



**Fe₃O₄@PEI_{10kDa} İLE DEKORE EDİLMİŞ
Komagataella phaffii TARAFINDAN ÜRETİLEN
Candida antarctica LİPAZ B KULLANILARAK
BİYODİZEL ÜRETİMİ**

Şeyda YILDIZ ARSLAN

**Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER
Doktora Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2025**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**Fe₃O₄@PEI_{10kDa} İLE DEKORE EDİLMİŞ *Komagataella phaffii* TARAFINDAN
ÜRETİLEN *Candida antarctica* LİPAZ B KULLANILARAK BİYODİZEL ÜRETİMİ**

(Biodiesel production using *Candida antarctica* lipase B produced by *Komagataella phaffii*
decorated with Fe₃O₄@PEI_{10kDa})

DOKTORA TEZİ

Şeyda YILDIZ ARSLAN

Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

Erzurum
Şubat, 2025

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Şeyda YILDIZ ARSLAN tarafından hazırlanan “Fe₃O₄@PEI₁₀kDa ile Dekore Edilmiş *Komagataella phaffii* Tarafından Üretilen *Candida antarctica* Lipaz B Kullanılarak Biyodizel Üretimi” başlıklı çalışması 07/02/2025 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı’nda, Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ahmet MAVİ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Zuhâl ALİM <i>Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Yeliz DEMİR <i>Ardahan Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Alper NUHOĞLU

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi BAP kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2023-12143

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Doç. Dr. Yağmur ÜNVER danışmanlığında sunulan “Fe₃O₄@PEI_{10kDa} ile Dekore Edilmiş *Komagataella phaffii* Tarafından Üretilen *Candida antarctica* Lipaz B Kullanılarak Biyodizel Üretimi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	1	30
Kuramsal Temeller	4	30
Materyal ve Metot	10	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	5	20
Sonuç ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	8	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'ten büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Şeyda YILDIZ ARSLAN	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER
7.2.2025	7.2.2025
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın başlangıcından itibaren fikir, bilgi birikimi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımda bakış açısıyla bana yön veren ve beni her daim destekleyen çok kıymetli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Yağmur ÜNVER'e göstermiş olduğu yardımseverlik ve samimi ilgi için teşekkür ederim.

GC-FID analizlerinde bana yardımcı olan ve fikir alışverişinde bulunduğum Sayın Öğr. Gör. Neslihan MACİT KAVAZ ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Hasan CAN hocalarım başta olmak üzere bütün DAYTAM (Atatürk Üniversitesi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) personeli ve yönetimine, tez izleme komite raporu sürecinde değerli fikir ve tecrübeleriyle çalışmamı yönlendiren Sayın Prof. Dr. Ahmet MAVİ ve Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN hocalarıma teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında yardıma ihtiyaç duyduğum zamanlarda beni destekleyen ve yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kübra SOLAK'a, Sayın Nurgül ABUL'a ve yoğun tez döneminde yanımda olarak beni sürekli motive eden Sayın Doç. Dr. Nilnur EYERCİ hocama teşekkür ederim.

Doktora sürecimde tarafıma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) bünyesinde faaliyet gösteren Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB, 2211-A) tarafından burs sağlanmıştır. TÜBİTAK'a bu değerli desteği için teşekkür ederim. Tez çalışmamı 12143 numaralı proje ile destekleyen Atatürk Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Akademik hayatım başta olmak üzere hayatımın her döneminde benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, beni her zaman destekleyen ve bu hayattaki en büyük şansım olan sevgili aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım. Doktora sürecimin yoğun tez döneminde beni her anlamda destekleyen ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan sevgili eşime ve ailesine çok teşekkür ederim.

Şeyda YILDIZ ARSLAN

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Fe₃O₄@PEI_{10kDa} İLE DEKORE EDİLMİŞ *Komagataella phaffii* TARAFINDAN ÜRETİLEN *Candida antarctica* LİPAZ B KULLANILARAK BİYODİZEL ÜRETİMİ

Şeyda YILDIZ ARSLAN

Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

Amaç: Bu çalışmada, indüklenebilir *AOX1* promotörü (*P_{AOX1}*) ve yapısal *GAP* promotörü (*P_{GAP}*)'ın kontrolü altında rekombinant *Candida antarctica* lipaz B'yi ifade eden *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) hücreleri elde edildikten sonra, rekombinant hücrelerin manyetik nanopartiküllerle dekore edilmesiyle hücre dışına salınan lipaz miktarını artırmak ve elde edilen rekombinant CalB (rCalB)'nin biyokatalizör olarak kullanılmasıyla ticari ve atık kıyartma (ayçiçek) yağından biyodizel üretmek amaçlandı.

Yöntem: Bu çalışmada, *CalB* geninin kodon optimizasyonu yapıldı ve optimize geni içeren pPICZαA-CalB satın alındı. Kodon optimize *CalB* geni, pGKBα'ya entegre edilerek pGKBα-CalB elde edildi. *K. phaffii*'nin protein disülfid izomeraz geni (*Pdi*), pGKB'ye entegre edilerek pGKB-PDI elde edildi. *K. phaffii* hücrelerine, elde edilen plazmit DNA'ların sıralı bir şekilde transfer edilmesiyle farklı gen kombinasyonlarına sahip rekombinant mayalar elde edildi. Elde edilen hücreler tarafından rCalB üretildi. Enzim aktivite tayini ve SDS-PAGE analizi yapıldı. Rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin manyetik nanopartiküllerle dekorasyonu için Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'ler sentezlendi ve karakterizasyonu yapıldı. En yüksek lipaz üretiminin gözlemlendiği hücreler MNP'ler ile dekore edildi. Ticari ve atık kıyartma (ayçiçek) yağı kullanılarak biyodizel üretimi için optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi ve gaz kromatografi analizi ile yağ asidi metil esterleri (FAME) içeriği belirlendi.

Bulgular: Kodon optimize edildikten sonra *CalB* geninin kodon adaptasyon indeksi %69'dan %87'ye yükseltildi. Rekombinant plazmitler *K. phaffii* hücrelerine transfer edilerek pGKB-PDI/X-33, pPICZαA-CalB/X-33, pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pGKBα-CalB+pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücreleri elde edildi. Enzim aktivite tayini ve SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre yaklaşık 34 kDa'lık rCalB'nin rekombinant hücrelerde başarıyla üretilerek hücre dışına salgılandığı gözlemlendi. En iyi üretimin *Pdi* genini içeren hücrelerde olduğu gözlemlendi. FTIR ve TEM analizleriyle Fe₃O₄ nanopartiküllerinin PEI ile modifiye edildiği ve yaklaşık 14-28 nm aralığında küresel yapıya sahip olduğu belirlendi. Dekore edilen maya hücreleri (pGKBα-CalB+pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33) SEM analizi ile doğrulandı. En yüksek lipaz aktivitesi, dekore edilen hücrelerin 48 saatlik inkübasyon grubunda gözlemlendi. Biyodizel üretimi için optimum değerler; metanol:yağ molar oranı; 4:1, reaksiyon sıcaklığı; 30 °C, enzim içeren kültür sıvısı; 8 ml (2,4 EÜ) ve reaksiyon süresi; ticari yağda 168 saat iken atık kıyartma (ayçiçek) yağında 96 saat olarak belirlendi. GC-FID analizlerine göre, üretilen biyodizelin yüksek oranda C16 ve C18 yağ asidi metil esterleri içerdiği belirlendi.

Sonuç: Bu tez çalışmasında, lipaz üreten *K. phaffii* hücreleri elde edildi. MNP'lerle dekore edilen hücreler tarafından üretilen rCalB'nin hücre dışına daha fazla salgılandığı görüldü. Elde edilen rCalB'nin transesterifikasyonu ile üretilen biyodizelin mevcut biyodizellere alternatif olabileceği görüldü.

Anahtar Kelimeler: *Komagataella phaffii*, *Candida antarctica* lipaz B, protein disülfid izomeraz, manyetik immobilizasyon, biyodizel.

Şubat 2025, 136 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

BIODIESEL PRODUCTION USING *Candida antarctica* LIPASE B PRODUCED BY *Komagataella phaffii* DECORATED WITH Fe₃O₄@PEI_{10kDa}

Şeyda YILDIZ ARSLAN

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yağmur ÜNVER

Purpose: In this study, after obtaining *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) cells expressing recombinant *Candida antarctica* lipase B under the control of inducible AOX1 promoter (*P_{AOX1}*) and constitutive GAP promoter (*P_{GAP}*), it was aimed to increase the amount of lipase released out of the cell by decorating the recombinant cells with magnetic nanoparticles and to produce biodiesel from commercial and waste frying (sunflower) oil by using the obtained recombinant CalB (rCalB) as a biocatalyst.

Method: In this study, codon optimization of the *CalB* gene was performed and pPICZαA-CalB containing the optimized gene was purchased. The codon optimized *CalB* gene was integrated into pGKBα to obtain pGKBα-CalB. The protein disulfide isomerase gene (*Pdi*) of *K. phaffii* was integrated into pGKB to obtain pGKB-PDI. Recombinant yeasts with different gene combinations were obtained by sequential transfer of the obtained plasmid DNAs to *K. phaffii* cells. rCalB was produced by the obtained cells. Enzyme activity determination and SDS-PAGE analysis were performed. Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNPs were synthesized and characterized for decoration of recombinant *K. phaffii* cells with magnetic nanoparticles. The cells with the highest lipase production were decorated with MNPs. Optimization experiments for biodiesel production using commercial and waste frying (sunflower) oil were carried out and fatty acid methyl ester (FAME) content was determined by gas chromatography analysis.

Findings: After codon optimization, the codon adaptation index of the *CalB* gene was increased from 69% to 87%. Recombinant plasmids were transferred to *K. phaffii* cells to obtain pGKB-PDI/X-33, pPICZαA-CalB/X-33, pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 and pGKBα-CalB+pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 cells. According to the results of enzyme activity determination and SDS-PAGE analysis, it was observed that approximately 34 kDa rCalB was successfully produced in recombinant cells and secreted into the extracellular space. The best production was observed in cells containing the *Pdi* gene. FTIR and TEM analyses determined that Fe₃O₄ nanoparticles were modified with PEI and had a spherical structure in the range of approximately 14-28 nm. Decorated yeast cells (pGKBα-CalB+pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33) were confirmed by SEM analysis. The highest lipase activity was observed in the 48 h incubation group of decorated cells. The optimum values for biodiesel production were determined as methanol:oil molar ratio; 4:1, reaction temperature; 30 °C, enzyme-containing culture broth; 8 ml (2.4 EU) and reaction time; 168 h in commercial oil and 96 h in waste frying (sunflower) oil. According to GC-FID analyses, it was determined that the produced biodiesel contained high levels of C16 and C18 fatty acid methyl esters.

Results: In this thesis study, lipase producing *K. phaffii* cells were obtained. It was observed that rCalB produced by cells decorated with MNPs was secreted more outside the cell. It was seen that biodiesel produced by transesterification of rCalB could be an alternative to existing biodiesels.

Keywords: *Komagataella phaffii*, *Candida antarctica* lipase B, protein disulfide isomerase, magnetic immobilization, biodiesel.

February 2025, 136 page

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ.....	1
Tez Çalışmasının Hedefleri.....	3
Araştırma Soruları.....	4
Araştırmanın Önem ve Gerekçesi	4
KURAMSAL TEMELLER.....	6
Biyodizel ve Genel Özellikleri.....	6
Biyodizelin Tarihçesi	7
Biyodizel Üretim Hammaddesi.....	8
Biyodizel Üretim Yöntemleri.....	9
Biyodizel Üretiminde Kullanılan Katalizör Çeşitleri.....	10
Lipaz Kaynakları.....	12
Mayalar.....	13
Lipaz Aktivite Belirleme Yöntemleri	14
Lipazların Katalizledikleri Reaksiyonlar ve Uygulama Alanları.....	16
Biyodizel	18
Biyodizel Üretimi için Proses Koşulları/Parametreleri.....	19
Metanolün Yağa Molar Oranının Etkisi	19
Sıcaklığın etkisi	20
Katalizör miktarının etkisi.....	21
Reaksiyon süresinin etkisi	21
Konak Organizmanın Seçimi	22
<i>Komagataella phaffii</i>	22

Heterolog Protein İfadesinde Etkili Olan Parametreler	25
Kodon optimizasyonu.....	25
Protein disülfid izomeraz (<i>Pdi</i>) geni	26
Post-transformasyonel vektör amplifikasyonu (PTVA).....	28
Manyetik Nanopartiküller ile Mikrobiyal Hücrelerin Dekorasyonu.....	29
MATERYAL VE METOT	33
Protokol Tasarımı ve Materyal Seçimi	33
Tasarlanan Primerler ve Restriksiyon Enzimleri	37
Plazmitler	38
Kullanılan Mikroorganizmalar, Besiyerleri, Kitler, Kimyasallar, Tampon ve Çözeltiler	40
Kullanılan Cihazlar	41
Rekombinant DNA'ların Elde Edilmesi	41
pGKB-PDI'nın elde edilmesi	41
pGKB α -CalB'nin elde edilmesi	43
Rekombinant <i>K. phaffii</i> Hücrelerinin Elde Edilmesi	47
pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi	48
pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZ α A-CalB/X-33 hücrelerinin elde edilmesi	50
PTVA ile Çok Kopyalı Klonların Seçilimi (pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZ α A-CalB/X-33).....	51
Rekombinant <i>Candida antarctica</i> Lipaz B (rCalB)'nin Üretimi	52
Rekombinant Lipazın Aktivite Analizi ve Görüntülenmesi	52
Kalitatif analiz (Kuyu difüzyon testi).....	52
Kantitatif analiz (Spektrofotometrik analiz).....	52
SDS-PAGE analizi ve gümüş boyama	53
pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi	54
PTVA ile Çok Kopyalı Klonların Seçilimi	55
Manyetik Nanopartikül (MNP) Sentezi ve Karakterizasyonu	55
Rekombinant <i>K. phaffii</i> Hücrelerinin Dekorasyonu (İmmobilizasyonu).....	56
Dekore edilen maya hücrelerinin görüntülenmesi.....	57
Dekore Edilmiş Hücreler Tarafından Üretilen rCalB Enziminin Aktivite Tayini ve SDS-PAGE Analizi.....	58
Rekombinant Lipazın Transesterifikasyon Aktivitesi ve Biyodizel Üretim Optimizasyonu	58

Metanol:yağ molar oranının biyodizel verimine etkisi	58
Reaksiyon (Transesterifikasyon) sıcaklığının biyodizel verimine etkisi	59
Katalizör (enzim) miktarının biyodizel verimine etkisi	59
Reaksiyon süresinin biyodizel verimine etkisi	59
Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi	59
İstatistiksel Analizler	60
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	61
Plazmit DNA'ların Elde Edilmesi	61
<i>CalB</i> geninin kodon optimizasyonu	61
Plazmit DNA'ların (pGKB ve pGKB α) kesilmesi ve görüntülenmesi	62
<i>E. coli</i> One Shot TOP10 hücrelerinin transformasyonu	63
Muhtemel rekombinant plazmit DNA'ların izolasyonu ve PCR işlemi	63
Muhtemel rekombinant plazmitlerin dizi analizi	64
Rekombinant <i>K. phaffii</i> Hücrelerinin Elde Edilmesi	66
pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi	67
pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZ α A-CalB/X-33 hücrelerinin elde edilmesi	68
pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi	75
Fe ₃ O ₄ @PEI _{10kDa} MNP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu	78
Rekombinant <i>K. phaffii</i> Hücrelerinin Dekorasyonu (İmmobilizasyonu)	80
Dekore Edilen Hücreler Tarafından Üretilen rCalB Enziminin Aktivite Tayini ve SDS-PAGE Analizi	81
Lipaz Enziminin Transesterifikasyon Aktivitesi ve Biyodizel Üretimi	83
SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	121

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Farklı Biyodizel Üretim Süreçlerinin Performans Değerlendirmesi	12
Tablo 2. <i>CalB</i> ve <i>Pdi</i> Geninin Amplifikasyonu İçin Dizayn Edilen Primerler	37
Tablo 3. Plazmit DNA'lara Ait Primerler	37
Tablo 4. Restriksiyon Enzimlerinin Tanıma Dizisi ve Kullanım Amacı	38
Tablo 5. Kullanılan Cihazlara Ait Bilgiler	41
Tablo 6. <i>Pdi</i> Geninin Amplifikasyonu İçin PCR Karışımı	42
Tablo 7. <i>Pdi</i> Geninin Amplifikasyonu İçin PCR Şartları	43
Tablo 8. <i>CalB</i> Geninin Amplifikasyonu İçin PCR Karışımı	43
Tablo 9. <i>CalB</i> Geninin Amplifikasyonu İçin PCR Şartları	44
Tablo 10. pGKB-PDI Eldesi İçin Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	44
Tablo 11. pGKB- α -CalB Eldesi İçin Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	45
Tablo 12. Ligasyon Reaksiyonu	45
Tablo 13. PCR İçin Karışım İçeriği	46
Tablo 14. PCR Şartları	46
Tablo 15. Rekombinant <i>K. phaffii</i> Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Adlandırılması	48
Tablo 16. Plazmit DNA'nın Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	48
Tablo 17. PCR İçin Karışım İçeriği	49
Tablo 18. PCR Şartları	50
Tablo 19. Plazmit DNA'nın Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	50
Tablo 20. PCR İçin Karışım İçeriği	51
Tablo 21. PCR Şartları	51
Tablo 22. Plazmit DNA'nın Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Katalizlenmiş transesterifikasyon prosesi	3
Şekil 2. Biyodizelin benzin-dizele göre avantajları.....	7
Şekil 3. 2005'ten 2020'ye kadar dünyadaki yıllık biyodizel üretimi	8
Şekil 4. Biyodizel hammadde çeşitleri	9
Şekil 5. Genel transesterifikasyon reaksiyon mekanizması	10
Şekil 6. Biyodizel katalizörünün sınıflandırılması	11
Şekil 7. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler	15
Şekil 8. Lipazların endüstriyel özelliklerini etkileyen kritik unsurlar	15
Şekil 9. Esterifikasyon, transesterifikasyon ve açıl göçünü hesaba katarak, biyodizel ve gliserol üretimi için lipaz aracılı gliserit metanolizine yönelik ayrıntılı bir kinetik model.....	17
Şekil 10. Lipazların uygulama alanları.....	18
Şekil 11. Transesterifikasyon reaksiyonu sırasında optimize edilmesi gereken çeşitli proses koşulları.....	19
Şekil 12. Tez çalışmasında kullanılan ve elde edilen bileşenlerin sembolik gösterimleri	33
Şekil 13. Tez çalışması hedeflerinin şematik gösterimi	34
Şekil 14. Çalışmada kullanılan plazmitler	39
Şekil 15. <i>p</i> -nitrofenil palmitatın (<i>p</i> -NPP) CalB katalizli reaksiyonu	53
Şekil 16. Fe ₃ O ₄ @PEI _{10kDa} MNP'lerin üretildiği reaksiyon düzeneği (Schlenk sistemi).....	56
Şekil 17. PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	62
Şekil 18. Plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	62
Şekil 19. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonilerine ait plaka görüntüsü	63
Şekil 20. Saf olarak elde edilen plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	63
Şekil 21. Plazmit DNA'lara ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	64
Şekil 22. pGKB-PDI'ya ait nükleotid dizisinin blast sonucu.....	65
Şekil 23. pGKBα-CalB'ye ait nükleotid dizisinin blast sonucu.....	65
Şekil 24. Rekombinant <i>K. phaffii</i> hücrelerinin elde edilmesine ait şematik görüntü.....	66
Şekil 25. Agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	67
Şekil 26. pGKB-PDI/X-33 transformantlarına ait plaka görüntüsü	67
Şekil 27. PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	68
Şekil 28. Agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	68

Şekil 29. A: pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve B: pPICZαA-CalB/X-33 transformantlarına ait plaka görüntüsü	69
Şekil 30. PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	69
Şekil 31. PTVA ile çok kopyalı klonların seçilimi ve spotlama testinin gösterimi	70
Şekil 32. PTVA ile çok kopyalı klonların seçilimine ait plaka görüntüsü	71
Şekil 33. pPICZαA-CalB/X-33 kolonilerini oluşturan hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları	73
Şekil 34. pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerini oluşturan hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları	73
Şekil 35. C8 ve CP31 kolonilerini oluşturan hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları	74
Şekil 36. SDS-PAGE analizine ait gümüş boyama sonucu	75
Şekil 37. Agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	76
Şekil 38. pGKBα-CalB+pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 transformantlarına ait plaka görüntüsü.....	76
Şekil 39. PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	77
Şekil 40. PTVA ile çok kopyalı klonların seçilimine ait plaka görüntüsü	77
Şekil 41. pGKBα-CalB+pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerini oluşturan hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları	78
Şekil 42. Üretilen Fe ₃ O ₄ @PEI _{10kDa} manyetik nanopartiküllerin A. Geçirimli elektron mikroskop görüntüleri ve bu görüntülerden çizilen boyut dağılımına ait B. Histogram grafiği	79
Şekil 43. Sentezlenen Fe ₃ O ₄ @PEI _{10kDa} MNP'lere ait FTIR spektrumu.....	79
Şekil 44. Rekombinant <i>K. phaffii</i> hücrelerine ait SEM görüntüleri	80
Şekil 45. Farklı inkübasyon sürelerinde üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları.....	82
Şekil 46. İmmobilize edilen ve edilmeyen hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları	82
Şekil 47. SDS-PAGE analizine ait gümüş boyama sonucu	83
Şekil 48. Metanol:yağ molar oranının biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması	85
Şekil 49. Reaksiyon (Transesterifikasyon) sıcaklığının biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması.....	86
Şekil 50. Katalizör (enzim içeren kültür sıvısı) miktarının biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması.....	87

Şekil 51. Reaksiyon süresinin biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması	88
Şekil 52. Reaksiyon süresinin biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması (Atık kızartma (ayçiçek) yağı).....	88
Şekil 53. Seri optimizasyon ile elde edilen optimum reaksiyon şartlarında oluşan FAME miktarlarının göreceli olarak yüzdesi (%).....	89
Şekil 54. Ticari ayçiçek yağı ve atık kızartma (ayçiçek) yağı kullanılarak optimum reaksiyon şartlarında oluşan FAME miktarlarının göreceli olarak yüzdesi (%)	89
Şekil 55. Ticari ayçiçek yağı ile gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucu oluşan FAME ürünlerine ait GC-FID kromatogramı	90
Şekil 56. Atık kızartma (ayçiçek) yağı ile gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucu oluşan FAME ürünlerine ait GC-FID kromatogramı	91

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AOX	Alkol oksidaz promotörü
bç	Baz çifti
BMGY	Buffered glycerol complex medium (Tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri)
BMMY	Buffered methanol complex medium (Tamponlanmış karmaşık metanol besiyeri)
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Sığır bağırsak alkalın fosfataz)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EÜ	Enzim ünitesi
Fe₃O₄@PEI_{10kDa}	10 kDa PEI ile kaplı demir oksit MNP'ler
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi)
g (RCF)	Relative centrifugal force (Göreceli santrifüj kuvveti)
g	Gram
GAP	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz promotörü
GC-FID	Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör)
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi)
LS-LB	Low-Salt Luria Bertani
MNP	Manyetik nanopartikül
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PEI	Polietilenimin
PTVA	Post-transformasyonel vektör amplifikasyonu
rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Scanning electron microscope (Taramalı elektron mikroskobu)
SOC Broth	Super Optimal Broth with Catabolite Repressor
TE	Tris EDTA
TEM	Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
V	Volt
YNB	Yeast nitrogen base
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose (Maya ekstraktı pepton dekstrozu)
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

GİRİŞ

Fosil yakıtlar uzun yıllardır motorlu makineler için kullanılan en yaygın yakıt olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, petrol kaynaklarının giderek azalması, sera gazı emisyonlarındaki yükselme, mevcut geleneksel yakıtlardan kaynaklanan çevresel problemler ve enerji talebinin giderek artması nedeniyle alternatif olabilecek yeni enerji kaynakları bulma çalışmaları giderek önem arz etmektedir (Franssen et al., 2013). Alternatif olabilecek potansiyele sahip enerji kaynaklarında aranan özellikler arasında; ekolojik ve çevre dostu olması, düşük maliyetle elde edilebilmesi ve en önemlisi sera gazı emisyonunda artışa sebep olmaması yer almaktadır. Bu alternatif enerji kaynakları arasında bulunan biyodizel, günümüzde giderek artan bir ilgiye sahiptir (Bisen et al., 2010; Şen, 2014).

