri ve bileşimindeki besin öğeleri aşağıda tek tek açıklanmıştır (Anonim 2011h).

### **2.11.1. Süt yağı**

Üretiminde kullanılan sütteki yağ oranına bağlı olarak peynirdeki yağ oranları çeşitlilik gösterebilir. Tüketiciler genellikle tam yağlı peynirleri tercih etmektedir. Çünkü süt yağının, peynirin duyusal kalitesine olumlu etkisi büyüktür. Tam yağlı beyaz peynir ve tam yağlı kaşar peyniri yaklaşık % 20-30 oranında süt yağı içerir; bu nedenle kalp-damar problemi olmayan ve özellikle büyüme çağındaki bireylerin günlük diyetlerinde yer alması gereklidir.

### **2.11.2. Protein**

Peyniri besin olarak önemli yapan, içeriğindeki biyolojik değeri yüksek proteinlerdir. Kullanılan sütteki protein oranı, peynirin çeşidi ve işlenme metoduna bağlı olarak farklılık göstermektedir. Peynirler % 10 ila % 30 oranında protein içerebilirler. Çok çeşitli faktörlerce etkilenmekle ve kaynaktan kaynağa değişmekle birlikte insan vücudunun günlük 45-50 gram proteine ihtiyacı vardır. Bu miktarın yaklaşık yarısının hayvansal protein kaynaklarından karşılanması gereklidir.

### **2.11.3. Laktoz**

Laktoz, süt şekeri diye de bilinen ve yalnızca sütte bulunan bir disakkarittir. Peynir yapımı sırasında laktoz büyük ölçüde laktik aside dönüşür, bir kısmı peynir altı suyuna geçer, içinde kalan da olgunlaşma boyunca laktik aside dönüşür. Yani peynir bir karbonhidrat kaynağı değildir. Ayrıca peynir az miktarda laktoz içerdiğinden, laktoz

intolerantlar için rahatsızlık yaratmayacak bir süt ürünüdür (Peynirde yaklaşık 1-3 g/100 g laktoz bulunur).

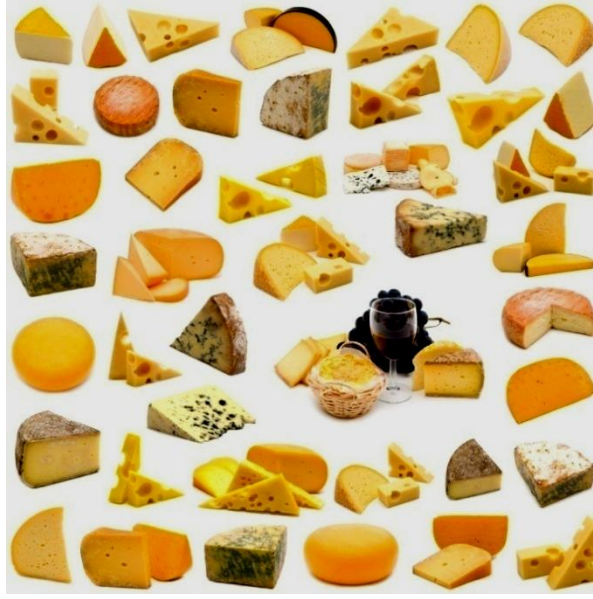
#### **2.11.4. Kalsiyum ve Mineraller**

Kalsiyum kemik ve diş gelişimi için yaşamsal bir mineraldir. Peynirdeki kalsiyum biyolojik değeri yüksek olan yani insan vücudu tarafından kolayca kullanılabilen formdadır. Kalsiyum ayrıca kasların kasılması ve sinir iletimi için vücuda gereklidir. Çocukların, hamile ve emziren kadınların ve menopoz dönemindeki kadınların kalsiyum ihtiyaı artar.

Peynirde, yağ oranına bağlı olarak değişen miktarlarda yağda çözünen vitaminler (A,D,E ve K) bulunur. Peyniri vitamin yönünden önemli yapan, bileşimindeki B grubu vitaminlerdir; bunlar suda çözünen vitaminlerdir. Beyaz peynir B2, B6 ve B12 vitaminleri için kaynak sayılabilecek nitelikte bir süt ürünüdür. Her gün tüketilmesinde yarar vardır (Anonim, 2011a).

#### **2.12. Peynir eşitleri**

Peynirin lokal anlamda pek çok çeşidinin olmasıyla beraber IDF (International Dairy Federation-Uluslararası Süt Federasyonu) 500 farklı peynir çeşidini tanımlamıştır. Bu çeşitlilikler olgunlaştırma süresinin uzunluğu, tekstür, yapım metodu, yağ içeriği, süt tipi, yapıldığı bölge gibi birçok farklı kritere göre belirlenir.



Şekil 2.4. Peynir Çeşitleri (Anonim 2012d)

## 2.13. Peynir Nasıl Yapılır ?

### 2.13.1. Pıhtılaştırma

Peynir üretiminde ilk basamak sütün katı olan pıhtı ve sıvı olarak da peynir altı suyu olarak ayrılmasıdır. Bu işlem sütün ekşitilmesi ve rennet ilavesi olarak iki basamakta gerçekleştirilir. Sütün ekşitilmesi direk sirke asidi gibi asitlerin eklenmesiyle yapılabilindiği gibi, genellikle starter kültür kullanımı tercih edilmektedir. Starter kültür bakterileri sütteki laktozu laktik asite çevirirler. Bu bakteriler aynı zamanda bazı enzimleri de ürettiklerinden dolayı peynirin olgunlaşması aşamasında ve nihai tadın oluşturulması işlemlerinde de görev yapabilirler. Peynirlerin çoğunda starter kültür olarak *Lactococci*, *Lactobacilli* veya *Streptococci* familyalarındaki bakteriler kullanılmaktadır. İsviçre peynirinde ise starter kültürde bunlara ek olarak bir de *Propionibacterium shermani* kullanılır ki, bu bakteri peynirin olgunlaşması esnasında CO<sub>2</sub> baloncukları üreterek peynirin gözenekli olmasını sağlar (Fox, 1999).

Bazı peynirler sadece asidifikasyonla pıhtılaştırılırlarken, peynirlerin büyük bir çoğunluğunda rennet kullanılır. Rennet peyniri, sadece asitle pıhtılaştırılana göre çok

daha sert ve elastiki bir yapıya kavuşturur. Rennet ile peynir yapımında pH'ı çok fazla düşürmeye gerek kalmadığından, olgunlaşma esnasında iş görecektir olan bakterilerin daha fazla hayta kalma şansları olacaktır (Fox, 1999).

Bu işlem esnasında peynir ıslak ve jel halindedir. Ancak peynirin satışa sunulabilmesi için suyu alınmış, tuzlanmış ve paketlenmiş olması gerekmektedir. Suyun alınması için pelte küçük parçalara ayrılır ki bu da suyun süzülmesini kolaylaştırır.

Bazı sert peynir türleri 35-55 °C'ye kadar ısıtılarak suların çok daha fazla uzaklaştırılması sağlanır. Peynirin son tadını alması esnasında kullanılan sütün özelliğinin ve starter kültürdeki bakterilerin fonksiyonu olduğu için genellikle bu tür peynirlerin yapımında termofilik bakteriler kullanılır.

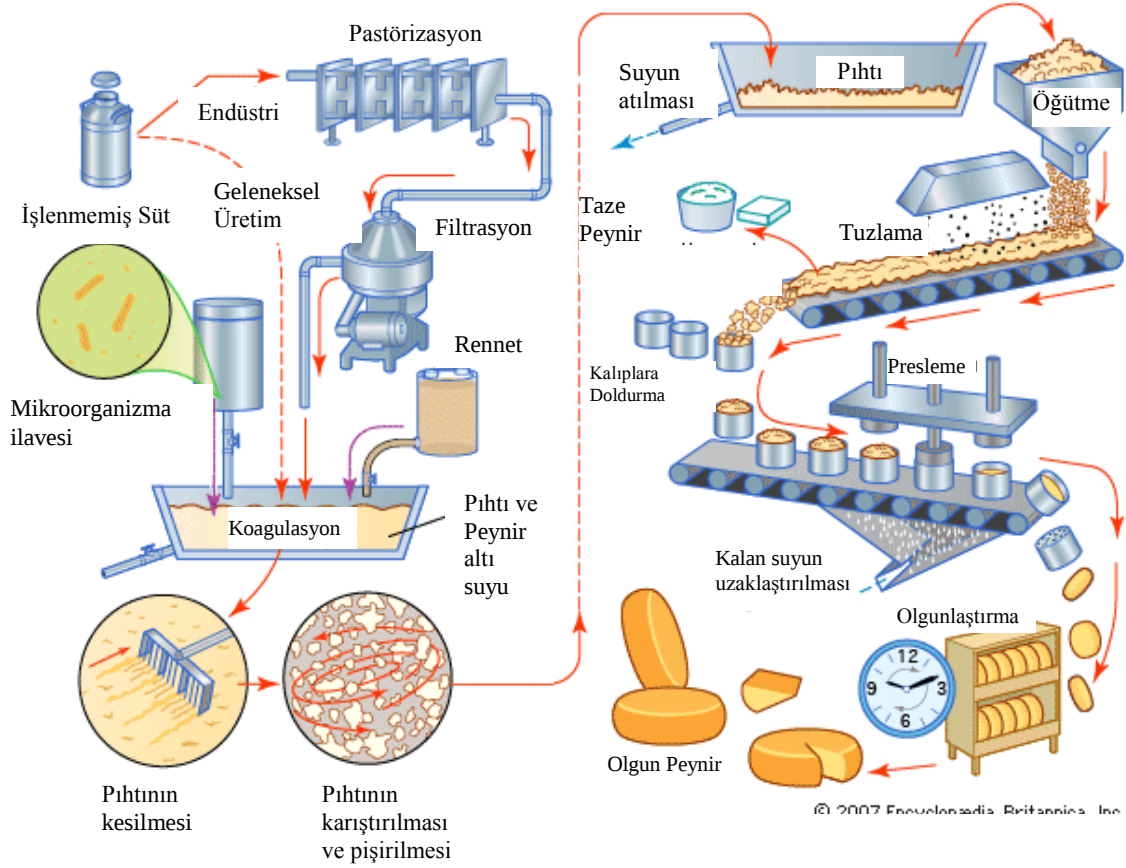
Tuz, peynire tuzluluk tadını vermesi yanında başka rollere de sahiptir. Örneğin pıhtıdaki suyu çekerek peynirin raf ömrünün artırılmasında (küflenmeyi önleyerek) önemli rol oynamasının yanı sıra, proteinlerle etkileşerek peynirin tadının sabit kalmasını da sağlar. Bazı peynirler salamura banyolarından geçirilirken, bazıları da direkt olarak kuru tuzla tuzlanabilir (Fox, 2000).

Peynirin tadını ve yapısı etkileyen başka etmenlerde vardır. Örneğin; germe: Pıhtı sıcak su içerisinde gerilir ve yoğrulur. Bu işlem peynire lifli (tel tel) bir yapı kazandırır. Bu teknik özellikle Mozerella peynirinin yapımında kullanılır.

### **2.13.2. Olgunlaştırma**

Yeni yapılan bir peynir genellikle yavan bir tada sahiptir. Elastiki bir yapısı vardır. Bu özellikler bazen hoşta giden peynir olarak görünse de normalde peynir kontrollü şartlarda dinlenmeye bırakılır. Bu periyot olgunlaştırma (ripening) periyodu olarak adlandırılır ve birkaç günden pek çok yıla kadar uzanan bir süre alabilir. Peynir yaşlandıkça mikroplar ve enzimler yapıyı ve yoğun tadı değiştirirler. Bu dönüşüm büyük ölçüde kazein proteinin yıkımının ve süt yağının amino asitlerle, aminlerle ve

yağ asitleriyle oluşturduğu komplekslerin bir sonucudur. Bazı peynirlerin olgunlaşmaları sırasında bazı başka bakteri ve küfler eklenebilir (Fox, 1999).



Şekil 2.5. Peynir Üretimi Akış Şeması (Anonim 2011b)

## 2.14. Rennet

Peynir, süt proteininin peynir mayası veya kültürü ile pıhtılaştırılması ve bu pıhtıdan peynir altı suyunun (whey) ayrıştırılmasıyla elde edilen fermente bir süt ürünüdür. Geleneksel peynir üretiminde süt peynir mayasıyla pıhtılaştırılır. Bu maya bir enzimdir ve görevi bir süt proteini olan kazeini parçalamaktır.

Bu enzimlerin genel adı proteazlardır. Bunların en kalitelisi kappa kazeini parçalama etkisine sahip olan kimoindir (Pepsin de bu enzimlerden biridir). Kappa kazein

parçalanınca süt sıvı halini kaybederek pıhtılaşmaya başlar. Bu enzimler geviş getiren hayvan buzağılarının dördüncü midelerinden (şirden) elde edilir.

## **2.15. Rennet Çeşitleri**

### **2.15.1. Dana Mayası**

Dana midesinden elde edilir. Peynir yapımında gerek tek başına, gerekse domuz ve piliç mayalarıyla beraber kullanılır. Kaliteli peynirlerin hemen hepsinde dana mayası kullanılır.

### **2.15.2. Domuz Mayası**

Bilhassa çedar peynirinin yapımında kullanılır. Elde edilmesi kolay ve ucuzdur. Çoğunlukla dana mayasına karıştırılarak kullanılır.

### **2.15.3. Piliç Mayası**

İyi peynir yapımına elverişli değildir. Daha ziyade dana ve domuz mayalarına katılarak kullanılır.

### **2.15.4. Mikrobik Mayalar**

Özellikle vejetaryenler bu mayayı tercih ederler. *Bacillus polymyyat*, *B. mesentericus*, *B. subtilis* adlı mikroplardan elde edilir. Bunlardan sadece *B.subtilis*'ten elde edilen enzim dana mayasıyla beraber kullanılırsa iyi sonuç vermektedir. Genellikle kalitesiz peynir yapımında kullanılırlar. Elde edilen peynirlerin ağır bir kokusu vardır.

### 2.15.5. Mantar Mayaları

*Mucor pusillus*, *Endothia parasitica*, *Mucor meihei*'den elde edilir. Dana mayasına göre performansları çok düşüktür.

### 2.15.6. Kimyasal Kaynaklı Mayalar

Bunlar genetik mühendisliği ürünleridir. Gen mühendisleri buzağı genlerini mikroplara aktararak kimozen üretmeyi başarmışlardır. Bu tip enzime ilk FDA onayı 1989 yılında verilmiş ve batı ülkelerinde bol miktarda kullanılmaktadır.

### 2.15.7. Mayasız Peynir

Bu tabir iki anlam ifade eder. Birincisinde peynir asitle çökeltilir (lor, çökelek). Diğeri ise kullanılan enzimin hayvansal değil bitkisel kaynaklı olmasıdır (Doğruyol, 2007).

Pek çok aspartik ve diğeri tip proteinazlar bitkilerden elde edilir. Bunların bir kısmı pıhtılaştırıcı olarak denenmiştir. *Benincasa cerifera*, *Calotropis procera*, *Dieffenbachia maculata*, *Solanum dobium*'un meyve kısımları, *Centaurea calcitrapa*, ve *Cynara cardunculus* çiçekleri, incir (*Ficus carica*), kenger otu (*Cynara cardunculus*) ananas (*Ananas sativa*) ve hintyağı tohumu (*Ricinus communis*) gibi bitkilerden elde edilen protezların sütü pıhtılaştırabildiği saptanmıştır. Ancak sığır sütünden peynir yapımında kullanımları, genel olarak başarısızdır. Çünkü süt pıhtılaştırma aktiviteleri aşırı proteolitik bulunmuştur. Aşırı proteoliz peynir veriminde azalmaya ve olgun peynirde aroma (acılık) ve tekstür (yumuşama) kusurlarına neden olabilir (Sousa ve ark., 2001; Low ve ark., 2006).

## 2.16. Maya İle İlgili Tartışma Konuları

Peynir mayasıyla ilgili olarak dünya ölçeğinde süregelen ve halende sıcaklığını koruyan bazı tartışma konuları vardır. Bu tartışmaların başlıkları aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

### 2.16.1. Dini Duyarlılık

İslam dini ve Musevilik et ürünlerinin tüketimiyle alakalı olarak bir takım kurallar koymuştur. Bunlar geleneksel yollarla üretilen peynir mayasını da kapsar. Amerika'daki İslami Yiyecek ve İçecekler Konseyi (Islamic Food and Nutrition Council of America) şu açıklamayı yapmıştır, her hangi bir gıdanın helal olabilmesi için belli bazı hayvan ürünleri ile bazı hayvan ürünleri ile bazı işlemlerden geçmemiş olması gerekmektedir. Konu peynir mayası olduğunda (danadan dahi elde edilse) dananın usulüne uygun kesilmiş olması ve elde edilen mayanın Müslümanlar için yasaklanmış katkı maddesi içermemesi ve uygun olmayan bir işleme tabi tutulmaması şarttır. Benzer şartlar musevilikte de geçerlidir.

### 2.16.2. Hayvan Hakları

Hayvan hakları savunucuları (peynir elde etmek için başka alternatifler varken) maya elde etmek amacıyla bir buzağının sadece midesini çıkarmak için boğazlanmasının insani olmayacağını iddia etmektedirler. Onlara göre peynir yemek isteyenler genetik ve mikrobiyal kaynaklı mayalarla üretileni tercih etmelidirler.

### 2.16.3. Genetik Mühendisliği

Genetik mühendisliği geleneksel peynir mayasına alternatif kimozen enzimini üretmeyi başarmıştır. Buzağıdan alınan kimozen geni normal şartlarda kalın bağırsaklarda yaşayan bir bakteri olan *Escherichia coli* gibi bazı mikroorganizmalara aktararak bu mikroorganizmaların mikro düzeyde kimozen üretmesini sağlayan bir atölyeye dönüştürülmesi sağlanmıştır.

Hayvan genetik materyali bir kez bakteri içerisine aşılandıktan sonra artık buzağı hücrelerine ihtiyaç duyulmamakta ve daha sonra üretilen mikroplar bu geni taşıyarak, devamlı maya üretmektedirler.

Kimozin genini taşıyan DNA'lar *Escherichia coli*'den başka farklı mikroorganizmalara da transfer edilmiş ve enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunlar; *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* ve *Pichia pastoris* gibi mikroorganizmlardır. Özellikle *Kluyveromyces lactis* aracılığıyla kimozin üretimi ciddi ticari boyuta ulaşmıştır. Dünya kimozin pazarının yarısından fazlası *K. lactis* ile rekombinant olarak üretilen enzim ile karşılanmaktadır

Bu ürünler hayvanlardan elde edilen enzimlerle eşdeğer ürünlerdir. Bunlar sayesinde hayvan kaynaklı maya piyasasındaki dalgalanmaların önüne geçilmiştir. Günümüzde peynirlerin yaklaşık% 70'i bu ürünlerle elde edilmektedir.

Bu mayaların peynir piyasalarında sağladığı kolaylık ve rahatlamının yanı sıra olası bazı riskleri de mevcuttur. Gen teknolojisinin taşıdığı potansiyel tehlikeler peynir mayaları içinde söz konusudur.

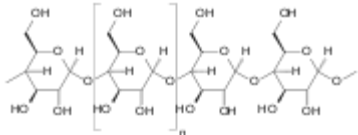
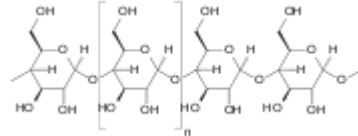
#### **2.16.4. Vejetaryenlik**

Vejetaryenler için hangi tip peynir mayasının uygun olduğu konusu zaman zaman vejetaryenler arasında tartışmalara neden olmaktadır. Bazı vejetaryenler süt ve süt ürünlerini tüketmezler. Süt ürünlerini tüketenler için ise hayvan kaynaklı mayalar yerine, mantar ve bakterilerden elde edilen mayalar tercih edilir. Bazı vejetaryen kuruluşlar ise gen mühendisliği ürünlerinin kullanımını onaylamışlardır (Doğruyol 2007).

