

# Farklı pH ve sıcaklık değerlerinin *Pichia pastoris*'de rekombinant ekspanzin üretimi üzerine etkisi

## *Effect of different pH and temperature on the production of recombinant expansin in Pichia pastoris*

Merve AYTEKİN AKBABA<sup>1</sup> , Asliye KARAASLAN<sup>2</sup> , Selin ALİHANOĞLU<sup>1</sup> , Hasan VARDİN<sup>1</sup> ,  
Mehmet KARAASLAN<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Şanlıurfa Teknik Bilimler MYO, Gıda Tekn. Programı, Şanlıurfa

### To cite this article:

Aytkin Akbaba, M., Karaaslan, A., Alihanoglu, S., Vardin, H., Karaaslan, M., 2018. Farklı pH ve sıcaklık değerlerinin *Pichia pastoris*'de rekombinant ekspanzin üretimi üzerine etkisi Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 22(2): 207-214

### Address for Correspondence:

Mehmet KARAASLAN  
e-mail:  
mk385@cornell.edu

### Received Date:

23.05.2017

### Accepted Date:

08.03.2018

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ÖZ

Bu çalışma kapsamında rekombinant Ekspanzin üretimi amacıyla domatesten izole edilen LeExp1 geni *Pichia pastoris* mayalarına pPIC9K vektörü vasıtasıyla aktarılmıştır. Ekspresyon koşulları 20, 25, 30°C ve pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 değerleri için ayrı ayrı sağlanmıştır. Fermentasyon özütlerinin Biomass analizi ve Bradford assay deneyleri sonucunda toplam rekombinant protein miktarları ve toplam hücre konsantrasyonları belirlenmiştir. Farklı pH ve sıcaklık değerlerinin rekombinant protein üretim miktarına ve toplam hücre konsantrasyonuna olan etkileri incelenmiştir. Deneysel sonuçlara göre maksimum rekombinant ekspanzin üretimi için *P. pastoris* mayalarının optimum fermentasyon koşulları 25°C sıcaklık ve pH 7.0 olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ekspanzin, *Pichia pastoris*, Rekombinant protein, pH, Sıcaklık

### ABSTRACT

In this study LeExp1 gene isolated from tomato genome was transferred to *Pichia pastoris* by using pPIC9K vector for production of recombinant Expansin protein. Recombinant protein expression was carried out at 20, 25, 30°C temperature and 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 pH levels. Total protein and dry cell weight amounts was determined in fermentation medium. The effects of different fermentation temperature and pH level in the medium on protein expression and total cell concentration were investigated. The optimum fermentation conditions for *P. pastoris* were determined as 25°C and pH 7.0 according to experimental results.

**Key Words:** Expansin, *Pichia pastoris*, Recombinant Protein, pH, Temperature,

## Giriş

Bitkilerde hücre duvarına yerleşmiş halde bulunan ve hücre duvarı modifikasyonu-na katılan (Cosgrove, 2000) ekspanzin proteinleri polisakkaritler arasındaki ko-valent olmayan bağları parçalama yeteneğine sahiptir (Cosgrove, 2005). Ekspanzinler sahip oldukları bu özellikleri

sayesinde hücre duvarı yapısının geri dönüşümsüz olarak modifikasyonuna katılırlar ve yaprak taslaklarının oluşumu, meyvenin olgunlaşması, ksilem dokunun oluşumu, tozlaşma, tohum çimlenmesi, yaprak dökümü (Sampedro ve Cosgrove, 2005), polen tüplerinin gelişimi gibi morfolojik değişimlerde rol oynarlar. Filogenetik olarak ekspanzin A (EXPA), ekspanzin B (EXPB),

ekspanzin benzer A (EXLA) ve ekspanzin benzer B (EXLB) olmak üzere dört alt grupta incelenen Ekspanzinler bitkinin kök ve gövdedeki meristemlerinde ve bitkinin büyüme organlarında bulunmaktadır (Sampedro ve Cosgrove, 2005). Ekspanzinler selüloz mikrofibrilleri ve pektin matriks üzerine etki ederek hücre duvarının modifikasyonunu ve parçalanmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra Ekspanzin proteinlerinin diğer pektolitik ve selüloolitik enzimler ile sinerjistik etki göstererek bu enzimlerin etkinliğini artırarak hücre duvarı parçalanmasını teşvik ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ekspanzin proteinleri *in vitro* ortamda hücre duvarının parçalanmasını sağlayan yegane protein olarak literatürdeki yerini almıştır (Cosgrove, 2005). Dolayısıyla Ekspanzin proteinleri endüstride kullanılmakta olan pektolitik -selülotik enzimlere ikame olarak kullanım potansiyeline sahiptirler. Ekspanzin proteinleri doğada az miktarda bulunmakta ve düşük miktarlardaki izolasyonu dahi zahmetli biyokimyasal metotlar gerektirmektedir. Dolayısıyla bu proteinlerin biyoteknolojik metotlarla laboratuvar koşullarında üretilmesi bir çözüm yolu olarak öne çıkmaktadır. Domates çabuk yumuşa-yabilen bir bitki olduğundan ekspanzin proteini üretimi için uygun bir kaynak olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