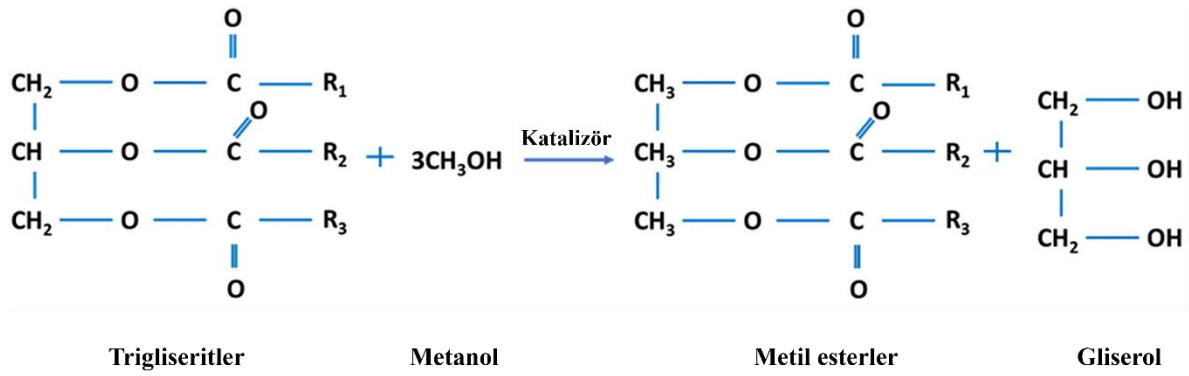
Biyodizel, modifiye edilmemiş dizel motorlu araçlarda kullanılabilen (tek başına veya geleneksel petrol-dizel ile harmanlanmış), tipik olarak bitkisel veya hayvansal yağların transesterifikasyonu ile yapılan kısa zincirli alkil (metil veya etil) esterlerden oluşan petrol bazlı olmayan dizel yakıt olarak tanımlanır. Biyodizel kelimesindeki ‘Biyo’ kökü biyolojik temelli olduğunu gösterirken, ‘dizel’ kelimesi dizel yakıt olduğunu göstermektedir. Biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik değildir, düşük emisyon profiline sahiptir ve bu nedenle çevre için daha faydalıdır (Hama et al., 2007; Krawczyk, 1996). Bununla birlikte, biyodizelin maliyeti, ürünün ticarileştirilmesinin önündeki en büyük engeldir.

Ülke ekonomisine katkı sağlamada büyük öneme sahip olan biyodizel üretiminde en yaygın kullanılan yöntem, asit, baz veya lipaz gibi bir katalizör varlığında monohidrik alkol ile reaksiyona giren sıvı ve katı yağların transesterifikasyonudur (Bisen et al., 2010). Transesterifikasyon reaksiyonu, katalitik bir yoldan gerçekleşir. Katalizör alkali (Georgogianni et al., 2007), asit (Haas et al., 2003; Van Gerpen, 2005) veya enzim (João et al., 2020; Wancura et al., 2019, 2021) olabilir. Endüstriyel olarak günümüzde en yaygın kullanılan yöntem alkali transesterifikasyondur (Kaieda et al., 1999; Srivastava and Prasad, 2000; Y. Zhang et al., 2003; Meher et al., 2006). Hem asit hem de alkali katalizörlü yöntemlerde çok miktarda metanolün kullanılması, son ürünlerdeki tuzun giderilmesi ve yan ürün olarak ortamdan uzaklaştırılması zor olan gliserini ortamdan uzaklaştırma gerekliliği gibi sorunlar nedeniyle günümüzde kimyasal transesterifikasyon yöntemi yerine enzimatik yöntem tercih edilmektedir (Gerpen et al., 2004). Enzimatik transesterifikasyon yönteminde, alkali katalizörlerdeki gibi sabun oluşumu olmamakta ve fazladan yıkama basamaklarına gerek kalmadan hem triaçilgliserollerin hem de

serbest yağ asitlerinin esterleşmesi mümkün olmaktadır (Fjerbaek et al., 2009). Bundan dolayı, enzimatik yöntemle biyodizel üretimi günümüzde olağanüstü bir ilgi görmektedir. Enzimlerin, farklı kaliteye sahip hammadde ve geri dönüşümlü olan kaynakların çeşitliliğine daha uyumlu olmaları, enerjiye ihtiyaçlarının daha az olması, oluşan ürünün ortamdan daha fazla ayrıştırılmasıyla daha yüksek kaliteye sahip gliserol veriminin elde edilebilmesi gibi sunduğu avantajlardan dolayı, alkali ve asit katalizörlere göre potansiyel olarak daha kullanışlı oldukları görülmektedir (Kaieda et al., 1999; Fukuda et al., 2001; Kumari et al., 2007; Meher et al., 2006). Enzim katalizli transesterifikasyon yönteminin sunduğu diğer avantajları arasında ise enzimin tekrar tekrar kullanılabilirliği ve reaksiyon sıcaklığının diğer yöntemlere kıyasla daha düşük (40 °C) seviyede olması yer almaktadır (Meng et al., 2011).

Enzim katalizli reaksiyonlar çevre dostudur, ılımlı reaksiyon koşulları gerektirir ve çok çeşitli hammaddelerle uyumludur (B. Zhang et al., 2012). Transesterifikasyonda katalizör olarak lipazları içeren enzimatik reaksiyonlar, yüksek saflıkta ürün ürettiği ve yan ürün olan gliserolden kolayca ayrılmasını sağladığı için biyodizel üretmek için mükemmel bir alternatif olabilir. Ancak enzimin maliyeti, endüstriyel uygulaması için bir engel olmaya devam etmektedir (Ranganathan et al., 2008). Protein mühendisliği, biyodizel üretimi için biyokatalizörler olarak lipazların katalitik etkinliğini artırmada yararlı olabilir. Yüksek miktarda lipaz üretmek için rekombinant DNA teknolojisinin kullanılması ve immobilize edilmiş tüm hücrelerin kullanılması güncel yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Ek olarak, enzimatik yaklaşım çevre dostudur, “yeşil reaksiyon” olarak kabul edilir ve endüstriyel olarak biyodizel üretimi için keşfedilmesi gerekmektedir (Akoh et al., 2007). Biyokatalizörler, biyodizel hazırlamada giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Çünkü, bu katalizörlerin eninde sonunda kimyasal katalizörlerden daha iyi performans gösterme yeteneğine sahip olacağı düşünülmektedir (Al-Zuhair et al., 2007). Biyokatalizörler, gliserolün hidrolizi, alkoliz ve asidoliz gibi bazı reaksiyonları katalize etmek için kullanılan lipaz enzimleridir. Lipazların, transesterifikasyon ve esterifikasyon reaksiyonları için de katalizör olarak kullanılabileceği keşfedilmiştir. Hücre dışı ve hücre içi lipazlar ayrıca triaçilgliserolün transesterifikasyonunu etkili bir şekilde katalize edebilir. Ayrıca, biyokatalizörlerin sahip olduğu biyoyuymululuk, biyobozunurluk ve çevresel kabul edilebilirlik gibi tarımsal ve tıbbi uygulamalarda istenen özellikler arasında yer alması onları daha da önemli kılmaktadır.

Transesterifikasyon sürecinin genelleştirilmiş moleküler yapısı Şekil 1’de gösterilmiştir (Mofijur et al., 2021). Bir mol trigliserit (lipit), üç mol alkol ile reaksiyona girerek üç mol metil ester (biyodizel) ve bir mol ham gliserol (yan ürün) üretmektedir.



Şekil 1. Katalizlenmiş transesterifikasyon prosesi

Şekil (Raza et al., 2022)’den alıntılanmıştır.

Tez Çalışmasının Hedefleri

Bu tez çalışmasının hedefleri genel olarak aşağıda listelenmiştir.

- *Candida antarctica* lipaz B (CalB) geninin kodon optimizasyonunu yapmak ve sentetik olarak temin etmek,
- *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*) X-33’ün genomik DNA’sını izole etmek,
- Sentetik kodon optimize *CalB* genini ve *K. phaffii* genomundan elde edilen protein disülfid izomeraz genini (*Pdi*) *Escherichia coli* (*E. coli*)’de klonlamak,
- PCR ile doğru bakteri transformantlarını seçmek ve saflaştırılan plazmitleri dizi (sekans) analizi ile kontrol etmek,
- Elde edilen rekombinant plazmitleri maya hücrelerine (ekspresyon konağı) transfer etmek ve rekombinant maya hücrelerinde CalB ekspresyonunu doğrulamak. Bunun için;
 1. pGKB-PDI’yı *K. phaffii* hücrelerine transfer etmek ve seçilen kolonileri PCR ile doğrulamak,
 2. Hem *K. phaffii* hücrelerine hem de önceki basamakta seçilen pGKB-PDI’yı içeren hücrelere pPICZαA-CalB’yi transfer etmek ve seçilen kolonileri PCR ile doğrulamak,
 - Doğrulan kolonilerde post-transformasyonel vektör amplifikasyonu (PTVA) (zeosin antibiyotigi ile) analizini gerçekleştirmek,
 - PTVA analizi sonrası seçilen hücreler tarafından rCalB enzimini üretmek ve enzim aktivite tayini yapmak,
 3. Önceki basamakta seçilen hem pGKB-PDI’yı hem de pPICZαA-CalB’yi içeren hücrelere pGKBα-CalB’yi transfer etmek ve seçilen kolonileri PCR ile doğrulamak,

- Doğrulanmış kolonilerde PTVA (genetisin antibiyotiği ile) analizini gerçekleştirmek,
- PTVA analizi sonrası seçilen hücreler tarafından rCalB enzimini üretmek ve enzim aktivite tayini yapmak,
- Hücre yüzeyini kolayca kaplayabilecek boyutlarda (<100 nm) Fe₃O₄@PEI₁₀kDa manyetik nanopartikülleri (MNP) sentezlemek ve karakterizasyonunu yapmak,
- MNP'ler ile rekombinant *K. phaffii* hücrelerini dekore etmek,
- Dekore edilen rekombinant hücreler tarafından rCalB enzimini üretmek ve enzim aktivite tayini yapmak,
- Üretilen rCalB enziminin transesterifikasyon aktivitesi sayesinde ticari ayçiçek yağı ve atık kızartma (ayçiçek) yağı kullanılarak biyodizel üretimi gerçekleştirmek ve GC-FID analizi ile FAME (yağ asidi metil esteri) verimini belirlemek.

Araştırma Soruları

Bu tez çalışmasında merak edilen sorular şunlardır;

1. Fazladan *Pdi* genini içeren (pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33) ve içermeyen (pPICZαA-CalB/X-33) rekombinant maya hücrelerinde ifade edilen rCalB enziminin aktivitesi arasında fark var mı?
2. PTVA analizi ile hücrelerde rCalB enziminin ifadesi ve aktivitesi artırılabilir mi?
3. PTVA analizi ve *Pdi* geninin birlikteliğinin, ifade edilen rCalB enziminin miktarı ve aktivitesi üzerinde doğrudan bir etkisi olduğu söylenebilir mi?
4. Rekombinant maya hücrelerinin MNP'ler ile dekore edilmesinin, ifade edilen rCalB enziminin miktarı ve aktivitesi üzerinde olumlu yönde etkisi var mı?
5. Kültür ortamına salgılanan rCalB enzimi ile ticari ve atık yağlardan biyodizel üretimi gerçekleştirilebilir mi?

Araştırmanın Önem ve Gerekçesi

Yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak fosil yakıtlar yerine biyodizel üretimi son zamanlarda popüler hâle gelmiştir. Biyodizel, çevreye zarar vermeyen, doğada kolayca bozulabilen ve toksik etkisi olmayan bir yakıttır. Bununla ilgili en önemli sorun, hammadde maliyetlerinin yüksek olmasıdır. Bu sorunu aşmak için biyodizel üretiminde atık yağların kullanılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte, atık yağlar ekotoksik özelliklere sahip olup canlılara ve çevreye zarar vermektedir. Enzimatik transesterifikasyon, biyodizel üretiminin artırılması yoluyla hem ülke ekonomisi için hayati önem taşıyacak hem de ülkenin enerji ihtiyacında yabancı kaynaklara olan bağımlılığı azaltmış olacaktır. Bu tez

alışmasında uygulanan yöntemde atık yağların kullanılmasıyla hem atık yağların çevresel sorunlarına çözüm sunulmuş olacağı, hem de ülke ekonomisini canlandırmak için değerli bir fikir olacağı düşünülmektedir.

Enzimatik transesterifikasyon üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, ticari lipazların yüksek maliyetleri ve uzun reaksiyon süreleri nedeniyle henüz ölçek büyütmede kullanılmamıştır. Lipaz konsantrasyonu, tüm hücre teknolojisi ve genetik mühendisliği yoluyla üretilen alternatif lipaz kaynakları, nanopartiküller dâhil olmak üzere son immobilize edici malzemeler ve enzimin yeniden kullanım kapasitesi dikkatle araştırılması gereken önemli kriterlerdir.

Bu tez projesi kapsamında, öncelikle kullanım açısından daha ekolojik bir yakıt olan biyodizel üretiminde hem hammadde maliyetini azaltmak hem de üretimin evre dostu olmasını sağlamak için indüklenebilir bir promotör olan AOX ve/veya yapısal bir promotör olan GAP'ın kontrolü altında rCalB enzimini kodlayan kodon optimize sentetik bir geni ifade eden *K. phaffii* hücrelerini elde etmek amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, *K. phaffii*'nin kodon kullanım eğilimine dayanarak kodon optimize edilen ve sentetik olarak elde edilen lipaz geninin (CalB) tek bir organizmada gen ifadesi güçlendirilmiş oldu. Ayrıca, yüksek miktarda üretimi hedeflenen rCalB enziminin hücresel endoplazmik retikulum (ER) stresinden etkilenmeden doğru bir şekilde katlanmasına destek olmak için *K. phaffii* hücrelerinde doğal olarak üretilen PDI miktarının artırılmasına yönelik önerilen yaklaşımımız biyoteknolojik öneme sahip olan tüm rekombinant proteinlerin elde edilmesinde uygulanabilecektir. Bunun yanı sıra, lipaz üretimini ve salınımını daha da iyileştirmek için gen dozajının ve manyetik nanopartiküllerle maya dekorasyonunun (literatürde "immobilizasyon veya manyetik immobilizasyon" olarak da ifade edilmektedir (Dagci, Solak, et al., 2024; Taghizadeh et al., 2022)) etkisi değerlendirilerek dekore edilen hücrelerde hücre dışına salgılanan rCalB enzim miktarında artış olduğu gözlendi. Sonuç olarak, bu tez kapsamında elde edilen kombine sistem ile lipaz üretiminin fazla ve enzim aktivitesinin yüksek olduğu ve buna bağlı olarak ticari ve atık yağ kullanılarak yüksek miktarda biyodizel üretiminin sağlandığı gözlendi. Yapılan literatür taramaları doğrultusunda, önerilen bu kombine sistemi kullanarak biyodizel üretimi gerçekleştiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Biyodizel ve Genel Özellikleri

Fosil yakıtlara olan artan talep ve yaşanılabilir bir çevreye duyulan ihtiyaç büyük küresel endişeleri de beraberinde getirmektedir. Dünya’da birincil enerji tüketimi yıllık yaklaşık 12,5 milyar tep’tir (Ton Eşdeğer Petrol; 1 TEP = 41,87 GJ) ve hızla büyüyen nüfusla birlikte ham petrolün fiyatı giderek artmakta ve bu durum da doğrudan küresel ekonomiyi etkilemektedir (He et al., 2010; Jess, 2010). Şu anda, petrol bazlı yakıtlar birincil enerji tüketiminin yaklaşık %85’ini oluşturmaktadır ve bunun %58’i ulaşım sektöründe kullanılmaktadır (Escobar et al., 2009; Nigam and Singh, 2011). Yenilenemeyen enerji kaynaklarının kitlesel kullanımı, küresel ısınma ve ciddi iklim değişiklikleri gibi zararlı çevresel sonuçlar nedeniyle endişe giderek artmaktadır (Bao et al., 2015). Fosil kaynaklı yakıtların yanması, karbon emisyonlarının yaklaşık %98’ini üretmektedir (Balat, 2011). Enerji üretimi için sürdürülebilir olmayan enerji kaynakları kullanılmaya devam edilirse Dünya, yaşamak için ideal bir yer olmaktan giderek uzaklaşacaktır. Bu nedenle, gelecek nesiller için çevreyi korumak adına fosil yakıtlara olan talebi azaltmak için bazı önlemlerin alınması gerekmektedir. Araştırmacılar, ham petrol fiyatlarındaki artış, küresel nüfusun nispeten hızlı büyümesi ve fosil yakıt rezervlerinin azalması nedeniyle potansiyel yenilenebilir enerji kaynaklarını geliştirmeye odaklanmaktadır. Uzun vadeli çevresel ve ekonomik büyüme için, fosil yakıtların hâkim olduğu enerjiden yenilenebilir enerji kaynaklarına dayalı sürdürülebilir teknolojilere geçiş yapmak artık elzemdir. Bunun yanı sıra, enerji kaynaklarının çeşitlendirilmesi mevcut küresel enerji talebini karşılamaya yardımcı olmaktadır (Farooq et al., 2013). Biyodizel üretimi, geleneksel fosil yakıtlara kıyasla bir dizi çevresel avantaj sağladığı için hızla artan bir biyoyakıt teknolojisidir. Biyoyakıt, birinci nesil yakıt olarak kullanılmaktadır.

Biyodizel, temiz yanma özellikleri ve sürdürülebilir kaynakları nedeniyle yeşil bir yakıt olarak çok fazla ilgi görmektedir (Demirbas, 2007; Muanruksa et al., 2019). Biyolojik olarak parçalanabilir olmasının yanı sıra kükürt içermez, toksik değildir, daha düşük egzoz emisyonuna sahiptir ve aromatik maddelerden arındırılmıştır (Muanruksa et al., 2019). Bunların dışında, yüksek parlama noktası, olağanüstü yağlama özellikleri ve mükemmel bir setan sayısı gibi çeşitli özelliklere de sahiptir. Biyodizelin, benzin dizeline göre çeşitli avantajları Şekil 2’de gösterilmiştir (Yusuf et al., 2024).



- Daha az toksiktir ve biyolojik olarak parçalanabilir.
- Yakıt yağlama özelliğini ve setan sayısını iyileştirir.
- Yaşam döngüsü emisyonlarını azaltır.
- Hava kalitesini ve çevreyi iyileştirir.
- Taşınması ve depolanması güvenlidir.
- Enerji güvenliğini artırır ve güvenlik avantajları sunar.

Şekil 2. Biyodizelin benzin-dizele göre avantajları

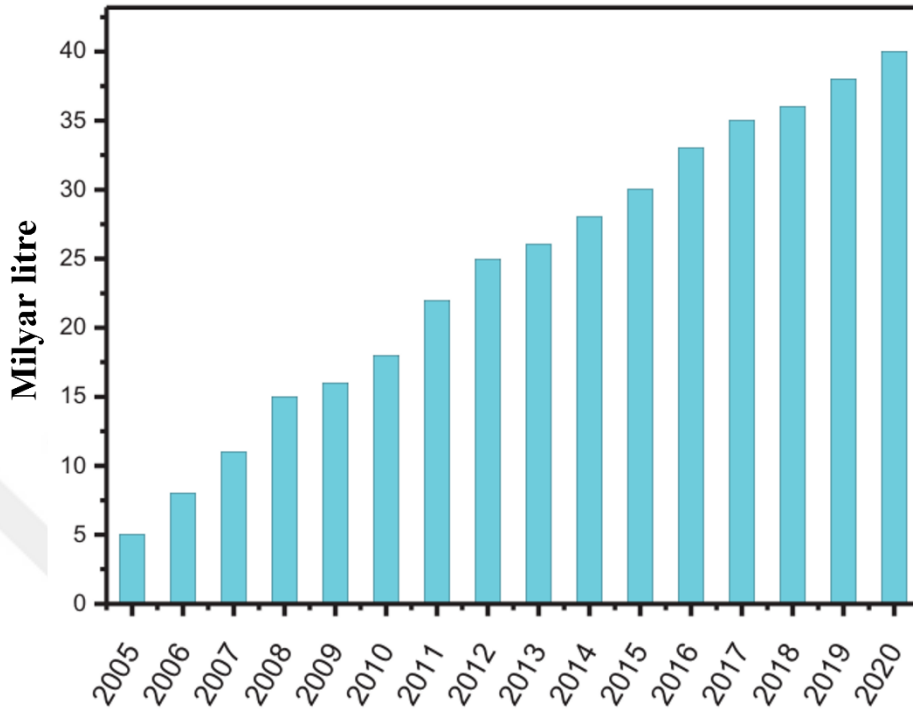
Biyodizel, geleneksel dizel yakıtına kıyasla daha yüksek kayganlık gösterme özelliğiyle bilinmektedir. Kayganlık, yakıt enjeksiyon sistemlerindeki sürtünmeyi ve aşınmayı azaltmak için çok önemlidir. Bu da özellikle yüksek basınçlı enjeksiyon sistemlerine sahip modern motorlar için faydalıdır. Biyodizeldeki oksijen içeriği, yağlama özelliklerini artırmasıyla motor bileşenlerini koruyarak kullanım ömürlerini uzatmaktadır. Dizel yakıtının yanma kalitesini ölçen setan sayısı açısından, biyodizel genellikle petrol dizel yakıtından daha yüksek bir setan sayısına sahiptir. Daha yüksek bir setan sayısı, biyodizelin daha kolay tutuşması anlamına gelmektedir. Bu da daha düzgün motor çalışması, daha az gürültü ve daha düşük yanmamış hidrokarbon ve partikül madde emisyonu demektir (Mekonnen et al., 2024). Oksijen içeriği nedeniyle biyodizel, fosil dizel yakıtından daha eksiksiz yanmaktadır ve bunun sonucunda ise, karbon monoksit (CO), partikül madde (PM) ve yanmamış hidrokarbon (HC) emisyonları azalmaktadır (Yusuf et al., 2024).