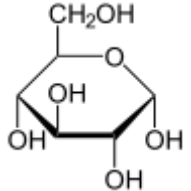
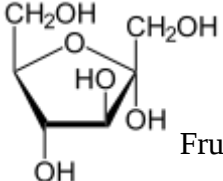
#### **2.17. Endüstriyel Enzimlerin Kullanım Alanları**

Enzimler, spesifik katalizörlere gerek duyulan kimya endüstrisinde ve diğer endüstriyel uygulamalarda kullanılır. Ancak, enzimler genelde katalizleyebildikleri tepkime sayısı, organik çözücü ve yüksek sıcaklıklarda stabiliteleri açısından sınırlıdır. Bu yüzden protein mühendisliği aktif bir araştırma sahası olmuştur, konusu yeni özelliklere sahip enzimlerin tasarımıdır. Bunun için ya rasyonel tasarım ya da laboratuvar ortamında in vitro yöntemler kullanılır.

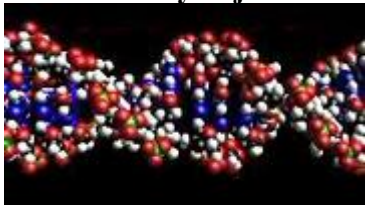
Çizelge 2.6. Endüstriyel Enzimlerin Kullanım Alanları (Renugopalakrishnan ve ark., 2005)

| Uygulama                                                                                                                                                                                           | Kullanılan enzim                                                                                     | Örnekler                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ekmek endüstrisi</b><br><br>Alfa-amilaz nişastadan şeker monomerlerinin serbestleşmesi reaksiyonunu katalizler | Fungal alfa-amilaz enzimleri normalde 50 derecede etkisizleşirler ve pişirme sırasında imha olurlar. | Undaki nişastanın şekere parçalanmasını katalizler. Mayanın şeker üzerindeki etkisi ile karbon dioksit meydana gelir. Ekmek ve ekmek ürünleri yapımında kullanılır.  |
|                                                                                                                                                                                                    | Proteazlar                                                                                           | Bisküvi imalatçıları undaki proteaz seviyesini azaltmak için kullanırlar.                                                                                                                                                                              |
| <b>Bebek gıdaları</b>                                                                                                                                                                              | Tripsin                                                                                              | Bebek gıdalarının önceden sindirimi amacıyla kullanılırlar.                                                                                                                                                                                            |
| <b>Meyve suları</b>                                                                                                                                                                                | Selülaazlar, pektinazlar                                                                             | Meyve sularının berraklaştırılması.                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Et yumuşatması</b>                                                                                                                                                                              | Papain                                                                                               | Piştirilecek etin yumuşamasını sağlar.                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Kauçuk endüstrisi</b>                                                                                                                                                                           | Katalaz                                                                                              | Peroksitten oksijen üretilerek lateksten sünger kauçuk imal etmek için kullanılır.                                                                                                                                                                     |
| <b>Biyoyakıt endüstrisi</b>                                                                                                                                                                        | Selülaazlar                                                                                          | Selülozu fermente edilebilir şekerlere parçalamak için kullanılır.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                                                                                                                                    | Ligninazlar                                                                                          | Lignin atıklarının kullanımı                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Kontakt lens temizleyicileri</b>                                                                                                                                                                | Proteazlar                                                                                           | Enfeksiyon olmaması için kontakt lenslerden proteinleri çıkarmak amacıyla kullanılır.                                                                                                                                                                  |
| <b>Fotoğraf endüstrisi</b>                                                                                                                                                                         | Proteaz (fisin)                                                                                      | Artık fotoğraf filmindeki jelatini çözerek içindeki gümüşü elde etmek için kullanılırlar.                                                                                                                                                              |

Çizelge 2.6. devam

|                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                |                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Alkol endüstrisi</b>                                                                                                                                                                                                              | Bira üretiminde arpanın ezilmesi ile enzimler salınır.         | Bu enzimler nişasta ve proteinleri parçalayarak basit şekerler, amino asitler ve peptitler üretir, bunlar da fermentasyonda kullanılır.                                                                                          |
|  <p>Malt üretimi için arpanın çimlendirilmesi.</p>                                                                                                  | Arpa enzimlerinin endüstriyel üretimi                          | Biracılıkta yaygınca kullanılır, arpadaki doğal enzimler yerine kullanılırlar.                                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Amilaz, glukanaaz, proteazlar                                  | Malttaki polisakkarit ve proteinleri parçalarlar.                                                                                                                                                                                |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Betaglukanazlar ve arabinoksilanazlar                          | Arpa bulamacını (wort) ve biranın filtreleme özelliklerinin iyileştirilmesi.                                                                                                                                                     |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Amiloglukozidaz ve pullulanazlar                               | Düşük kalorili bira yapımı ve fermentasyonun ayarlanması.                                                                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Proteazlar                                                     | Biranın saklanması sırasında oluşan bulanıklığın giderilmesi.                                                                                                                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Asetolaktatdekarboksilaz (ALDC)                                | Diasetil oluşumunun engellenmesi.                                                                                                                                                                                                |
|  <p>Rokfor peyniri</p>                                                                                                                            | Genç geviş getirici hayvanların midesinden elde edilen Rennin. | Peynir üretimi, proteinin hidrolizi için.                                                                                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Mikroplar tarafından üretilmiş enzim                           | Süt endüstrisinde artarak kullanılmaktadır.                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Lipazlar                                                       | Mavi küflü Rokfor peynirinin üretimi sırasında peynirin olgunlaşmasında kullanılır.                                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Laktazlar                                                      | Laktozun glukoz ve galaktoza parçalar.                                                                                                                                                                                           |
| <b>Nişasta endüstrisi</b><br> <p>Glukoz</p><br> <p>Fruktoz</p> | Amilazlar, amiloglucosideazlar ve glukoamilazlar               | Nişastayı glukoz ve çeşitli şuruplara dönüştürür.                                                                                                                                                                                |
|                                                                                                                                                                                                                                      | Glukoz izomeraz                                                | Nişastalı malzemelerden yüksek fruktozlu mısır şurubu üretiminde glukozu fruktoza dönüştürür. Bu şurupların kuvvetli tatlandırıcı özellikleri ve aynı tatlılık derecesi için sükroza kıyasla daha düşük kalori değerleri vardır. |

Çizelge 2.6. devam

|                                                                                                                                                      |                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Kâğıt endüstrisi</b></p>  <p>Bir kâğıt fabrikası.</p>         | <p>Amilaz</p> <p>Ksilanaz</p> <p>Selülaz</p> <p>Ligninazlar</p>                 | <p>Nişastanın daha düşük viskoziteye indirerek kâğıdın şekillenmesi ve kaplanması kolaylaştırır.</p> <p>Ksilanaz, renk gidermek için kullanılan çamaşır suyu miktarını azaltır.</p> <p>Selülaz lifleri düzgünleştirir, su çekilmesini artırır ve mürekkep giderilmesini kolaylaştırır; lipazlar kalınlığı azaltır; ligninazlar lignini sindirip kâğıdı yumuşatırlar</p> |
| <p><b>Biyolojik çamaşır tozu</b></p>                                                                                                                 | <p>Başlıca proteazlar, bunlar bakteriler tarafından hücre dışına salgılanır</p> | <p>Giysilerden protein lekelerinin çıkarılması için kullanılırlar.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                      | <p>Amilazlar</p>                                                                | <p>Bulaşık makinası deterjanlarında, dayanıklı nişasta lekelerinin çıkarılmasında kullanılırlar.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                                                                                                                                                      | <p>Lipazlar</p>                                                                 | <p>Yağ lekelerinin çıkartılmasını kolaylaştırmak için kullanılırlar.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                                                                                                                                      | <p>Selülazlar</p>                                                               | <p>Çamaşır yumuşatıcılarında kullanılır.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <p><b>Moleküler biyoloji</b></p>  <p><b>DNA çift sarmalı.</b></p> | <p>Restriksiyon enzimleri, DNA ligaz ve polimerazlar</p>                        | <p>Gen mühendisliğinde DNA'nın manipülasyonu için, farmakoloji, tarım ve tıpta kullanılır. Restriksiyon sindirimi ve polimeraz zincir reaksiyonu için esastırlar. Moleküler biyolojinin ayrıca adli tıpta da önemli bir yeri vardır.</p>                                                                                                                                |

## 2.18. Enzim Teknolojisi

Enzimlerin endüstriyel süreçlerde kullanılmaları işlemlerine “enzim teknolojisi” denir.

Enzim Teknolojisi:

- ✓ Mikrobiyal işlemler (üretici suşların seçimi, geliştirilmesi vb.),
- ✓ Enzimlerin fermentasyon yoluyla üretimleri (büyük ölçekte üretimi için yapılan besiyeri, ortam koşulları vb. düzeylerdeki optimizasyonlar),
- ✓ Katalitik etkinliğin artırılması için enzimlerin üç boyutlu yapılarının değiştirilmesi (protein mühendisliği),
- ✓ İzolasyonları ve immobilizasyonları (enzimlerin çözünmeyen destek materyaller yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmesi) çalışmalarını kapsar.

Enzimler binlerce yıldır bilinçsizce de olsa insanlar tarafından peynir, bira ve ekmek yapımında kullanılmışlardır. Günümüzde enzimlerin kullanıldığı endüstriyel alanlar oldukça çeşitlenmiş ve mikroorganizmalar kullanılarak her yıl üretilen saf enzimlerin miktarları 500 ton gibi değerlere ulaşmıştır. 2000 yılında endüstriyel enzimler için pazardaki toplam değer yaklaşık 2 milyar dolardır ve büyüme hızı yılda % 5-10’dur (Anonim 2012e).

### 2.18.1. Mikrobiyal Enzim Üretimi

Bu yolla enzim üretiminin ilk aşaması uygun katalitik özgüllük ve istenilen fiziksel özellikleri taşıyan mikroorganizmanın seçimi ile başlar. Mikroorganizma düzeyindeki modifikasyonlar genellikle hücre başına üretilen enzim miktarının artırılmasına yöneliktir. Ayrıca kültür ortamı ve fermentasyon koşulları da enzim üretim maliyetini düşürmeye yönelik olan önemli parametrelerdendir.

Suş seşiminde uygun fiziksel özellikler taşıyan enzimlerin seçimi genellikle bir organizmanın optimum üreme koşulları ile enzim özellikleri arasında pozitif korelasyonun varlığı esasına dayanır. Örneğin reme sıcaklığı ile hücre dışı proteazların stabilitesi arasında pozitif bir ilişki vardır. Hücre içi enzimler üzerine çevresel koşulların etkisi söz konusu değildir.

Farklı mikroorganizmalar tarafından aynı reaksiyonu katalizleyen enzimlere izofonksiyonel enzimler denir. Bu izofonksiyonel enzimler farklı pH optimumları gibi değişik özellikler taşırlar. Bu farklı özellikler istenenler mikroorganizma seşiminde kriter olur.

### 2.18.2. Koji Prosesi (Solid-State Fermentasyon)

Mikroorganizmalar katı ya da yarı katı tavalardaki besiyerlerinde üretilirler. Bu katı substratlar buğday kepeği, buğday sapı, pirinç kabuğu, arpa, suyu çıkarılmış şeker kamışı vb. dir. Çoğunlukla bu katı substratlar proteazlar, lipazlar, selülazlar ve oksidazlar gibi enzimlerin üretiminde funguslar için kullanılır. Bu tip fermentasyonda kontaminasyondan korunmak, sabit sıcaklık, havalandırma ve nemlendirme sağlamak zordur (Anonim 2012e).



şekil 2.6. Solid State Fermentasyon (Anonim 2012e)

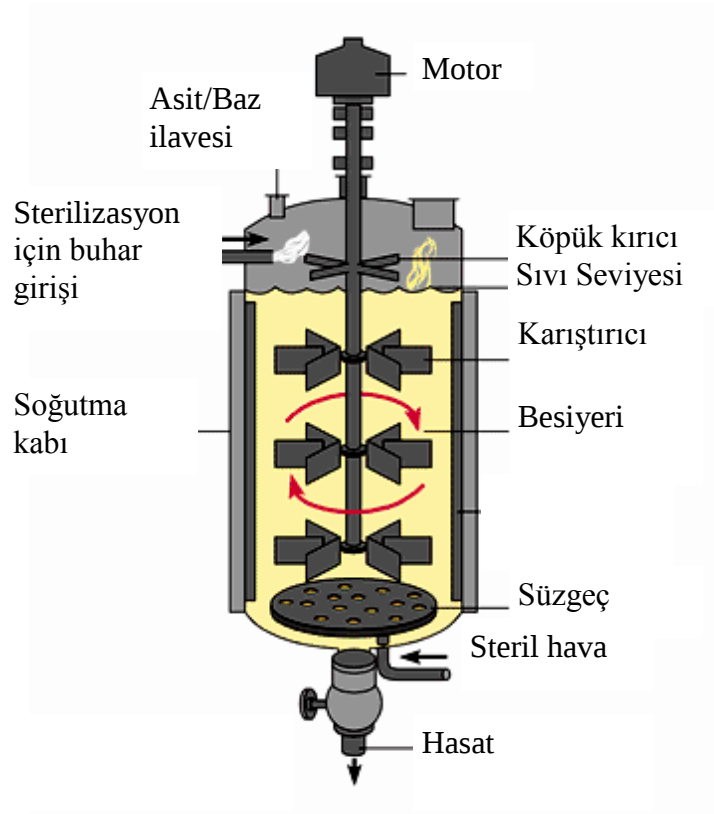
### 2.18.3. Fermentör Kullanımı

Modern yöntemdir. Bu fermentörlerin kullanımı Solid state fermantasyonun olumsuzluklarını ortadan kaldırır. Mikrobiyal enzim üretiminde başlıca 4 çeşit fermentör kullanılır:

- ✓ Karıştırıcılı tank tipi fermentör
- ✓ Bubble column
- ✓ Air lift
- ✓ Packed bed

#### Karıştırıcılı Tank Tipi Fermentör

Bir motor yardımıyla pervaneler kullanılarak karıştırmanın sağlandığı fermentör tipidir. Besiyeri ortamına asit-baz ilave edilerek istenilen pH'da sabit tutulabilir.



Şekil 2.7. Karıştırıcılı tank tipi fermentör (Anonim 2012e)

### Bubble Column Fermentör

Altan hava sağlanarak uygun karışım ve havalandırmanın elde edildiği uzun, silindirik kolonlardır.



Şekil .2.8. Bubble Column Fermentör (Anonim 2012f)

### Air Lift Fermentör

Havalandırma ve karıştırma, havanın reaktör içerisinde aşağı ve yukarı yönlü çevrimi ile sağlanır.



Şekil 2.9. Air Lift Fermentör (Anonim 2012g)

### Packed Bed Fermentör

Kültür ortamı, substrat parçacıklarından veya immobilize enzimden oluşan dolgulu yatak içerisinde geçirilir. Ürün sürekli ya da kesikli proseslerle elde edilir.



Şekil 2.10. Packed Bed Fermentör (Anonim 2012h)

## **2.19. Enzim Saflaştırma Metodları**

### **2.19.1. Enzim Kaynağından Enzimin Çıkarılması**

Bu işlem her kaynak için farklı şekillerde yapılabilir. Mesela bakteri için sonikasyon kullanılırken, bitki için ezme yöntemi kullanılabilir.

### **2.19.2. Santrifüjleme**

Değişik basamaklarda uygulanabilecek bir işlemdir. Bir önceki basamaktan sonra hücre

organellerinin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için kullanılabilir. Bunun yanı sıra amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra da yapılır. Çok defa başvurulabilecek bir işlemdir.

#### **2.19.3. Amonyum Sülfatla Çöktürme**

Belirli doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat değişik molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olur. Çöktürme işlemlerindeki istenilen aralık bulunduğu kısmi saflaştırma yapılabilir.

#### **2.19.4. Diyaliz**

İstenmeyen küçük maddelerden (örneğin tuzlardan) kurtulmak için yapılan bir işlemdir.

#### **2.19.5. Isıtma**

Aranılan enzimin de özellikleri göz önünde bulundurularak belirli dereceye kadar ısıtma işlemi yapıldığında ilgilenilmeyen diğer bazı proteinler elemine edilebilir.

#### **2.19.6. İzoelektrik pH'ya Göre Çöktürme**

Aranılan enzimin izoelektrik pH'sına göre belli bir pH aralığında karıştırılarak çöktürme işlemi yapıldığında birçok protein ortamdan uzaklaştırılabilir.

#### **2.19.7. Kolon**

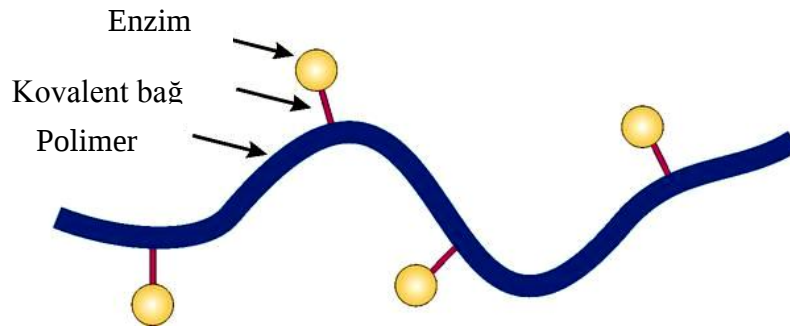
Saflaştırma işlemlerinden en çok saflaştırma derecesi veren işlemdir. Molekül büyüklüğü, elektriksel yük, afinite gibi değişik özelliklerden yararlanılarak hazırlanan kolonlardan numune geçirildiği zaman yüksek bir saflaştırma yüzdesi elde edilir.

## 2.20. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin çözünmeyen destek görevi gören materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmeleri immobilizasyondur. Mikrobiyal hücreler de enzimler gibi immobilize edilir. Tüm hücrelerin immobilize edilmesi saf enzimin gerekli olmadığı proseslerde kullanılan ucuz ve hızlı bir metoddur. Enzim İmmobilizasyonunda beş temel yöntem vardır.

### 2.20.1. Kovalent Bağlama

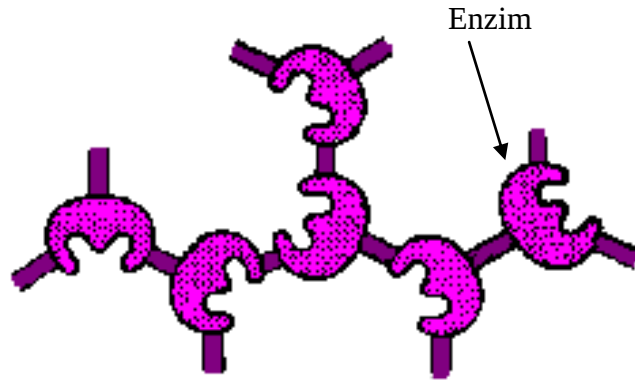
Enzimler kimyasal olarak kovalent bağlarla selüloz, sefadeks, agaroz, poliakrilamid, porlu seramik gibi suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanırlar.



Şekil 2.11. Kovalent bağlama yöntemiyle immobilizasyon (Anonim 2011f).

### 2.20.2. Çapraz Bağlama

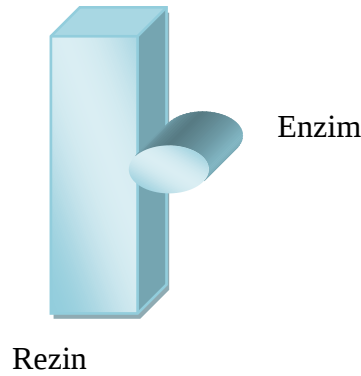
Enzimler glutaraldehit, alifatik diaminler gibi bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanırlar. Bu reaktifler enzim molekülleri arasında bağ oluştururlar. Glutaraldehit enzim moleküllerinin amino gruplarından, diaminler ise karboksil gruplarından çapraz bağlarlar (Anonim 2011c).