*P. pastoris* mayaları *Fungi* alemi, *Ascomycota* şubesi, *Saccharomycetes* sınıfı, *Saccharomycetales* takımı, *Saccharomycetaceae* familyası, *Komagataella* cinsinin bir türüdür. Metiltropik bir maya olan *P. pastoris* ekspresyon sistemi son yıllarda gerek araştırma amaçlı gerekse de endüstriyel olarak çok sayıda rekombinant protein üretiminde başarılı şekilde kullanılmaktadır (Higgins ve Cregg, 1998). Beş binden fazla proteinin başarılı bir şekilde ekspresyonu *P. pastoris* mayalarını en iyi bilinen heterolog protein sistemlerinden biri olduğunun göstergesi olmuştur (Goodrick ve Kurtzman, 2009; Ahmad ve ark., 2014; Spohner ve ark., 2015). *P. pastoris* ekspresyon sistemi kolay kullanımı, düşük maliyetli oluşu ve hızlı ekspresyon yeteneği gibi

özelliklerinden dolayı oldukça popüler bir sistem haline gelmiştir. Ayrıca *P. pastoris* ekspresyon sistemi en güçlü ve en yüksek verimli promotörlerden biri olan alkol oksidaz 1 (AOXI) promotörüne sahiptir (Cereghino ve Cregg, 2000). *P. pastoris* sahip olduğu bazı önemli özellikler sayesinde farklı türlere ait proteinlerin ekspresyonuna uygundur. Bunlar; genetik düzeyde kolaylıkla manipüle edilebilir olması, proteinleri intraselüler veya ekstraselüler olarak yüksek miktarlarda eksprese edebilmesi, geniş pH (3.0 – 7.0) aralığında gelişimini sürdürebilmesi (Cregg ve ark., 1993) ve glikozilasyon, disülfid bağlarının oluşumu, proteinlerin doğru şekilde katlanması gibi yüksek ökaryotik hücrelerde görülen post translasyonel modifikasyonları gerçekleştirilebilmesi şeklinde sayılabilir (Cregg ve ark., 2000). Bu karakteristik özelliklerinden dolayı bakteriler, *Saccharomyces cerevisiae* veya baculovirüslerde fonksiyonel olarak aktif halde eksprese edilemeyen bazı proteinler *P. pastoris*'de başarılı bir şekilde üretilmiştir (Cereghino ve ark., 2001). *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak eksprese edilen proteinlere insan eritroproteini (Soyaslan ve Çalık, 2011 ), poligalaktronat liyaz (Wang ve ark., 2010), lipaz B (Jahic ve ark., 2003), ksilosidaz (Dehnavi ve ark., 2016) üretim çalışmaları örnek verilebilir.

Bu çalışmada domates bitkisinden Ekspanzin proteinini kodlayan gen bölgesinin (*Lycopersicum esculantum*-LeExp1) izole edilmesi ve *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) mayaları kullanılarak rekombinant olarak üretilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda domatesten (*Lycopersicum esculentum*) Ekspanzin proteinini kodlayan gen bölgesi (LeExp1) izole edilmiş ve pPIC9K vektörüne uygun enzimler vasıtasıyla klonlanarak hedef geni taşıyan vektörler elektroporasyon yöntemi ile *P. pastoris* mayalarına transfer edilmiştir. Uygun ekspresyon koşulları sağlanarak farklı pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0) ve sıcaklık (20, 25, 30°C) değerlerinde *P. pastoris* maya hücrelerinde rekombinant Ekspanzin üretim miktarları ve kuru hücre ağırlıkları belirlenmiştir.

## Materyal ve Metot

### Materyal

Bitki materyalleri Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden elde edilerek DNA ve RNA kaynağı olarak kullanılmışlardır. Araştırmada kullanılan kimyasal materyaller Merck ve Sigma Co.'dan elde edilmişlerdir. *P. pastoris* GS115 mayaları Invitrogen firmasından temin edilmiş ve araştırmada kullanılmışlardır.