Biyodizelin Tarihçesi

İlk biyoyakıtlar ticari olarak 1880 yıllarında kullanılmıştır. Dizel motorun mucidi olan Alman mühendis Rudolf Diesel, 1898'de Paris fuarında icadını yakıt olarak bitkisel (yerfıstığı) yağ kullanarak test etmiştir. Daha sonra, esas olarak 1973 ve 1978 petrol krizleri nedeniyle, özellikle ABD'de fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak için alternatif yakıt arayışına gidilmiştir (Ullah et al., 2024). Biyodizel üretimi, artan petrol fiyatları ve sunduğu çevresel faydalar nedeniyle önem kazanmış ve bilim insanlarının vurguladığı gibi modern ve gelişmiş bir alan hâline gelmiştir (Marchetti et al., 2007).

Biyodizel pazarına Malezya, Avrupa Birliği (AB), Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Brezilya hâkimdir (Hosseini and Wahid, 2012; Leung et al., 2010). OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development; Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü) ve FAO

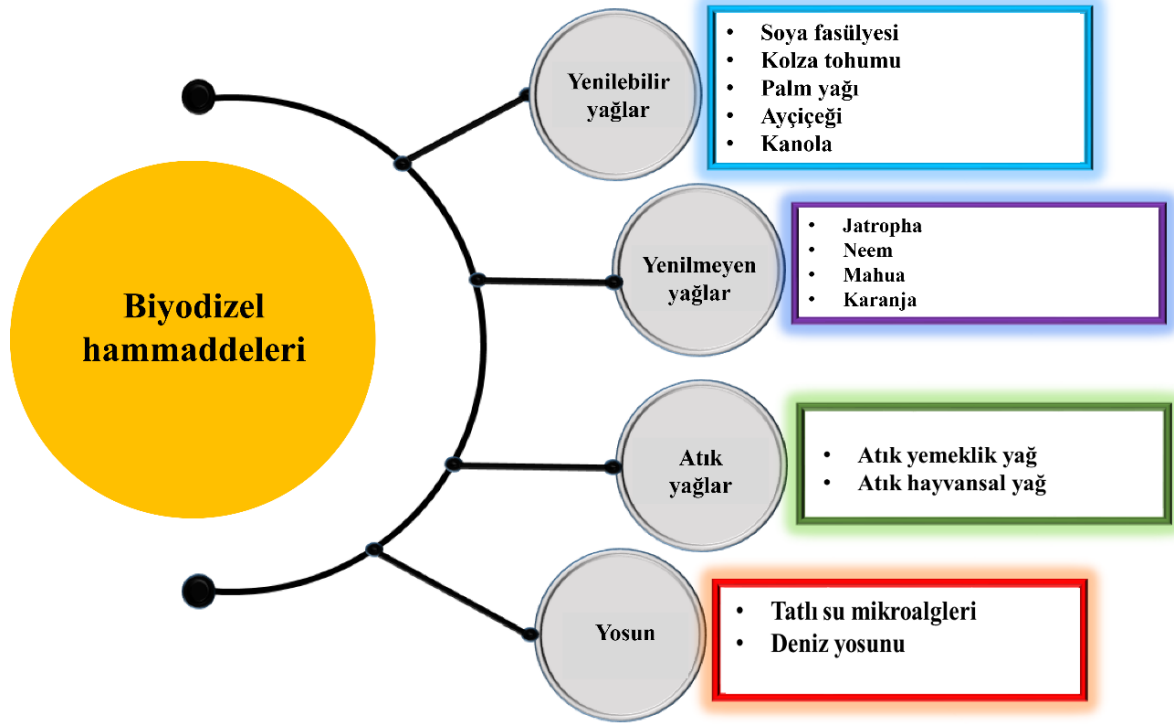
(Food and Agriculture Organization of the United Nations; Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) kuruluşlarındaki verilere göre, dünyadaki yıllık biyodizel üretiminin yıllara göre değişimi Şekil 3’te verilmiştir (Hosseini and Wahid, 2012; OECD-FAO, 2011).



Şekil 3. 2005’ten 2020’ye kadar dünyadaki yıllık biyodizel üretimi
Şekil (Ullah et al., 2024)’ten alıntılanmıştır.

Biyodizel Üretim Hammaddesi

Biyodizel üretim maliyetinin %70’ini oluşturan hammadde maliyeti, biyodizelin ticarileştirilmesinin önündeki en önemli engeldir. Hammaddelerin erişilebilirliği, biyodizel üretiminin ekonomik uygulanabilirliğinin önemli bir faktörüdür. Bu bağlamda, düşük maliyetli hammadde bulmak için çeşitli çabalar sarf edilmiştir (Janaun and Ellis, 2010). Geleneksel yakıtlarla karşılaştırıldığında, alglerden, hayvansal ve bitkisel yağlardan elde edilen yağ asidi metil esterlerinin geliştirilmiş viskozite, uçuculuk ve yanma davranışı nedeniyle biyodizel üretimi için bariz bir hammadde kaynağı olduğu gösterilmiştir. Sığır yağı, domuz yağı, kümes hayvanı yağı ve balık yağı en yaygın hayvansal yağ kaynaklarıdır. Benzer şekilde, biyodizel üretimi için kolza yağı, hint yağı, palmye posası, palmye çekirdeği, ayçiçeği çekirdeği, hindistan cevizi çekirdeği, pamuk çekirdeği, fıstık tanesi ve kanola çekirdeği gibi bitkisel yağlar kullanılmıştır (Leung et al., 2010). Biyodizel hammaddesi olarak kullanılan yağ kaynaklarının çeşitli formları Şekil 4’te özetlenmiştir (Borugadda and Goud, 2012; K. S. Chen et al., 2012; Talebian-Kiakalaieh et al., 2013; H. Zhang et al., 2012).



Şekil 4. Biyodizel hammadde çeşitleri

Şekil (Yusuf et al., 2024)’ten alıntılanmıştır.

Birçok ülke, ulaşım sektöründe yenilenebilir yakıtların kullanılmasını teşvik etmektedir. Bu sektörün talebini karşılamak için, sürdürülebilir ve ucuz hammaddeler kullanılarak biyodizel üretimi konusunda araştırma ve geliştirme yapılmalıdır (Mofijur, Atabani, et al., 2013; Mofijur, Masjuki, et al., 2013). Biyodizel üretiminde bitkisel yağ kullanımında herhangi bir sınırlama yoktur, ancak biyodizel maliyeti artmaktadır.

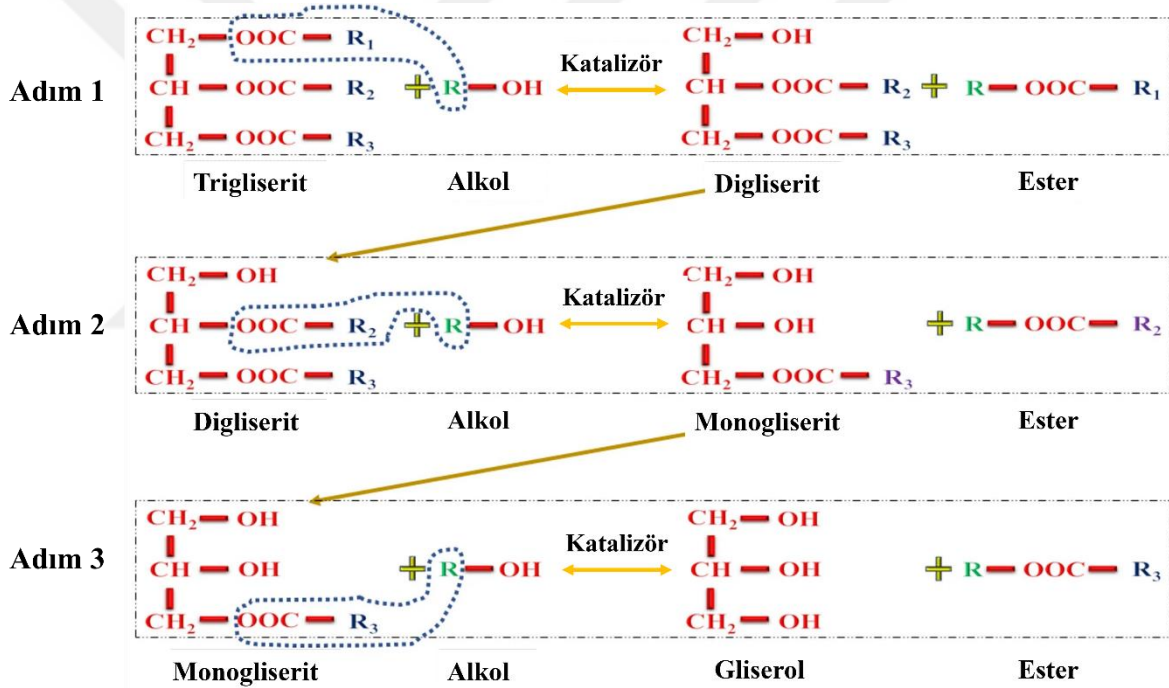
Atık yemeklik yağ (WCO; Waste Cooking Oil), yenilebilir yağ yerine biyodizel hammaddesi olarak kullanılabilir. WCO doğrudan su yoluna bırakılır veya çoğu kafeteryada, otelde ve diğer hizmet endüstrilerinde biriktirilir (Owolabi et al., 2011). WCO’dan biyodizel üretmek, atık yönetimi, çevresel ve ekonomik katkı olmak üzere üç olası çözüm sunmaktadır (Knothe et al., 2010). WCO’dan biyodizel üretmek çevre dostu bir yöntemdir. Çünkü, kullanılmış yağ geri dönüştürülür ve daha düşük emisyonlarla sürdürülebilir enerji sağlanmış olur. WCO’nun hammadde kaynağı olarak kullanılması durumunda hem biyodizel üretim maliyetinin %70’e kadar azaltılması, hem de atık yağın nasıl bertaraf edileceği konusundaki endişelere de çözüm sunması anlamına gelmektedir (Balat, 2011).

Biyodizel Üretim Yöntemleri

Biyodizel, geleneksel fosil dizel yakıtı için umut vadeden bir alternatiftir. Biyodizel üretiminin dört ana yolu vardır; seyreltme, mikroemülsiyonlar, termal kraking (piroliz) ve transesterifikasyondur (Farooq et al., 2013). Enzim katalizli transesterifikasyon, “yeşil” bir

biyodizel üretim yöntemidir. Trigliseritlerin transesterifikasyonu, yağ asidi alkil esterleri ve gliserol üretimiyle sonuçlanır (Sundaramahalingam et al., 2021).

Hammadde olarak kanola, soya, ayçiçeği ve diğer yağlı tohum bitkilerinden elde edilen bitkisel yağlar, hayvansal ve atık yağlar, uygun bir katalizör (asidik, bazik ve enzimatik katalizörler) ve monohidrik bir alkol (metanol veya etanol) (Fukuda et al., 2001) ile yeniden esterleştirilir ve esas ürün olarak yağ asidi esterleri ve gliserol oluşturulur. Bu yöntem, biyodizel üretiminde yaygın olarak kullanılan ve alkoliz olarak da ifade edilen transesterifikasyon yöntemidir (Meher et al., 2006) (Şekil 5) (Amais et al., 2010; V. F. De Almeida et al., 2015). Genel olarak, bu transesterifikasyon reaksiyonu sırasında üç ardışık geri dönüşümlü reaksiyon adımı meydana gelmektedir. Reaksiyonun her adımında biyodizel (bir yağ asidi metil esteri, FAME) üretilir. Bu nedenle, reaksiyon sırasında toplamda üç yağ asidi metil esteri üretilmiş olur (Amais et al., 2010; Mondal et al., 2017).

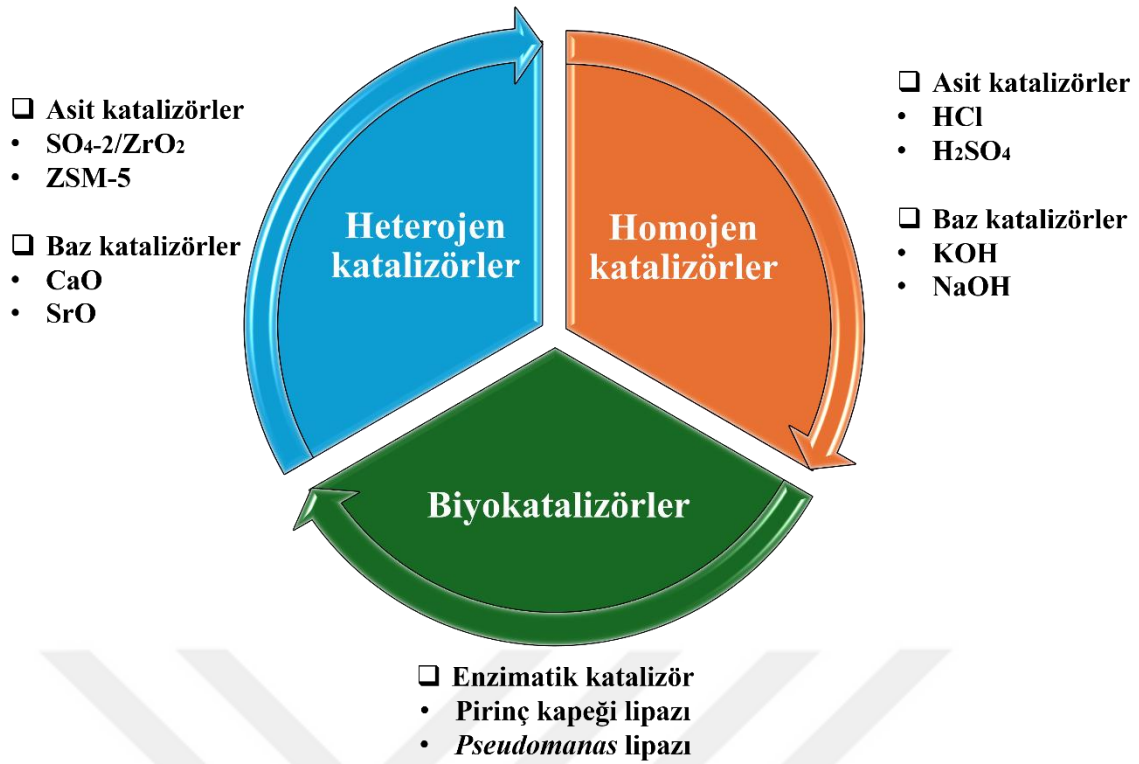


Şekil 5. Genel transesterifikasyon reaksiyon mekanizması

Şekil (Sundaramahalingam et al., 2021)'den alıntılanmıştır.

Biyodizel Üretiminde Kullanılan Katalizör Çeşitleri

Daha önce belirtildiği gibi, bitkisel yağ, hayvansal yağ ve geri dönüştürülmüş atık yağın uygun bir katalizör varlığında alkol ile transesterifikasyonu sonucu, yan ürün olarak gliserol içeren uzun zincirli yağ asidinin metil esteri (biyodizel) elde edilmektedir (Sankaranarayanan et al., 2012). Genel olarak, biyodizel üretimi, trigliseritlerin transesterifikasyonu için kullanılan farklı türde katalizörlerin kullanımını içermektedir. Bunlara homojen ve heterojen katalizörler ile biyokatalizörler dâhildir (Şekil 6).



Şekil 6. Biyodizel katalizörünün sınıflandırılması

Şekil (Yusuf et al., 2024)’ten alıntılanarak modifiye edilmiştir.

Kimyasal katalizörler, daha hızlı ve uygun maliyetli olmalarına rağmen, elde edilen ürünün düşük saflığı, yüksek enerji tüketimi, hammadde kalitesine duyarlılık ve atık su üretimi gibi sınırlamalara sahiptir (Taher et al., 2020; Wilkanowicz et al., 2020). Sürdürülebilir prosesler oluşturma perspektifinde biyodizel üretimi için enzimler, kimyasal katalizörler için daha uygulanabilir bir alternatif gibi görünmektedir. Modern kimyada lipazlar, yüksek substrat özgüllüğü, fonksiyonel grup özgüllüğü ve enantioselektiflikleri vb. özelliklerinden dolayı kimyasal katalizörlerin yerini almak için kullanılmaktadır (Christopher et al., 2014; Y. Zhang et al., 2003). Hammaddelerin kalitesindeki değişiklikler söz konusu olduğunda, enzimler oldukça uyumludur (Guldhe et al., 2015). Ayrıca reaktörde daha düşük sıcaklıklarda çalışırlar ve bu da daha yüksek reaksiyon verimleriyle sonuçlanmasına yol açmaktadır (Bhatt et al., 2022). Biyodizel üretimi için enzim katalizli reaksiyonlar oldukça seçici olduğundan, daha verimli, daha az enerji ve daha az atık madde üretilir. Lipaz katalizli biyodizel sentezi, oluşan ürünün yüksek saflığı, çevre dostu olma, düşük enerji tüketimi ve yüksek güvenlik gibi belirli avantajlara sahiptir (Gao et al., 2013; Jiang et al., 2018). Bu nedenle, bu teknik gelecekteki biyoenerji gelişimi için sürdürülebilir bir yöntem olarak kabul görmektedir (Q. Li et al., 2020). Kimyasal ve enzimatik katalizli reaksiyonlarının genel görünümü Tablo 1’de verilmiştir (Aarthy et al., 2014; Raza et al., 2022).

Tablo 1. Farklı Biyodizel Üretim Süreçlerinin Performans Değerlendirmesi

Parametre	Asit katalizli	Baz katalizli	Enzimatik katalizli
Verim	>%90	>%95	>%95
Serbest yağ asidi	Metil esterlere dönüşüm	Sabuna dönüşüm	Metil esterlere dönüşüm
Gliserol	Geri kazanımı zor, düşük kaliteli ham gliserol	Geri kazanımı zor, düşük kaliteli ham gliserol	Geri kazanımı kolay, yüksek kaliteli ham gliserol
Atık su miktarı	Daha çok	Daha çok	Daha az
Tepkime hızı	Yavaş	Yüksek	Düşük
Reaksiyon sıcaklığı	>100 °C	60-80 °C	20-50 °C
Katalizörün geri kazanılması	Zor	Zor	Kolay
Katalizörün yeniden kullanımı	Zor	Kısmen	Yeniden kullanılabilir
Katalizör maliyeti	Düşük	Düşük	Çok yüksek
Kütle transferi sınırlamaları	Daha az	Daha az	Daha yüksek
Ekipman korozyonu	Yüksek	Orta	Düşük
Reaktör basitliği	Basit	Basit	Orta
İşlem basitliği	Basit	Basit	Orta

Enzimatik yöntemin en önemli avantajlarından biri, yüksek oranda serbest yağ asitleri ve su içeren düşük maliyetli ham maddelerin herhangi bir karmaşık ön işlem yapılmadan kullanılabilmesidir. Rafine kolza tohumu, soya fasulyesi ve palmye yağı gibi rafine edilmiş yenilebilir yağlar artık çoğu ülkede biyodizel üretimi için temel yağ hammaddesidir ve bu yağ hammaddesinin maliyeti toplam üretim maliyetinin %85'inden fazlasını oluşturmaktadır (Moser, 2008). Düşük kaliteli ham maddeler, kullanılmış yemeklik yağ, hayvansal yağ, ham palmye yağı ve diğer bitki veya çayır yağları gibi işlenmemiş yağlar dâhil olmak üzere çeşitli yerlerde bulunabilir (Encinar et al., 2011). Enzimatik yöntem, kimyasal prosedürlerin aksine, düşük kaliteli ham maddeler için kabul edilebilirdir ve serbest yağ asidi ve su içeriği için özel bir gereklilik yoktur. Enzimatik yöntemde sabun üretilmediğinden reaksiyon, daha iyi bir dönüşüm verimiyle sonuçlanmaktadır (Lv et al., 2021).

Lipaz Kaynakları

Lipazlar çeşitli bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilir. Bitki lipazları, yüksek substrat özgüllüğüne ve düşük üretim maliyetine sahiptir, ancak zayıf ifadeleri ve ekonomik olarak uygun olmadığından dolayı endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmazlar (Vilas Bôas and de Castro, 2022). Sığır ve domuz pankreas bezleri ve buzağı, kuzu ve yeni doğmuş keçilerden alınan mide öncesi sıvılar, hayvan lipazlarının kaynaklarıdır.

Hayvan lipazları, daha az sayıda ticari uygulamada kullanılmalarına rağmen süt ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Goswami et al., 2013). Bakteriler (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Enterococcus faecalis*, *Moraxella* sp.), mantarlar (*Mucor miehei*, *Streptomyces* sp., *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Humicola lanuginos*), ve mayalar (*Pichia* sp., *Candida* sp., *Saccharomyces lipolytica*, *Geotrichum candidum*) en sık kullanılan mikrobiyal lipaz kaynaklarıdır (Moazeni et al., 2019). Mikroorganizmalar, hayvansal ve bitkisel kaynaklara kıyasla endüstriyel lipaz üretimi için oldukça tercih edilen bir kaynaktır. Mikroorganizmaların yetiştirilmesi kolaydır, üretim süreleri çok kısadır ve genetik olarak manipüle edilebilirler. Mikroorganizmalar, yüksek bir substrat-ürün dönüşüm oranına sahiptir, yüksek lipaz verimi sağlayabilir ve ayrıca çok değişkenli çevre koşullara tolerans gösterebilirler (Cavalcante et al., 2021). Ayrıca, mikrobiyal lipazlar aşırı sıcaklıklara, pH değişikliklerine ve çözücü koşullarına dayanabilmesinin yanı sıra, geniş bir özgüllüğe ve seçiciliğe sahiptirler (Sharma and Kanwar, 2014). Mikrobiyal lipazların pH aralığı 6,0 ile 10,0 arasındayken aktivite gösterdiği sıcaklık 30 °C ile 60 °C arasında değişkenlik göstermektedir (Fan, 2012).