Şekil 2.12. Çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyon (Anonim 2011c).

### 2.20.3. Adsorbsiyon

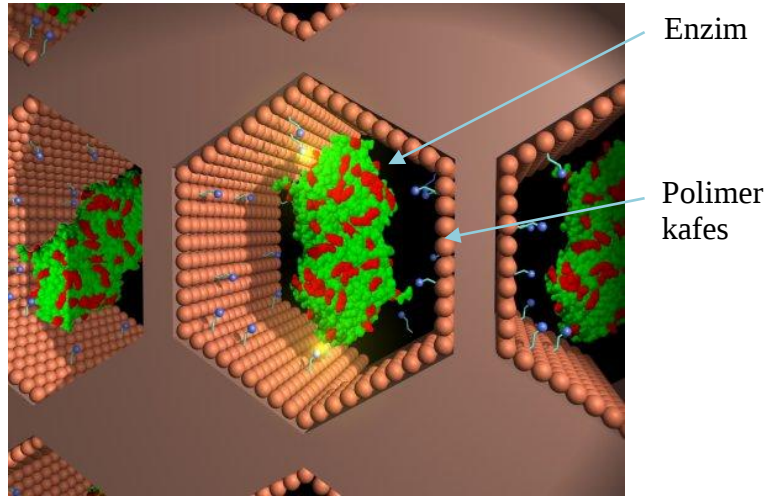
Enzim moleküllerinin taşıyıcıların yüzeyine adsorblanmaları esasına dayanır. Kolay bir yöntemdir. Agaroz, sefadeks türevleri, selüloz türevleri, metal tuzları ve mineraller adsorban olarak kullanılırlar.



Şekil 2.13. Adsorbsiyon yöntemiyle immobilizasyon (Anonim 2011d).

### 2.20.4. Tutuklama

Enzimler yapay ya da doğal polimer kafesleri içinde tutuklanırlar. Polimer kafesler içine substrat girer ve ürün dışarı çıkar. Çapraz bağlı poliakrilamid jeller, Ca alginat, kappa karragenan bu polimerlerin örneklerindendir.

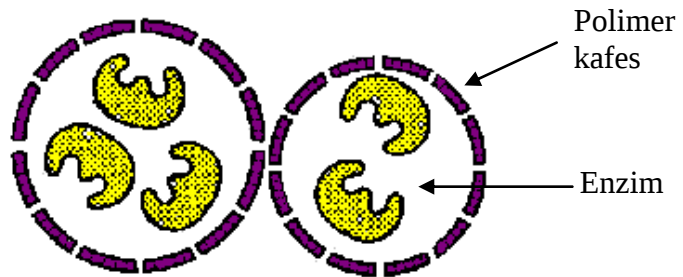


Şekil 2.14. Tutuklama yöntemiyle immobilizasyon (Anonim 2011e).

#### 2.20.5. Kapsülleme

Enzimler çeşitli tipteki membranlar içine alınırlar. Bu membranlar yarı geçirgendir. Düşük molekül ağırlıklı substratı ve molekülleri geçirirler. Hegza metilen diamin mikrokapsüllemeye kullanılır.

Ayrıca bu yöntemlerin kombinasyonları da, tutuklama-çapraz bağlama, kapsülleme-çapraz bağlama gibi, enzim immobilizasyonunda kullanılır.

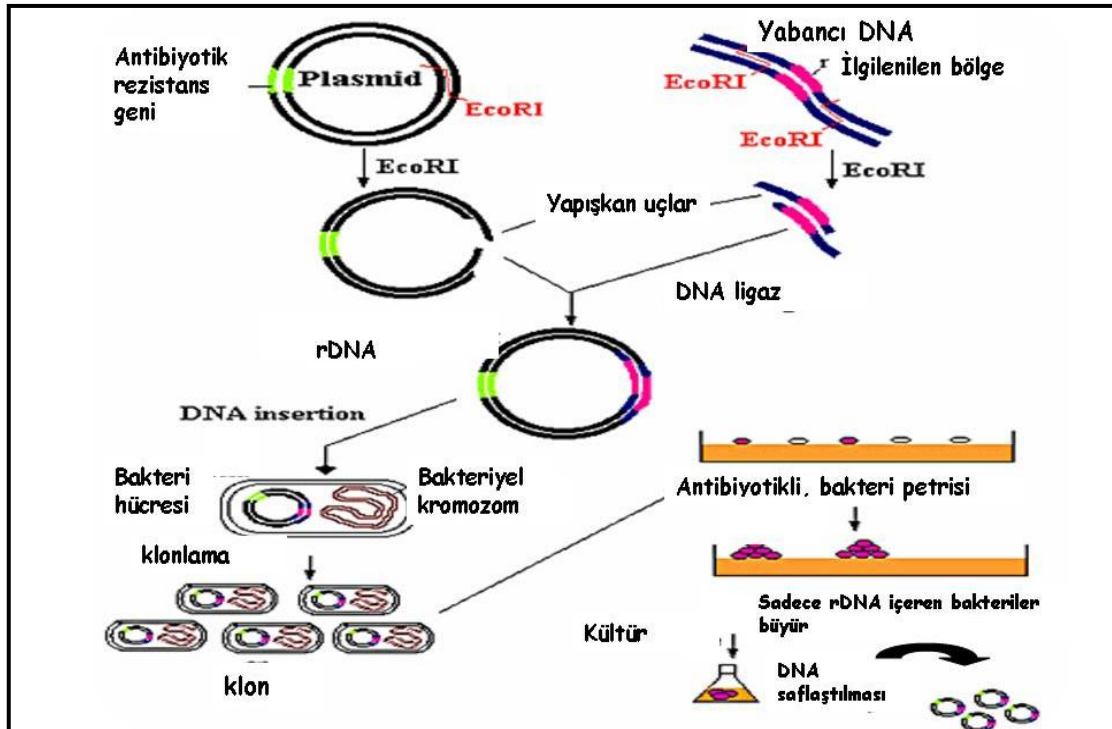


Şekil 2.15. Kapsülleme yöntemiyle immobilizasyon (Anonim 2011f).

## 2.21. Gen Klonlaması

Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşılarının oluşturulması ve rekombinant proteinlerin açıklatılması gibi amaçlarla yapılmaktadır. Rekombinant DNA ya da rekombinant DNA teknolojisi, çoğunlukla farklı biyolojik türlerden elde edilen DNA moleküllerinin, genetik mühendislikle kesilmesi ve elde edilen farklı biyolojik kaynaklı DNA parçalarının birleştirilmesi işlemine ve bu işlem sonucu üretilmiş olan yeni DNA molekülüne verilen isimdir. (Brown, 1990; Alberts ve ark. 1994; Lewin, 2000; Kuk ve Erensoy, 2008 ).

Rekombinant DNA teknolojisi, günümüzde genetik hastalıklarda tanı, rekombinant aşı yapımı, başka canlılardan gen transferi yoluyla transgenik bitki ve hayvan soyları elde edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Alper, 2003; Alper, 2004).



Şekil 2.16. Plazmid kullanarak gen klonlanması ve rekombinant DNA eldesi (Anonim, 2010a)

Rekombinant teknolojisi; Hamilton Smith tarafından 1970’de *Heamophilus. influenzae*’den elde edilen restriksiyon endonükleaz enzimlerin keşfi ile başlamıştır. Bu enzimler özgün DNA bölgelerini tanıyıp DNA’yı bu özgün bölgelerden kesen enzimlerdir (Sultuybek ve ark., 1995).

## 2.22. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri

Nükleik asit metabolizması üzerindeki onlarca yıldır süren çalışmaların bir sonucu olan bir dizi enzimin varlığı, rekombinant DNA teknolojisi için çok önemlidir (Nelson ve Cox, 2005).

Restriksiyon enzimleri, bir bakterinin kendine özgü DNA’yı kesmezken yabancı bir DNA’yı tanıdığı ve onu belirli bölgelerden kestiğinin anlaşılması ile keşfedilmiştir. Bakterinin kendi DNA’sı bazı özgün bazlara (A ve C) metil grubu bağlanarak modifiye edildiğinden restriksiyon enzimleri tarafından hidrolizlenememektedir. Restriksiyon enzimleri DNA içerisindeki belirli bir diziyi tanır ve bu bölge modifiye olmamış ise buradaki fosfodiester bağımlı hidrolizlerler (Sultuybek ve ark.,1995).

Her bir bakteri türünde farklı diziyi tanıyan bir restriksiyon enzimi bulunmakla birlikte bazı bakterilerde birden fazla restriksiyon enzimi vardır. Restriksiyon enzimlerinin en belirgin özelliği DNA üzerinde tanıdıkları baz dizilerinin çift yönlü bir simetri göstermesidir. Komplementer iki DNA zincirinde belirli bir uçtan (5' veya 3' ucundan) başlayarak okunduğunda aynı baz dizisini içeren bu dizilere “polindrome” (ters yönden okunduğunda aynı anlamı veren) adı verilmektedir (Şekil 2.17). Restriksiyon enzimi tarafından, bir iplik üzerindeki özgün iki baz arasında bulunan fosfodiester bağları kırılırken diğer iplikteki eşdeğer bazlar arasındaki fosfodiester bağları da kırılır. Kesim sonucunda DNA uçlarında birbirine komplementer nükleotitler ortaya çıkar. Bu uçlara genellikle komplementer yada yapışkan uç denir (Sultuybek ve ark.,1995).



Şekil 2.17. Yapışkan uçlu (polindrom dizili) restriksiyon enzim kesim bölgesi (Anonim, 2010b)

Bazı enzimler ise DNA'nın her iki iplikçliğini aynı noktada kestiği için herhangi bir yapışkan uç ortaya çıkmamaktadır (Şekil 2.18). Bu tip uçlara küt (blind) uç denir (Sultuybek ve ark.,1995).

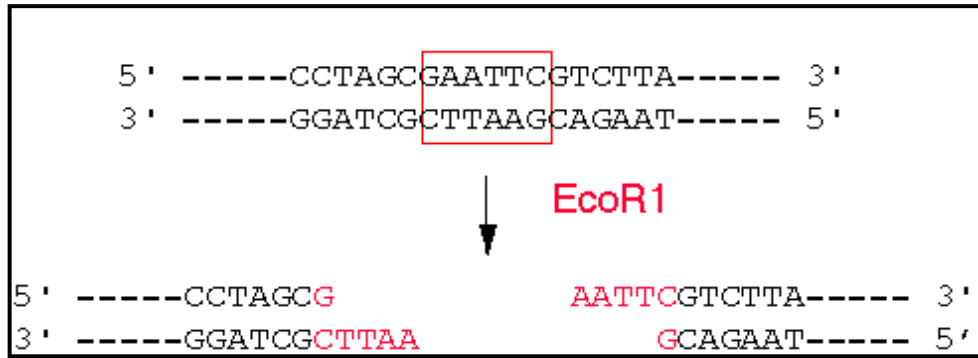


Şekil 2.18. Küt uçlu restriksiyon enzim kesim bölgesi (Anonim, 2010b)

Restriksiyon enzimleri ile kesilme sonucu DNA'nın 5' ucunda fosfat grubu, 3' ucunda bir hidroksil grubu ortaya çıkar. Her restriksiyon enzimi, üç harften oluşan bir kısaltma ile belirtilmekte ve enzimin izole edildiği bakteri genomunu ve türünü simgelemektedir (Çizelge 2.7) (Şekil 2.19). Aynı bakteride birden fazla enzim izole edildiğinde I, II, III gibi kısaltmalar ismin sonuna eklenmektedir (Watson ve ark., 1983).

Çizelge 2.7. Bazı restriksiyon enzimleri ve izole edildiği bakteriler (Anonim, 2010b)

| Enzim           | Organizma                         | Tanım Bölgesi |
|-----------------|-----------------------------------|---------------|
| <i>EcoRI</i>    | <i>Escherichia coli</i>           | G↓AATTC       |
| <i>BamHI</i>    | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | G↓GATCC       |
| <i>Bgl II</i>   | <i>Bacillus globigii</i>          | A↓GATCT       |
| <i>Hind III</i> | <i>Haemophilus influenza</i>      | A↓AGCTT       |
| <i>Pst I</i>    | <i>Providencia stuartii</i>       | CTGCA↓G       |
| <i>Sal I</i>    | <i>Streptomyces albus</i>         | G↓TCGAC       |
| <i>Sma I</i>    | <i>Serratia marcescens</i>        | CCC↓GGG       |
| <i>Sau 3A</i>   | <i>Staphylococcus aureus</i>      | ↓GATC         |
| <i>Hinf I</i>   | <i>Haemophilus influenza</i>      | G↓ATC         |
| <i>Hpa I</i>    | <i>Haemophilus parainfluenza</i>  | GTT↓AAC       |
| <i>Taq I</i>    | <i>Thermus aquaticus</i>          | T↓CGA         |



Şekil 2.19. Restriksiyon enzimi *EcoR* I ile kesim (Anonim, 2010c)

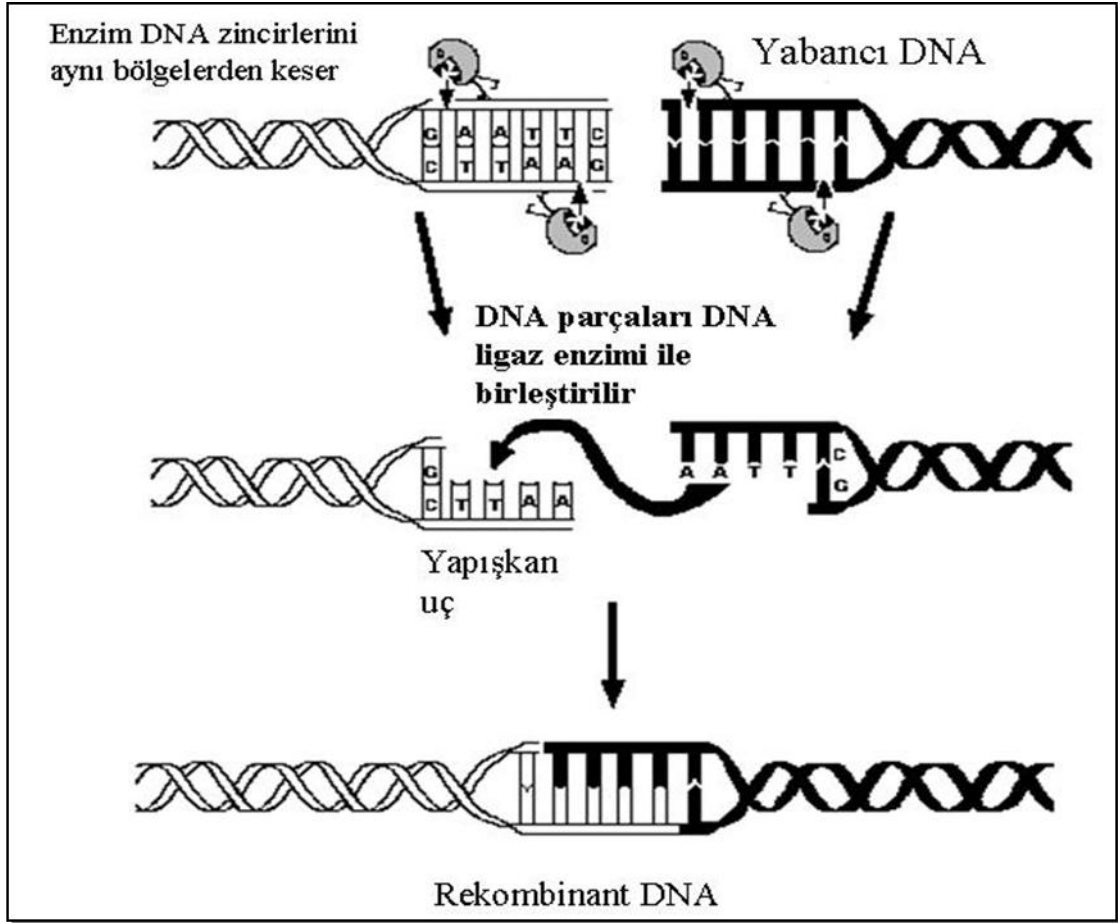
### 2.23. Gen DNA'sının Vektör DNA'sı ile Birleştirilmesi

Saf olarak hazırlanan genomik DNA segmentleri ile vektör DNA (eğer plazmid ise) 37°C - 40°C'de birlikte 3–5 dakika inkübasyona bırakılır. Böylece, karşılıklı yapışkan uçların birleşmesi sağlanır. Yapışkan uçları birbirine bağlamada, ortama, DNA ligaz enzimi de ilave edilir ve birleşme sağlamlaştırılır. DNA ligaz enzimi bu işlevini, DNA'nın bir ucundaki 5'-P (fosfat) ile diğer DNA'nın 3'-OH ucu arasında fosfodiester bağları kurarak gerçekleştirir (Arda, 2000).

Bu işlem sonunda birleşen moleküller (rekombinant plazmid) oluşabileceği gibi resirkülarizasyon nedeniyle birleşmeyen genomik DNA segmentleri ve plazmid DNA'sı da meydana gelebilecektir. Ayrıca, plazmidle sadece genomik DNA segmenti değil, ortamda çok sayıda bulunan diğer genleri taşıyan veya taşımayan ve uygun uzunluktaki segmentler de birleşebilirler (Arda, 2000).

DNA'yı özgül dizilerinden keserek, bir dizi küçük parçalar oluşturulur. Bunun ardından agaroz jel elektroforezi yapılarak istenen uzunluktaki parçalar belirlenir. Hedeflenen DNA parçası izole edildiğinde, DNA ligaz enzimi kullanarak benzer şekilde kesilmiş klonlama vektörüne bağlanır (Şekil 2.20). Karşılık gelen tamamlayıcı yapışkan uçların baz eşleşmeleri bu bağlama tepkimesini kolaylaştırır. Küt uçlarda ancak daha az verimlilikle bağlanabilir. Örneğin; *EcoR* I tarafından oluşturulan bir DNA parçası *BamH* I tarafından oluşturulan bir parçayla bağlanmayacaktır. Bağlanmakta olan uçlar arasına sentetik DNA parçaları (bağlayıcılar) sokularak, yeni DNA dizileri

oluşturulabilir. Restriksiyon enzimleri için çoklu tanıma dizilerine sahip DNA parçalarına çoklu bağlayıcılar denir (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 2.20. *EcoR* I ile kesim sonrası; DNA ligaz enzimi ile uçların bağlanması (Anonim, 2010e)

#### 2.24. Rekombinant Plazmid DNA'sının Alıcı Hücreye Aktarılması

Vektör olarak plazmidlerin) kullanıldığı durumlarda alıcı hücre olarak da bu plazmidlerin ait olduğu uygun konakçı *E. coli*, seçilerek kullanılır (Arda, 2000).

Vektör ve genomik DNA segmentleri birleşmesinden oluşan konjugat, yeteri miktarda konakçı *E. coli* ile birlikte bulundurulduktan sonra, içinde uygun bir sıvı besi yeri ve  $\text{Ca}^{+2}$  iyonları bulunan erlenmayere transfer edilirler. *E. coli* 60–90 dakika kadar 37°C'de üretilir. Ortama katılan  $\text{CaCl}_2$  *E. coli* 'nin yüzeyini, sirküler plazmid DNA'sı için

geçirgen hale getirir ve rekombinant plazmid kolayca bakteriye transfekte olur (Arda, 2000).