### LeExp1 Geninin pPIC9K Vektörüne Klonlanması ve Maya Hücrelerine Elektroporasyonu

Maya hücrelerinde rekombinant olarak üretilecek proteinleri kodlayan gen bölgeleri domates bitkisinden izole edilerek toplam RNA, Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda (RT-PZR) kullanılmıştır. PZR reaksiyonu sonucunda hedef genlerin uygun primerler (Forward-Reverse) yardımıyla doğru bir şekilde izole edildiği tespit edilmiştir ve genler klonlama işleminde kullanılmak üzere Illustra™ GFX™ PCR Gel Band Purification Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), uygun restriksiyon ve DNA ligaz enzimleriyle hedef DNA parçacıklarının vektörlere yapıştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda rekombinant Ekspanzin proteinini üretebilir hale getirilmiş pPIC9K vektörü elde edilmiştir. Klonlama işlemi tamamlandıktan sonra üretici firmanın kullanma kılavuzuna bağlı kalınarak Standart *Escherichia coli* JM109 Competent Cells Transformation yöntemi vasıtasıyla *E. coli* hücreleri vektörlerle transforme edilmiştir. *E. coli* hücrelerinde vektörlerin varlığını doğrulama işlemi ilk adımda *E.coli* hücreleri antibiyotikli ortamda çoğaltılarak; 2. adımda ise PZR reaksiyonu ile tamamlanmıştır. *E. coli* hücrelerinde çoğaltılmış olan pPIC9K vektörleri hazırlanan kompetent maya hücrelerine aktarılmadan önce SacI enzimi ile 37°C'de gece boyunca inkübe edilerek doğrusal hale getirilmiş ve elektroporasyon yöntemiyle mayalara aktarılmışlardır. Elektroporasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği *P. pastoris* maya

hücrelerinin Histidinsiz besiyerinde gelişimi ve PZR reaksiyonu sonucuna göre belirlenmiştir.

### Rekombinant Protein Ekspresyonu

Transgenik *P. pastoris* hücrelerinin rekombinant protein üretebilmesi için belli bir konsantrasyona ulaşması amacıyla 25ml BMG (Buffered Minimal Glycerol) besiyerinde (pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0), 150 rpm hızda, 3 farklı sıcaklıkta (20, 25, 30°C' de) yaklaşık 24 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. 600 nm'de OD<sub>600</sub> değeri 2'ye ulaşan örnekler için pelletler ekspresyonda kullanılmıştır. Bu amaçla pelletler BMM (Buffered Minimal Methanol) besiyerinde OD<sub>600</sub> değeri 1'e ulaşana kadar çözündürülmüştür. Pellet besiyeri karışımı 1 litrelik erlenler içerisinde ağzı iki katlı steril gazlı bez ile kapatılarak 250 rpm'de 30°C'de inkübasyona alınmıştır. Her bir örnek için pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 olacak şekilde olarak rekombinant protein ekspresyonu başlatılmıştır. pH değişimi BMM besiyeri içeriğinde yer alan ve farklı pH değerlerinde hazırlanan 1M potasyum fosfat buffer ile sağlanmıştır. Ekspresyon boyunca her 24 saatte bir indüksiyonun devamını sağlamak amacıyla konsantrasyon %0.5 olacak şekilde saf metanol eklenmiştir. 24., 48., 72. ve 96. saatler sonunda 1 ml kültür alınarak pellet ve supernatant ayrıştırılmış ve protein miktarı tayininde kullanılmak üzere -20°C' de muhafaza edilmiştir.

### Kuru Hücre Konsantrasyonu

Kuru hücre ağırlığı ölçümü UV – Vis spektrofotometre kullanılarak 600 nm'de yapılmıştır (Libra S70, BioChrom, UK). Absorbans değerinin hücre konsantrasyonuna dönüştürülmesinde Eş. 1 kullanılmıştır.

$$C (\text{g.l}^{-1}) = 0.275 * OD_{600} \quad (1)$$

OD; 600 nm de optik yoğunluk

### Toplam Protein Konsantrasyonu

Toplam protein konsantrasyonunun ölçümü spektrofotometrik yöntemle Bradford assay (Bradford, 1976) prensibine göre yapılmıştır.

Örnekler (20 µL) 80 µl 1 X Bradford reagent ile karıştırılarak oda sıcaklığında 5 – 15 dakika bekletilmişlerdir. Absorbans değeri 595 nm’de spektrofotometre vasıtasıyla ölçülmüş ve protein miktarı tespit edilmiştir.