Dünya çapındaki enzim piyasasında çok sayıda şirket lipaz üretmektedir ve 20'den fazla mikrobiyal lipaz ticari olarak elde edilmektedir (Shu et al., 2010). Ticari uygulamalarda tercih edilen en önemli lipazlar *Chromobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Burkholderia* cinslerinden elde edilmektedir (Beisson et al., 2000). *Candida antarctica* ve *Candida rugosa*'dan ticari öneme sahip maya kaynaklı lipazlar elde edilmektedir (Jaeger and Reetz, 1998). Novo Nordisk tarafından ilk rekombinant lipaz olan Lipolase, 1994 yılında *Aspergillus oryzae*'den elde edilmiştir (Marul, 2007). Novozyme firması tarafından üretilen Novozyme 735, Novozyme 435, Novozyme CALB-L lipazları, *C. antarctica*'dan elde edilen biyokatalizörlerdir (<https://www.novozymes.com/en>).

Mayalar

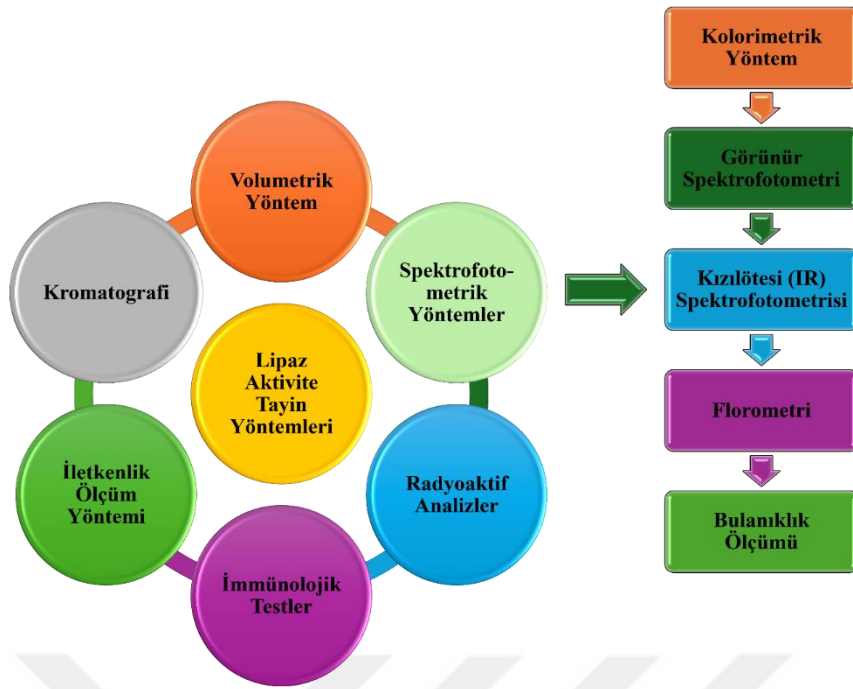
Neredeyse tüm mayalar lipaz üreticisidir ve GRAS (Genel olarak güvenli) kategorisinde yer almaktadır. Gıda işleme, farklı endüstriyel biyotransformasyon ve diğer biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılırlar (Melani et al., 2020). Mayaları lipaz kaynağı olarak kullanmanın avantajları, geniş substrat özgüllüğü, düşük çözünmüş oksijene ve ağır metallere karşı azaltılmış duyarlılık, daha yüksek ürün verimi, hızlı büyüme ve genetik manipülasyonun kolaylığıdır (Putti Paludo et al., 2018). Yaygın lipaz üreten maya cinsleri *Candida* sp., *Pichia* sp., *Yarrowia* sp., *Saccharomyces* sp., *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp. ve *Torulospira* sp.'dir (Gunasekaran and Das, 2005). *Candida* cinsine ait mayalar en çok kabul gören ve kullanılan ticari lipaz üreticileridir.

C. antarctica mayası lipaz A (CalA) ve lipaz B (CalB) olmak üzere iki çeşit lipaz üretebilir (Robert et al., 2019). *C. antarctica* lipase B (CalB) ilk olarak Antarktika'daki Victoria toprakları, Vanda Gölü'ndeki tortuldan izole edilen bir maya olan *C. antarctica*'dan saflaştırılmıştır (Carrasco-López et al., 2009). Yüksek lipolitik aktivitesinin tanımlanması, bu lipazın biyokimyasal (Kirk and Christensen, 2002; Rogalska et al., 1993; Solymár et al., 2002) ve yapısal (Uppenberg et al., 1995; Xie et al., 2014) özelliklerini karakterize etmek için çeşitli çalışmalara yol açmıştır. İlk olarak, *C. antarctica* LF058'den klonlandığından beri CalB, *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae* (Høegh et al., 1995; Jung and Park, 2008; Tamalampudi et al., 2007) ve *Pichia pastoris* (Budisa et al., 2010; Larsen et al., 2008) gibi bir dizi konakçıda başarılı bir şekilde ifade edilmiştir. CalB'yi ticari olarak önemli kılan özellikler arasında, yüksek enantioselektifliği ve çok çeşitli substratlara karşı seçiciliği (Anderson et al., 1998), yüksek katalitik aktivitesi (Kirk and Christensen, 2002) ve termal kararlılığı (N. Zhang et al., 2003) bulunmaktadır. CalB'yi endüstriyel amaçlar için ilginç kılan bir diğer özelliği ise, transesterifikasyon reaksiyonlarında substrat olarak ikincil alkoller kullanıldığında özgülüğü ve katalitik etkinliğidir (Wu et al., 2013).

Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 33 kDa olan CalB; 6,0 izoelektrik noktası, 70 °C pH 7'de 20 dk.'lık inkübasyondan sonra %15 tutulan aktivite, bazik pH'ta kararlı (Cereghino and Cregg, 2000; Cregg et al., 1993; Kirk and Christensen, 2002) ve triaçilgliserol Sn-3'ün hidrolizinin bölgesel özgülüğü (Kirk and Christensen, 2002) gibi özelliklere sahiptir. *C. antarctica*'dan elde edilen lipaz B, biyokatalizde en yaygın kullanılan lipazlardan biridir (Anderson et al., 1998; Gotor-Fernandez et al., 2006). Çok çeşitli alanlarda kullanılabilir ve biyodizel üretimi (Ko et al., 2012; Yu and Lutz, 2010), polimer sentezi (Tanino et al., 2009), kiral çözünürlük (Andrade and Barcellos, 2009) ve farmasötik hazırlama (Anderson et al., 1998) açısından diğer tüm lipazlardan daha mükemmel katalitik performansa sahiptir.

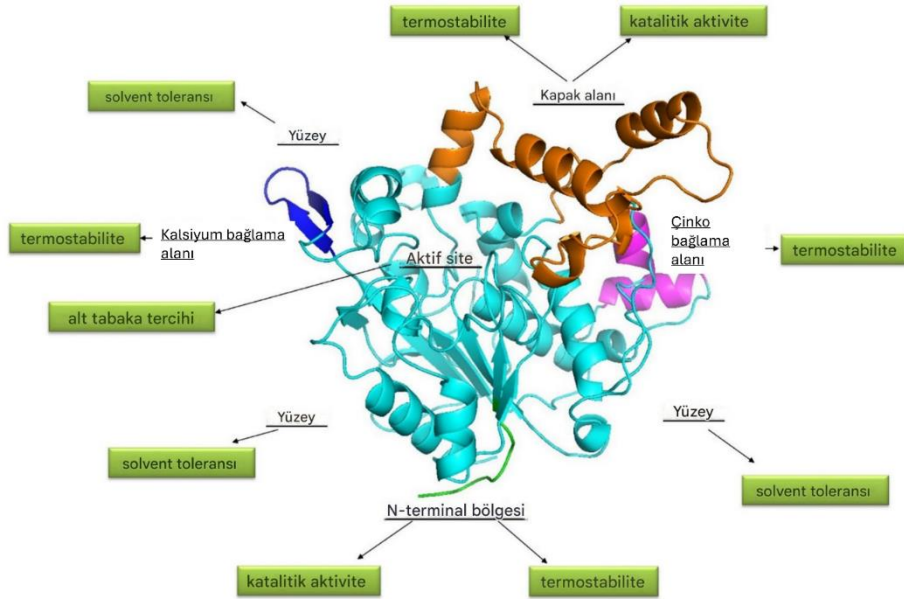
Lipaz Aktivite Belirleme Yöntemleri

Bilim insanları lipazların katalitik aktivitesini belirlemek için çeşitli yöntemler araştırmaktadır (Hasan et al., 2009). Lipaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan farklı yöntemler Şekil 7'de özetlenmiştir.



Şekil 7. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler

Lipazların endüstriyel özelliklerinin (katalitik aktivite, termostabilite, substrat tercihi ve çözücü toleransı) iyileştirilmesi için hedef bölgeleri Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8. Lipazların endüstriyel özelliklerini etkileyen kritik unsurlar

Şekil (Vardar-Yel et al., 2024)’ten alıntılanmıştır.

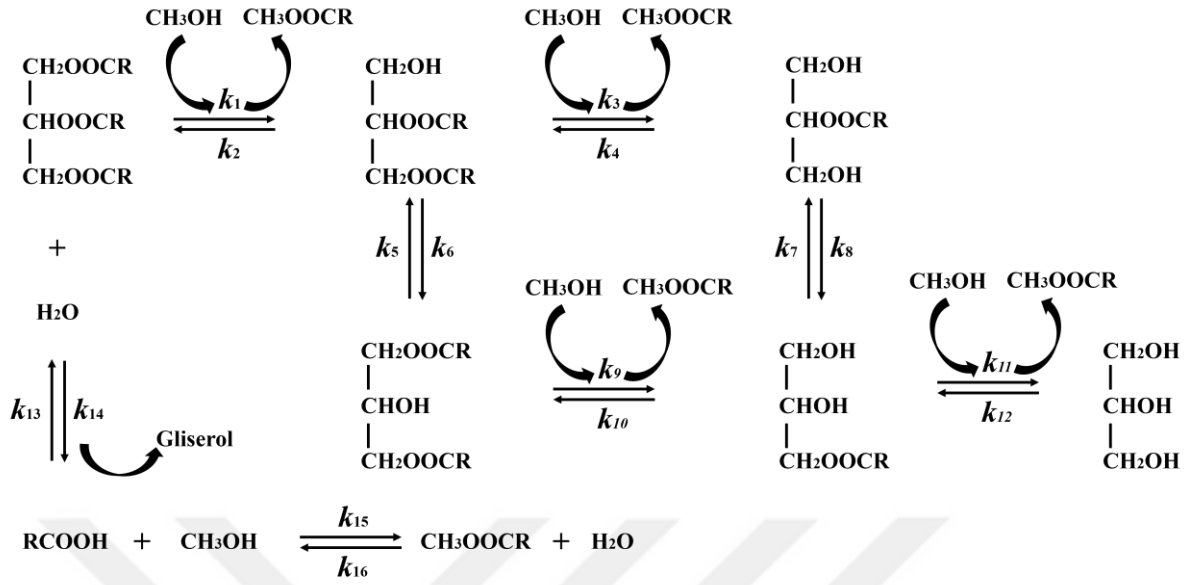
Sıcaklığın kararlılığı (termostabilite), lipaz içeren endüstriyel prosedürlerde önemli bir unsurdur (Haki and Rakshit, 2003) ve çok sayıda lipazda oldukça aranan bir özellik olmaya devam etmektedir (Veno et al., 2019). Disülfid bağı, proteinin kararlılığı için önemli olan kovalent bir bağlantı görevi görmektedir. Bu çapraz bağların her biri, proteine 2,3 ile 5,2 kcal/mol aralığında bir termodinamik kararlılık katar (Dombkowski et al., 2014). Hidrofobik

etkileşimler, termal kararlılığa yaklaşık %60 oranında katkıda bulunarak önemli bir rol oynamaktadır ve protein kararlılığını belirlemede çok önemlidir (Pace et al., 2011). Elektrostatik etkileşim veya tuz köprüleri kavramı, protein stabilizasyonunda temel hususlardan biridir ve termostabil proteinler, orta sıcaklıklara adapte olmuş proteinlere kıyasla daha yüksek oranda tuz köprüsü sergiler (Veno et al., 2019). Enzimlerin katalitik fonksiyonu tüm biyoteknolojik süreçlerde temel bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır.

Lipazların Katalizledikleri Reaksiyonlar ve Uygulama Alanları

Lipazlar (E.C 3.1.1.3), çeşitlilikleri ve seri üretimlerinin kolaylığı nedeniyle biyoteknolojik açıdan önemli enzim kategorilerinden birini oluştururlar (Ray, 2012) . Lipazların enzimatik yeteneklerinin ve substrat özgüllüğünün çok yönlülüğü, onları endüstriyel uygulamalar için özellikle çekici kılmaktadır (Vakhlu and Kour, 2006). Lipazların önemli endüstriyel uygulamaları arasında yağları ve katı yağları değiştirerek biyodizel ve diğer yapılandırılmış lipidler oluşturmak yer alır (Rajendran et al., 2009). Bu sebeple, triaçilgliserol ester hidrolazları olarak da bilinmektedir. Genellikle büyük miktarda su molekülü içeren atık yağları kullanırken, yüksek su içeriğinin varlığında bile biyodizel üretilmesine olanak sağladığı için lipaz bazlı bir yöntem kullanmak iyi bir fikir olmaktadır (Lotti et al., 2015). Doğal substratlarının (sıvı ve katı yağlar) suda çözünmez olması nedeniyle, bu tür enzimler doğal gereği su-lipit arayüzünde hareket etmek üzere seçilmişlerdir (Kapoor and Gupta, 2012). İlginç bir şekilde, daha az miktarda su içeren reaksiyon ortamında lipazlar, kofaktörlere ihtiyaç duymadan hidroliz, esterifikasyon, interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir (Q. Li et al., 2020).

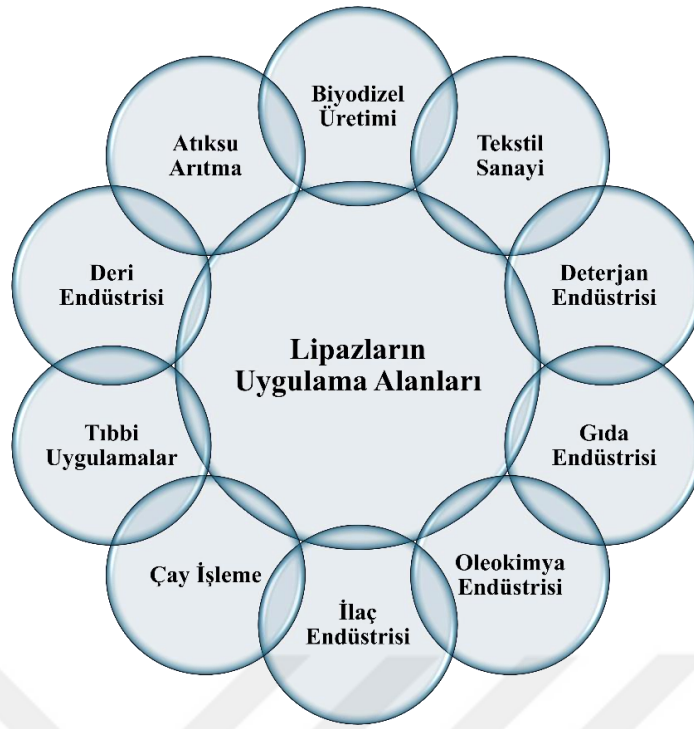
Transesterifikasyonda lipazın ayrıntılı kinetik mekanizması Şekil 9’da gösterilmiştir (Zhao et al., 2015).



Şekil 9. Esterifikasyon, transesterifikasyon ve açıl göçünü hesaba katarak, biyodizel ve gliserol üretimi için lipaz aracılı gliserit metanolizine yönelik ayrıntılı bir kinetik model

Şekil (Raza et al., 2022)’den alıntılanmıştır.

Lipazlar, şu anda küresel enzim pazarının yaklaşık %5’ini oluşturmaktadır ve biyoteknoloji alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Gıda (Basso and Serban, 2019), biyomedikal (Lu et al., 2019), kozmetik (N. R. Khan and Rathod, 2015), biyosensör (Basso and Serban, 2019), içecek (Angajala et al., 2016), biyolojik bozunma (Salihu and Alam, 2015), kimyasal (Basso and Serban, 2019), polimer (Salihu and Alam, 2015), deterjan (R. N. Lima et al., 2019; Navvabi et al., 2018), kağıt (Angajala et al., 2016; R. N. Lima et al., 2019), deri (Angajala et al., 2016; Navvabi et al., 2018) ve yakıt (R. N. Lima et al., 2019) uygulamaları gibi çeşitli alanlarda kullanıldıkları için yeşil katalizörler olarak da adlandırılırlar (Moya Joëlle Carole et al., 2023). Ayrıca biyodizel (N. W. Li et al., 2009), aromatik esterler (L. N. de Lima et al., 2018), yapılandırılmış lipidler (Guo et al., 2020) ve diğer birçok ürünün (F. L. C. Almeida et al., 2021) üretiminde de kullanılmaktadır. Lipazların çeşitli uygulama alanları Şekil 10’da özetlenmiştir.



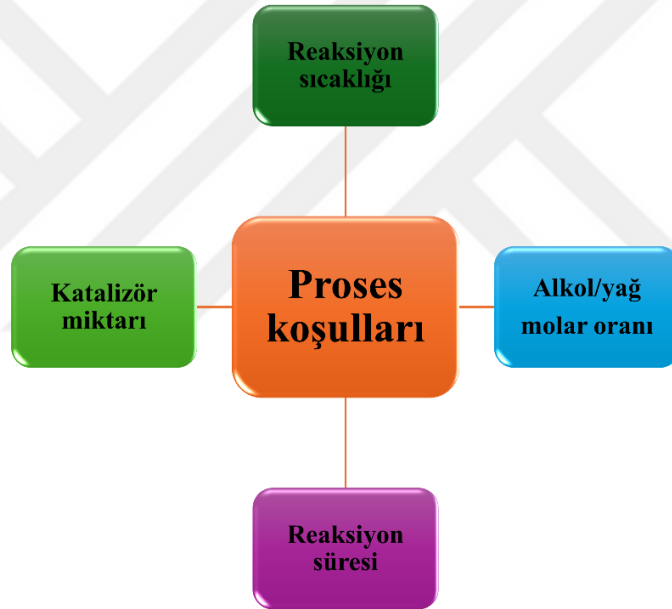
Şekil 10. Lipazların uygulama alanları

Biyodizel

Enzimatik biyodizel, daha az enerji tüketimi ve daha düşük kimyasal yan ürün üretimi nedeniyle genellikle geleneksel biyodizel üretim yöntemlerine göre daha çevre dostu bir alternatif olarak tanıtılmaktadır (Mustafa et al., 2023). Enzimatik reaksiyon tek adımda gerçekleşmektedir ve alkali ve asit katalizörlerin kullanımının yerini alma potansiyeline sahiptir (Ghaly et al., 2010). Son yıllarda, özellikle lipaz kullanan enzimatik transesterifikasyonla ilişkili avantajlar, birçok araştırmacının dikkatini kimyasal transesterifikasyondan kaydırmasına sebep olmuştur (Vasudevan and Briggs, 2008). Biyodizel üretiminde ideal bir lipaz, tüm serbest yağ asitlerini (mono-, di- ve triağılgiseritler) yüksek verimle kullanabilmeli, ürün inhibisyonu olmamalı, daha az miktarlarda yüksek aktivite göstermeli, suyun az olduğu ortamlarda aktivitesini korumalı, reaksiyonu kısa sürede tamamlamalı, alkoller içeren reaksiyon ortamında stabilite göstermeli ve düşük sıcaklıkta yüksek aktivite göstermelidir (Bajaj et al., 2010; Yoo et al., 2011). Literatürde, ayçiçeğinden, karışık bitkisel yağlardan, soya yağından, donyağından ve gres gibi çeşitli yağlardan enzim (lipaz) katalizli biyodizel üretimi ile ilgili araştırmalar bulunmaktadır (Abigor et al., 2000; Kaieda et al., 1999; Kamini and Iefuji, 2001; Manoel et al., 2016; Mittelbach, 1990; Nelson et al., 1996; Watanabe et al., 2000). Diğer yandan, hücre dışı veya hücre içi lipaz kullanılarak enzimatik biyodizel üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Marchetti et al., 2007). Bu konuda çok sayıda araştırma yapılmasına rağmen, halen daha biyodizel üretimi için yeni ve üstün özelliklere sahip enzimler aranmaktadır.

Biyodizel Üretimi için Proses Koşulları/Parametreleri

Lipaz aracılı transesterifikasyonla biyodizel üretimi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Lipaz türü, miktarı, kaynağı, özgülüğü ve seçiciliği, sıcaklık ve pH toleransı, immobilizasyon tekniği vb. özellikler transesterifikasyon sürecini etkilemektedir. Bu özellikler arasında, uygun lipazın seçimi daha da önem arz etmektedir (Sundaramahalingam et al., 2021). Transesterifikasyon reaksiyonları; alkolün yağa molar oranı, reaksiyon sıcaklığı, katalizör miktarı ve reaksiyon süresi gibi çeşitli koşullar altında meydana gelmektedir ve bunların hepsi biyodizel verimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Zhong et al., 2020). Yüksek biyodizel verimi elde etmek için, bu koşulların transesterifikasyon reaksiyonu sırasında optimize edilmesi gerekmektedir. Transesterifikasyon reaksiyonu sırasında optimize edilmesi gereken çeşitli proses koşulları Şekil 11’de gösterildiği gibi, aşağıdaki bölümlerde de ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Yusuf et al., 2024).



Şekil 11. Transesterifikasyon reaksiyonu sırasında optimize edilmesi gereken çeşitli proses koşulları

Metanolün Yağa Molar Oranının Etkisi

Alkol, biyodizel üretiminde yaygın olarak kullanılan açıl akseptörüdür. Hem kısa zincirli hem de uzun zincirli alkoller açıl akseptörü olarak kullanılmaktadır. Ancak endüstriyel biyodizel üretiminde en yaygın olarak kullanılan alkoller, daha düşük maliyetleri ve daha kolay bulunulabilirlikleri nedeniyle metanol ve etanoldür (Manaf et al., 2019). Transesterifikasyon reaksiyonu, alkoliz olarak da bilinmektedir (metanol kullanılıyorsa metanoliz, etanol kullanılıyorsa etanoliz olarak adlandırılır). Etanol, tarımsal ürünlerden elde edilebildiği, yenilenebilir olduğu ve çevre açısından biyolojik olarak daha az sakıncalı olduğu için tercih edilen alkoldür. Öte yandan metanol, düşük maliyeti ve fiziksel ve kimyasal avantajları

nedeniyle öncelikli olarak kullanılmaktadır (Richard, 2010). Metanol yaygın olarak kullanılmasına rağmen, enzimi inhibe edebilir ve enzim performansını düşürebilir. Bu sorun, reaksiyon ortamına adım adım metanol ekleyerek veya organik çözücüler kullanarak çözülebilir (Gog et al., 2012).