## **2.25. Gen Ürününün Kontrolü**

Bakteri içinde veya aynı zamanda dışa salgılandığı durumlarda filtratlardan, gen ürünü saptandığı hallerde aktivite, saflık, zararsızlık, yan etkileri vs. etkinliklerinin dikkatlice incelenmesi gerekmektedir. Bakteri içinde veya filtratlarda bulunan gen ürünleri, bakterilere ait endo- ve ekzo- proteinlerle, toksin veya toksik maddelerle, enzimlerle, metabolitlerle, vs. yabancı ve zararlı maddelerle kontamine olabilirler. Bu nedenle gen ürününün bunlardan ayrılması ve saf olarak elde edilmesi gereklidir. Bunun ilk aşamasını klonlamada kullanılan mikroorganizmaların iyi seçilmesi oluşturur. Ayrıca, bakteri içinde bulunan endoenzimler ve dışa salgılanan ekzoenzimler (hidrolitik enzimler) sentezlenen gen ürünü proteinini hidrolize ederek ayrıştırabilir ve etkinliğini bozabilirler. Bazen de gen ürünü, bakteri için toksik olabilir (Arda, 2000).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

“ARÇELİK” MD<sub>500</sub> mikrodalga fırın,  
 “BIORAD” DNA Engine, PCR makinesi,  
 “BIORAD” Güç kaynağı (SDS ve agaroz için),  
 “BIOSAN” Bio TDB-100 Termostatlı Blok Isıtıcı,  
 “BIOSAN” Combi Spin FVL 2400N, Spin Cihazı,  
 “BIOSAN” ES 20, Çalkalayıcı İnkübatör,  
 “GEL LOGIC 200” Agaroz jel fotoğraf makinesi,  
 “HETTICH” Mikro 22R santrifüj,  
 “HETTICH” -80 dondurucu,  
 “HMC-HIRAYAMA veya HICLAVE HV-50L” otoklav,  
 “VARIAN CARRY 50” UV/VIS Spektrofotometresi,  
 “MEMMERT” Etüv,  
 “OPTIC-PRO” 4830P Tarayıcı,  
 “SONICS (VCX130)” Sonikatör  
 “SYNGENE” SYTC/1422, UV Gösterici,  
 “UĞUR” Dikey Soğutucu +4°C,  
 “VELP SCIENTIFICA” ARE, Isıtıcı-Magnetik Karıştırıcı,  
 “VESTEL” GTP 455A, Buzdolabı,  
 “VISION” VS 30 000i, Yüksek Hızlı Santrifüj,  
 “VISION” Kar makinesi,  
 “ZHICHENG” ZHWY-111C, Çalkalayıcı İnkübatör,

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

LB Broth Base “Invitrogen- lennox L Broth Base”

Agar “BD Bacto™ Agar”

KCl “Sigma”

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O “Carlo Erba”

Gliserol “Euromedex”

KCH<sub>3</sub>COO “Merck”

DMSO “Merck”

Ampisilin “Sigma Aldrich”

Kloramfenikol “Sigma”

Trypton “BD- Bacto™”

Maya ekstrakt “Difco”

NaCl “Tekkim”

D-glukoz monohidrat “Alfa Aesar”

IPTG “Amresco”

Agaroz “Bioron”

Etidyum bromür “ICN”

Akrilamid “Amresco”

SDS “Serva”

APS “Biorad”

TEMED “Biorad”

PIPES “Alfa Aesar”

Tris “Sigma Aldrich”

HCl “Merck”

PMSF “Sigma Aldrich”

Bezamidin “Merck”

İmidazol “Merck”

MgCl<sub>2</sub> “Riedel de Haën”

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O “Riedel de Haën”

Etanol “Merck”

Metanol “Merck”

Plazmid DNA saflaştırma kiti “Promega”

PCR ürünleri temizleme kiti “Bio Basic”

Q solution “Qiagen”

MgCl<sub>2</sub> “Qiagen”

Taq DNA Polimreaz “Fermentas”

Not I “Promega”

Mlu I “Promega”

Tampon D “Promega”

Tampon H “Takara”

BSA “Promega”

BSA “Takara”

T<sub>4</sub> DNA ligaz “Promega”

T<sub>4</sub> DNA ligaz tamponu “Promega”

Triton X100 “Takara”

Şırınga filtresi “Sartorius / Minisart”

Pfu DNA Polimeraz “Laboratuarımız tarafınan üretilen”

Pfu DNA Polimeraz Tamponu “Laboratuarımız tarafınan üretilen”

Azokazein “Sigma-Aldrich”

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> “Sigma-Aldrich”

### 3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

**LB çözeltisi:** 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1 l suda çözüldü. Hazırlanan 1 l’lik çözelti 400’er ml olacak şekilde 2 tane stok şişesine alındı ve üzerine 6 g agar ilave edilip karıştırıldı, otoklavlandı.

Artan LB çözeltisi yaklaşık 5 ml olacak şekilde deney tüplerine konuldu ve ağız kısımları alüminyum folyo ile kapatıldı, otoklavlandı.

(LB: 10 g yeast ekstrakt, 10 g tripton, 5 g tuz)

**FSB çözeltisi:** 7,4 g KCl, 7,5 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100g gliserol, 10 ml 1M (pH=7,5)  $\text{KCH}_3\text{COO}$  alınarak pH=6,2'ye ayarlandı ve hacim 1 l'ye tamamlandı. Otoklavlandı.

**Ampisilin:** 1g ampisilin alınarak 10 ml steril suda çözüldü. Enjektöre alınarak; nitro-selüloz membrandan süzülerek 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine alındı ve dondurucuda saklandı.

**Rich media:** 5 g tripton, 4 g maya ekstrakt, 2,5 g NaCl ve 1 g D-glukoz monohidrat tartıldı ve toplam hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı.

**IPTG:** 1 g IPTG, 10 ml steril suda çözüldü ve nitro selüloz membrandan süzüldü. 1'er ml olacak şekilde ependorflara bölündü ve dondurucuya (-20 °C) kaldırıldı.

**Agaroz Elektroforez Jeli:** 1 g agaroz üzerine 100 ml 1x TAE tamponu eklendi ve mikrodalga fırında eritildikten sonra üzerine 5 µl etidyum bromür eklendi ve kasete döküldü.

#### **SDS Elektroforez Jeli:**

**Yürütme jeli:** 2,7 ml %40 akrilamid, 2,25 ml alt tampon, 4 ml su, 50 µl %10 APS ve 20 µl TEMED.

**Yükleme jeli:** 0,35 ml %40 akrilamid, 1 ml üst tampon, 2,55 ml su, 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED.

Tüm maddeler katıldı ve en sona TEMED eklenip kasete döküldü. Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli döküldü ve polimerleşmesi beklendi.

**PİPES'li Tampon Çözeltisi:** 0,5 M, 50 ml PİPES çözeltisi hazırlandı. KOH ile pH 6,7'e getirildi. Ardından 6,92 g  $\text{MnCl}_2$ , 1,66 g  $\text{CaCl}_2$  ve 18,64 g KCl 980 ml suda çözüldü. Üzerine 20 ml PİPES çözeltisi eklendi ve hacim 1 l'ye tamamlandı. 0,45 µm'lik Nalgene filtreden geçirildi ve steril şişelere bölünerek, -20°C'de saklandı.

**Tris Tamponu:** 12,115 g tris alınarak bir miktar suda çözüldü. pH derişik HCl ile 7,5'e getirildi. 2.922 g NaCl (50 mmol) eklendi ve hacim su ile 1 l'ye tamamlandı.

**PMSF çözeltisi:** 200 µg PMSF %99'luk 1 ml etanol ile çözöldü.

**İmidazol çözeltisi:** (300 mM) 2,045 g imidazol, bir miktar tris tamponunda çözöldü. Son hacim tris tamponuyla 100 ml'ye getirildi.

**SOB:** (Super Optimal Broth) 20 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 2 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, 10 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> ve 10 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O büyük bir behere alınarak üzeri deiyonize su ile 1 l'ye tamamlandı, iyice karıştırıldı ve otoklavlandı.

**Kloramfenikol Çözeltisi:** Kloramfeikol 34 mg/ml olacak şekilde mutlak etanolde çözöldü ve 0,2 mikron filtreden geçirilerek steril edildi.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. PCR işlemleri için Primerlerin Tasarımı (pTOLT sistemi için)

Kimozin enziminin üretimi için gerekli olan DNA dizisi, DNA kütüphanelerinden belirlendi ve *E. coli* mikroorganizması için biyoinformatik araçlar kullanılarak nadir kodonlardan arındırılarak kodon optimizasyonu yapıldı.

Çizelge 3.1. a. Kimozin enzimin *Bos taurus*'a ait doğal DNA dizisi

b. Kimozin gen sekansının doğal ve optimize edilmiş hali

a)

```

1  GGGGAGGTGG CCAGCGTGCC CCTGACCAAC TACCTGGATA GTCAGTACTT TGGGAAGATC
61  TACCTCGGGA CCCC GCCCCA GGAGTTCACC GTGCTGTTTG AACTGGGCTC CTCTGACTTC
121 TGGGTACCCT CTATCTACTG CAAGAGCAAT GCCTGCAAAA ACCACCAGCG CTTCGACCCG
181 AGAAAGTCGT CCACCTTCCA GAACCTGGGC AAGCCCCTGT CTATCCACTA CGGGACAGGC
241 AGCATGCAGG GCATCCTGGG CTATGACACC GTCAGTGTCT CCAACATTGT GGACATCCAG
301 CAGACAGTAG GCCTGAGCAC CCAGGAGCCC GGGGACGTCT TCACCTATGC CGAATTCGAC
361 GGGATCCTGG GGATGGCCTA CCCCTCGCTC GCCTCAGAGT ACTCGATACC CGTGTGTTGAC
421 AACATGATGA ACAGGCACCT GGTGGCCCAA GACCTGTTCT CGGTTTACAT GGACAGGAAT
481 GGCCAGGAGA GCATGCTCAC GCTGGGGGCC ATCGACCCGT CCTACTACAC AGGGTCCCTG
541 CACTGGGTGC CCGTGACAGT GCAGCAGTAC TGGCAGTTCA CTGTGGACAG TGTCACCATC
601 AGCGGTGTGG TTGTGGCCTG TGAGGGTGGC TGTCAGGCCA TCCTGGACAC GGGCACCTCC
661 AAGCTGGTCG GGCCAGCAG CGACATCCTC AACATCCAGC AGGCCATTGG AGCCACACAG
721 AACCAGTACG ATGAGTTTGA CATCGACTGC GACAACCTGA GCTACATGCC CACTGTGGTC
781 TTTGAGATCA ATGGCAAAAT GTACCCACTG ACCCCCTCCG CCTATACCAG CCAGGACCAG
841 GGCTTCTGTA CCAGTGGCTT CCAGAGTGAA AATCATTCCC AGAAATGGAT CCTGGGGGAT
901 GTTTTCATCC GAGAGTATTA CAGCGTCTTT GACAGGGCCA ACAACCTCGT GGGGCTGGCC
961 AAAGCCATCT GA

```

Nadir kodon optimizasyonu çalışmasında sığır kimozin DNA dizisinde bulunan ve *E. coli* K12 mikroorganizmasında düşük sıklıkla ifade edilen kodonlar, daha yüksek sıklıkla ifade edilen kodonlarla değiştirildi. Örneğin *E.coli*'de Metiyonin için nadir olan AGA, CGG, CGA kodonlarının yerine CGT kodonu; lösin için CTA yerine CTG ve İzölösün için de ATA yerine AUU kodonu yerleştirilmiştir. Kimozin gen sekansının doğal olanı ve optimize edilmiş hali aşağıda birbirine hizalanmış olarak verilmiştir. DNA hizalama işlemi BLAST-Basic Local alignment tool programı kullanılarak yapılmıştır.

b)

|        |     |                                                                   |     |
|--------|-----|-------------------------------------------------------------------|-----|
| Optimz | 1   | ATGGGGGAGGTGGCCAGCGTGCCCTGACCAACTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAG<br>   | 60  |
| Doğal  | 1   | ATGGGGGAGGTGGCCAGCGTGCCCTGACCAACTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAG<br>   | 60  |
| Optimz | 61  | ATCTACCTCGGGACCCCGCCCCAGGAGTTCACCGTGCTGTTTGACACTGGCTCCTCTGAC<br>  | 120 |
| Doğal  | 61  | ATCTACCTCGGGACCCCGCCCCAGGAGTTCACCGTGCTGTTTGACACTGGCTCCTCTGAC<br>  | 120 |
| Optimz | 121 | TTCTGGGTACCCTCTATCTACTGCAAGAGCAATGCCTGCAAAAACCACCAGCGCTTCGAC<br>  | 180 |
| Doğal  | 121 | TTCTGGGTACCCTCTATCTACTGCAAGAGCAATGCCTGCAAAAACCACCAGCGCTTCGAC<br>  | 180 |
| Optimz | 181 | CCGCGTAAGTCGTCCACCTTCCAGAACCTGGGCAAGCCCCTGTCTATCCACTACGGGACA<br>  | 240 |
| Doğal  | 181 | CCGAGAAAGTCGTCCACCTTCCAGAACCTGGGCAAGCCCCTGTCTATCCACTACGGGACA<br>  | 240 |
| Optimz | 241 | GGCAGCATGCAGGGCATCCTAGGCTATGACACCGTCACTGTCTCCAACATTGTGGACATC<br>  | 300 |
| Doğal  | 241 | GGCAGCATGCAGGGCATCCTAGGCTATGACACCGTCACTGTCTCCAACATTGTGGACATC<br>  | 300 |
| Optimz | 301 | CAGCAGACAGTAGGCCTGAGCACCCAGGAGCCCGGGGACGTCTTCACCTATGCCGAATTC<br>  | 360 |
| Doğal  | 301 | CAGCAGACAGTAGGCCTGAGCACCCAGGAGCCCGGGGACGTCTTCACCTATGCCGAATTC<br>  | 360 |
| Optimz | 361 | GACGGGATCCTGGGGATGGCCTACCCCTCGCTCGCCTCAGAGTACTCGATACCCGTGTTT<br>  | 420 |
| Doğal  | 361 | GACGGGATCCTGGGGATGGCCTACCCCTCGCTCGCCTCAGAGTACTCGATACCCGTGTTT<br>  | 420 |
| Optimz | 421 | GACAACATGATGAACCGTCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCGGTTTACATGGACCGT<br>  | 480 |
| Doğal  | 421 | GACAACATGATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCGGTTTACATGGACAGG<br>  | 480 |
| Optimz | 481 | AATGGCCAGGAGAGCATGCTCACGCTGGGGGCCATCAACCCGTCCTACTACACAGGGTCC<br>  | 540 |
| Doğal  | 481 | AATGGCCAGGAGAGCATGCTCACGCTGGGGGCCATCGACCCGTCCTACTACACAGGGTCC<br>  | 540 |
| Optimz | 541 | CTGCACTGGGTGCCCCGTGACAGTGCAGCAGTACTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGTACC<br>  | 600 |
| Doğal  | 541 | CTGCACTGGGTGCCCCGTGACAGTGCAGCAGTACTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGTACC<br>  | 600 |
| Optimz | 601 | ATCAGCGGTGTGGTTGTGGCCTGTGAGGGTGGCTGTGAGGCCATCTTGGACACGGGCACC<br>  | 660 |
| Doğal  | 601 | ATCAGCGGTGTGGTTGTGGCCTGTGAGGGTGGCTGTGAGGCCATCCTGGACACGGGCACC<br>  | 660 |
| Optimz | 661 | TCCAAGCTGGTCGGGCCCAGCAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACA<br>  | 720 |
| Doğal  | 661 | TCCAAGCTGGTCGGGCCCAGCAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACA<br>  | 720 |
| Optimz | 721 | CAGAACCACTACGGTGAGTTTGACATCGACTGCGACAACCTGAGCTACATGCCCACTGTG<br>  | 780 |
| Doğal  | 721 | CAGAACCACTACGATGAGTTTGACATCGACTGCGACAACCTGAGCTACATGCCCACTGTG<br>  | 780 |
| Optimz | 781 | GTCTTTGAGATCAATGGCAAAATGTACCCACTGACCCCCTCCGCCTATACCAGCCAAGAC<br>  | 840 |
| Doğal  | 781 | GTCTTTGAGATCAATGGCAAAATGTACCCACTGACCCCCTCCGCCTATACCAGCCAAGAC<br>  | 840 |
| Optimz | 841 | CAGGGCTTCTGTACCACTGGCTTCCAGAGTGAAAATCATTCCCAGAAAATGGATCCTGGGG<br> | 900 |
| Doğal  | 841 | CAGGGCTTCTGTACCACTGGCTTCCAGAGTGAAAATCATTCCCAGAAAATGGATCCTGGGG<br> | 900 |
| Optimz | 901 | GATGTTTTTCATCCGTGAGTATTACAGCGTCTTTGACCGTGCCAACAACCTCGTGGGGCTG<br> | 960 |
| Wild   | 901 | GATGTTTTTCATCCGAGAGTATTACAGCGTCTTTGACAGGGCCAACAACCTCGTGGGGCTG<br> | 960 |
| Optimz | 961 | GCCAAAGCCATC 972<br>                                              |     |
| Doğal  | 961 | GCCAAAGCCATC 972                                                  |     |