### Araştırma Bulguları ve Tartışma

Rekombinant protein ekspresyonu için gerekli olan optimum fermentasyon şartları kullanılan *P. pastoris* suşu ve eksprese edilen yabancı protein çeşidine göre farklılık göstermektedir (Files ve ark., 2001; Sinha ve ark., 2003). Bu nedenlerden dolayı *P. pastoris*’te rekombinant protein üretiminin yapılabilmesi için ortam pH’sının ayarlanması, sıcaklığın değiştirilmesi gibi çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Ling ve ark., 2010). Bu tür kultivasyon seviyesindeki gelişim ortam normlarının tek başına veya kombine olarak modifiye edilmesine dayanan stratejiler mayaların rekombinant protein üretim yeteneklerini arttırırken proteolitik parçalanma seviyesini de minimum düzeylerde tutma potansiyeli taşımaktadır (Ling ve ark., 2010).

Yüksek hücresel gelişim protein salgılanması için önem taşımaktadır. Genel olarak salgılanan rekombinant protein miktarının kültür içerisindeki hücre konsantrasyonuyla orantılı olduğu bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda *P. pastoris* KM71H suşunun kesikli sistem fermentörlerde pH 5.0’da heterolog protein üretimini daha iyi sağladığı belirtilmiştir (Wanderley ve ark., 2009). Chang, (2006)’nın yaptığı bir çalışmada ise *P. pastoris*’in fermentasyon ortamındaki sıcaklık, glikoz konsantrasyonu, yeast ekstrakt miktarı, ve pH değerinin toplam protein, populasyon yoğunluğu ve spesifik büyüme hızı ve minimum lag fazı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre optimum miktarda protein üretimi için sıcaklığın 24.2 °C, glikoz konsantrasyonu %1.9, yeast ekstraktı %1.5, ve pH 7.6 olarak belirlenmiştir ve toplamda 780 mg.l<sup>-1</sup> düzeylerinde olacak şekilde protein elde edilmiştir.

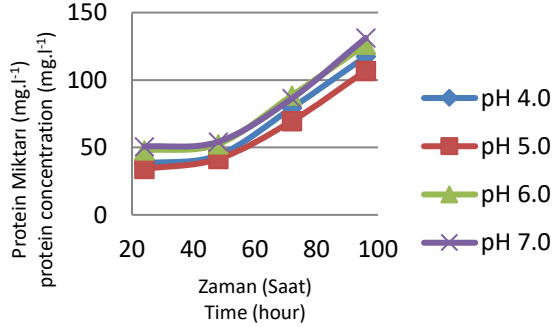
*P. pastoris* pH 3.0 – 7.0 aralığında gelişebilme

özelliği göstermektedir (Cregg ve ark., 1993). pH’nın düşük olmasının hücre büyümesi üzerine fazla bir etkisi yoktur fakat potansiyel proteaz aktivitesini engelleyeceği için olumlu bir durumdur. Proteazların çoğu nötr pH’ da aktiftir ve pH değeri düştükçe aktivitesi azalabilir (Dale ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda heterolog protein üretiminde üretilen proteinin bozulmasını engellemek için farklı pH’ lar denenmiştir (Kobayashi ve ark., 2000; Jahic ve ark., 2003). pH fermentasyon parametresinin rekombinant protein (r-protein) ekspresyon düzeyine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada pH 4.2, 5.0, 5.5 ve 6.0 değerleri incelenmiş ve pH 6.0’da en yüksek hücre konsantrasyonu 53 g.l<sup>-1</sup> ve en yüksek r-protein konsant-rasyonu ise pH 5.0’da 0,27 g.l<sup>-1</sup> olarak elde edilmiştir (Çalık ve ark., 2010). Alkali pH değerinin heterolog protein üretime etkisinin araştırıldığı bir çalışmada pH 8.0’da pH 6.0 kontrol değerine göre daha yüksek değerde protein sentezlendiği gözlenmiştir fakat r-proteinlerin yapısı incelendiğinde protein kalitesinin %50 azaldığı gözlenmiş ve bu durumun nedeninin proteaz aktivitesi engellenmediğinden olabileceği düşünülmektedir (Hu, 2014).

Yapılan bu çalışmalar göz önünde bulundurularak *P. pastoris*’ in rekombinant Ekspanzin ekspresyonuna farklı ortam sıcaklığı ve pH değerinin etkisini gözlemlemek amacıyla bu çalışmada fermentasyon sıcaklıkları olarak 20, 25, 30°C ve besiyeri pH değerleri ise 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 olarak belirlenmiştir. Besiyeri pH’sı 0.5 M sodyum fosfat ve 0.25 M sitrik asit kullanılarak istenilen değerlere ayarlanmıştır.