Transesterifikasyon reaksiyonunda yağın tam dönüşümü için en az üç mol eşdeğeri (stokiyometrik miktar) metanol gereklidir (Atadashi et al., 2012). Enzimatik sürecin başlangıcında metanolün molar eşdeğerinin yarısından fazlasının eklenmesiyle metanoliz önemli ölçüde azaltılır. Bu aktivite kaybı, enzimatik biyodizel üretimindeki en büyük engeldir. Bu sorunu çözmek için metanol, reaksiyon ortamına kademeli olarak eklenmelidir. Bu genellikle iki adımlı veya üç adımlı bir ekleme işlemidir (Szczesna Antczak et al., 2009). Adım adım eklemenin avantajı, metanol inaktivasyonu olmadan daha yüksek biyodizel veriminin sağlanmasıdır (>%85). Organik çözücü sisteminde alkol:yağ molar oranı genellikle 3:1–6:1 aralığındadır. Enzimatik biyodizel üretimi için gereken alkol miktarı, lipaz ve yağ kaynağına bağlı olarak değişiklik göstermektedir ve her çalışmada özel olarak optimize edilmelidir.

Sıcaklığın etkisi

Transesterifikasyon reaksiyonu sırasında biyodizel verimini ve reaksiyon hızını etkileyen bir diğer önemli proses parametresi sıcaklıktır (Choi et al., 2018; Mata et al., 2012). Prensipte olarak, reaksiyon hızı sıcaklık arttıkça artar (Tomic et al., 2015). Yüksek sıcaklığın kullanılması; yağ viskozitesini azaltır ve reaksiyon hızını artırır. Bu da biyodizel veriminin artışına sebep olur (Jayaraman et al., 2020; Vasudevan and Briggs, 2008). Ancak, optimum sıcaklığın üzerine çıkılması durumunda trigliseritlerin sabunlaşma hızı artacağından, reaksiyon daha düşük verimde biyodizel üretimiyle sonuçlanacaktır (Chaisutyakorn et al., 2018). Biyokatalizör aracılı transesterifikasyon, kimyasal katalizli transesterifikasyona kıyasla daha düşük sıcaklıkta gerçekleştirilir. Bu durum, enerji tüketimini azalttığı için ek bir avantaj olarak ortaya çıkmaktadır (Sandoval et al., 2017). Genellikle, lipazlar yüksek termostabiliteye sahiptir ve optimum sıcaklıkları kaynaklarına bağlı olarak 30 °C ile 60 °C arasında değişkenlik göstermektedir (Fan, 2012). Enzimatik transesterifikasyon oranı, lipazın optimum sıcaklığına ulaşana kadar sıcaklık arttıkça artar (Dias Ribeiro et al., 2011). Çok yüksek sıcaklıklarda lipaz denatüre olur ve aktivitesini kaybeder. Optimum reaksiyon sıcaklığını etkileyen faktörler arasında lipaz stabilitesi, immobilizasyon yöntemi ve desteği, alkol türü, alkol:yağ molar oranı ve çözücü türü yer almaktadır (Fan, 2012).

Katalizör miktarının etkisi

Bir katalizörün, genel reaksiyon aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artırdığına inanılmaktadır. Bu nedenle, trigliseritlerin biyodizele dönüştürülmesinde katalizörlerin varlığı, gereken aktivasyon enerjisini azaltarak reaksiyon sürecini hızlandırır. Tipik olarak, reaksiyon düşük miktarda katalizör eklenmesiyle başlatılmalı ve optimum bir biyodizel verimi elde edilene kadar diğer koşullar sabit tutulurken kademeli olarak artırılarak optimize edilmelidir (Yusuf et al., 2024).

Reaksiyon süresinin etkisi

Reaksiyon süresi, süperkritik koşullar altında yağın biyodizele dönüşümünün reaksiyon kinetiğini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır (Leung et al., 2010). Trigliseritlerin transesterifikasyonunda trigliseritlerin biyodizele dönüşümünün zamanla arttığı gözlemlenmiştir (Leung et al., 2010). Ayrıca, yağ-metanol katalizörü arasındaki kütle transferi sınırlaması nedeniyle, dönüşüm hızı reaksiyon süresiyle birlikte artış göstermektedir.

Sonuç olarak, reaksiyon parametrelerinin birbirine bağımlılığı, biyodizel üretimi için kullanılan belirli hammaddelere ve katalizöre göre uyarlanması gereken seri optimizasyon çalışmalarını gerektirmektedir (Okwundu et al., 2019). Proses koşullarının biyodizel üretimine etkisinin incelendiği örnek çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

(D. Huang et al., 2012)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, *Rhizomucor miehei* lipazını ifade eden rekombinant *Pichia pastoris*'in tüm hücre biyokatalizörünün kullanılmasıyla soya fasulyesi yağından elde edilen biyodizel veriminin 72 saatlik bir reaksiyon sonunda yaklaşık %83,14'e ulaştığını ifade etmişlerdir.

Başka bir çalışmada, *Thermomyces lanuginosus* lipazını üreten rekombinant *Pichia pastoris*'in kullanılmasıyla, soya fasulyesi yağından 108 saatlik bir reaksiyon sonunda yaklaşık %82 oranında biyodizel verimine ulaşıldığı bildirilmiştir (Yan et al., 2014).

(Şen, 2014) yapmış olduğu tez çalışmasında, *Streptomyces lienomycini* 350-2 (LipS350-2) suşu tarafından hücre dışı üretilen lipazı tanımlamış ve karakterize etmiştir. Kısmi saflaştırma sonucu LipS350-2'nin spesifik aktivitesini 1466.8 (EÜ/mg), saflaştırma verimini %1,17 ve saflaştırma katsayısını 1,56 olarak hesaplamıştır. Saf lipazın moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile yaklaşık 52 kDa olarak tespit etmiştir. Biyodizel üretim reaksiyonunu ilk olarak, zeytinyağı ile etanol ve metanol varlığında, 200 rpm'de, 40 °C'de, 48 saatte gerçekleştirmiş ve standart olarak metil oleat kullanmıştır. Pozitif kontrol olarak ise biyodizel üretiminde endüstriyel olarak kullanılan Novozym 435 (*C. antarctica* lipaz B)'i kullanmıştır. Zeytinyağının yanı sıra ayçiçek yağı ve atık yağ kullanarak da biyodizel reaksiyonunu

gerçekleştirmiş ve biyodizel üretimini kalitatif olarak TLC (ince tabaka kromatografisi) ile belirlemiştir.

(Jayaraman et al., 2020) tarafından yapılan bir çalışmada pankreas lipaz katalizörü kullanılarak WCO (Waste cooking oil; atık yemeklik yağ)'nın katalitik transesterifikasyonunu incelenmiştir. Bu katalizör kullanılarak %88'lik optimum yağ dönüşümünün, 3:1 metanol:yağ molar oranı, %1,5 ağırlıkça katalizör miktarı ve 60 °C sıcaklıkta 4 saatlik inkübasyon sırasında elde edildiği ifade edilmiştir.

(Iyyappan et al., 2022)'ın yapmış oldukları bir çalışmada, *Caulerpa racemosa racemosa* (bir alg türü) yağı ve bağlı (rPp-BL) ve salgısal lipaz (rPp-SL) ifade eden rekombinant *Pichia pastoris*'in kullanılmasıyla biyodizel üretilmiştir. Toplanan algler, ultrasonikasyon, mikrodalga ve çözücü ekstraksiyonu kullanılarak ön işleme tabi tutulmuştur. Hem rPp-BL hem de rPp-SL, *C. racemosa* biyokütlesi hidrolizatını ve gliserolünü etkili bir şekilde kullanmıştır. 4:1 metanol:yağ molar oranı ve 38 °C'de 30 saatlik reaksiyon sonunda maksimum biyodizel veriminin yaklaşık %93,64'e ulaştığını gözlemişlerdir.

Konak Organizmanın Seçimi

Komagataella phaffii

Bir enzimin heterolog ekspresyonu, daha düşük maliyetle daha yüksek miktarlarda enzim elde etmek için bir alternatiftir (Gomes et al., 2016). Bu teknik, düşük protein ekspresyonu, yavaş büyüme hızı ve olası özel ekipman ihtiyacı gibi yerli organizmaların yetiştirilmesinde bulunan problemlerden kaçınarak, enzimlerin yerleşik ekspresyon vektörlerinde üretimini mümkün kılmıştır (Potvin et al., 2012; Zerbs et al., 2009). Örneğin, Novozymes şirketi yerli mikroorganizmada üretim yerine *Aspergillus niger*'de klonlanmış CalB'nin üretimini gerçekleştirmektedir. Bu bağlamda, *K. phaffii* yüksek miktarda protein üretimi, salgılanması ve hedef proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarını yapabilen, yaygın olarak kullanılan bir maya ekspresyon sistemi olarak gündeme gelmektedir (Potvin et al., 2012). Heterolog ekspresyon ve gen optimizasyonunun kombinasyonu yoluyla, daha termostabil (H. J. Park et al., 2014; N. Zhang et al., 2003), aktif (Qian and Lutz, 2005) ve/veya enantiyoselektif (Gaskin et al., 2001; Liebeton et al., 2000; Wu et al., 2013) enzimler elde etmek mümkündür. CalB'nin *K. phaffii* kullanılarak yapısal promotör altında heterolog ekspresyonu yoluyla üretimi rapor edilmiştir (Brito e Cunha et al., 2019; Robert et al., 2019). Bu rekombinant enzim, biyodizel (Aguieiras et al., 2014), esterler (Barsé et al., 2019; Cipolatti et al., 2018) ve farmasötik bileşiklerin (Manoel et al., 2016) sentezi gibi çeşitli biyoteknolojik işlemlerde biyokatalizör olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu rekombinant lipaz, ticari CalB

(Lipozyme® CalB) ile karşılaştırıldığında, esas olarak ekstrem pH değerleri ve yüksek sıcaklık altındaki stabilitesi ile ilgili olarak çeşitli biyokimyasal farklılıklar göstermiştir (Robert et al., 2017).

Metilotrofik maya *K. phaffii*, rekombinant proteinlerin endüstriyel üretiminde en yaygın kullanılan konakçılardan biridir (Gao et al., 2021) ve son zamanlarda yapılan bir literatür araştırmasına göre heterolog protein üretimi için *S. cerevisiae*'dan daha sık kullanılmaktadır (Bill, 2014; Vogl et al., 2018). Bu metilotrofik maya, diğer konakçılara göre üstünlükleri nedeniyle, en çekici konakçılardan biri hâline gelmiştir (Koutz et al., 1989; Zhan et al., 2016). *K. phaffii*'nin CalB üretimi için bir ifade platformu olarak diğer ökaryotik veya prokaryotik sistemlere göre çeşitli avantajları vardır (Gotor-Fernandez et al., 2006).

Bunlar;

1. Rekombinant protein üretiminde “Genel olarak güvenli” (GRAS) mikroorganizma statüsünde yer almaktadır (Fickers, 2014; Ghaly et al., 2010; Z. Yang and Zhang, 2018).
2. Metanol tarafından indüklenen olağanüstü güçlü ve sıkı düzenlenmeye sahip özel AOX1 promotörü bulunmaktadır (Liao et al., 2022).
3. *K. phaffii*'nin tüm genomu dizilenmiştir, bu da moleküler genetik manipülasyonu için büyük fayda sağlamaktadır (De Schutter et al., 2009).
4. Memeli hücresi kültür ortamı ile karşılaştırıldığında, *K. phaffii* için büyüme ortamı ve kültür koşulları nispeten daha basittir ve kalıplaşmış fermentasyon protokolleri bulunmaktadır (Wu et al., 2013).
5. Ucuz karbon kaynağı içeren basit ortamda, yüksek seviyelerde yabancı protein ekspresyonu sağlayabilen yüksek yoğunluklu fermentasyon elde edilebilir (Anderson et al., 1998; Robert et al., 2017).
6. Hücre içi veya hücre dışı olarak yüksek düzeyde protein ekspresyonu sağlamaktadır.
7. Hedef proteinin (ürün) kültür sıvısına salgılanabilmesi, diğer ökaryotik/prokaryotik ekspresyon sistemleriyle karşılaştırıldığında, proteinin daha etkin saflaştırılması için fayda sağlamaktadır (Cregg et al., 1993; P. Li et al., 2007).
8. Glikozilasyon, disüfit bağı oluşumu ve proteolitik işleme gibi daha yüksek ökaryotik protein modifikasyonlarını gerçekleştirme yeteneğine sahiptir (Aguieiras et al., 2014; Zhan et al., 2016).
9. Ekspresyon sistemi, ticari olarak temin edilebilen bir kit olarak mevcuttur (Invitrogen, 2010b).
10. Artan heterolog protein üretimi için metanol içermeyen substrat kullanım yolları üzerinde ekspresyonu transkripsiyonel olarak yeniden düzenleyen *de novo* özel olarak

tasarlanmış hibrit ve hibrit yapılı güçlü sentetik promotörler bulunmaktadır (Liao et al., 2022).

Karbon kaynağı ile düzenlenen promotörler, gen ekspresyonunu kontrol etmek için iyi çalışılmış standart araçlardır. Promotörlerin doğal düzenlenmesi üzerinde kontrol elde etmek, metabolik mühendislik ve sentetik biyoloji uygulamaları için önemlidir. Yaygın olarak kullanılan protein üretimi konakçısı *K. phaffii*'de, sıkı düzenlemeleri ve olağanüstü güçleri nedeniyle başta *AOX1* promotörü (P_{AOX1}) olmak üzere metanol ile indüklenebilir promotörler kullanılmaktadır (Cereghino and Cregg, 2000; Vogl et al., 2018). 1960'larda, metanolün bazı mayalarda karbon kaynağı olarak kullanılabileceği bulunmuştur (Ogata et al., 1969). Bu sistemde, yabancı genlerin ekspresyonu genellikle metanol kullanım yolundaki ilk enzimi kodlayan alkol oksidaz I geninin (*AOX1*) promotörü tarafından yönlendirilir. P_{AOX1} 'in ifadesi, farklı karbon kaynaklarına yanıt veren hem baskılama hem de baskı giderme mekanizmalarıyla düzenlenebilir. P_{AOX1} yalnızca metanole yanıt olarak indüklenir, glikoz veya etanol gibi diğer karbon kaynakları tarafından baskılanır (Cereghino and Cregg, 2000; Cregg et al., 1989, 2000; P. Zhang et al., 2010). P_{AOX1} 'in düzenlemesi esas olarak, metanol varlığında yaklaşık 1000 kat artarken, glikoz ve etanole yanıt olarak transkripsiyon seviyesinin düştüğü bir represyon/derepresyon mekanizması ile transkripsiyonel düzeyde gerçekleştirilir (Tschopp et al., 1987). Metanole ihtiyaç duymadan üretimi düzenlemek için P_{AOX1} 'in varyantları geliştirilmektedir, ancak üretim oranları klasik P_{AOX1} kadar iyi çalışılmamıştır (Looser et al., 2017). Diğer yandan, yapısal ifade sistemleri, biyodizel endüstrisinin bir yan ürünü olan ham gliserol dâhil olmak üzere farklı karbon kaynaklarının kullanılabilmesi avantajıyla çekici bir alternatif sunmaktadır (Anastácio et al., 2014).

K. phaffii'den türetilen *GAP* (Waterham et al., 1997), *ICL1* (Menendez et al., 2003), *FLD1* (S. Shen et al., 1998), *PEX8* (H. Liu et al., 1995), *TEF1* (Ahn et al., 2007), *PGK1* (Moreira de Almeida et al., 2005) ve *YPT1* (Segev et al., 1988) promotörleri mevcuttur. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan yapısal promotör, güçlü bir şekilde düzenlenen ve aşırı ekspresyon yapabilen *GAP* promotörü (P_{GAP})'dür (A. L. Zhang et al., 2009). NAD-bağımlı gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenaz, *GAP* geni tarafından kodlanmaktadır ve tetramerleri oluşturmaktadır. P_{GAP} , gliserol, glikoz, etanol ve oleik asit dâhil olmak üzere diğer karbon kaynakları üzerinde sürekli protein ekspresyonu sağlayan bir yapısal promotördür (Juturu and Wu, 2018).

Heterolog Protein İfadesinde Etkili Olan Parametreler

Kodon optimizasyonu

Heterolog gen ekspresyonu, kodon kullanım sıklığından önemli ölçüde etkilenebilir. Çoğu organizma gibi, *K. phaffii* de eş anlamlı kodon kullanımının bir modelini sergilemektedir ve bir kodon alt kümesine karşı genel bir eğilim göstermektedir (Sinclair and Choy, 2002). Orijinal diziyi içeren organizmadaki nükleotid dizilerini, konakçı organizmanın nükleotid dizilerine dönüştürerek ifade edilmesi istenen genlerin translasyon verimliliğini artırmak amacıyla kodon optimizasyonu yapılmaktadır (Fuglsang, 2003; J. Yang and Liu, 2010). Kodon optimizasyonu yapılırken, kodon adaptasyon indeksi (CAI), haberci RNA (mRNA)'nın ikincil yapısı ve transfer RNA havuzu dâhil olmak üzere diğer faktörler de dikkate alınmalıdır (Y. Tu et al., 2016). Translasyon verimliliğinin iyi olması için CAI'nın 1'e yakın olması tavsiye edilmektedir (Al-Hawash et al., 2017). Yabanıl *C. antarctica* LF 058'in orijinal *CalB* geni dizisinde, *K. phaffii*'de muhtemelen ekspresyon etkinliğini azaltacak ve hatta translasyon mekanizmasını devre dışı bırakacak nadir ya da düşük frekansa sahip kodonlar bulunmaktadır (X. Li et al., 2016). Bu sebeple ekspresyon seviyesini iyileştirmek amacıyla, konakçı olarak kullanılacak olan *K. phaffii*'nin kodon kullanım eğilimine göre orijinal *CalB* dizisini kodon optimize etmek önem arz etmektedir.

(J. K. Yang et al., 2013) yapmış oldukları bir çalışmada, *CalB*'nin *Pichia*'da üst düzey ifadesini elde etmek için bir de novo tasarım ve sentez stratejisi kullanarak *CalB* geninin kodonlarını ve α -faktörünü optimize etmişlerdir. Farklı ifade bileşenlerine sahip bir dizi rekombinantın karşılaştırmalı analizi yoluyla, kodon-optimize edilmiş α -faktörünü ve olgun *CalB* genini (pPIC9KaM-CalBM) taşıyan metanolle indüklenebilir ifade sisteminin en yüksek lipaz üretim kapasitesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Ek olarak, kodon optimize edilmiş geni taşıyan *Pichia* transformantlarının, *CalB* enziminin endüstriyel ölçekte üretimi için büyük bir potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

(Wahyuni et al., 2016), yabanıl tip *CalB* geninin katalitik etkinliğini ve termostabilitesini artırmak amacıyla üç amino asit dizisinde değişiklik yapmışlardır. Elde ettikleri *CalBsyn* sentetik geni, *E. coli* hücrelerine transfer ederek pGAPZ α -*CalBsyn* rekombinant plazmitini elde etmişlerdir. Daha sonra, lineer hâle getirilen rekombinant plazmiti elektroporasyon metodu ile *P. pastoris* SMD1168H hücrelerine göndermişlerdir. Oluşan transformantları zeosin içeren plakalarda taramışlardır. Doğrulanmış kolonilerin kullanılmasıyla lipaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Lipaz aktivitesini belirlemek için substrat olarak *p*-nitrofenil bütirat (*p*-NPB) kullanmışlardır. Üretilen rekombinant enzim için pozitif kontrol olarak *Candida rugosa* lipazı (CRL) kullanmışlardır ve en yüksek lipaz aktivitesini 48 saatlik

inkübasyon sonunda 6,35 EÜ/ml olarak belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra kültür süpernatantının kullanılmasıyla yapılan SDS-PAGE analizinde üretilen CalB proteininin moleküler ağırlığının yaklaşık 45 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

(Karaoğlu and Karaoğlu, 2022)'nın yaptıkları bir çalışmada, kodon optimize edilmiş *Geobacillus stearothermophilus* lipaz enzimini kodlayan genin kodon optimizasyonu yapılmış ve pPICZαA ekspresyon plazmitine yerleştirilmiştir. *P. pastoris* hücrelerine transfer edildikten sonra en yüksek lipaz üretimi yapan koloni belirlenmiştir. Seçilen koloni ile 72 saat boyunca üretim gerçekleştirilmiş ve elde edilen kültür sıvısı ile toplam protein, enzim aktivitesi ve SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant lipaz enzimi, Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE analizi yapılmış ve saflaştırma verimi hesaplanmıştır. En yüksek üretim gösteren koloninin 25,02 mg/l lipaz üretim seviyesine ulaştığı belirlenmiştir.

Protein disülfid izomeraz (Pdi) geni

Geçmişten günümüze kadar *K. phaffii*, ilaçların (Dou et al., 2013; C. Liu et al., 2022) ve heterolog proteinlerin (Xiang et al., 2021) üretimi için önemli bir konakçı olarak kullanılmıştır. *K. phaffii*'de protein salgılanması esas olarak Endoplazmik retikulum-Golgi yolu üzerinden gerçekleşir ve N-terminalindeki sinyal peptidine ihtiyaç duymaktadır. Örneğin, alfa sinyali pre-pro peptitlerini kullanarak çoğu protein, hücre dışı olarak ifade edilmektedir. Bununla birlikte, bu sistemdeki birçok protein, kalite kontrol sisteminin sınırlamaları nedeniyle hâlâ yüksek miktarda hücre dışı ifadeye ulaşamamaktadır (Werten et al., 2019). Eksojen proteinlerin ekspresyonunu iyileştirmek için hedef genlerin kopya sayısını artırmak, birçok durumda başarılı olmuştur ve bu, *K. phaffii*'de etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Sallada et al., 2019; Q. Shen et al., 2012, 2020). Bununla birlikte, daha iyi bir sonuç elde etmek için yüksek kopya sayısı ile genellikle moleküler şaperonların birlikte ifade edilmesi gerekmektedir. Çünkü aşırı yüksek bir gen dozajı, ekspresyonda bir durgunluğa yol açmaktadır ve hatta çoğu zaman zararlı olabilmektedir (Cámara et al., 2016; Cos et al., 2005).