### Gene Synthesis Specification Sheet

Sales Nbr: 7141473

Order Date: 08/31/2011

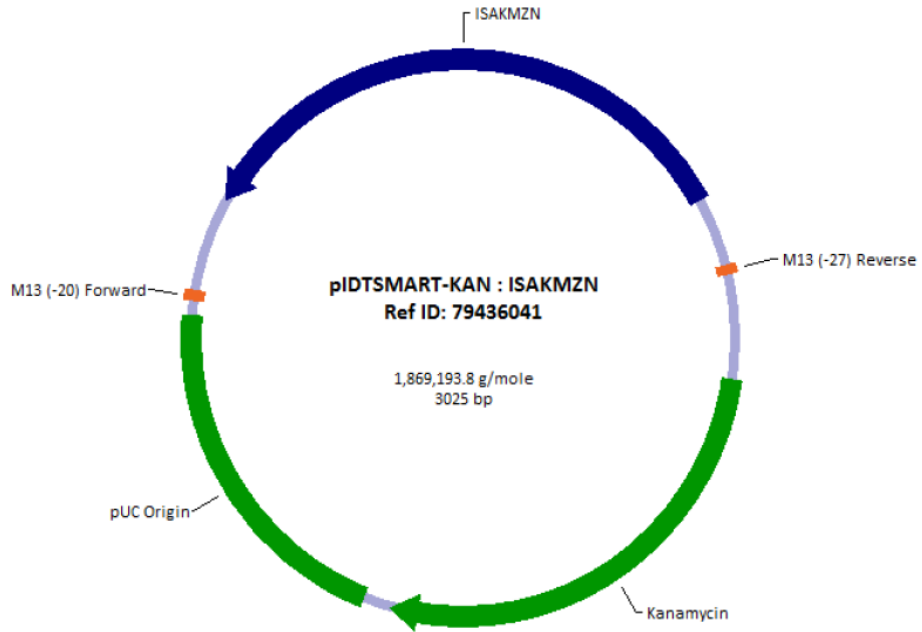
Ref ID: 79436041

Gene Name: pIDTSMART-KAN : ISAKMZN

Gene Size: 1013 bp

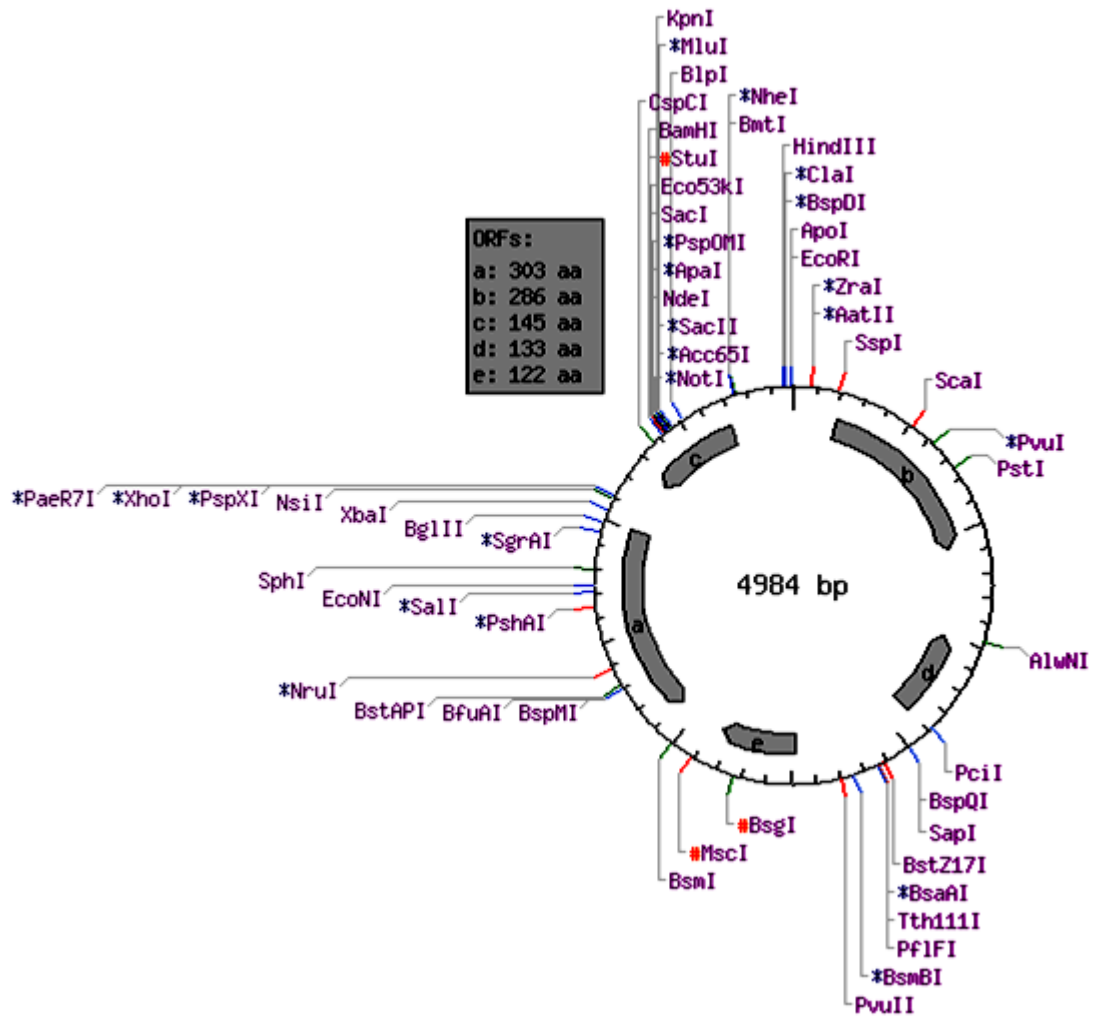
Plasmid Weight: 1,869,193.8 g/mole

### Plasmid Map



Şekil 3.1. IDT tarafından sentezlenen kimoziin genini taşıyan plazmit





Şekil 3.3. pTOLT pilazmitinin restriksiyon enzim haritası

Klonlama işlemlerinde vektör olarak pTOLT vektörü seçildi. Vektöre klonlamak üzere kimozin proteininin DNA dizisinin çoğaltılması için PCR işleminde gerekli olan primerler şu şekilde dizayn edildi.

#### Primerler

#### DNA Dizisi

**Chy NotI tolt sense** TTTTTTTTTTGC GGCCGCATGGGGGAGGT 29 bç

**Chy MluI tolt reverse** TTTTTTACGCGTTCAGATGGCTTTGGCCAG 30 bç

Seçilen restiriksiyon enzim bölgeleri seçilen enzimin tanıma bölgesinin 5' ve 3' yönlerinde optimum kesim için en az kaçar tane daha baz bulunması gerektiği göz önüne alınıp (New England Biolab katalogunun “appendix” bölümünde var olan

çizelgelerden faydalanılmıştır) aşağıda açıklandığı gibi ona göre seçim ve restiriksiyon enzimleri ile kesim yapılmıştır (Anonim, 1998).

### 3.2.2. PCR ile Kimozi DNA'sının Amplifikasyonu

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) işlemleri için satın alınan yüksek saflıktaki oligonukleotidler DNaz olmayan saf su ile PCR işlemlerinde kullanılacak konsantrasyona seyreltildi ve aşağıdaki PCR karışımı hazırlandı.

#### PCR

32,5 µl H<sub>2</sub>O (DNaz & RNaz free)  
 5 µl 10x tamponu  
 2 µl MgCl<sub>2</sub>  
 2 µl dNTP karışımı (25 mM)  
 3 µl primer “sense”  
 3 µl primer “reverse”  
 2 µl kalıp DNA (pIDTSMART-KAN:ISAKMZN)  
 0,5 µl Taq DNA polimeraz

Şeklinde toplam 50 µl olan PCR tüpleri hazırlandı. PCR işleminde; sıcaklık değerleri her bir döngü için aşağıda gibi ayarlanmış ve toplamda 30–35 döngüyle PCR işlemi tamamlanmıştır.

- |                      |       |
|----------------------|-------|
| 1. Denatürasyon:     | 94 °C |
| 2. Primer Annealing: | 55°C  |
| 3. Ekstensiyon:      | 72 °C |

PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra 10 µl PCR karışımından alınarak %1'lik agaroz jelinde analiz edildi ve jelin fotoğrafı alındı.

### 3.2.3. PCR ürünlerinin Saflaştırılması

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra, DNA PCR karışım çözeltisinden “Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up” kiti kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak saflaştırıldı.

### 3.2.4. Restiriksiyon Enzimleri ile Kesim

Kesimin ilk aşaması:

Çizelge 3.2. Birinci kesim için gereken madde miktarları

| Kimozin Geni İçin Kesim        | Vektör İçin Kesim              |
|--------------------------------|--------------------------------|
| DNA (20 µl)                    | Vektör DNA (15 µl)             |
| Buffer D (10x, Promega) (4 µl) | Buffer D (10x, Promega) (4 µl) |
| BSA (10x, Promega) (4 µl)      | BSA (10x, Promega) (4 µl)      |
| H <sub>2</sub> O (10 µl)       | H <sub>2</sub> O (15 µl)       |
| Mlu I (Promega) (2 µl)         | 2 µl Mlu I (Promega) (2 µl)    |

- ✓ Çizelge 3.2’deki gibi olmak üzere, toplam hacmi 40 µl’lik tüpler hazırlandı ve vortekslendi. Ardından mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürülerek 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 1 saat sonra tüpler alınarak hızlıca döndürüldü ve tekrar 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 1 saat sonra tüpler alınarak; sadece vektörlere 1 µl *Mlu* I eklendi. Ardından tüm tüpler hızlıca döndürülerek tekrar 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 1 saat sonra tüpler alınarak hızlıca döndürüldü ve tekrar 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 1 saat sonra tüpler hızlıca döndürüldü ve tüpler alındı.

Şeklinde sıralanan işlemlerle ilk kesim 4 saatte tamamlandı, “Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up” kiti ile saflaştırıldıktan sonra, ikinci kesime geçildi.

Kesimin ikinci aşaması:

Çizelge 3.3. İkinci kesim için gereken madde miktarları

| Kimozin Geni İçin Kesim      | Vektör İçin Kesim             |
|------------------------------|-------------------------------|
| DNA (20 µl)                  | Vektör DNA (15 µl)            |
| Buffer H (10x,Takara) (4 µl) | Buffer H (10x, Takara) (4 µl) |
| BSA (10x, Takara) (4 µl)     | BSA (10x,Takara) (4 µl)       |
| H <sub>2</sub> O (6 µl)      | H <sub>2</sub> O (11 µl)      |
| Not I (Takara) (2 µl)        | Not I (Takara) (2 µl)         |
| Triton x100 (Takara) (4 µl)  | Triton x100 (Takara) (4 µl)   |

- ✓ Çizelge 3.3.’deki gibi olmak üzere 40 µl’lik tüpler hazırlandı ve vortekslendi. Ardından tüpler hızlıca döndürüldü ve 37<sup>0</sup>C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 1 saat sonra tüpler alınarak hızlıca döndürüldü ve tekrar 37<sup>0</sup>C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 1 saat sonra tüpler alınarak; sadece vektörlere 1 µl *Not I* eklendi. Ardından tüm tüpler hızlıca döndürülerek tekrar 37<sup>0</sup>C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 1 saat sonra tüpler alınarak hızlıca döndürüldü ve tekrar 37<sup>0</sup>C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 1 saat sonra tüpler hızlıca döndürüldü ve tüpler alındı.
- ✓ Vektör plazmid DNA’sı ve PCR ürünleri ayrı ayrı kesildikten sonra tekrar “Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up” kiti kullanılarak saflaştırıldı.

### 3.2.5. DNA Ligasyonu

Kesilen vektör plazmid DNA’ları ve PCR ürünleri Promega T4 DNA Ligaz kullanılarak birleştirildi.

Ligasyon karışımı için işlemler aşağıdaki şekilde yapıldı;

Çizelge 3.4. Ligasyon için gereken madde miktarları

| Ligasyon Karışımı I                 | Ligasyon Karışımı II                |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,5 µl pTOLT plazmiti               | 2,5 µl pTOLT plazmiti               |
| 2 µl T4 DNA Ligaz Tamponu (Promega) | 2 µl T4 DNA Ligaz Tamponu (Promega) |
| 16,5 µl Kimozin Geni                | 14,5 µl Kimozin Geni                |
| 1 µl T4 DNA Ligaz (Promega)         | 1 µl T4 DNA Ligaz                   |

Çizelge 3.3.'teki gibi yapılan pipetlemenin ardından, hazırlanan ligasyon karışımının inkübasyonu genelde +16 °C'de gece boyu gerçekleştirildikten sonra transformasyon işlemlerinde kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

### 3.2.6. Kompetent Hücre Hazırlanması

#### 3.2.6.1. FSB'li Kompetent Hücre Hazırlanması

- ✓ 1 gece önce inoküle edilen kültürden 1 ml ve 0,5 ml alınarak 2 tane steril erlene eklendi. Üzerine 50 ml LB (Luria Bertani) eklenerek; 37°C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Optik dansite, 600 nm'de absorbans yaklaşık olarak 0,7 olduğunda erlenler inkübatörden alındı ve +4°C 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
- ✓ Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 50 ml soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisi eklendi çok iyi vortekslendi. Ardından 1 saat buz banyosunda inkübe edildi.
- ✓ 1 saatin ardından; +4°C, 4 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 8 ml soğuk FSB çözeltisi eklendi ve tüpe vurarak çözünme sağlandı.
- ✓ Peletin tamamı çözününce üzerine 560 µl DMSO eklendi ve 3 saat buza gömüldü.
- ✓ 3 saatin ardından kompetent hücre hazır hale geldi (Hanahan, 1983).

### 3.2.6.2. PİPES’li Kompotent Hücre Hazırlanması

- ✓ Petriye DH5 $\alpha$  ekildi ve 16 saat inkübe edildi.
- ✓ 16 saatlik inkübasyonun ardından alınan petriden 1 koloni alınarak; içinde 25 ml SOB bulunan 250 ml’lik erlene inoküle edilerek, 250 rpm ve 37 $^{\circ}$ C de 6 saat inkübe edildi.
- ✓ 6 saatin ardından kültür için içinde 250 ml SOB bulunan 3 tane erlen hazırlandı ve bir önceki DH5 $\alpha$ ’dan; 10 ml, 4 ml ve 2 ml inoküle edildi. Hazırlanan erlenler 18-22 $^{\circ}$ C arası 14 saat boyunca 150 rpm’de inkübe edildi.
- ✓ Kültürlerin 600 nm’deki OD’leri her 45 dakikada bir okundu ve değer 0,55’e ulaştığında kültür çalkalayıcıdan alındı.
- ✓ 10 dakika buzlu-su banyosunda bekletildi.
- ✓ Ardından hücreler +4 $^{\circ}$ C’de 2 500 g (3 900 rpm)’de 10 dakika santrifüjlendi.
- ✓ Besiyeri boşaltıldı ve santrifüj şişesinin içinde kalan besiyeri temizlendi.
- ✓ Hücrelere 0 $^{\circ}$ C ‘deki 80 ml PİPES’li tampon ilave edilerek, hassas olarak yeniden süspansiyon haline getirildi.
- ✓ Hücreler, +4 $^{\circ}$ C 2 500 g (3 900 rpm)’de 10 dakika santrifüjlendi. Tüpün içindeki tampon boşaltıldı ve temizlendi.
- ✓ Hücrelere 0 $^{\circ}$ C’de 20 ml PİPES’li tampon ilave edildi ve hassasça yeniden süspansiyon hale getirildi.
- ✓ 1,5 ml DMSO eklendi, hafifçe karıştırıldı. Buz banyosuna alındı ve 10 dakika beklendi.
- ✓ Hızlı bir şekilde hücreler steril ependorf tüplere bölündü ve hızlıca donması için sıvı azota atıldı. Ardından hücreler -80 $^{\circ}$ C’de saklandı (Inoue ve ark., 1990).

### 3.2.7. Transformasyon

- ✓ Buz banyosunda bulunan kompotent hücrelerden 250  $\mu$ l’lik kısımlar alındı. Gerekli sayıda ependorfa pipetleme yapıldı. Üzerine çalışılan kültürden 3  $\mu$ l eklendi ve karıştırılarak 1 saat buz banyosuna gömüldü.
- ✓ 1 saatin ardından 2 dakika 42 $^{\circ}$ C’de ısı şokuna maruz bırakıldı.

- ✓ Tekrar buza gömülerek 5 dakika inkübe edildi.
- ✓ Üzerine 250 µl LB (veya kullanılan kompotente göre SOB) eklendi ve yarım saat 37<sup>0</sup>C ve 250 rpm’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Yarım saatin ardından her bir ependorf bir ampisilinli petriye döküldü ve sprader ile yayıldı. 37<sup>0</sup>C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Hanahan, 1985).

### 3.2.7. Plazmid DNA Saflaştırılması

Petri tabaklarından elde edilen koloniler 3 ml’lik ampisilin ihtiva eden (100 µM/ml) steril sıvı LB içerisine tek koloni olarak inoküle edildikten sonra 37 <sup>0</sup>C de gece boyu inkübe edilerek yetiştirildiler. Santrifüjle ependorf tüplerine toplanan hücrelerden plazmit DNA “Promega Wizard® Plus SV minipreps” kiti kullanarak aşağıdaki protokole göre saflaştırıldı.

- ✓ Ependorfların üzerine 250 µl “hücreleri yeniden süspansiyon haline getirme çözeltisi” eklendi ve peletin süspanse edilene kadar çok iyi vortekslendi.
- ✓ Üzerine 250 µl “hücre parçalama çözeltisi” eklendi. Birkaç sefer manuel olarak alt üst edilerek karıştırıldı.
- ✓ 10 µl “alkalin proteaz” eklendi ve birkaç sefer alt-üst edilerek karıştırıldı. 5 dakika inkübe edildi.
- ✓ 350 µl “nötralizasyon çözelti tamponu” eklendi ve birkaç sefer alt-üst edilerek karıştırıldı.
- ✓ Ependorf tüpleri maksimum hızda (15 000 rpm) 10 dakika santrifüjlendi. Ardından süpernatant kısım pipetle alındı (peletin gelmemesine özen gösterildi).
- ✓ Alınan süpernatant, mini DNA bağlama kolonuna verildi. 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- ✓ 750 µl yıkama çözeltisi kolona verildi ve 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- ✓ 250 µl yıkama çözeltisi kolona verildi ve 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.

- ✓ Kolonda çözelti kalmış olabileceğinden boş kolon 15 000 rpm’de 2 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- ✓ Kolona 100 µl “nükleaz bulunmayan su” verildi ve 1 dakika inkübe edildi.
- ✓ Ardından 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenerek, plazmid DNA’lar saflaştırıldı ve PCR analizi için kullanılmak üzere -20 °C’de dondurucuda saklandı.

### 3.2.8. Plazmid DNA’ların PCR ile analizi

Ligasyon reaksiyonu sonucunda oluşturulan rekombinant pTOLT-CHY plazmiti *E. coli* DH5α’dan saflaştırıldıktan sonra genin plazmite doğru bir şekilde klonlanıp klonlanmadığını anlamak amacıyla **Chy NotI tolt sense** ve **Chy MluI tolt reverse** primerleri kullanılarak bir doğrulama PCR’ı gerçekleştirildi. PCR reaksiyonunda kalıp olarak oluşturulan rekombinant plazmit kullanıldı.

15,5 µl H<sub>2</sub>O (DNAz & RNAz free)  
 2,5 µl 10x Pfu Dna polimeraz tamponu  
 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>  
 1,5 µl dNTP karışımı (25 mM)  
 1,5 µl primer “sense”  
 1,5 µl primer “reverse”  
 0,5 µl pTOLT-CHY plazmit DNA  
 0,5 µl Pfu DNA polimeraz

Şeklinde toplam 25 µl olan PCR tüpleri hazırlandı. PCR işleminde; sıcaklık değerleri her bir döngü için aşağıda gibi ayarlanmış ve toplamda 30–35 döngüyle PCR işlemi tamamlanmıştır.

- |                      |       |
|----------------------|-------|
| 1. Denatürasyon:     | 94 °C |
| 2. Primer Annealing: | 55 °C |
| 3. Ekstensiyon:      | 72 °C |

PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra 20 µl PCR karışımından alınarak %1'lik agaroz jelinde analiz edildi ve jelin fotoğrafı alındı.

### 3.2.9. DNA Dizileme

Transforme olmuş plazmid DNA'larından 30 µl alındı ve T7 promotor primeri ile dizi analizi yapılmak üzere "REFGEN" firmasına DNA dizilemeye gönderildi.

### 3.2.10. Tol-A-III-Kimozin Füzyon Proteinin Üretilmesi (indüklenme)

Protein ekspresyon çalışmaları için *E. coli* BL21 pLysE suşu kullanıldı. -80 °C derin dondurucudan çıkarılan stok hücreler 4 µl kloramfenikol içeren 4 ml'lik LB besiyerine inoküle edilerek bir gece 37 °C'de 250 rpm çalkalama hızında yetiştirildi. Daha sonra FSB'li kompetant hücre hazırlama protokolüne uygun şekilde hücreler kompetent hale getirildi (Bkz 3.2.6.1).

Kompetent hücrelere pTOLT-CHY plazmiti başlık 3.2.7'de anlatılan protokole göre transfer edildi. Transformasyonun ardından hücreler içerisinde kloramfenikol ve ampisilin bulunan LB Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekildi ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Üreyen hücrelerden birer koloni olarak tekrar içerisinde 4 µl kloramfenikol ve 4 µl ampisilin bulunan 4 ml'lik LB besiyerine inoküle edilerek bir gece 37 °C'de 250 rpm çalkalama hızında yetiştirildi. Yetişen hücreler 500 ml ampisilinli LB bulunan 2 l'lik steril erlenlere ekildi. Her saat 600 nm'deki absorbansları okunarak yetiştirildi. OD ~ 0,7 olduğunda 500 µl 1 M IPTG ilave edilerek indüklendi. IPTG'li 3 saatlik inkübasyonun ardından erlenler alınarak; 250 ml'lik santrifüj kaplarında, 6000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Toplanan *E. coli* BL21 pLysE hücreleri -20°C'de saklandı (Guda ve ark., 1995).