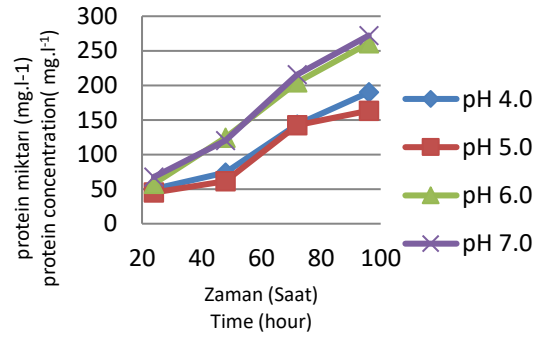
Çizelge 1’de 20, 25 ve 30°C’de farklı ortam pH değerleri kullanıldığında elde edilen toplam protein oranları gösterilmiştir. Yapılan analiz sonucunda fermentasyon süreci 4 gün (96 saat) olarak belirlenmiştir. Denemede kullanılan tüm pH değerlerinde (pH 4.0 – 7.0 aralığı) fermentasyon süresinin gelişimiyle beraber fermentasyon ortamına salgılanan protein miktarlarında artış gözlenmiştir ve maksimum protein miktarları 4 gün sonunda elde edilmiştir. Protein miktarları mg.l<sup>-1</sup> düzeyinde belirlenmiş ve

%0,5 metanol konsant-rasyonunda maksimum protein miktar-larının pH 6.0 ve pH 7.0 değerlerinde bulunduğu ortaya konulmuştur. İstatistiki olarak incelendiğinde ise dördüncü gün sonunda pH 6.0 ve pH 7.0 ortam şartlarının bulunduğu kültürlerin diğer örneklere göre daha yüksek miktarda protein sekresyonuna uygun olduğu sonucuna varılmıştır. 20, 25, 30 °C'de pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de protein üretim miktarlarının zamana bağlı değişim grafikleri Şekil 1, 2 ve 3'de verilmiştir.



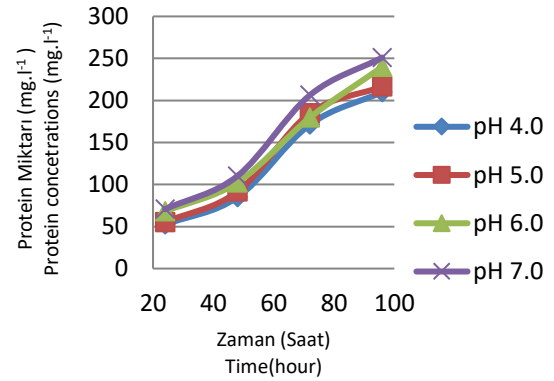
Şekil 1. 20°C ve pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de zamana bağlı protein üretim miktarı (mg.l<sup>-1</sup>).

Figure 1. Total protein concentrations depending on time at 20°C and pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0.



Şekil 2. 25°C ve pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de zamana bağlı protein üretim miktarı (mg.l<sup>-1</sup>).

Figure 2. Total protein concentrations depending on time at 25°C and pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0.



Şekil 3. 30°C ve pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de zamana bağlı protein üretim miktarı (mg.l<sup>-1</sup>).

Figure 3. Total protein concentrations depending on time at 30°C and pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0.

Çizelge 1. pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de ve 20, 25, 30°C'de *P. pastoris* fermentasyonu sonucunda elde edilen toplam protein miktarları (mg.l<sup>-1</sup>).

Table 1. Total protein concentration obtained from *P. pastoris* fermentation at pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de ve 20, 25, 30°C.

Sıcaklık (°C) Temperature (°C)	Zaman(s) Time (h)	pH			
		4.0	5.0	6.0	7.0
20	24	38.12±0.01a <sup>A</sup>	34.11±0.07bA <sup>1</sup>	47.92±0.01cA	50.63±0.03dA
	48	44.23±0.03aB	41.53±0.02bB	52.58±0.02cB	54.12±0.04dB
	72	79.38±0.02aC	69.65±0.11bC	88.53±0.07cC	86.34±0.08dC
	96	117.55±0.04aD	106.92±0.09bD	126.32±0.05cD	131.15±0.02dD
25	24	50.24±0.13aE	45.14±0.03bE	57.84±0.21cE	67.52±0.09dE
	48	74.22±0.18aF	61.30±0.07bF	124.54±0.23cF	120.16±0.17dF
	72	143.51±0.12aG	142.49±0.09aG	204.31±0.02bG	215.42±0.19cG
	96	189.92±0.02aH	163.41±0.07bH	261.13±0.17cH	272.29±0.13dH
30	24	52.46±0.03aK	55.32±0.18bK	67.92±0.19cK	70.65±0.17dK
	48	84.91±0.02aL	91.51±0.13bL	102.56±0.17cL	110.17±0.02dL
	72	171.30±0.21aM	184.87±0.12bM	179.63±0.02cM	206.23±0.19dM
	96	209.93±0.13aN	216.46±0.19bN	239.91±0.13cN	251.12±0.12dN

\* Aynı satırda farklı küçük harflerle (a,b,c,d) gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır (LSD, p < 0.05).