Heterolog proteinlerin aşırı ifadesi, maya hücrelerinde kümelenmeye sebep olabilir ve salgı stresini artırabilir (J. Huang et al., 2020). Genellikle, ökaryotik sekresyon yolundaki hız sınırlayıcı adım, ER'de protein katlanmasıdır (Orman et al., 2009). Endoplazmik retikulum (ER)'da protein katlanmasıdır (Orman et al., 2009). ER'de büyük miktarlarda protein olduğunda, bunların çok azı uygun bir yapıya kavuşabilir ve sonunda katlanmamış protein tepkisine (UPR) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açacak olan katlanmamış proteinler hâline gelebilir (Hohenblum et al., 2004). Protein katlanmasına yardımcı olmak ve sekresyonu hızlandırmak için *Hac1*, *Bip* ve *Pdi* gibi aşağı akış genlerin aktive edilmesiyle ER stresi azaltılabilir (Hohenblum et al., 2004). ER'de yerleşik olan PDI ve endoplazmik retikulum

oksidoredüksiyon 1 (ERO1) proteinleri bu sürece doğrudan dâhil olmaktadır. PDI ve ERO1'in, yalnızca hedef genin yüksek kopya sayısına sahip olduğu durumlarda pozitif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Sallada et al., 2019). Tanımlanan ilk PDI oksidanı, evrimsel olarak en çok korunan ERO1'dir (Jha et al., 2021). ERO1, yanlış katlanmış proteinlerin toplanmasını önlemek için yeni üretilen proteinin hidrofobik yapısını tanımlamakta (Mayer et al., 2000) ve daha sonra disülfid bağlarının oluşumunu katalize eden PDI'yı oksitlemektedir (B. P. Tu et al., 2000).

Disülfid bağının oluşumu, proteinlerin normal biyolojik fonksiyonlarının yerine getirilmesinde ve doğal yapılarının korunmasında çok önemli bir role sahiptir. PDI'nın dâhil edilmesi, bildirilen ilk protein katlama katalizörü olan bu temel süreçte merkezi bir rol oynamaktadır. PDI, a, b, a' ve b' olmak üzere dört farklı alandan oluşmaktadır (Hatahet and Ruddock, 2009). Tüm PDI alanlarının, şaperon aktivitesi için hedef proteinin bağlanmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (Sun et al., 2000). Ek olarak, protein katlanması, hedef genin kopya sayısının artmasıyla birlikte önemli bir sınırlama faktörü olabilir. PDI, moleküler bir şaperon görevi gördüğünden, hücrelerdeki proteinlerin doğru katlanmasına katkıda bulunur ve çözünmeyen ifadelerini azaltır (Deng et al., 2020). PDI, sadece disülfid bağlarının redoks ve izomerizasyonunu katalize etmekle kalmaz, aynı zamanda proteinlerin katlanmasına katkıda bulunan ER'de yerleşik bir moleküler şaperon görevi görür. PDI'nın daha fazla disülfid bağına sahip proteinler ile birlikte ifade edilmesi, disülfid içermeyen proteinlerle birlikte ifade edilmesinden daha etkili olduğu görülmektedir (Kerr et al., 2021). Ek olarak, PDI'nın doğru glikozilasyonu, katalitik bölge yapısının oluşumunu desteklemektedir (Weiß et al., 2021).

(X. Li et al., 2016) yapmış oldukları bir çalışmada, bir *P. pastoris* sisteminde *C. rugosa* lipaz Lip1 (CRL1)'i aşırı ifade etmek için birleşik stratejiler kullanmıştır. *Lip1* geni optimize edilerek kodon adaptasyon indeksi (CAI) 0,55'ten 0,85'e yükseltilmiş ve sentetik olarak temin edilmiştir. Kodon optimize *Lip1* geninin üç kopyasını barındıran bir rekombinant suşun LIP1 aktivitesinin, çalkalamalı kültürde 1200 EÜ/ml'ye ulaştığı gözlenmiştir. Daha yüksek lipaz aktivitesi (1758 EÜ/ml), ERO1p ve BİP şaperonlarının bir kopyası *Lip1p* ile birlikte ifade edildiğinde gözlenmiştir. Böylece, *Lip1p*'nin tek başına ifade edilmesi veya yalnızca bir moleküler şaperonun birlikte ifade edilmesiyle elde edilenden önemli ölçüde daha yüksek olmuştur. Dolayısıyla bu çalışma, kodon optimizasyonunu moleküler şaperonların ortak ifadesi ile birleştirme stratejisinin endüstriyel ölçekte saf Lip1 üretimi için büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

(J. Huang et al., 2020), ER stresi olan veya olmayan farklı suşlarda PDI ve ERO1 dahil olmak üzere protein katlama şaperonlarının birlikte ifadesini araştırmıştır. PDI'nın aşırı ekspresyonunun, protein katlama stresini hafifleterek pRML (*Rhizomucor miehei* lipaz)

üretimini 705 EÜ/ml'den 1430 EÜ/ml'ye, protein konsantrasyonunu 0,56 mg/ml'den 0,65 mg/ml'ye ve spesifik enzim aktivitesini ise 1238 U/mg'den 2186 U/mg'ye yükselttiğini bildirmiştir.

Post-transformasyonel vektör amplifikasyonu (PTVA)

K. phaffii'nin protein üretimini iyileştirmek için, *in vitro* multimerizasyon, PVTa (post-transformasyonel vektör amplifikasyonu), ribozomal DNA (rDNA) lokusunu hedef alan entegrasyon ve kusurlu belirteçlerin kullanımı gibi farklı yaklaşımlar kullanılarak istenen genin kopya sayısını artırmaya odaklanan birçok çalışma yapılmıştır (Piva et al., 2017). *K. phaffii*'de eksojen genleri dâhil etmenin en yaygın yolu, rekombinant vektörler oluşturmaktır (Gao et al., 2021). Plazmitler, konakçıda bulunma şekline göre epizomal plazmitler ve bütünleştirici plazmitler olarak ikiye ayrılabilir. pPIC vektör serisi, *K. phaffii*'de yaygın olarak kullanılan bütünleştirici vektörlerdir (Gaffar et al., 2019; Khan et al., 2020; Papakonstantinou et al., 2009; Y. Wang et al., 2020), bu da çok kopyalı entegrasyon suşlarının yüksek konsantrasyonda antibiyotik varlığında taranmasını sağlar. Bu mekanizma, PTVA olarak bilinmektedir (Aw and Polizzi, 2016; D. Li et al., 2017; Marx et al., 2009; Sunga et al., 2008). Transformasyon sonrası amplifikasyon yoluyla tandem tekrarların oluşumuna ek olarak, çok kopyalı suşlar, rDNA dizileri gibi *K. phaffii* genomunun tekrarlayan dizilerine entegre edilerek oluşturulabilir (Yamada et al., 2019). 2008 yılında Sunga ve arkadaşları antibiyotik konsantrasyonunda kademeli bir artışa maruz kalmanın daha yüksek kopya sayısına sahip suşlarla sonuçlandığını kanıtlayan bir yöntem bildirmiştir (Sunga et al., 2008).

PTVA yöntemi, *K. phaffii*'de çok kopyalı klonların verimli bir şekilde üretilmesine olanak sağlamıştır. Bununla birlikte, göreceli kolaylığına ve başarısına rağmen, bu süreç pahalı ve zaman alıcı olabilir. Çoklu kopya klonların daha hızlı ve daha ucuz seçimine olanak sağlayan sıvı PTVA adı verilen yeni bir seçim yöntemi geliştirilmiştir (Aw and Polizzi, 2016). Ek olarak, sıvı PTVA küçük hacimlerde uygulanabildiğinden antibiyotik maliyeti önemli ölçüde azaltılmış olmaktadır. Şaşırtıcı bir şekilde, elde edilen sonuçlara göre, kullanılan PTVA yönteminden bağımsız olarak, ilk suşun başlangıç kopya sayısının, nihai ortalama kopya sayısını ve üretilen kopya sayısı aralığını etkilediği keşfedilmiştir (Aw and Polizzi, 2016). Aw ve diğerlerinin (2016) geliştirdikleri bu yöntemle geleneksel 45 gün yerine 12 günde ve yaklaşık yarı maliyetle elde edilebilen çok kopyalı klonlar oluşturmak mümkün hâle gelmektedir (Aw and Polizzi, 2016). Ayrıca sıvı PTVA'da zeosin gibi seçim belirteçlerinin kullanılması, rekombinant protein üretim süreçleri için faydalı olabilecek daha yüksek büyüme oranlarına sahip suşlarla sonuçlandığı bilinmektedir. Antibiyotik direnç genleri *Sh ble* ve *kan* (sırasıyla zeosin ve G418 direnci) tipik olarak mayalarda çoklu kopya klonlarını seçmek için

kullanılmaktadır. Bu belirteçlerin kullanımı zahmetli ve pahalı antibiyotik gerektirmesine rağmen, yabani tip maya suşlarında kullanılabilirler ve çok kopyalı suş elde etme imkânı sağlarlar.

Manyetik Nanopartiküller ile Mikrobiyal Hücrelerin Dekorasyonu

K. phaffii ekspresyon sistemi, proteinleri hem intraselüler (hücre içi) hem de ekstraselüler (hücre dışı) olarak üretebilme yeteneğine sahiptir. Proteinlerin ekstraselüler olarak üretilmesi, saflaştırma proseslerinde fazladan iş yükü, zaman ve maliyet gerektirmeden ürünlerin saf olarak elde edilmesine olanak tanımaktadır. *K. phaffii* ekspresyon sisteminde üretilen proteinlerin büyük çoğunluğu ekspresyon vektöründe yer alan alfa-faktör sinyal dizisi sayesinde kültür sıvısına bırakılsa da üretilen proteinin bir kısmı hücre içerisinde kalabilmektedir (Juturu and Wu, 2018; Unver et al., 2021). Bu nedenle, üretilen proteinin hücre dışına salınımını artırıcı teknikler kullanılması, hem kültür ortamından elde edilecek rekombinant protein verimi hem de üretilen proteinin saflaştırılması sırasında hücrelerin parçalanmasına ihtiyaç duyulmaması noktasında büyük avantaj sağlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda, mikro- veya nano-yapılar kullanılabilir.

Prokaryotik veya ökaryotik olsun her hücre, çevresindeki mikro- ve nano-yapılar ile etkileşim hâlinindedir ve genellikle bu iletişim hücrelerin canlılık performanslarını olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak, bazı durumlarda hücrelerde istenilen birtakım özelliklerin iyileştirilmesi veya hücreye ek özelliklerin kazandırılması açısından mikro- ve nano-yapılardan faydalanılabilir. Örneğin mikrobiyal organizmalar, biyoremediasyonda kullanılmaktadır (Khatoon and Rai, 2018). Ancak, bu uygulamada serbest hücreler kullanıldığında düşük biyobozunma hızı, sınırlı hücre ayrımı ve substrat inhibisyonu gibi bazı sınırlamalarla karşılaşmaktadır. *K. phaffii* hücrelerinin performansını artırmaya yönelik çalışmalar yapılmakta olup hücre immobilizasyonu da bu çabalardan biridir (Taghizadeh, Ebrahiminezhad, et al., 2020; Taghizadeh et al., 2021, 2022). Hücre immobilizasyonu, işlemin yoğunlaştırılması ve sonraki işlem maliyetlerinin düşürülmesine yönelik etkili bir teknik olarak kabul edilmiştir. Tuzaklama, yüzeye bağlanma (adsorpsiyon), kapsülleme, muhafaza ve toplama gibi hücre immobilizasyonu için çeşitli teknikler bulunmaktadır. Ancak, bu konuda en yaygın yaklaşım tuzaklamadır ve kalsiyum aljinat gibi polimerik boncuklarda hücre immobilizasyonu için çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (Igbiosa et al., 2016; Kamel, 2020).

Son zamanlarda manyetik immobilizasyon, önceki yöntemlerin teknik zorluklarını ve dezavantajlarını aşmak için bir hücre immobilizasyonu tekniği olarak tanıtılmıştır. Bu teknikte hücreler, elektrostatik, hidrofobik ve van der Waals kuvvetleri gibi spesifik olmayan etkileşimler yoluyla manyetik nanopartiküller ile immobilize edilmiştir. Manyetik

nanopartiküllerle immobilizasyon, hücreleri manyetik açıdan duyarlı hâle getirdiği için hücreler, harici bir manyetik alanla manipüle edilebilmektedir (Zielińska et al., 2009). Şimdiye kadar, bakteriler (örn. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ve *Psychrobacter* sp.), mikroalgler ve ayrıca maya hücreleri (*S. cerevisiae* ve *K. phaffii*) gibi çeşitli mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu için manyetik immobilizasyon tekniği kullanılmıştır (Dagci, Acar, et al., 2024; Dagci, Solak, et al., 2024; Hou et al., 2021; Nadi et al., 2019; Raee, Ebrahiminezhad, Gholami, et al., 2018; Raee, Ebrahiminezhad, Ghoshoon, et al., 2018; Taghizadeh, Berenjian, et al., 2020; Y. Wang et al., 2022; Zielińska et al., 2009). Manyetik nanopartiküllerine ek olarak, mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu için diğer nanopartiküllerin kullanılmasına yönelik bazı çalışmalar da bulunmaktadır (Ba et al., 2010; Chatraei and Emtiazi, 2019; Khatoon and Rai, 2018; Yuan et al., 2009). Ayrıca nanopartiküllerin, nematodların immobilizasyonu için de kullanıldığı bilinmektedir (E. Kim et al., 2013).

Manyetik nanopartiküller ile mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunun, metabolik bileşiklerin sitoplazmik membran yoluyla transferini de artırabilmesi oldukça ilginçtir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, manyetik nanopartiküllerin mikrobiyal hücrelerle etkileşiminin sitoplazmik zarın geçirgenliğini artıracak ve hücreleri daha yüksek bir metabolik duruma getireceğini göstermiştir (Ansari et al., 2009). Demir oksit manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4 MNP), parçalayıcı enzimlerin indüksiyonunu, enzimlerin aktivitesini ve hücre membran geçirgenliğini artırma gibi avantajlarından dolayı immobilizasyon için destek olarak kullanılmaktadır (Brady et al., 1997; Taghizadeh, Ebrahiminezhad, et al., 2020; Taghizadeh et al., 2021). Immobilizasyon işlemi için MNP'lerin kullanılması, aynı zamanda fermentasyon ortamındaki immobilize hücrelerin bir mıknatıs ile kolay bir şekilde geri kazanılmasına ve MNP'lerin hücre membran geçirgenliğini artırması sayesinde ekstraselüler rekombinant proteinlerin kültür ortamına salımının artırılmasına olanak tanımaktadır (Ansari et al., 2009; Brady et al., 1997; Dagci, Solak, et al., 2024; Taghizadeh et al., 2021).

Manyetik immobilizasyonun mikrobiyal hücrelerin üretkenliği üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur aksine, bazı durumlarda immobilize hücrelerin serbest hücrelerden daha fazla çoğaldığı bulunmuştur (Raee, Ebrahiminezhad, Gholami, et al., 2018). Viral enfeksiyonların tüm fermentasyon sürecini durdurabileceği ve bir koruma seçeneğinin çok değerli olabileceği açıktır. Manyetik immobilizasyonun mikrobiyal hücreleri viral enfeksiyonlardan koruyabileceği bildirilmiştir (Kim et al., 2011). Manyetik immobilizasyonda mikrobiyal hücrelerin yüzeyi manyetik nanopartiküller ile dekore edilmektedir. Oluşan bu dekorasyon şekli, viral partiküllerin hücrelere erişimini sınırlamak için fiziksel bir bariyer görevi görebilir.

Öte yandan nanopartiküller, hücre yüzeyindeki viral reseptörleri bloke edebilir ve hücrelerin viral enfeksiyonlara karşı hassasiyetini de azaltabilir (Taghizadeh et al. 2020). Ayrıca, demir bazlı nanopartiküllerden salınan demir iyonlarının antiviral aktivite sağladığına dair bazı kanıtlar da bulunmaktadır (Kim et al., 2011).

(Taghizadeh et al., 2021) ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, manyetik immobilizasyonun rekombinant proteinin yapısı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla model olarak insan serum albümini (HSA) ifade eden *P. pastoris* hücrelerini kullanmışlardır. Hücreler, çeşitli konsantrasyonlarda APTES kaplı manyetit nanopartikülleri ile immobilize edilmiştir. HSA üretimi 5 günlük indüksiyonda yapılmış ve ürünün yapısı UV-vis, floresans ve ATR-FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. HSA'nın ikincil yapısını analiz etmek için ikinci türev dekonvolüsyon yöntemi kullanılmıştır. 0,5 ve 1 mg/ml konsantrasyonda nanopartiküller ile immobilize edilen *P. pastoris* hücrelerinde sağlam yapıda HSA üretilmiş, ancak 2 mg/ml konsantrasyonda nanopartiküller ile immobilizasyon sonucunda üretilen HSA'nın ikincil yapılarında (yani, α -sarmallar ve β -dönüşler) bazı değişiklikler gözlenmiştir. Bu verilere dayanarak, *P. pastoris* hücrelerinin 0,5 veya 1 mg/ml nanopartiküllerle immobilizasyonun, hücre hasadı için tamamen etkili olduğu ve rekombinant ürünün yapısı üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir. Elde edilen bulgular, mikrobiyal hücrelerin yüksek konsantrasyonlarda nanopartiküller ile immobilize edilmesinin salgı proteinlerinin yapısı üzerinde bazı etkileri olduğunu ortaya koymuştur.

(Taghizadeh et al., 2022) ve arkadaşlarının diğer bir çalışmasında ise, rekombinant HSA üreten *P. pastoris* hücreleri, 3-aminopropiltrioksasilan kaplı manyetit nanopartiküller (APTES@Fe₃O₄) ile immobilize edilmiştir. Immobilizasyon yönteminin gücü ve immobilize hücrelerin tekrar tekrar kullanım etkinliği, birbirini izleyen üç parti fermantasyon döngüsü üzerinde değerlendirilmiştir. İlginç bir şekilde, manyetik immobilizasyonun, HSA üretiminde 1,4 kat artışa ve verimliliğin 0,7 mg/ml'den 1 mg/ml'ye çıkarılmasına neden olduğunu gözlemişlerdir. Ancak, her üretim döngüsünden sonra, serbest ve immobilize hücrelerde verimlilikte önemli (iki kattan fazla) bir azalma kaydedilmiş ve ardışık üretim döngüleri boyunca, manyetik immobilizasyon etkinliğinde de azalma olmuştur. Üç üretim döngüsünden sonra, manyetik kuvvete duyarsız hücrelerin ortaya çıkması nedeniyle immobilizasyon verimliliği %80'den %64'e düşmüştür. Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) analizleri sonucunda, manyetik kuvvete duyarsız hücrelerin nanopartikül içermeyen hücreler olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bu serbest hücrelerin hücre çoğalmasından ve nanopartiküllerin hücre yüzeyinden ayrılmasından kaynaklanabileceği ve bu

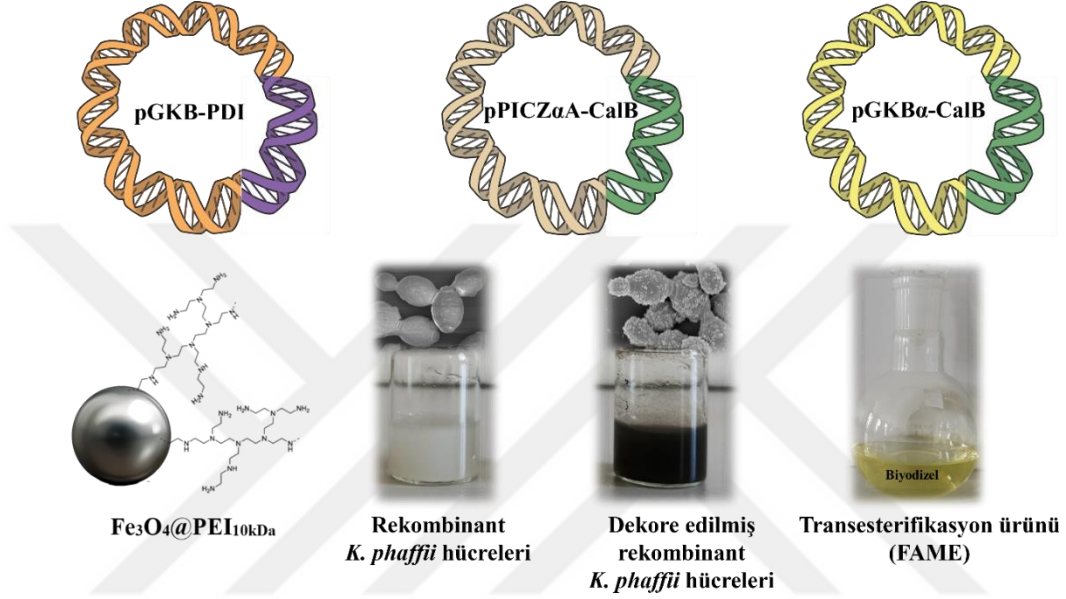
sebeple de ardışık üretim döngüleri boyunca maya hücrelerini toplamak için etkili bir immobilizasyon tekniğinin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Yine (Tagizadeh et al., 2022)'nin yapmış oldukları diğer bir çalışmada, manyetik immobilizasyonun, rekombinant *P. pastoris*'in büyümesi ve metabolik durumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Koloni oluşturan birim, OD₆₀₀ ve tripan mavisi testine dayalı elde etmiş oldukları sonuçlar, manyetik immobilizasyonun *P. pastoris* hücrelerinin büyümesi ve canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Ayrıca, 0.5–2 mg/ml nanopartiküller ile immobilize edilmiş hücrelerde metabolik aktivitede yaklaşık %20–40 artış kaydedilmiştir. Hücrelerin toplam protein ve karbonhidratları da hücre fonksiyonunun ana göstergeleri olarak ölçülmüş ve immobilize edilen hücrelerde önemli bir değişiklik gözlenmediği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, manyetik immobilizasyonun indüklenmiş rekombinant maya hücreleri üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı, buna karşın ilginç bir şekilde manyetik immobilizasyonun hücrelerin metabolik aktivitesini artırabileceği ifade edilmiştir (Dagci, Acar, et al., 2024; Dagci, Solak, et al., 2024).

MATERYAL VE METOT

Protokol Tasarımı ve Materyal Seçimi

Bu başlık altında, tez çalışmasında kullanılan ana materyallerin neden seçildiği ve nihai olarak elde edilen ürünler hakkında genel bilgi verildi (Şekil 12).