### 3.2.11. *E. coli* BL21 pLysE Hücrelerinin Parçalanması

İndüklemenin ardından  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan hücreler çıkarılarak buza gömüldü. Üzerine 100 mM Tris tamponundan ( $\text{pH} = 7,5$ ) 10 ml eklenerek süspansiyon haline getirildi. Süspansiyona 100 mM bezamidinden 50  $\mu\text{l}$  eklendi ve vortekslendi. Üzerine 100 mM PMSF'den 50  $\mu\text{l}$  eklendi ve buz üzerine alındı. Buz üzerindeki hücreler 3 mm ucu olan sonikatörle 7–8 tur yapıldı.  $+4^{\circ}\text{C}$  ve 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant ayrı bir tüpe alındı. Pelet üzerine yine 10 ml Tris tamponu eklenerek önceki işlemler tekrar edildi. Bu şekilde yinelenen işlemlerin ardından hücreler parçalanmış oldu ve bütün süpernatantlar birleştirildi.

### 3.2.12. Yüksek Hızda Santrifüjle Proteinlerin Ayrımı

Toplanan süpernatantlar 30 000 rpm ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat santrifüjlenerek, karışımdaki hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürüldü.

### 3.2.13. Afinite Kromatografisi ile Füzyon Proteinin Saflaştırılması

Önce küçük bir polikarbonat kolon içerisine “Promega-Hislink” reçineden (nikel bağlı dolgu maddesi) veya Ni-NTA agaroz (Qiagen) 3 ml kadar konulduktan sonra, kolon 100 mM Tris/HCl ( $\text{pH} = 7,5$ ) tamponuyla yıkandı. Santrifüj sonrasında alınan protein karışımı kolona tatbik edildi ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplandı. Protein yüklenmiş kolon 30 ml 100 mM Tris/HCl ( $\text{pH} = 7,5$ ) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş diğer proteinlerin ayrılması sağlandı. 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCl ( $\text{pH} = 7,5$ ) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein 3 ayrı fraksiyon olarak elüe edildi ve bütün fraksiyonlar toplanarak bir gece boyu 5 lt lik sodyum sitrat tamponunda  $\text{pH} 7$  de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de diyaliz edildikten sonra füzyon protein aktivite testlerinde kullanılmak üzere  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### **3.2.14. SDS-PAGE ile Tol-A-III-Kimozin Füzyon Proteininin Saflaştırılmasının Analizi**

Toplanan her fraksiyondan alınan 200 µl'lik numuneler 100 µl jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100 °C'de 2 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS PAGE (sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) jelinin kuyucuklarına 10'ar µl yüklendi. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra distile su ile yıkanan jel sonrasında Coomassie mavisini ile boyandı. Boyanan jel destain ile iyice temizlendikten sonra bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alındı (Laemmli, 1970).

### **3.2.15. Saflaştırılan Füzyon Proteinin Kantitatif Analizi**

Proteinin kantitatif analizi için önce 2 adet kuartz mikro küvete (1 ml kapasiteli) proteinin içinde bulunduğu tampon çözeltiden (Tris/HCl pH = 7,5) konularak sıfırlandı.

Sonra küvetlerden birisine konulan protein numunesinin 280 nm de absorbansı okundu. Bulunan absorbans değeri yüksek olduğundan protein numunesi seyreltilerek absorbans ölçüldü (1 in altında bir değere indirildi). Seyreltmeden dolayı belli bir katsayıyla çarpıldıktan sonra toplam protein numunesinin absorbansı hesaplandı. Tol-A-III-Kimozin füzyonunun DNA dizisi alınarak önce Expasy Translate tool' u (Anonim, 2012j) kullanılarak füzyonun amino asit dizisi belirlendi. Tol-A-III-Kimozin füzyon proteininin belirlenen amino asit dizisi daha sonra Expasy ProtParam tool 'u (Anonim, 2012i) kullanılarak teorik moleküler ağırlığı ve 280 nm deki extinction coefficient (ekstinksiyon katsayısı) hesaplandı. Sonrasında absorpsiyon, moleküler ağırlığı ve ekstinksiyon katsayısı değerleri alınarak Lambert-Beer yasasına göre proteinin konsantrasyonu mg/ml olarak hesaplandı ve buradanda litredeki verim bulundu (80 mg/L).

### 3.2.16 Total Proteolitik Aktivite

Total proteolitik aktivite azokazeine dayalı spektrofotometrik metodla belirlenmiştir. 20 µl enzim çözeltisinin, 50 mM, pH 7,5 olan Tris-HCl tamponunda çözölmüş 0,5 ml % 1,5'luk azokazein çözeltisine ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. 15 dakika boyunca 25 °C'de inkübasyona bırakılmış ve reaksiyonun ilerlemesi sağlanmıştır. 15 dakikanın sonunda reaksiyon karışımına 0,5 ml % 20'lik triklorasetik asit (TCA) ilavesiyle reaksiyon durdurulmuştur. İçerisinde reaksiyon karışımın bulunduğu tüp 6 dk, 6500 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatantın absorbansı 340 nm'de ölçölmüştür. Bir ünite total proteolitik aktivite 1 ml enzim çözeltisinin bir dakikada meydana getirdiği absorbans farkı olarak tanımlanmış ve total proteolitik aktivite U/mg protein olarak belirlenmiştir. Kör olarak kullanılan çözeltiye ise substrattan önce TCA eklenmiştir (Fernando ve Norman, 1993).

### 3.2.17. pH ve Sıcaklığın Proteolitik Aktivite Üzerine Etkisi

Optimum pH'nın belirlenebilmesi için 25 °C'de pH 3-9'a kadar değişen aralıkta % 1,5 konsantrasyonundaki azokazeine karşı total proteolitik aktivite ölçölmüştür. Sonuçlar azokazeinin % hidrolizi cinsinden ifade edilmiştir. Burada pH 3-6 aralığı için 50 mM sodyum sitrat tamponu, pH 6-9 aralığı için 50 mM Tris-HCl tamponu kullanılmıştır.

Optimum pH belirlendikten sonra, optimum pH'da 20-70 °C sıcaklık aralığında proteolitik aktivite hesaplanarak optimum sıcaklık belirlenmiştir. (D'Ambrosio ve ark., 2003).

### 3.2.18 Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi

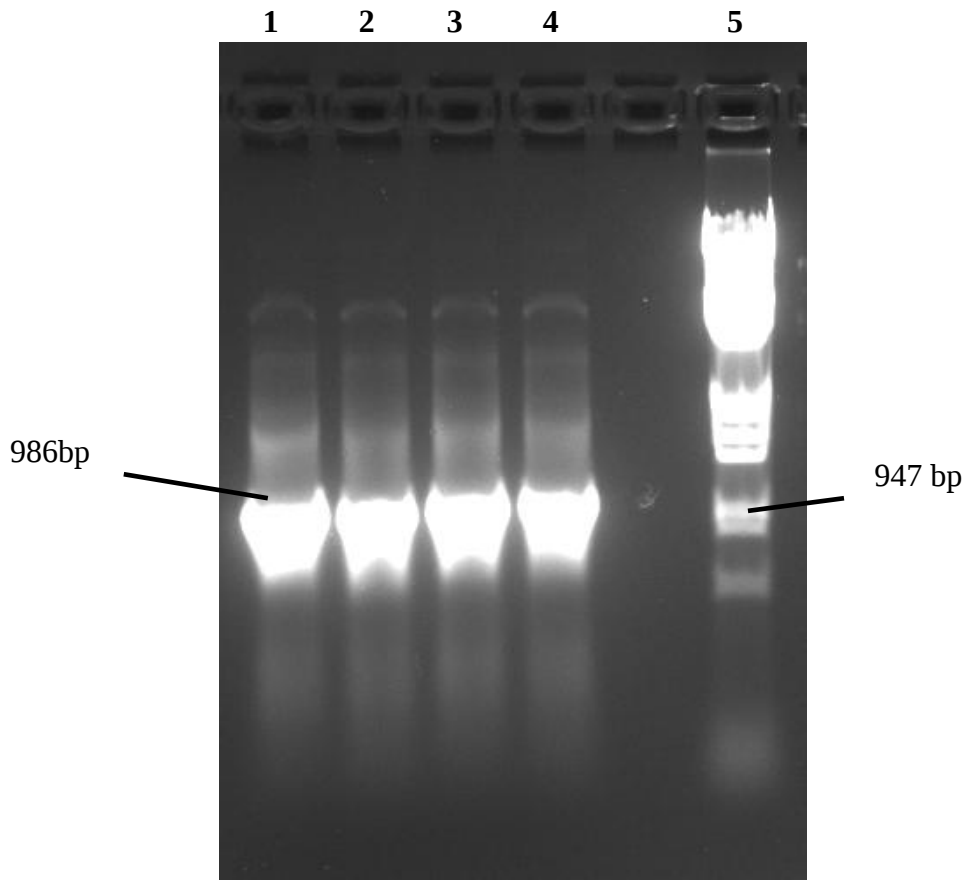
Süt pıhtılaştırma aktivitesi Berridge (1952)'ye belirlendi. Üretilen Tol-A-III-Kimozin füzyon proteininin 100 µl'si, 1 ml 10 mM CaCl<sub>2</sub> içerisinde süspanse edildi. Bu çözeltinin 100 µl'si 1 ml % 12 konsantrasyonunda 10 mM CaCl<sub>2</sub> içerisinde pH: 6,5'da hazırlanmış olan yağsız süt tozuna eklendi. Bu karışım 37 °C'de pıhtı oluşana kadar

inkübe edildi. 1 enzim ünitesi 1 ml yağsız süt tozunu 37 °C'de 1 dakikada pıhtılaştıran enzim miktarı olarak tanımlandı.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Kimozin DNA dizisinin PCR ile amplifikasyonu

Başlık 3.2.2. anlatılan PCR reaksiyonu sonucunda *Bos taurus*'a ait optimize edilmiş kimozin DNA dizisinin amplifiye edildiği görüldü.



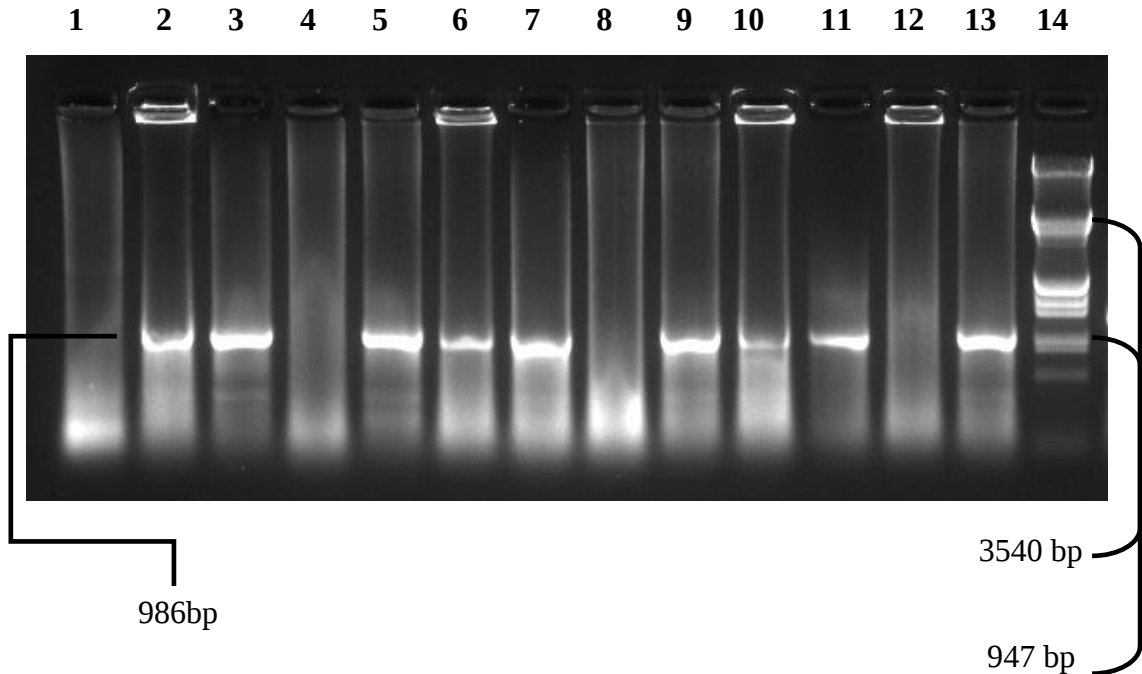
Şekil 4.1. Chy NotI tolt sense ve Chy MluI tolt reverse primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen agaroz jelgörüntüsü **1-4:** Kimozinin amplifiye edilmiş DNA parçası, **5:**  $\lambda$  / *Hind* III-*EcoR* I DNA markörü

#### 4.2. PCR ürünlerinin Saflaştırılması

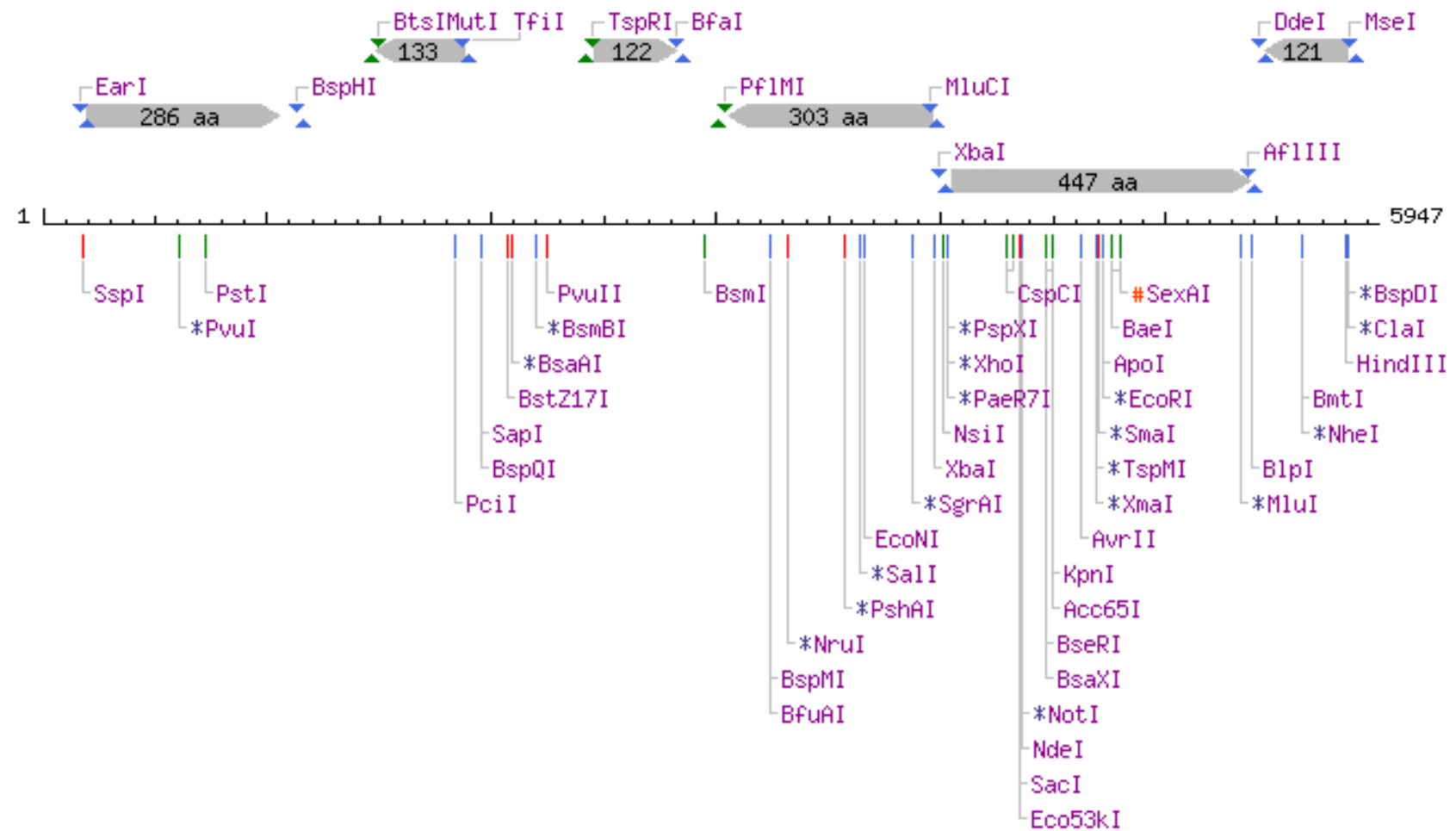
PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra, Kimozin DNA'sı PCR karışım çözeltisinden Bio Basic PCR ürünleri saflaştırma kiti kullanılarak, üreticinin önerdiği protokole uygun olarak saflaştırıldı.

#### 4.3. pTOLT-CHY Plazmid DNA'larının PCR ile Analizi

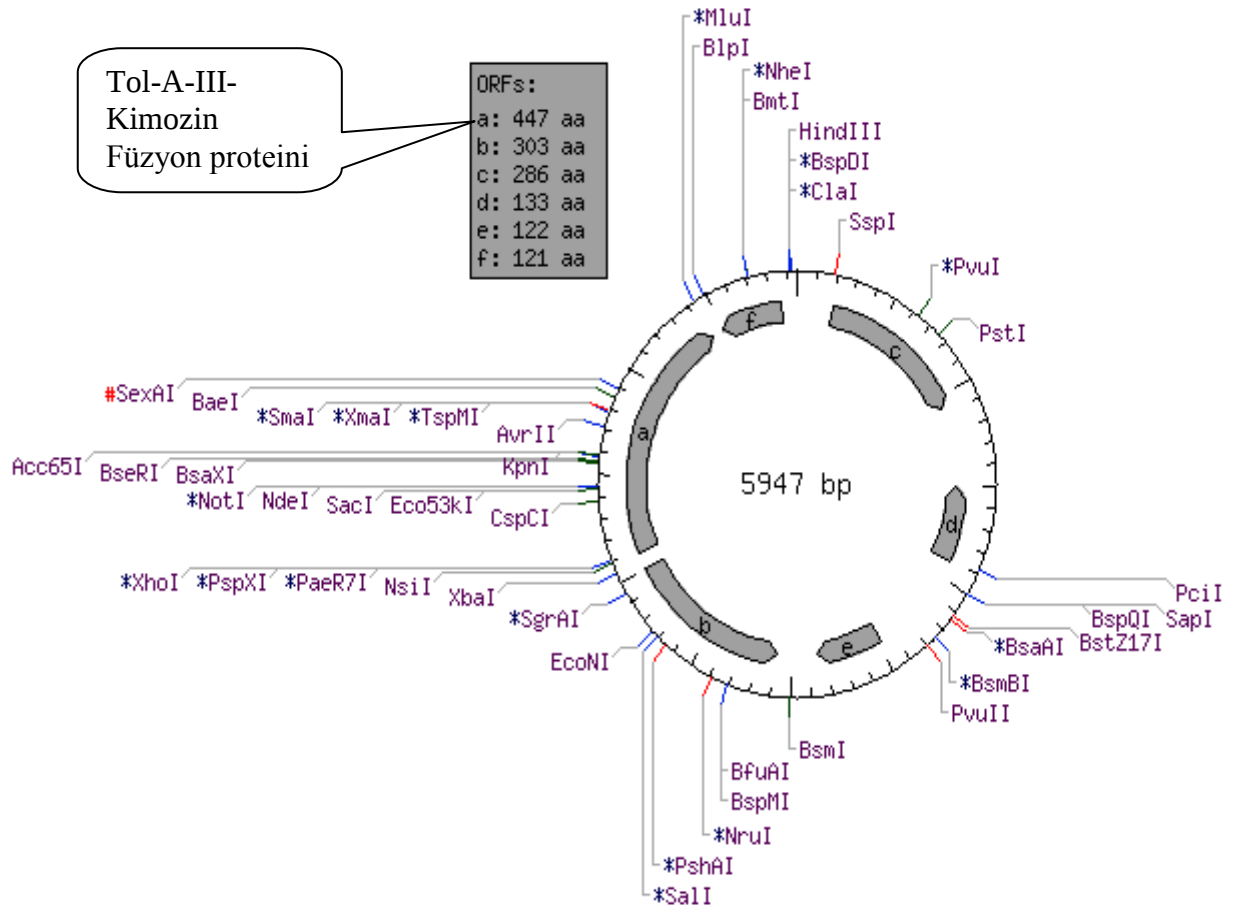
Elde edilen PCR ürünleri ve vektörler restiriksion enzimleriyle kesilip ligasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra *E. coli* DH5 $\alpha$  suşu kullanılarak transformasyon işlemi yapıp ekilen ampisilin içeren petri tabaklarında (bir gece sonrası) beliren kolonilerden 3'er ml'lik kültürler inoküle edilmesinden sonra bunlardan plazmit DNA saflaştırması Promega Wizard® *Plus* SV minipreps kiti kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 4.2. pTOLT-CHY plazmitinin kalıp olarak kullanılmasıyla yapılan doğrulama PCR'ı sonucunda elde edilen agaroz jelgörüntüsü **1-13**: PCR ürünleri, **14**:  $\lambda$  / *Hind* III-*EcoR* I DNA markörü