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı büyük harflerle (A, B, ...) gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır (LSD, p < 0.05).

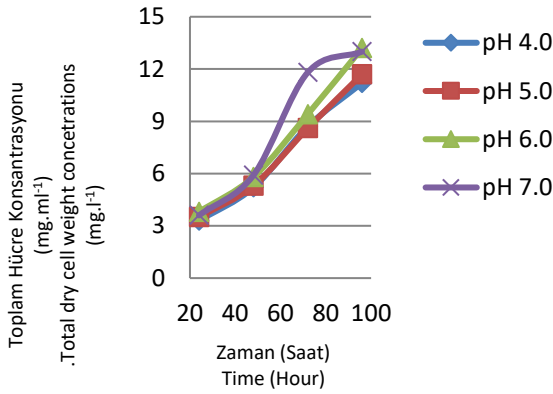
<sup>a,b,c</sup> Means within a same row with different superscript letters are significantly different between different pH values (LSD, p < 0.05).

<sup>1A,B,C</sup> Means within a same column with different superscript letters are significantly different between different temperatures and storage times (LSD, p < 0.05).

Çizelge 2'de benzer fermantasyon koşullarında elde edilen hücre kuru ağırlıkları verilmektedir.

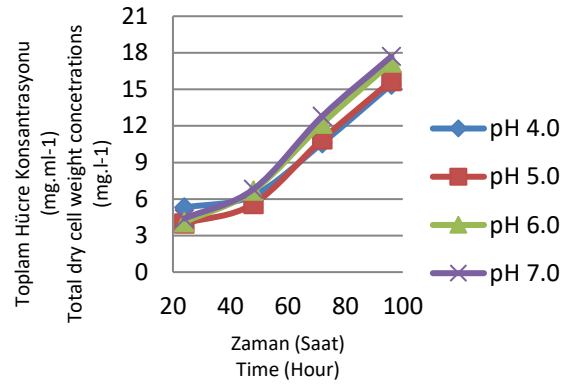
Yapılan çalışmalarda popülasyon yoğunluğu ve salgılanan protein miktarı arasında pozitif yönde

bir korelasyon bulunduğu ifade edilmektedir (Cosgrove 2005). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da popülasyon yoğunluğu ile salgılanan protein miktarı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu destekler niteliktedir. Fermantasyon süresinin gelişimiyle beraber hücre kuru ağırlıklarında bir artış olduğu maksimum yoğunluklara dördüncü günün sonunda erişildiği belirlenmiştir (Şekil 4,5,6).



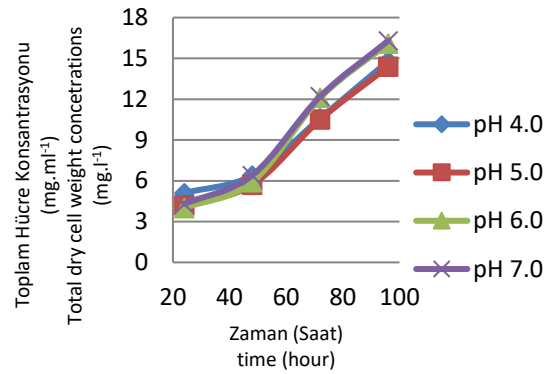
Şekil 4. 20°C ve pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de zamana bağlı toplam hücre konsantrasyonu (mg.ml<sup>-1</sup>).

Figure 4. Total dry cell weight concentrations depending on time at 20°C and pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0.



Şekil 5. 25°C ve pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de zamana bağlı toplam hücre konsantrasyonu (mg.ml<sup>-1</sup>).

Figure 5. Total dry cell weight concentrations depending on time at 25°C and pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0.



Şekil 6. 30°C ve pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de zamana bağlı toplam hücre konsantrasyonu (mg.ml<sup>-1</sup>).

Figure 6. Total dry cell weight concentrations depending on time at 30°C and pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0.

Çizelge 2. pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de ve 20, 25, 30°C'de *P. pastoris* fermentasyonu sonucunda elde edilen kuru hücre ağırlıkları (mg/ml).

Table 2. Total dry cell weight obtained from *P. pastoris* fermentation at pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de ve 20, 25, 30°C.