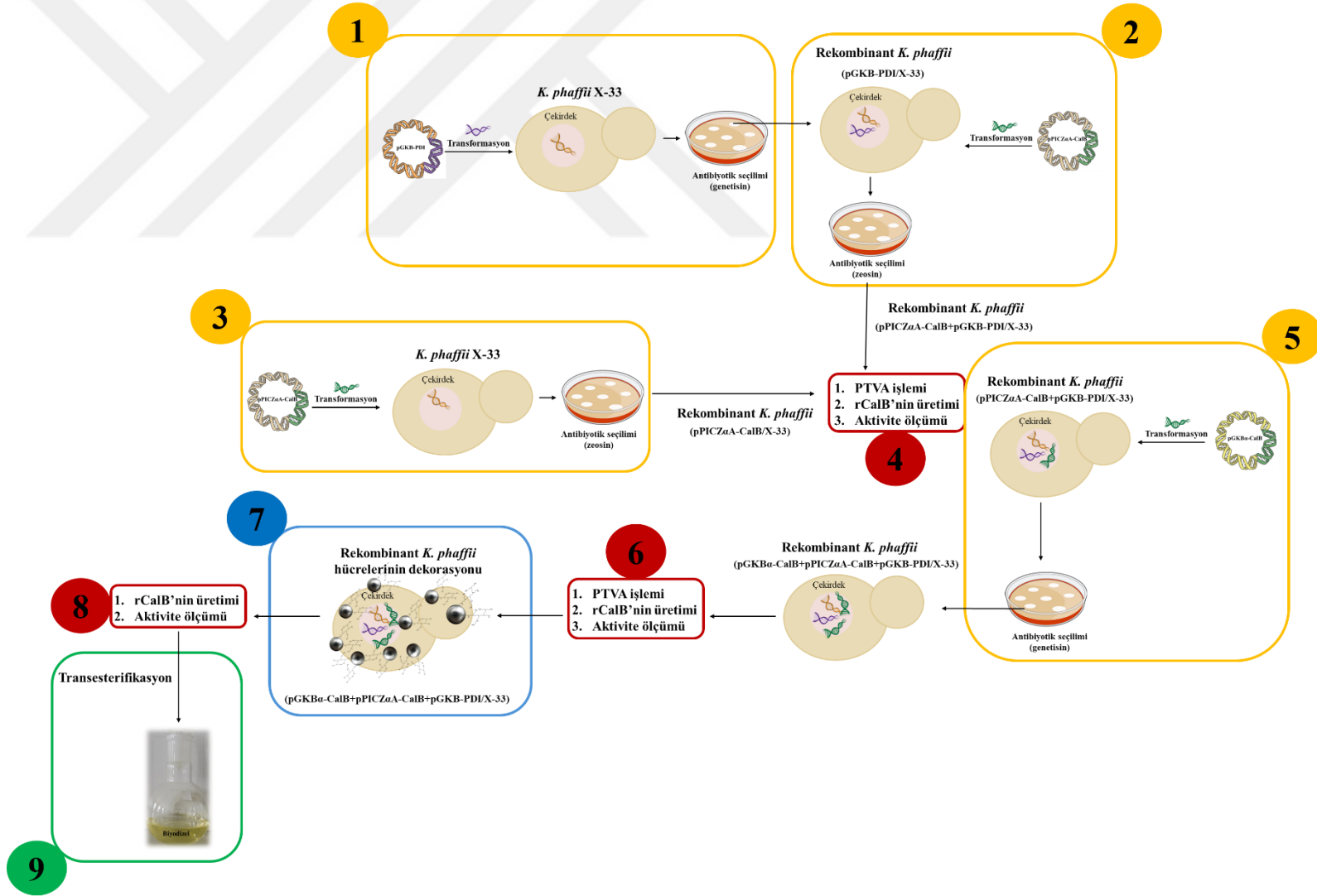


Şekil 12. Tez çalışmasında kullanılan ve elde edilen bileşenlerin sembolik gösterimleri

Bu tez çalışması 5 aşama olarak planlandı ve her bir basamak aşağıdaki yöntemler takip edilerek tamamlandı.

1. Sentetik kodon optimize *C. antarctica* lipaz B (*CalB*) ve *K. phaffii* genomundan elde edilen *Pdi* geninin *E. coli* hücrelerinde klonlanması, koloni PCR ile doğru bakteri transformantlarının seçimi ve saflaştırılan plazmitlerin dizi analizi ile kontrolü.
2. Elde edilen rekombinant plazmitlerin maya hücrelerine (ekspresyon konağı) transferi, PTVa analizi ve rekombinant maya hücreleri tarafından *CalB* enziminin kültür ortamına salgılanması.
3. Hücre yüzeyini kolayca dekore edebilecek boyutlarda (<100 nm) $Fe_3O_4@PEI_{10kDa}$ MNP'lerin sentezlenmesi.
4. Rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin MNP'ler ile dekorasyonu (immobilizasyonu) ve dekore edilen (immobilize) hücreler tarafından salgılanan r*CalB*'nin aktivite tayini.
5. r*CalB* enziminin transesterifikasyon aktivitesi ile biyodizel üretimi.

Tez çalışması hedeflerinin şematik gösterimi Şekil 13'te verildi.



Şekil 13. Tez çalışması hedeflerinin şematik gösterimi

*(1, 2, 3 ve 5 sırasıyla; pGKB-PDI/X-33, pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33, pPICZ α A-CalB/X-33 ve pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 rekombinant hücrelerin elde edilmesi ve antibiyotik içeren ortamda seçilimini, 4, 6 ve 8 elde edilen hücreler tarafından rCalB'nin üretilmesi ve aktivite analizlerini, 7 en yüksek lipaz üretimine sahip hücrelerin (pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33) Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'ler ile dekorasyonunu ve 9 dekore edilen hücreler tarafından üretilen rCalB kullanılarak biyodizel üretimini göstermektedir.)

Enzimatik transesterifikasyon yöntemiyle ticari ve atık yağlardan biyodizel üretimini gerçekleştirmek için katalizör olarak CalB enzimi seçildi. CalB, biyokataliz reaksiyonlarında en yaygın kullanılan lipazlardan biridir (Anderson et al., 1998; Gotor-Fernandez et al., 2006) ve birçok konakçıda başarılı bir şekilde ifade edilmiştir (Budisa et al., 2010; Høegh et al., 1995; Jung and Park, 2008; Larsen et al., 2008; Tamalampudi et al., 2007). Çeşitli substratlara karşı seçiciliği (Anderson et al., 1998), yüksek katalitik aktivitesi (Kirk and Christensen, 2002) ve termal kararlılığı (N. Zhang et al., 2003) bu enzimi ticari olarak önemli hâle getirmiştir. Bunun yanı sıra, transesterifikasyon reaksiyonlarında substrat olarak ikincil alkoller kullanıldığında özgülülüğü ve yüksek katalitik etkinliği sayesinde endüstriyel alanda önemli yere sahiptir (Wu et al., 2013).

Bir enzimin, daha düşük maliyetle ve daha yüksek miktarda üretimini gerçekleştirmek için çeşitli ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada *K. phaffii* ekspresyon sistemi, yüksek miktarda protein üretimi yapabilmesi, proteini hücre dışına salgılayabilme yeteneğinin olması ve hedef proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarını doğru yapabilmesi gibi özelliklerinden dolayı tercih edildi. Ayrıca, *K. phaffii* hücreleri kullanılarak CalB'nin üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır (Budisa et al., 2010; Larsen et al., 2008, 2008; Xiao et al., 2023).

Heterolog gen ekspresyonu, kodon kullanım sıklığından önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu sebeple, rCalB enziminin üretiminde verimi artırmak için *C. antarctica*'nın orijinal nükleotid dizileri, *K. phaffii*'nin kodon kullanım eğilimine göre yeniden düzenlenerek kodon optimizasyonu yapıldı.

rCalB ifadesini güçlendirmek için kodon optimizasyonunun yanı sıra, *CalB* geni hem yapısal (*P_{GAP}*) hem de indüklenebilir (*P_{AOX}*) bir promotörün ardına yerleştirilerek *K. phaffii* hücrelerine transfer edildi.

Heterolog proteinin aşırı ifadesinin, maya hücrelerinde kümelenmeye sebep olabileceği ve salgı stresini artırabileceği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (J. Huang et al., 2020). Bu sebeple, bu tez çalışmasında elde edilen rekombinant hücreler tarafından yüksek miktarda üretilmesi hedeflenen rCalB enziminin hücreSEL ER stresinden etkilenmeden doğru bir şekilde katlanmasına destek olmak için *K. phaffii* hücrelerinde doğal olarak üretilen PDI (protein disülfid izomeras) enzim miktarını artırmak amaçlandı. Bu amaçla, hücre içinde (intraseLLüler)

Üretilcek Şekilde *Pdi* geni yapısal promotör (P_{GAP}) arkasına yerleştirilerek *K. phaffii* hücrelerine transfer edildi.

Elde edilen bu ekspresyon sisteminde rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin protein üretimini iyileştirmek için, PVTA diye bilinen bir yaklaşımla CalB enzim miktarını artırmak amaçlandı. Zaman ve maliyet olarak daha uygun olması açısından katı PTVA yerine sıvı PTVA yöntemi tercih edildi (Aw and Polizzi, 2016).

MNP'ler ile mikrobiyal hücrelerin dekorasyonunun sitoplazmik zarın geçirgenliğini artırdığı ve dolayısıyla ekstraselüler rekombinant proteinlerin kültür ortamına salımının artırılmasına olanak sağladığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Ansari et al., 2009; Brady et al., 1997; Dagci, Acar, et al., 2024; Dagci, Solak, et al., 2024; Taghizadeh et al., 2021). Bu bilgiler doğrultusunda, ekstraselüler olarak üretimi hedeflenen rCalB enziminin hücre dışına salınımını artırmak amacıyla $Fe_3O_4@PEI_{10kDa}$ manyetik nanopartikülleri sentezlendi ve rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin dekorasyonunda kullanıldı.

Son olarak, dekore edilmiş hücreler tarafından üretilen rCalB enziminin transesterifikasyon yeteneğiyle biyodizel üretimi amaçlandı. Öncelikle ticari ayıek yağı kullanılarak optimum reaksiyon şartları belirlendi. Ardından nceki çalışmalarda bildirildiği gibi (Altınok et al., 2023), bu tez çalışmasında da lipaz katalizli reaksiyonu başlatmak için substrat olarak atık kızartma (ayıek) yağı kullanıldı.

Biyodizelin yüksek üretim maliyeti, ticarileştirilmesinin önünde önemli bir engel teşkil etmektedir. Biyodizel retiminde kullanılan hammaddelerin maliyeti de bu maliyeti belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, farklı hammaddelerden üretilen biyodizelin kullanımını teşvik etmek için genellikle üretim maliyetinin yüksek bir oranını oluşturan hammadde maliyetini en aza indirmek esastır. Bu nedenlerden dolayı, son zamanlarda biyodizel hammaddesinin maliyetini en aza indirmek için atık yemeklik yağlar, atık hayvansal yağlar, sabun kalıntıları, sarı ve kahverengi gresler biyodizel üretimi için hammadde olarak tercih edilmektedir (Canakci and Sanli, 2008; rs et al., 2021; şanlı, 2019). Mevcut yönetmeliklere göre, atık yağların bazı olumsuz etkileri (insan sağlığı üzerindeki etkiler, su kirliliği, hava kirliliği, kanalizasyon hatlarının tıkanması vb.) nedeniyle atık yağ bertarafı için onaylı tek yöntem biyodizele dönüştürülmesidir (şahin et al., 2024). Bu bağlamda, biyodizel üretiminde atık yağların tercih edilmesi sadece yakıt maliyetlerini düşürmekle kalmayacak, aynı zamanda olası olumsuz çevresel etkilerin azaltılmasına da katkı sağlayacaktır (şahin et al., 2024).

Tasarlanan Primerler ve Restriksiyon Enzimleri

Kodon optimizasyonu yapılan *CalB* genini ve *Komagataella phaffii* genomunda bulunan *Pdi* genini amplifiye etmek için dizayn edilen primerlere ait bilgiler Tablo 2’de verildi (T_m Calculator programı; www.thermofisher.com). Çalışmada kullanılan plazmit DNA’lara ait primerler ise Tablo 3’te verildi.

Tablo 2. *CalB* ve *Pdi* Geninin Amplifikasyonu İçin Dizayn Edilen Primerler

Primer Adı	Dizisi (5’-3’)	T_m (°C)		%GC	Uzunluk (bp)
		Dream Taq DNA polimeraz	Phusion HF DNA polimeraz		
EcoRI-CalB-Forward	GCGGAATTCATGAAGTTGTTGTCTTTG	61,7	64,0	40,74	27
XbaI-CalB-Reverse	ATCTCTAGA AGGAGTAACTATAACCAGA	61,9	64,4	44,44	27
Bsp119I-PDI-Forward	GCGTTCGAAATGCAATTCAACTGGGATA	63,9	63,6	42,86	28
EcoRI-PDI-Reverse	TAGAATTCTTAAAGCTCGTCGTGAGCGT	63,3	64,6	42,86	28

*Altı çizili kısımlar, restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini göstermektedir.

Tablo 3. Plazmit DNA’lara Ait Primerler

Primer Adı	Dizisi (5’-3’)	T_m (°C)	%GC	Uzunluk (bp)	Plazmitler
pGAP Forward	GTCCTATTTCATCAATTGAA	47,0	32,0	22	pGKB/pGKB α
3’AOX1 Reverse	GCAAATGGCATTCTGACATCC	59,0	47,6	21	pGKB/pGKB α /pPICZ α A
5’AOX1 Forward	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	59,0	47,6	21	pPICZ α A

Kodon optimize *CalB* ve *Pdi* gen dizilimlerine dayanarak www.restrictionmapper.org adresinden belirlenen restriksiyon enzimlerinin tanıma dizisi ve kullanım amacı Tablo 4’te verildi.

Tablo 4. Restriksiyon Enzimlerinin Tanıma Dizisi ve Kullanım Amacı

Enzim ismi	Hedef bölgesi	Kullanılma Amacı
<i>EcoRI</i>	5'-G ^A AATTC-3'	Ligasyon işlemi öncesinde ilgili genleri (PCR ürünü; <i>CalB</i> ve <i>Pdi</i>) ve plazmit DNA'ları (pGKB α ve pGKB) keserek yapışkan uç oluşturmada kullanıldı.
<i>XbaI</i>	5'-T ^A CTAGA -3'	Ligasyon işlemi öncesinde ilgili geni (PCR ürünü; <i>CalB</i>) ve plazmit DNA (pGKB α)'yı keserek yapışkan uç oluşturmada kullanıldı.
<i>BstBI (Bsp119I)</i>	5'-TT ^A CGAA-3'	Ligasyon işlemi öncesinde ilgili geni (PCR ürünü; <i>Pdi</i>) ve plazmit DNA (pGKB)'yı keserek yapışkan uç oluşturmada kullanıldı.
<i>AvrII (XmaII)</i>	5'-C ^A CTAGG-3'	Elde edilen rekombinant plazmiti (pGKB-PDI) maya hücrelerine transfer etmek için GAP promotör bölgesinden lineer hâle getirmede kullanıldı.
<i>PmeI (MssI)</i>	5'-GTTT ^A AAAC-3'	Elde edilen rekombinant plazmiti (pPICZ α A-CalB) maya hücrelerine transfer etmek için AOX promotör bölgesinden lineer hâle getirmede kullanıldı.
<i>BsiWI-HF</i>	5'-C ^A GTACG-3'	Elde edilen rekombinant plazmiti (pGKB α -CalB) maya hücrelerine transfer etmek için AOX <i>TT</i> bölgesinden lineer hâle getirmede kullanıldı.

*Kesim enzimlerinin hepsi hızlı kesim (FastDigest) özelliğindedir.

Plazmitler

Tez çalışmasında kalıp olarak kullanılan (A, B ve C) ve klonlama sonrası elde edilen plazmitler (D, E ve F) Şekil 14'te verildi. Yapısal GAP promotör bölgesini içeren pGKB önceki çalışmalarımızda kullanılmak üzere Addgene'den (USA, <https://www.addgene.org/85077/>) temin edildi (Yildiz et al., 2021) ve bu tez çalışmasında *Pdi* genini klonlamak ve maya genomuna transfer etmek için kullanıldı. Klonlama işlemleri sonucunda pGKB-PDI elde edildi. Diğer yandan, kodon optimize edilen *CalB* geni metanol ile indüklenebilen güçlü bir AOX promotörünü içeren pPICZ α A içerisine yerleştirilmiş halde pPICZ α A-CalB olarak GenScript firmasından satın alındı. Rekombinant proteinlerin hücre dışı (ekstrasellüler) üretimi için *S. cerevisiae* α -eşleşme faktörü (α -MF) sinyal dizisinin pGKB'ye yerleştirilmesiyle elde edilen pGKB α laboratuvarımızda mevcuttur (Acar and Unver, 2022). pPICZ α A-CalB'de yer alan kodon optimize *CalB* geni, bu tez çalışmasında pGKB α 'ya yerleştirilerek pGKB α -CalB elde edildi. Çalışmada kullanılan rekombinant plazmit haritaları SnapGene® yazılımı (www.snapgene.com) ile çizilerek görselleştirildi (Şekil 14).

Kullanılan Mikroorganizmalar, Besiyerleri, Kitler, Kimyasallar, Tampon ve Çözeltiler

K. phaffii X-33 suşu, *E. coli* One Shot® TOP10 suşu, Zeocin™, protein ve DNA belirteci (markır) ve restriksiyon endonükleaz enzimleri ThermoFisher Scientific™ firmasından satın alındı. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, DreamTaq DNA Polymerase ve GeneJet Plasmid Miniprep Kit'i Thermo Scientific™ firmasından, Geneticin (G418) Sülfat, ChemCruz firmasından, MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit'i Intron, Genomic DNA Isolation Kit'i ise HibiGen firmasından satın alındı.

Transformasyondan sonra *E. coli* hücreleri LS-LB (Low-Salt Luria Bertani; pH 7,5; %1 tripton, %0,5 maya özütü ve %0,5 NaCl) plakalarında kültüre edildi. Pozitif bakteri transformantların seçilimi için 25 µg/ml zeosin veya 50 µg/ml kanamisin içeren LS-LB plakaları kullanıldı. *K. phaffii* hücreleri YPD (%2 pepton, %1 maya ekstraktı ve %2 glikoz) besiyerinde kültüre edildi. Pozitif maya transformantların seçilimi için 100 µg/ml zeocin veya 200 µg/ml genetisin içeren YPD (%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %2 glikoz ve %2 agar) plakaları kullanıldı. EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (ThermoFisher Scientific™)'inde önerilen protokollere göre hazırlanan BMGY (buffered glycerol complex medium- tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri; %1 maya ekstraktı, %2 pepton, %1 KH₂PO₄ tamponu (pH: 6; 100 mM), %1,34 YNB, 25 µl 500X B (%0,02 Biotin) ve %1 gliserol) ve BMMY (buffered methanol complex medium- tamponlanmış karmaşık metanol besiyeri; %1 maya ekstraktı, %2 pepton, %1 KH₂PO₄ tamponu (100 mM; pH: 6), %1,34 YNB, %1 sorbitol, 50 µl 500X B (%0,02 Biotin), ve %1 kazaminoasit) besiyerleri ekspresyon çalışmaları için kullanıldı. Enzim aktivite tayini için tribütirin agar plakası (%1 tribütirin içeren) ve p-nitrofenil palmitat (p-NPP) içeren substrat solüsyonu kullanıldı. Demir(II) klorür tetrahidrat (FeCl₂.4H₂O), demir(III) klorür heksahidrat (FeCl₃.6H₂O) ve amonyak çözeltisi (%25-30, NH₄OH) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Polietilenimin (PEI, dallı, 10 kDa, Polyscience), MNP'lerin yüzey modifikasyonu için kullanıldı. Rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin MNP'lerle dekorasyonu için %0,9 NaCl içeren fizyolojik su kullanıldı.

Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler Tablo 5’te verildi.

Tablo 5. Kullanılan Cihazlara Ait Bilgiler

Cihaz Adı	Marka/Model
Mikrobiyoloji biyogüvenlik kabini	ESCO, Laminar flow cab.
Isıtmalı, çalkalamalı inkübatör	JSR, JSSI300C
İnkübatör	Memmert
Çeker ocak	Tolkim
Elektroforez Güç Kaynağı	Bio Rad
Elektroforez yürütme tankı	Bio-rad, WideMini-Sub Cell GT
Mikroplaka Okuyucu	Biotek-EPOCH
Santrifüj	Mini-G (IKA)
Santrifüj	Hettich Rotofix 32A
UV-görünür spektrofotometre	Shimadzu, UV-1800 240V
UV görüntüleme cihazı	BIO-RAD Gel Doc™ XR ⁺
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
PCR cihazı	Proflex-Applied Biosystems

Rekombinant DNA’ların Elde Edilmesi

pGKB-PDI’nın elde edilmesi

Genomik DNA izolasyonu ve Pdi geninin amplifikasyonu

Yapısal GAP promotörünü içeren pGKB’ye yerleştirilecek olan *Pdi* geni (EMBL AJ302014), *Bst*BI (*Bsp*119I) ve *Eco*RI restriksiyon enzim tanıma dizilerini (Tablo 4) içerecek şekilde tasarlanan primerler (Tablo 2) kullanılarak *K. phaffii*’nin genomik DNA’sından amplifiye edildi (J. Huang et al., 2020; Inan et al., 2006; Q. Shen et al., 2012). Amplifikasyon sırasında hata yapma oranı Taq DNA polimerazdan 50 kat, Pfu DNA polimerazdan 6 kat daha düşük olduğu bildirilen Phusion High-Fidelity DNA Polymerase kullanıldı (Warsame et al., 2001). *Pdi* geni, Tablo 2’de verilen primerler kullanılarak optimum şartlarda PCR ile çoğaltıldı (Yıldız, 2020). Bu amaçla öncelikle, *K. phaffii* hücreleri YPD sıvı besiyerinde büyütüldü ve ardından genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Saflaştırılan genomik DNA’lar kullanılarak PCR amplifikasyonu için optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi. En uygun şartlar belirlendikten sonra *Pdi* gen bölgesi, Tablo 2’deki gibi dizayn edilen primerler ile Tablo 6 ve Tablo 7’deki uygun PCR protokolü kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra, *Bst*BI (*Bsp*119I) ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve genin insört edileceği vektör de (pGKB) aynı enzimlerle kesildikten sonra ligasyon işlemi yapıldı. Elde edilen rekombinant vektör pGKB-PDI olarak adlandırıldı.