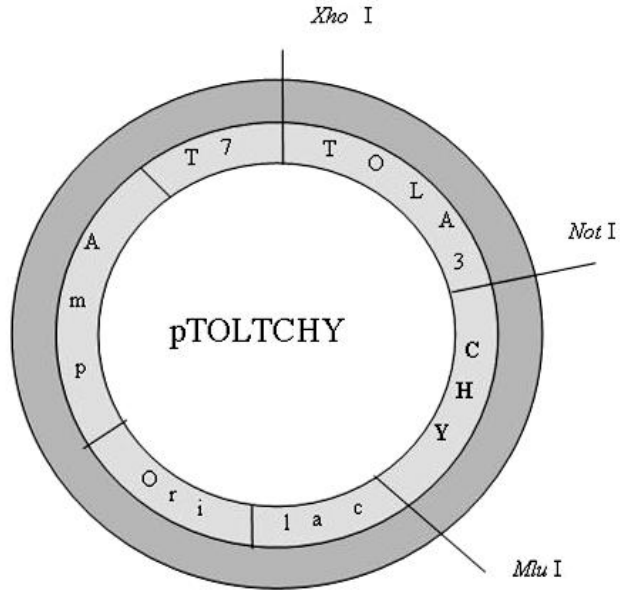


a



b

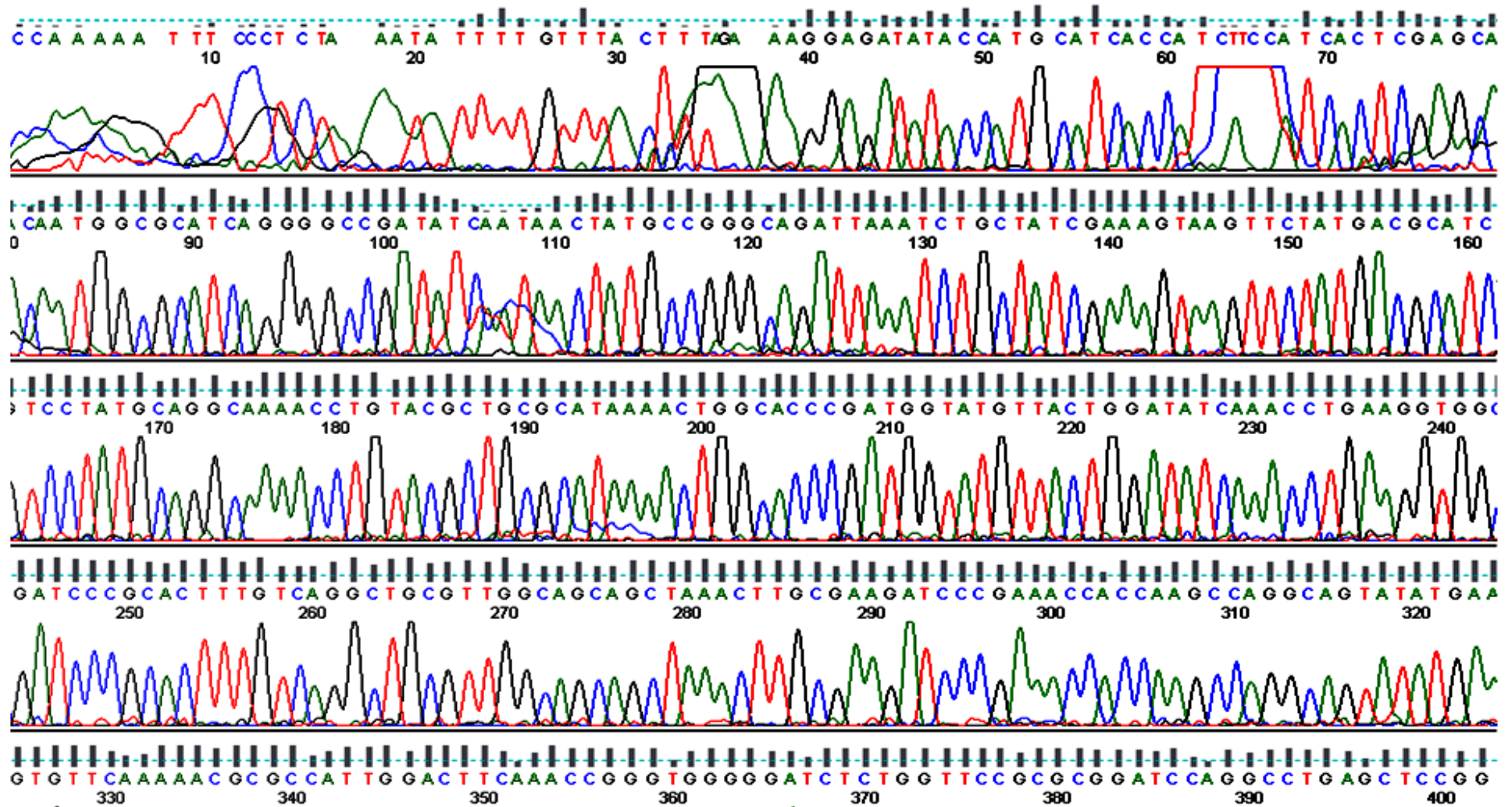
Şekil 4.3. pTOLT-CHY plazmitinin restriksiyon enzim haritası (a: doğrusal, b: dairesel)



Şekil 4.4. Elde edilen pTOLT-CHY plazmit DNA'sının şematik görüntüsü

Bu işlemlerden sonra oluşturmuş olan rekombinant pTOLT-CHY plazmitini pozitif olarak taşıyan hücrelerden izole edilen plazmit DNA'lar Universal T7 promotor primeri ile beraber DNA dizileme (sequencing) işlemi yapılması için "Refgen" firmasına gönderildi.

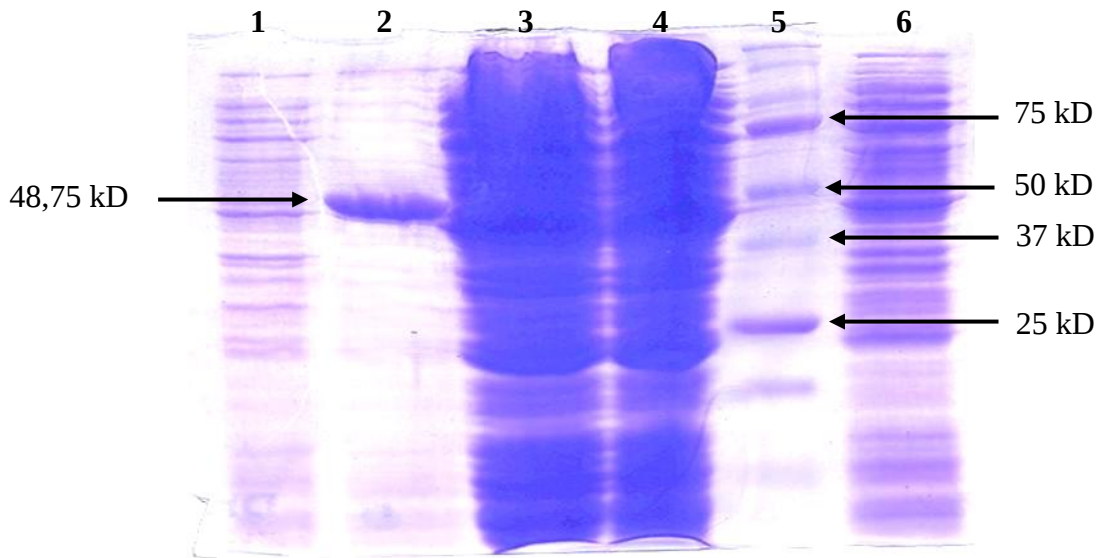
Kimozin genini kodlayan DNA fragmanının Tol-A-III proteinine füzyon şeklinde herhangi bir çerçeve kayması problemi olmaksızın başarılı bir şekilde klonlayabildiğimiz aşağıdaki DNA dizileme kromatogramından (Şekil 4.5) alınan DNA dizisi ile analiz edilerek ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4.5. pTOLT-CHY vektörünün DNA dizileme sonucunun kromotogram şeklindeki görüntüsü

#### 4.4. Tol-A-III-Kimozin Füzyon Proteinin Ekspresyon Çalışmaları

DNA dizileme için gönderilen numunelerden Tol-A-III-Kimozin'in üretiminde kullanmak üzere pTOLT-CHY plazmit DNA'ları *E. coli* BL21 pLysE suşuna transformasyon yapıldı. Transformasyon yapıp ekilen petri tabaklardan dikkatlice birer koloni alınarak 5 ml'lik LB ve ampicilin (100 µg/ml) ve kloramfenikol (34 mg/ml) içeren kapaklı kültür tüplerinde 37 °C' de gece boyu yetiştirildi. Bu kültürler 500 ml'lik 100 µg/ml ampicilin ve 34 mg/ml kloamfenikl içeren LB besiyerlerine transfer edildi ve 37 °C'de 250 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde yetiştirilmeye başlandı. UV spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde OD<sub>600</sub> ~ 0,7 olduğunda IPTG ile indüklemeye yapıldı. İndüksiyon sonrasında yaklaşık 3 saat kadar daha inkübe edilerek yetiştirilen hücrelerden alınan numuneler % 12'lik SDS PAGE'ye tabi tutuldu. Elektroforez işlemleri bittikten sonra SDS PAGE jelleri kasetlerden çıkartılarak Coomassie brilliant mavi boyası ile boyandı. Boyama işlemlerinin akabinde iyice yıkanıp temizlenen jeller tarayıcı kullanılarak resim şeklinde digital ortamna alındı.

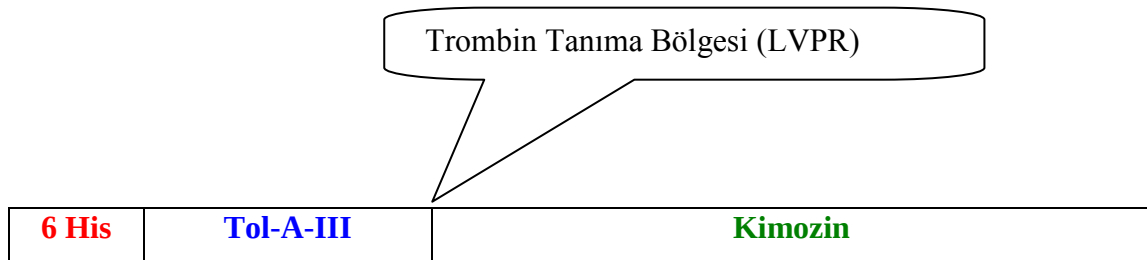


Şekil 4.6. Tol A-III-Kimozin füzyon proteininin saflaştırılmasının %12'lik SDS PAGE jelinde gösterilmesi 1. pTOLT plazmitini içeren *E. Coli* BL21 pLysE hücre lizatı, 2. His-Link afinite rezinini içeren kolondan elde edilen elüat, 3. Afinite kolonundan geçirilen süpernatant 4. Yüksek hızda santrifüj sonrası elde edilen pelet 5. BioRad dual color precision plus protein markörü 6. pTOLT-CHY plazmitini taşıyan indüklenmemiş hücre lizatı

Afinite kromatografisi ile saflaştırılma işleminin ardından, şekil 4.6.'de görüldüğü gibi Tol-A-III-Kimozin füzyon proteini saflaştırılmıştır. Füzyonun amino ucuna eklenen histidinlerin (6 adet) nikel ile olan afinitesi ile füzyon kolona bağlanmış, diğer proteinler kolondan ayrılmış ve böylece saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Tol-A-II-Kimozin füzyon proteininin amino asit dizisi (1-123: Tol-A-III; 124-447 Kimozin proteini) (Anonim, 2012ı)

|             |             |            |            |            |            |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 10          | 20          | 30         | 40         | 50         | 60         |
| MHHHHHSSN   | NGASGADINN  | YAGQIKSAIE | SKFYDASSYA | GKTCTLRIKL | APDGMLLDIK |
| 70          | 80          | 90         | 100        | 110        | 120        |
| PEGGDPALCQ  | AALAAAKLAK  | IPKPPSQAVY | EVFKNAPLDF | KPGGGSLVPR | GSRPELRAPY |
| 130         | 140         | 150        | 160        | 170        | 180        |
| GGRMGEEVASV | PLTNYLDSQY  | FGKIYLGTPP | QEFTVLFDTG | SSDFWVPSIY | CKSNACKNHQ |
| 190         | 200         | 210        | 220        | 230        | 240        |
| RFDPRKSSTF  | QNLGKPLSIH  | YGTGSMQGIL | GYDTVTVSNI | VDIQQTVGLS | TQEPGDVFTY |
| 250         | 260         | 270        | 280        | 290        | 300        |
| AEFDGILGMA  | YPSLASEYSI  | PVFDNMMNRH | LVAQDLFSVY | MDRNGQESML | TLGAINPSYY |
| 310         | 320         | 330        | 340        | 350        | 360        |
| TGSLHWVPVT  | VQYQWQFTVD  | SVTISGVVVA | CEGGCQAILD | TGTSKLVGPS | SDILNIQQAİ |
| 370         | 380         | 390        | 400        | 410        | 420        |
| GATQNQYGEF  | DIDCDNLSYM  | PTVVFEINGK | MYPLTPSAYT | SQDQGFCSTG | FQSENHSQKW |
| 430         | 440         |            |            |            |            |
| ILGDVFIREY  | YSVFDRAANNL | VGLAKAI    |            |            |            |

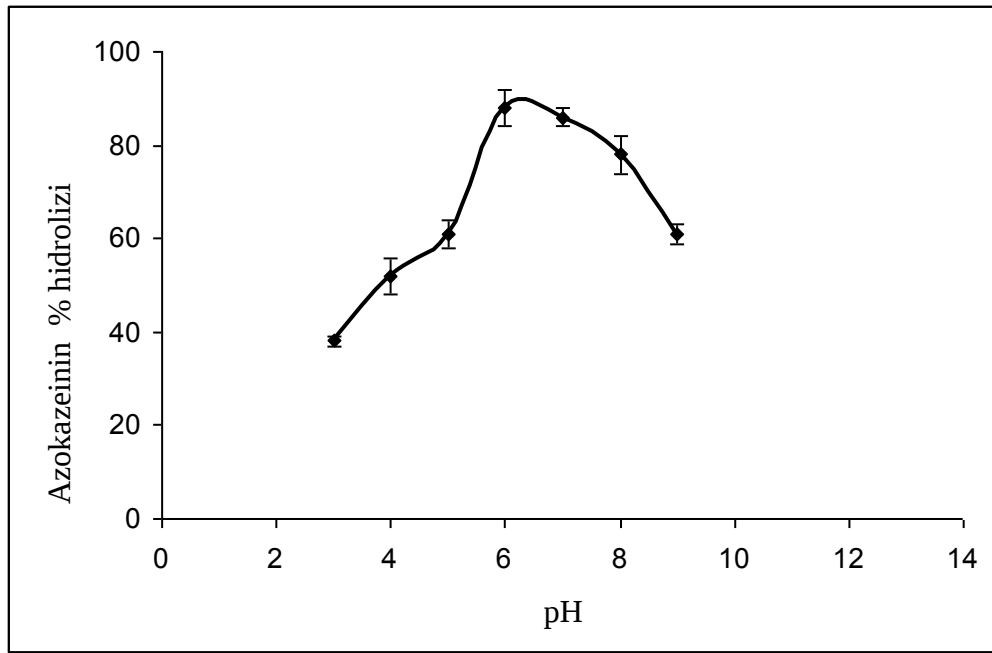


Şekil 4.7. Üretilen Tol-A-III-Kimozin füzyon proteininin şematik gösterimi

#### 4.5. Saflaştırılan Füzyon Proteinin Kantitatif Analizi

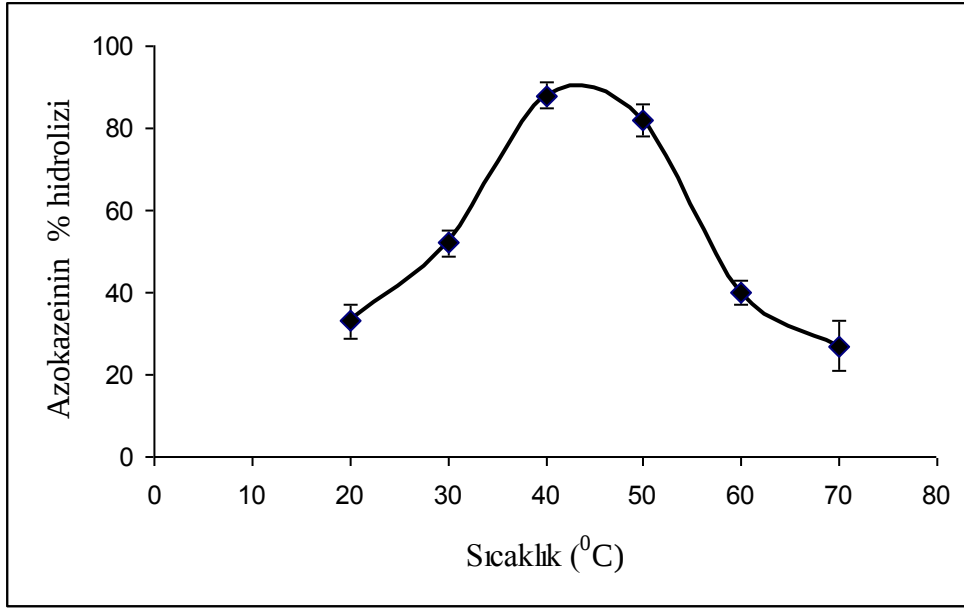
“Expasy tools” sitesinde bulunan “ProtParam tool” una girilerek alınan verilerden Tol-A-III-Kimozin füzyon’unun teorik moleküler ağırlığı 48755,8 Dalton ve molar absorpsiyon katsayısının (extinction coefficient) ise  $58260 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Anonim, 2012ı). Daha sonra saflaştırılan Tol-A-III-Kimozin füzyon proteininin absorbansı 280 nm’ de UV spektrofotometresinde ölçülerek, gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra saflaştırılan proteinin miktarı (mg/ml) olarak hesaplandıktan sonra toplam verim (80 mg/L) olarak bulunmuştur.