Sıcaklık (°C) Temperature (°C)	Zaman (s) Time (h)	pH			
		4.0	5.0	6.0	7.0
20	24	3.32±0.01a <sup>A</sup>	3.51±0.01bA <sup>1</sup>	3.88±0.03cA	3.65±0.02dA
	48	5.23±0.04aB	5.34±0.02bB	5.89±0.02cB	5.90±0.01cB
	72	8.71±0.03aC	8.63±0.01bC	9.44±0.01cC	11.82±0.01dC
	96	11.22±0.07aD	11.75±0.02bD	13.26±0.03cD	13.04±0.03dD
25	24	5.32±0.02aE	4.02±0.01bE	4.17±0.01cE	4.41±0.02dE
	48	6.38±0.02aF	5.67±0.03bF	6.74±0.01cF	6.84±0.01dF
	72	10.67±0.01aG	10.96±0.02bG	12.23±0.03cG	12.88±0.01dG
	96	15.47±0.03aH	15.78±0.02bH	17.24±0.01cH	17.71±0.03dH
30	24	5.18±0.02aB	4.27±0.01bK	4.03±0.04cK	4.39±0.02dE
	48	6.42±0.04aK	5.70±0.02bF	5.92±0.03cB	6.42±0.01dK
	72	10.65±0.03aG	10.51±0.01bL	12.18±0.02cG	12.20±0.03cL
	96	14.80±0.02aL	14.42±0.03bM	16.14±0.02cL	16.32±0.01dM

\*Aynı satırda farklı küçük harflerle (a,b,c,d) gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır (LSD, p < 0.05).

<sup>1</sup>Aynı sütunda farklı büyük harflerle (A, B, ...) gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır (LSD, p < 0.05).

<sup>a,b,c</sup> Means within a same row with different superscript letters are significantly different between different pH values (LSD, p < 0.05).

<sup>1A,B,C</sup> Means within a same column with different superscript letters are significantly different between different temperatures and storage times (LSD, p < 0.05).

pH değerlerinin artışıyla da populasyon yoğunluklarında gelişme gözlenmiş ve arada pozitif bir korelasyon olduğu ortaya konulmuştur. Ancak elde edilen veriler her ne kadar hücre ağırlıklarının artışına, özellikle 96 saat sonunda, işaret etse de pH'nın hücre ağırlığının artışı üzerinde çarpıcı bir etkisi bulunamamıştır. Bilindiği üzere *P. pastoris* mayaları gelişimleri açısından pH 3.0 – 7.0 gibi geniş bir aralığı dahi tolere edebilmekte ve bu nedenle elde edilen sonuçlar arasında dramatik farklar olmaması anlaşılabilir (İnan ve ark., 1999; Bayraktar, 2009).

Fermentasyon sıcaklık derecesinin düşürülmesi *P. pastoris*'in rekombinant protein salgılama yeteneği üzerinde etkili olmuştur. Ortam pH'sının 4.0 ve 5.0 olarak seçildiği deneme koşullarında sıcaklık düşüşü üretilen protein miktarının 30°C'de geliştirilen hücrelerin ürettiği protein miktarına oranla kısmen de olsa azalmasına neden olmuştur. Ancak ortam pH'sının 6.0 ve 7.0 olarak belirlendiği denemelerde ise bunun tersi bir sonuç elde edilerek üretilen protein miktarının Çizelge 1'de görüleceği üzere 272 mg.l<sup>-1</sup> düzeylerine kadar çıktığı gözlemlenmiştir. Benzer veriler kuru hücre ağırlığının ölçülmesinden elde edilen sonuçlarda da görülmüştür. Sıcaklığın 25°C'ye düşürülmesi özellikle ortam pH'sının 7.0 olarak ayarlandığı fermentasyon koşullarında ölçülen hücre ağırlığının 30°C'deki örneklere kıyasla yükselmesine sebebiyet verdiği tespit edilmiştir. 20°C' de yapılan fermentasyon sonucunda ise; 4.0-7.0 aralığında farklı pH değerlerinde bile 25 °C ve 30 °C de yapılan fermentasyon sonucunda ulaşılan toplam protein ve toplam kuru hücre ağırlığına erişilememiştir.

## Sonuçlar

*P. pastoris* gelişimi açısından değerlendirildiğinde her ne kadar pH 3.0 – 7.0 gibi geniş bir aralıkta dahi canlılığını ve protein eksprese etme yeteneğini sürdürebilse de uygun kultivasyon pH değerleri üretilmesi arzu edilen rekombinant proteinin spesifik özelliklerine bağlı olmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre pH değerlerinin artışı

üretilen toplam protein miktarının ve toplam hücre konsantrasyonunun paralel olarak artış göstermesine neden olduğu veriler ışığında tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra fermentasyon ortam sıcaklığının üretici firmanın kullanma kılavuzunda (Invitrogen User Manual) önerdiğinin ötesinde 25°C olarak ayarlanmasının protein üretimini arttırdığı da belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre *P. Pastoris* mayaları için optimum protein fermentasyonu koşullarının 25°C sıcaklık ve pH 7.0 olduğu tespit edilmiş, bundan sonra *P. Pastoris* ile ilgili yapılacak fermentasyon çalışmaları sıcaklık ve pH olarak bu değerlerin dikkate alınmasının uygun olacağı belirlenmiştir.