#### 4.6. Total Proteolitik Aktivite ve pH ile Sıcaklığın Proteolitik Aktiviteye Etkisi



Şekil 4.8. pH’nın proteolitik aktivite üzerine etkisi

Azokazeine dayalı metodla belirlenen total proteolitik aktivite  $0,98 \pm 0,01 \text{ U/mg protein}$  olarak belirlenmiştir. Yine optimum pH 6,5 ve optimum sıcaklık  $40^\circ\text{C}$  olarak belirlenmiştir. Analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 4.9. Sıcaklığın proteolitik aktivite üzerine etkisi

#### 4.7. Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi

Berridge (1952)'ye belirlenen süt pıhtı aktivitesi Tol-A-III-Kimozin füzyon proteinini için 200 U/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Tol-A-III-Kimozin füzyon proteininin süt pıhtılaştırma aktivitesi

E. Saflaştırılan Tol-A-III-Kimozin proteini 1. pTOLT plazmitini içeren hücre lizatı, 2. pTOLT-CHY plazmitini içeren indüklenmemiş hücre lizatı. 3. *E. Coli* BL21 pLysE hücre lizatı

Üretilen PTOLT-CHY plazmit vektörü ve uygun *E. coli* suşu BL21 pLysE kullanılarak Tol-A-III proteinine füzyon olarak 80 mg/L verimle elde edilmesi başarıldı. Saflaştırılan füzyon proteininin amino asit dizisi “Expasy Translate tool”u kullanılarak elde edilmiştir. İleriki çalışmalarda üretilen füzyon proteini trombin ile Tol-A-III proteininden ayrılarak füzyon protein ile kimozin arasındaki aktivite farklılıkları araştırılabilir.

## 5. SONUÇ

Şu anda ülkemizde hem endüstride hem de kırsal kesimde kullanılan peynir mayaları üç grupta toplanmaktadır. Bunlardan ilki direk kimozen enziminin doğal kaynağı olan dana şirdenin den izole edilen renin'dir. Ülkemizde bu yolla üretim yapan firmaların en önemli sorunu yeterli dana kesimi yapılmadığından hammadde problemidir. Tahmin edilebileceği gibi dünya çapındaki peynir endüstrisinin tamamının kimozen ihtiyacını bu yolla karşılamak mümkün olmamaktadır. Ayrıca şirdenden saflaştırma sırasında pepsin kirliliği de olabilmekte ve bu da peynirin acılaşmasına ve tadının bozulmasına sebep olmaktadır. Ülkemizde bu yolla yani doğal kimozen eldesi için bol miktarda hayvansal şirden ithal edilmektedir ancak bu hayvanların hepsinin buzağı - dana olup olmadığı bilinmemektedir bu da bilinçli tüketicilerin peynir tercihlerinde önem arz etmektedir. İkinci pıhtılaştırıcı kaynağı mikrobiyel pıhtılaştırıcılardır, bu yolla peynir üretim prosesi esnasında kimozenle birlikte birçok yan ürün organizma tarafından ortama salınır ki, bunlarda peynirin tat ve tekstüründe bozulmalara yol açar. Üçüncü kimozen kaynağı ise aktivite şartlarını en optimal düzeyde sağlamak için gerekli modifikasyonlar yapılmış, ekstra hiçbir enzimi içermeyen devamlı olarak aynı kaliteyi sağlayabilen rekombinant kimozenidir. Günümüzde rekombinant kimozenin yerli üretiminin hiç olmayışı ülkemiz için ciddi bir döviz kaybına yol açmaktadır. Bu kapsamda rekombinant kimozen üretiminin ülkemiz için bir katma değeri olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada üretilen rekombinant kimozen enzimi miktar ve aktivite olarak yeterli seviyede olmasına rağmen verimin organizma kültürünün sadece erlenmayerler de yapılmasından dolayı düşük olduğu gözlemlenebilir ancak sistemin verimi fermentör kullanılarak ve üretim şartlarında optimize edilerek çok daha artırılabilir. Ayrıca füzyon olan enzim ekli olan füzyonundan ayrıldığı takdirde aktivitesinde değişiklikler meydana gelebilir, bu da verimi artıran faktörlerden bir diğeri olabilir.

Bu enzimi kullanılan sistem gibi prokaryotik olmayan *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *K. lactis* ve *H. polymorpha* gibi sekresyon yapabilen ökaryotik sistemler kullanarak enzim direk sıvı besi yeri ortamına salgılanarak kimozen elde edilebilir ki, bu hem fermentör

hem de devamlı sistemler için daha uygun olmaktadır. Bu sebeple yukarıdaki sistemlerden ikisi (*P. pastoris*, *K. lactis*) ile çalışmalar devam etmektedir.

Sonuç olarak sınırlı miktarda da olsa çalışmamızda rekombinant kimozen enzimi elde edilmiş olup, bu çalışma bundan sonra yapılacak rekombinant kimozen ve benzeri rekombinant enzimlerin üretilebilmesi için yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1994. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland PPublishing, p. 308-318.
- Alper, J., 2004. Bioengineering. Biology and inkjets. Science; 305, 1895.
- Alper, J., 2003. Biotechnology. Hatching the golden egg; a new way to make drugs. Science; 300, 729-730.
- Anonim, 1998. 1998-1999 Catalog. New England BioLabs. USA.
- Anonim, 2010a. <http://scienceniche.com/wp-content/uploads/2008/12/plasmidprocess.gif> (22.08.2010)
- Anonim, 2010b. Restriction enzyme. [http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction\\_enzyme](http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_enzyme) (01.11.2010)
- Anonim, 2010c. [http://www.mun.ca/biology/scarr/Fg15\\_01.gif](http://www.mun.ca/biology/scarr/Fg15_01.gif) (08.08.2010)
- Anonim, 2010e. <http://faculty.ccri.edu/lmfrolich/Microbiology/restriction.gif> (01.11.2010)
- Anonim, 2011a. <http://www.gidateknolojisi.org/?p=331> (10.12.2011)
- Anonim, 2011b. [http://www.milknmorestore.net/cheese\\_production\\_flow\\_chart.html](http://www.milknmorestore.net/cheese_production_flow_chart.html) (09.12.2011)
- Anonim, 2011c. <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-nviron/IMMOB/crosslink.htm>. (13.10.2011).
- Anonim, 2011d. <http://flylib.com/books/3/110/1/html/2/images/fig7-7.jpg> (14.12.2011)
- Anonim, 2011e. <http://www.technet.pnnl.gov/sensors/biological/projects/images/biological288.jpg> (14.12.2011).
- Anonim, 2011f. <http://www.docstoc.com/docs/77860294/immobilization-of-enzyme---College-of-Engineering> (20.12.2011).
- Anonim, 2011g. <http://media.web.britannica.com/eb-media/76/69076-004-17A6713C.jpg> (20.12.2011)
- Anonim, 2011h. [http://www.tarimziraat.com/faydali\\_bilgiler/gida/273-peynirin\\_besin\\_ozellikleri.html](http://www.tarimziraat.com/faydali_bilgiler/gida/273-peynirin_besin_ozellikleri.html) (20.12.2011).
- Anonim, 2012a. <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs560/topic1/t1g/t1g.htm> (14.09.2012).
- Anonim, 2012b. <http://www.arserrc.gov/CaseinModels/> (14.09.2012).
- Anonim, 2012c. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Peynir\\_-\\_cite\\_note-4](http://tr.wikipedia.org/wiki/Peynir_-_cite_note-4) (10.08.2012)
- Anonim, 2012d. <http://cheeseheadsdoc.files.wordpress.com/2010/07/cheese-world.jpg> (15.09.2012)
- Anonim, 2012e. <http://www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1260108315>. (15.09.2012)
- Anonim, 2012f. <http://lab.tekim.undip.ac.id/proses/2010/03/04/hidrodinamika-reaktor/> (15.09.2012)
- Anonim, 2012g. <http://image.made-in-china.com/2f0j00iBJadrAhCYgE/Stainless-Sreel-Airlift-Fermenter-In-Situ-.jpg>. (15.09.2012)
- Anonim, 2012h. <http://www.medorex.com/flycms/Fixedbed+fermentors/0731465357.html> (15.09.2012)
- Anonim, 2012i. ExPASy Proteomics Server ProtParam tool. <http://expasy.org/cgi-bin/protparam>. (15.07.2012)
- Anonim, 2012j. <http://web.expasy.org/translate/>
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, Ankara.

- Beppu, T., 1983. The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends Biotechnol.* 1, 85-89.
- Berridge, N.J., 1952. An improved method of observing the clotting of milkcontaining rennin. *Journal of Dairy Research*, 9, 328-329.
- Broome, MC., Limsowtin, GYK., 1998. Milk coagulants. *Aust. J Dairy Technol*, 53(3), 188.
- Brown, T.A., 1990. *Gene Clonning. Second Edition.* London: Chapman & Hall, p. 3-11.
- Büyükkılıç, D., Arpacıoğlu, H., 1990. Süt ve Ürünleri Sanayinde Verimlilik ve Firmalararası Karşılaştırma, s: 9-10, Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları, Yayın no: 406, Ankara.
- Carr, C.M., Kim, P.S., 2003. A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* 73: 823–832.
- D'Ambrosio, A., Rossano, R., Ungaro, N., Riccio, P., 2003. Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 22, 145-150.
- Dervişoğlu, M., Aydemir, O., Yazıcı F., 2007. Peynir Yapımında kullanılan pıhtılaştırıcı enzimler ve kazein fraksiyonları üzerine etkileri. *Gıda*, 32 (5), 241-249.
- Doble, B.W., Woodgett, J.R., 2003. GSK-3: Tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell. Sci.* 116: 1175–1186.
- Doğruyol, H., 2007. Gıdalardaki Katkı Maddeleri ve Zararları, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Dubos, J., 1951. Louis Pasteur: Free Lance of Science, Gollancz. Quoted in Manchester K. L. (1995) Louis Pasteur (1822–1895)—chance and the prepared mind". *Trends Biotechnol* 13 (12): 511–515
- Er, B., Sarımehtetoğlu, B., 2009. Süt endüstrisinde mikrobiyel enzim kullanımı. *Vet. Hekim Der. Derg.*, 80 (1), 25-30.
- Faergeman, N.J, Knudsen, J., 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 323: 1–12.
- Fernandao Luis, G.C., Norman, F.D., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and cryfish (*Pasifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17 (2), 97-113.
- Foltman, B., 1987. General and molecular aspects of rennets. In: Fox PF, editor. *Cheese: Chemistry. Physics and Microbiology*, 1, 37-68.
- Fox, P. F., 2000. *Fundamentals of cheese science.* Springer, p. 388.
- Fox, P. F., 1999. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Volume 1. Springer,.
- Fox, PF., 1988. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnol Appl Biochem*, 10, 522-535.
- Garrett, R.H., Grisham, C.M., 1999. *Biochemistry Second Edition.* Saunders College Publishing, 426-427.
- Gilliland, GL., Winborne, EL., Nachman, J., Wlodawer, A., 1990. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins*, 8, 82-101
- Guda, C., Zhang, X., McPherson, D.T., Xu, J., Cherry, J.H., Urry, D.W., Daniell, H., 1995. Hyper expression of an environmentally friendly synthetic polymer gene. *Biotechnol. Lett.*, 17,745–750.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J. Mol Biol.*, 166, 557–580.

- Hanahan, D., 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning: A Practical Approach (ed. D.M. Glover), 1, 109-135. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Hill, RD., 1968. The nature of the rennin sensitive bond in casein and its possible relation to sensitive bonds in other proteins. *Biochem Biophys Res Commun.*, 33, 659-663.
- Hill, RD., 1969. Synthetic peptide and ester substrates for rennin. *J. Dairy Res.*, 36, 409-415.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Jasvir, S., Navdeep, G., Gina, D., and Debendra, K., 1998. Studies on Alkaline Protease by *Bacillus* sp. NG312. All rights of any nature whatsoever reserved. 0273-2289 /99/76/0057
- Kuk, S., Erensoy, A., 2008. Gene Cloning, Selection of Plasmids and Application of *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Gene. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (1), 16-22.
- Laemmli, U.K., 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, 227 (5259), 680-685
- Lewin, B., 2000. *Gene VII* New York: Oxford Un. Pres, p. 52-60.
- 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. *Int. Dairy J.*, 16, 4: 335-343.
- McMahon, DJ., Brown, RJ., 1984. Enzymic coagulation of milk casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 67, 745-748.
- Metin, M., 2003. Süt Teknolojisi, Sütün Bileşimi ve İşlenmesi, s: 3-4, 5. Baskı, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Yayın no: 33, İzmir.
- Mohanty, AK., Mukhopadhyay, UK., Grover, S., Batish, VK., 1999. Bovine chymosin: Production by rRNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, 17, 205-217.
- Neelakantan, S., Mohanty, AK., Kaushik, JK., 1999. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Current Science*, 77, 143.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, USA. (W.H. Freeman and Company)
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Gupta and Gupta S.R., 2001. Characterization and Wash Oh, Y., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S., 1999. Protease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its Application in The Deproteinization of shrimp and Crab Shell Wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 27 : 3-10.
- Pedersen, VB., Christensen, KA., Foltmann, B., 1979. Investigations on the activation of bovine prochymosin. *Eur. J. Biochem.*, 94, 573-580.
- Performance Analysis of an SDS-Stable Alkaline Protease From a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 493-497.
- Rao, MB., Tabksale, AM., Ghatge, MS., Deshpande, VV., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbol. Mol. Bio. Rev.*, 62 , 597-635.
- Reich, V., 2002. Cheese January Newsletter, Moscow Food Co-op Food Info.
- Renugopalakrishnan, V., Garduno-Juarez, R., Narasimhan, G., Verma, C.S., Wei, X., Li, P., 2005. Rational design of thermally stable proteins: relevance to bionanotechnology. *J Nanosci Nanotechnol*. 5 (11): 1759-1767.

- Ridgwell, J., Ridgway, J., 1986. Food around the World, Oxford University Press, ISBN 0-19-832728-5.
- Smith, A.D., 1997. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford
- Sousa, M. J., Ardö, Y. and McSweeney, P. L. H., 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 11: 327–345.
- Spök, A., 2006. Safety regulations of food enzymes. *Food Technol Biotech*, 44 (2), 197-209.
- Sultuybek, G., Ulutin, T., Sayhan, N., 1995. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Tıpta Kullanımı. İstanbul. University Press.
- Ustunol, Z., Hicks, CL., 1990. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. *J. Dairy Sci.*, 73, 8-16.
- Vallejo, JA., Ageitos, JM., Poza, M., Villa, TG., 2008. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia Pastoris*. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 10606-10610.
- Watson, J.D., Tooze, J. & Kurtz, D.T., 1983. Recombinant DNA. A short course, W.H. Freeman and Company, Newyork.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry. 274-373
- Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S., 1999. Production And Purification of Protease From a *Bacillus subtilis* That Can Deproteinize *Crustacean* Wastes. *Enzyme And Microbial Technology*. 26 : 406-413.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yakup ULUSU  
Doğum Tarihi ve Yeri : 18.11.1982 Tokat  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 0505 9311157  
e-mail : yakupulusu@yahoo.com

### Eğitim

| Derece        | Eğitim Birimi                                 | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|-----------------------------------------------|------------------|
| Yüksek Lisans | Gaziosmanpaşa Üniversitesi<br>Biyoloji Bölümü | 07.09.2007       |
| Lisans        | Atatürk Üniversitesi Biyoloji<br>Bölümü       | 08.07.2004       |

### İş Deneyimi

| Yıl       | Yer                                           | Görev               |
|-----------|-----------------------------------------------|---------------------|
| 2004-2008 | Gaziosmanpaşa Üniversitesi<br>Biyoloji Bölümü | Araştırma Görevlisi |
| 2008-     | Gaziosmanpaşa Üniversitesi<br>Biyoloji Bölümü | Öğretim Görevlisi   |

### Yayınlar

Sonmezoglu, S., Ulusu, Y., Gedikli, F., Sonmezoglu, O.A., Gokce, İ., High Efficiency Single-Layer Organic Light-Emitting Diode Based On Green Fluorescent Protein, 2012. Philosophical Magazine Letters. Vol. 92, No. 5, 211–216.

Ulusu, Y. and Gökçe, İ., Codon Optimization and Cloning of Bovine Chymosin Gene into pTOLT Expression Plasmid of *Escherichia coli*, 2012. Journal of New Results in Science. Vol. 1, 33-39.

Ulusu, Y., Bilgin Şentürk, S., Gedikli, F., Lakey, H. J., Gökçe, İ., Bacterial toxin Colicin N-T domain gains ordered structure upon binding C terminal domain of TolA 18. International Biomedical Science & Technology Symposium September 10-13, 2012 Tokat.

- Ulus, Y., Buldağ, A., Bilgin Şentürk, S., Gökçe, İ., *Pichia pastoris* pIB4α Sekresyon Pilazmid Vektörünün Moleküler Olarak Modifikasyonu. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012 İzmir.
- Ulus, Y., Bilgin Şentürk, S., Gökçe, İ., Rekombinant kimozen enziminin *Escherichia coli* mikroorganizmasında pTOLT ekspresyon sistemi kullanılarak üretilmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012 İzmir.
- Bilgin Şentürk, S., Çadırcı, B. H., Ulus, Y., Gökçe, İ., Ksılanaz Üreticisi Mikroorganizmaların Toprakdan İzolasyonu MALDI-TOF Yöntemiyle ve 16S rDNA Dizi Analiziyle Tür Teşhisi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012 İzmir.
- Bilgin Şentürk, S., Ulus, Y., Gökçe, İ., *Bacillus subtilis*'den Ksılanaz Enzimini Kodlayan GeninEldesi ve pIB4α Vektörüne Klonlanması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012 İzmir.
- Kuduğ, H., Bilgin Şentürk, S., Ulus, Y., Gökçe, İ., His-Tag'lı Selüloz enziminin rekombinant olarak üretilmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılması. Kromatografi 2012 Kongresi, 6-9 Haziran 2012 Tokat.
- Ulus, Y., Bilgin Şentürk, S., Kuduğ, H., Gökçe, İ., *Escherichia coli* mikroorganizmasında rekombinant olarak üretilen His-Tag'lı kimozen enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması. Kromatografi 2012 Kongresi, 6-9 Haziran 2012 Tokat.
- Ulus, Y., Bilgin Şentürk, S., Kuduğ, H., Gökçe, İ., Rekombinant olarak üretilen His-Tag'lı yeşil floresan proteininin (GFP) afinite kromatografisiyle saflaştırılması. Kromatografi 2012 Kongresi, 6-9 Haziran 2012 Tokat.
- Gökçe, İ., Gedikli, F., Ulus, Y., Bilgin, S., Antiapoptotik Bcl-2 Ailesi Proteinlerinin Yapay Membranlara İnseriyonu, XXV. Ulusal Kimya Kongresi 27 Haziran-2 Temmuz 2011 Erzurum.
- Gökçe, İ., Gedikli, F., Bilgin, S., Ulus, Y., Rekombinant Tam Boy Antiapoptotik Bcl-XL Proteininin Yapı ve Fonksiyon Çalışmaları, XXV. Ulusal Kimya Kongresi 27 Haziran-2 Temmuz 2011 Erzurum.
- Gedikli F., Bilgin S., Ulus Y., Gökçe I., "Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin immünolojik, fonksiyonel ve yapı çalışmaları için üretilmesi" XXIII. *Ulusal Kimya Kongresi* 16-20 Haziran 2009
- Gedikli F., Ulus Y., Gökçe I., "Anti-apoptotik Bcl-XL proteininin immünolojik, fonksiyonel ve yapı çalışmaları için üretilmesi" XXIII. *Ulusal Kimya Kongresi* 16-20 Haziran 2009.

- Ulus Y, Öztürk L, Farklı Dozlardaki Kadmiyumun Maydanoz (*Petroselinum hortense*) Bitkisinde Fotosentetik Pigmentler Ve Total Fenolik Bileşikler Üzerine Etkisi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2008 Trabzon.
- Ulus Y, Öztürk L, Karataş İ., Maydanoz (*Petroselinum hortense*) bitkisinde kadmiyum stresinin antioksidant enzim aktiviteleri üzerine etkileri. 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007 Malatya.
- Karataş İ, Öztürk L, Ulus Y., *Tropaeolum majus* L. yapraklarında senesens sürecinde sentetik ve doğal oksin hormonlarının klorofil, nişasta, protein miktarları ve enzim aktiviteleri üzerine etkisinin incelenmesi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 16-30 Haziran 2006 Kuşadası/Aydın