## Ekler

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 113O392 nolu proje kapsamında desteklenmiştir. Yazarlar TÜBİTAK'a yaptığı desteklerden dolayı teşekkürlerini sunarlar.

## Kaynaklar

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: (12),5301-5317.
- Bayraktar E., 2009. Effects of pH on human growth hormone production by *Pichia pastoris* considering the expression levels of regulatory genes, Master Thesis.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Calık P, Bayraktar E, İnankur B, Soyaslan ES, Sahin M, Taspınar H, Acık E, Yılmaz R ve Ozdamar TH, 2010. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*; *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(12), 1628-1635
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45-66.
- Cereghino, G.P.L., Sunga, A.J., Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2001. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*, *Genetic Engineering*, 23:157-169.
- Cosgrove, D.J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407:321-326.
- Chang S,W, Shieh C,J, Lee G,C, Akoh C, C, Shaw J, F, 2006. Optimized Growth Kinetics of *Pichia pastoris* and

- Recombinant *Candida rugosa* LIP1 Production by RSM. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 11(1-2), 28-40.
- Cosgrove, D. J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Review Molecular & Cell Biology*, 6(11), 850.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *BioTechnology* 11: 905 – 910.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16(1), 23-52.
- Dehnavi, E., ve ark., 2016. Cloning and highlevel expression of  $\beta$ -xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in *Pichia pastoris* by optimizing of pH, methanol concentration and temperature conditions. *Protein Expression and Purification*, 124, 55-61.
- Dale F, C. Robert, W. Tracy, 2010. Optimization of the expression of recombinant human Activin A in the yeast *Pichia pastoris*; *Biotechnology Progress*, 26(2), 372-383.
- Files D, Ogawa M, Scaman CH, Baldwin SA, 2001. A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme and Microbiol Technology*, 29(6-7), 335-340.
- Goodrick, J.C., Kurtzman, C., 2009. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1435.
- Higgins, D.R., Cregg, J.M., 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. In *Pichia protocols* (pp. 115). Humana Press.
- Hu M., 2014. An Alkaline pH Control Strategy for Methionine Adenosyltransferase Production in *Pichia pastoris*. *Fermentation. Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19(5), 900-907.
- Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K.M., Vlasuk, G.P., Dickerson, K., Brown, S., Meagher, M.M., 1999. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fedbatch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(7), 438-445.
- Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P., Enfors, S.O., 2003. Temperature limited fedbatch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures, *Microbial Cell Factories*, 2(1), 6.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Tomomitsu, K, 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fedbatch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, with minimal protease production and activation; *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(3), 280-288.
- Ling LY, Ithoi I ve Yik FM, 2010. Optimization for high-level expression in *Pichia pastoris* and purification of truncated and full length recombinant SAG2 of *Toxoplasma gondii* for diagnostic use. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 41(3), 507-513.
- Sampedro J and Cosgrove, D.J., 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6(12), 242.
- Sinha J, Plantz BA, Zhang W, et al., 2003. Improved production of recombinant ovine interferon-T by Mut+ strain of *Pichia pastoris* using an optimised methanol feed profile. *Biotechnology Progress*, 19(3), 794-802.
- Spohner SC, Müller H, Quitmann H, Czermak P.,2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202, 118-134.
- Soyaslan, E.S., Calik, P., 2011. Enhanced recombinant human erythropoietin production by *Pichia pastoris* in methanol fed-batch/sorbitol batch fermentation through pH optimization; *Biochemical Engineering Journal* (2011): 59-65.
- Wang, Z., Wang, Y., Zhang D., Li, J., Hua, Z., Du, G., Chen, J., 2010. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation, *Bioresource Technology*, 101(4), 1318-1323.
- Wanderley, M. S. O., Oliveira, C. C. M., Mussatto, S. I., Bruneska, D., Lima-Filho, J.L., Domingues, L., Teixeira, J. A., Influence of pH on cellular growth of *Pichia pastoris* KM71H by fed-batch process, 2009. *Microbial Physiology, Molecular Biology and Functional Genomics*, ISBN 978-972-97810-6-3. p. 29.