Daha önceden YPD sıvı besiyerinde büyütüldükten sonra %15 gliserol içeren ortamda karıştırılarak -80 °C’de saklanan hücreler çözündürüldü ve YPD katı plakasına ekim yapılarak 48 saat boyunca 30 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, büyüyen hücreler toplanarak YPD sıvı besiyerine (10 ml) inoküle edildi ve ardından, 30 °C’de 150 rpm’de gece boyunca inkübe edildi. Ardından, toplanan maya hücrelerinden “Genomik DNA İzolasyon Kiti” kullanılarak genomik DNA izolasyonu işlemi üretici firma protokolüne göre gerçekleştirildi. Genomik DNA izolasyonu kısaca şu şekilde gerçekleştirildi; OD₆₀₀ değeri 1,5-2,0 ulaşan maya kültürü 1200 g’de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp, elde edilen pelet üzerine doğrudan 2 ml hacimde steril distile su eklendi. Hazırlanan örnek üzerine 600 µl ML Tamponu 2 µl enhancer, 20 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ve 10 µl RNaz A (10 mg/ml) eklendi. Örnekler, en az 15 saniye vortekslenildi ve ardından 60 °C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince 2-3 dakikada bir yavaşça birkaç kez alt üst edildi. Örneklerin üzerine 220 µl MB Tamponu eklendi ve yavaşça 10-15 kez alt üst edildi. Karışım üzerine 220 µl önceden soğutulmuş etanol (%100-96) eklendi. Hazırlanan karışımın 750 µl’si alınıp kolona aktarıldı ve 10900 g’de 3 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Toplama tüpüne süzülen sıvı atıldıktan sonra kolona 500 µl MY Tamponu eklendi ve 10900 g’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi (2 kere). Filtreli tüpün membranının tamamen kuruması için hiçbir sıvı eklenmeden 10900 g’de 3 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü süzülen sıvıyla birlikte atıldı. Ardından, filtreli tüp temiz 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve membran üzerine 50-100 µl ME Tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi ve ardından 10900 g’de 2 dk santrifüj edildi. Elde edilen genomik DNA’lar nanodrop spektrofotometrede ölçüldü ve konsantrasyonları belirlendi. Ardından, kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklandı (Yıldız, 2020).

Tablo 6. *Pdi* Geninin Amplifikasyonu İçin PCR Karışımı

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µl)
DNA (gDNA)	0,5 (45 ng)
dNTP mix (10 mM)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,5
F primer (10 pmol/µl)	1
R primer (10 pmol/µl)	1
5X Phusion HF tamponu	5
Nükleaz içermeyen su	10
Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polimeraz	0,5
Toplam hacim	20

Tablo 7. *Pdi* Geninin Amplifikasyonu İçin PCR Şartları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
98	30 sn	1
98	10 sn	
64	30 sn	35
72	1 dk	
72	5 dk	1
4	∞	1

pGKBα-CalB'nin elde edilmesi

CalB geninin kodon optimizasyonu ve amplifikasyonu

C. antarctica LF 058 suşuna ait *CalB* geninin kodonları *K. phaffii*'ye göre optimize edildi (C. G. Park et al., 2009; J. K. Yang et al., 2013). *K. phaffii* hücrelerine gönderilecek *CalB* geninin translasyon verimliliğini artırmak için NCBI'dan (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) *C. antarctica* lipase B genine ait dizi (GenBank: Z30645; P41365) alındıktan sonra "Codon optimization tool" (<https://eu.idtdna.com/codonopt>) aracı kullanılarak *K. phaffii*'nin kodon kullanım eğilimi incelendi. Optimizasyon öncesi ve sonrası kodon adaptasyon indekslerini (CAI) belirlemek için GenScript Rare Codon Analysis Tool (GenScript, Piscataway, NJ, ABD) adlı yazılım kullanıldı. Yalnızca S, L, V, G ve A (serin, lösin, valin, glisin ve alanin) amino asitlerini kodlayan düşük frekansa sahip kodonlar, *K. phaffii*'nin kodon kullanma sıklığına göre daha yüksek frekansa sahip kodonlarla yer değiştirildi. Kodon optimize *CalB* dizisi, pPICZαA'ya yerleştirilmiş olarak (pPICZαA-CalB) temin edildi.

pPICZαA-CalB içerisinde bulunan kodon optimize *CalB* geni, spesifik olarak dizayn edilen primerler (Tablo 2) ile Tablo 8 ve Tablo 9'daki uygun PCR protokolü kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra, *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve genin insört edileceği plazmit de (pGKBα) aynı enzimlerle kesildikten sonra ligasyon işlemi yapıldı. Bakteri transformasyonu sonrası elde edilen rekombinant plazmit, pGKBα-CalB olarak adlandırıldı.

Tablo 8. *CalB* Geninin Amplifikasyonu İçin PCR Karışımı

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (μl)
Plazmit DNA (pPICZαA-CalB)	2,5 (5 ng)
dNTP mix (10 mM)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,5
F primer (10 pmol/μl)	1
R primer (10 pmol/μl)	1
5X Phusion HF tamponu	5
Nükleaz içermeyen su	8,2
Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polimeraz	0,3
Toplam hacim	20

Tablo 9. *CalB* Geninin Amplifikasyonu İçin PCR Şartları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
98	30 sn	1
98	10 sn	
62	30 sn	35
72	1 dk	
72	5 dk	1
4	∞	1

Bundan sonraki kısımda, *Pdi* ve *CalB* genlerinin PCR işlemi ile amplifiye edilmesinden pGKB-PDI ve pGKBα-CalB'nin elde edilmesine kadar gerçekleştirilen tüm klonlama basamakları birlikte verilerek açıklandı.

Klonlama deneyleri özetle şu şekilde yapıldı (Yıldız, 2020); PCR sonrası elde edilen *Pdi* ve *CalB* genlerine ait DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV görüntüleme cihazı ile görüntülenerek doğruluğu teyit edildi (Sambrook and Russell, 2001). Amplifiye edilen *CalB* ve *Pdi* genlerinin jelden saflaştırılmasında MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit'i kullanıldı ve saflaştırma işlemi üretici protokolüne göre yapıldı (Dağcı, 2024). Saflaştırma sonucunda nanodrop spektrofotometrede (Epoch) ölçülen ve kesim enzimlerinin tanıma dizilerini içeren PCR ürünleri, restriksiyon enzimleri ile kesildi (*Pdi* geni için *BstBI* (*Bsp119I*) ve *EcoRI* enzimleri kullanılırken, *CalB* geni için *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri kullanıldı). Rekombinant plazmitleri elde etmek için pGKB ve pGKBα da entegre edilecek genlerin kesiminde kullanılan aynı enzimlerle kesildi. Kesilen plazmitlerin 5' ucundaki fosfat grupları, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi ile uzaklaştırıldı. Kesim reaksiyonu, üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Kesim reaksiyonlarına ait karışım içerikleri Tablo 10 ve Tablo 11'de verildi.

Tablo 10. pGKB-PDI Eldesi İçin Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Kesim reaksiyonu içerikleri	Miktar (µl) (pGKB)	Miktar (µl) (PCR ürünü; PDI)
Nükleaz içermeyen su	13,38	19,97
10X FastDigest tamponu	2	2
DNA	2,62 (1 µg)	6,03 (200 ng)
FastDigest <i>Bsp119I</i>	1	1
FastDigest <i>EcoRI</i>	1	1
Toplam hacim	20	30

Tablo 11. pGKB α -CalB Eldesi İçin Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Kesim reaksiyonu içerikleri	Miktar (μ l) (pGKB α)	Miktar (μ l) (PCR ürünü; CalB)
Nükleaz içermeyen su	14,08	23,26
10X FastDigest tamponu	2	2
DNA	1,92 (1 μ g)	2,74 (200 ng)
FastDigest <i>Xba</i> I	1	1
FastDigest <i>Eco</i> RI	1	1
Toplam hacim	20	30

Elde edilen karışımlar, 37 °C’de 30 dakika boyunca inkübe edilerek enzim aktivasyonu sağlandıktan sonra, 5 dakika boyunca 80 °C’de inkübe edilerek enzim inaktive edildi. Daha sonra, plazmit DNA içeren kesim tüplerine CIAP (1 μ l) eklendi ve 60 dakika boyunca 50 °C’de inkübe edildi. Reaksiyon sonunda plazmitlerin kesilip kesilmediği, %1’lik agaroz jelde 1,5 saat boyunca 60 V’de yürütüldükten sonra görüntülenerek tespit edildi.

İki enzim ile kesim işlemi yapılan PCR ürünlerinin fenol-kloroform ekstraksiyonu gerçekleştirildi ve elde edilen pelet, 10-20 μ l TE tamponunda çözüldü (Yıldız 2020). Kesim reaksiyonu sonrası agaroz jele yüklenip yürütülen plazmit DNA’lar da “MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kiti” ile jelden ekstrakte edildi (Dağcı, 2024). Elde edilen Genler (*Pdi* ve *CalB*) ve yerleştirilecekleri plazmit DNA’lar aynı spesifik enzimlerle kesilip saflaştırıldıktan sonra, Tablo 12’de verilen ligasyon karışımları ayrı ayrı hazırlanarak 16 saat boyunca 16 °C’de inkübe edildi.

Tablo 12. Ligasyon Reaksiyonu

Ligasyon reaksiyon karışım içeriği	Miktar (μ l) (pGKB-PDI)	Miktar (μ l) (pGKB α -CalB)
10X ligasyon tamponu	4	4
İnsört DNA	6,7 (134,12 ng)	4,14 (82,8 ng)
Çift kesilmiş plazmit DNA	3 (100 ng)	4,4 (100 ng)
T4 DNA ligaz	1,5	1,5
Nükleaz içermeyen su	4,8	5,96
Toplam hacim	20	20

Ligasyon reaksiyonu basamağında elde edilen ürünlerin, bakteri hücrelerine transfer edilmesi için önce kompetan *E. coli* One Shot TOP10 hücreleri hazırlandı ve 100 μ l’lik alikuatlara ayrıldı (Dağcı, 2024). Ardından üzerine, 10 pg-100 ng (5 μ l) ligasyon ürünü ilave edildi (Invitrogen, 2010a, 2010b). Aynı zamanda, ticari olarak temin edilen pPICZ α A-CalB (30 ng) de transfer edildi.

Transformasyon işleminin ardından, tüplerin kapağı sıkıca kapatılarak 37 °C’de 1 saat boyunca 225 rpm’de çalkalanarak inkübe edildi. Süre sonunda, LB-kanamisin (pGKB-PDI ve pGKB α -CalB) ve LSLB-zeosin (pPICZ α A-CalB) seçim plakalarına transformasyon karışımlarından 100-200 μ l yayılarak 37 °C’de gece boyu inkübe edildi.

Büyüyen kolonilerden birer tane seçilerek LB sıvı besiyerinde 30 °C’de 180 rpm’de inkübe edilerek büyütüldü. Daha sonra, ‘GeneJET plazmid Miniprep Kit’i kullanılarak üretici firma protokolüne göre plazmit DNA izolasyonu yapıldı (Dağcı, 2024). Plazmit DNA’nın miktarı, nanodrop spektrofotometre ile belirlendi. Diğer yandan, plazmitler agaroz jele yüklendi ve 60 V’de 1,5 saat yürütüldükten sonra görüntülendi.

Elde edilen plazmit DNA’lar kullanılarak Tablo 2 ve Tablo 3’te verilen hem gen hem de vektör DNA’lara ait spesifik primerlerle PCR yapıldı. Reaksiyon için gerekli olan karışım içeriği ve PCR şartları Tablo 13 ve Tablo 14’te verildi. Vektör primerlerinin bağlanma sıcaklığı 56 °C olarak ayarlandı. Reaksiyon sonunda elde edilen PCR ürünleri, %1’lik agaroz jelde, 60 V’de 90 dk. yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 13. PCR İçin Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (μ l) (pGKB-PDI)	Miktar (μ l) (pGKB α -CalB)
Plazmit DNA	30 ng	30 ng
dNTP mix (10 mM)	1,5	1
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1
F primer (10 pmol/ μ l)	1	1
R primer (10 pmol/ μ l)	1	1
10xPCR tamponu	1,5	1,5
Nükleaz içermeyen su	7,5	8,5
DreamTaq DNA polimeraz	1	1
Toplam hacim	15	15

Tablo 14. PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)
1	94	10
	94	1
	PDI 64	1
35	CalB 62,5	1
	PDI 72	2
	CalB 72	1,5
1	72	5
	4	∞

Muhtemel rekombinant plazmitin dizi analizi ile doğrulanması

Seçilen kolonilerden izole edilen plazmit DNA'ların doğruluğunu teyit etmek için çift yönlü (pGKB-PDI için pGAP-F ve 3'AOX-R primerleri; pGKB α -CalB için Alpha-F ve 3'AOX-R primerleri ile) Sanger dizi analizi BMLabosis firması'na (Ankara) hizmet alımı ile yaptırıldı.

Rekombinant *K. phaffii* Hücrelerinin Elde Edilmesi

K. phaffii hücrelerine, elde edilen plazmit DNA'ların sıralı bir şekilde transfer edilmesiyle farklı gen kombinasyonlarına sahip rekombinant mayalar elde edildi. Başarılı bir şekilde gen aktarımı yapılan rekombinant *K. phaffii* hücreleri antibiyotikli ortamda ve PCR ile seçildi. Ardından, seçilen koloniler YPD sıvı besiyerinde büyütüldükten sonra %15 gliserol içeren ortamda karıştırılarak -80  C'de saklandı (Manoel et al., 2016).

Gen kopya sayısındaki artışlar, ER'de proteinlerin aşırı birikimine yol açarak hücresel strese neden olmaktadır. Bu sebeple, öncelikle protein katlanmasına yardımcı olmak ve sekresyonu hızlandırmak için *K. phaffii* genomunda doğal olarak bulunan *Pdi* geni, mayanın genomik DNA'sından spesifik primerler kullanılarak çoğaltıldı. Daha sonra, yapısal bir promotör ardına yerleştirilerek elde edilen pGKB-PDI *K. phaffii* hücrelerine transfer edildi (pGKB-PDI/X-33 hücreleri elde edildi) **(A)**. Ardından elde edilen bu rekombinant hücrelere, metanolle indkленebilir güçlü bir promotör olan *AOX1* ardına yerleştirilerek elde edilen pPICZ α A-CalB transfer edildi (pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücreleri elde edildi) **(B)**. PDI'nın CalB enziminin üretimine olan etkisini değerlendirmek amacıyla kontrol grubu olarak pPICZ α A-CalB, *K. phaffii* hücrelerine transfer edildi (pPICZ α A-CalB/X-33 hücreleri elde edildi) **(C)**. Daha sonra, genomik DNA izolasyonu ve ardından apraz PCR ile doğrulan koloniler (rekombinant B ve C hücreleri), PTVA yöntemiyle sıralı antibiyotik (zeosin) dozları ile muamele edildi. PTVA sonrasında seçilen koloniler üretim kültürüne alınarak lipaz üretimi sağlandı ve ardından, lipaz aktivite testi ve tayin yöntemleriyle en iyi etkinlik gösteren grup belirlendi. Hem metanolle indkленebilir *AOX1* promotörü hem de yapısal *GAP* promotörü arkasında enzim üretimi (rCalB) gerçekleştirmek amacıyla en iyi aktivitenin gözlendiği, hem PDI hem de CalB içeren rekombinant maya hücrelerine (pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33) pGKB α -CalB transfer edildi (pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücreleri elde edildi) **(D)**. Yine, genomik DNA izolasyonu ve ardından apraz PCR ile doğrulan koloniler (rekombinant D hücreleri), PTVA yöntemiyle sıralı antibiyotik (genetisin) dozları ile muamele edildi. PTVA sonrasında seçilen koloniler üretim kültürüne alınarak lipaz üretildi ve aktivite

tain yöntemleriyle en iyi etkinlik gösteren koloni belirlendi. Bu süreçte elde edilen tüm rekombinant *K. phaffii* hücrelerine ait bilgiler Tablo 15’te verildi.

Tablo 15. Rekombinant *K. phaffii* Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Adlandırılması

	Rekombinant plazmit	Transfer edildiği hücre	Elde edilen rekombinant hücre	Kısaltma
A	pGKB-PDI	<i>K. phaffii</i> X-33	pGKB-PDI/X-33	P
B	pPICZαA-CalB	pGKB-PDI/X-33	pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33	CP
C	pPICZαA-CalB	<i>K. phaffii</i> X-33	pPICZαA-CalB/X-33	C
D	pGKBα-CalB	pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33	pGKBα-CalB+pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33	CCP

pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi

Rekombinant DNA’nın kesimi ve fenol-kloroform ekstraksiyonu

E. coli hücrelerinden izole edilen pGKB-PDI, *K. phaffii* hücrelerine transfer edilmeden önce FastDigest *Xma*II (*Avr*II) enzimi kullanılarak lineer hâle getirildi. Kesim işlemi, üretici firma protokolüne göre gerçekleştirildi. Tablo 16’daki gibi hazırlanan karışım, 37 °C’de 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra CIAP (1 µl) eklenerek 5 dakika boyunca 50 °C’de inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda, karışımın 3 µl’si agaroz jelde yürütülüp UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

Tablo 16. Plazmit DNA’nın Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µl)
Nükleaz içermeyen su	15,82
10xFast Digest Tamponu	2
Plazmit DNA (pGKB-PDI)	1,18 (1 µg)
FastDigest Enzim	1
Toplam hacim	20

Lineer hâle getirilmiş vektörler fenol/kloroform/izoamilalkol ekstraksiyonu ile saflaştırıldı ve pelet, 50 µl nükleaz içermeyen su ile çözüldü (Yıldız, 2020).

Kompetan K. phaffii hücrelerinin hazırlanması ve LiCl ile transformasyonu

Yaklaşık 48 saat boyunca 30 °C’de YPD katı plakasında inkübe edilen *K. phaffii* hücreleri YPD sıvı (50 ml) besiyerine inoküle edildi. OD₆₀₀ değeri 0,8-1’e ulaşana kadar 30 °C’de (100-150 rpm) inkübe edilen kültür sıvısı santrifüj edilerek hücreler toplandı (+4 °C, 1500 g, 4 dakika). Elde edilen hücre peleti 25 ml steril saf su ile yıkandıktan sonra santrifüjlendi (1500 g’de 10 dakika). Pelet üzerine 1 ml 100 mM LiCl eklenerek süspanse edildi ve steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücre süspansiyonu, 15 saniye boyunca maksimum hızda (16000

rpm) 24 °C’de santrifüj edilerek LiCl uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 100 mM LiCl’den 400 µl eklendi ve hücreler süspanse edildi. Transformasyon işleminde kullanılmak üzere süspanse edilen hücreler 50 µl’lik alikuatlara ayrıldı. Lineer hâle getirilen rekombinant DNA’ların *K. phaffii* hücrelerine transformasyon işlemi, üretici firma protokolüne göre gerçekleştirildi (Invitrogen, 2010a, 2010b; Ünver et al., 2015). Ardından, hücre peletinin üzerine antibiyotik içermeyen YPD sıvı besiyerinden 1 ml eklenerek hücreler tekrardan süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, steril tüpe alınarak 30 °C’de 200 rpm’de çalkalanarak inkübe edildi. 4 ve 16 saatlik inkübasyonun ardından hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak antibiyotik içeren YPD katı plakalarına steril drigalski ile yayma işlemi yapıldı. Transformant içeren plakalar, 30 °C’de 48-72 saat boyunca inkübe edildi. pGKB-PDI içeren transformantların seçilimi için antibiyotik (200 µg/ml genetisin (G418)) içeren YPD katı plakaları kullanıldı.

Pozitif maya transformantlarının doğrulanması

Transformasyon işlemi sonrası lineer pGKB-PDI’nın maya genomuna entegrasyonunu teyit etmek amacıyla genetisin antibiyotiğine direnç gösteren kolonilerden 5 tanesi seçildi. YPD katı plakasına ekim yapılarak 48 saat boyunca 30 °C’de inkübe edildi. Inkübasyon sonunda büyüyen hücreler toplanarak YPD sıvı (10 ml) besiyerine inoküle edildi ve ardından, 30 °C’de 150 rpm’de gece boyu inkübe edildi. Inkübasyonun ardından toplanan maya hücrelerinden “Genomik DNA İzolasyon Kiti” kullanılarak genomik DNA izolasyonu işlemi daha önceki basamakta anlatıldığı gibi üretici firma protokolüne göre gerçekleştirildi.

Elde edilen gDNA’lar kullanılarak PDI-F ve 3’AOX-R primerleri ile çapraz PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR için primerler, Tablo 2 ve Tablo 3’te verilirken karışım içeriği ve reaksiyon şartları Tablo 17 ve Tablo 18’de verildi. Reaksiyon sonunda elde edilen PCR ürünleri, %1’lik agaroz jele yüklenerek 60 V’de 90 dk. yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 17. PCR İçin Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (µl)
gDNA (pGKB-PDI/X-33)	1 (100 ng)
dNTP mix (10 mM)	1,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
F primer (10 pmol/µl)	1
R primer (10 pmol/µl)	1
10xPCR tamponu	1,5
Nükleaz içermeyen su	6,5
DreamTaq DNA polimeraz	1
Toplam hacim	15

Tablo 18. PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)
1	94	10
35	94	1
	62	1
	72	2
1	72	5
	4	∞

pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZαA-CalB/X-33 hücrelerinin elde edilmesi

E. coli hücrelerinden izole edilen pPICZαA-CalB, önceki basamakta elde edilen pGKB-PDI/X-33 hücrelerine (P3) ve kontrol grubu olarak *K. phaffii* hücrelerine transfer edilmeden önce FastDigest MssI (*PmeI*) enzimi kullanılarak lineer hâle getirildi. Kesim işlemi, üretici firma protokolüne göre gerçekleştirildi. Tablo 19’a göre hazırlanan karışımlar, 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildikten sonra 65 °C’de 10 dakika inkübe edilerek enzim inaktive edildi. Daha sonra, CIAP (1 µl) eklenerek 5 dakika boyunca 50 °C’de inkübe edildi. Reaksiyon sonunda, karışımın 3 µl’si agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 19. Plazmit DNA’nın Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µl)
Nükleaz içermeyen su	14,32
10xFast Digest Tamponu	2
Plazmit DNA (pPICZαA-CalB)	2,68 (1 µg)
FastDigest Enzim	1
Toplam hacim	20

PCR ürünlerinin fenol-kloroform ekstraksiyonu, kompetan *K. phaffii* ve pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin hazırlanması ve bu kompetan hücrelerin ayrı ayrı LiCl ile transformasyonu önceki bölümde anlatıldığı şekilde yapıldı. Pozitif maya transformantlarının doğrulamasının yapılması için genomik DNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen gDNA’lar kullanılarak CalB-F ve 3’AOX-R primerleri ile çapraz PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR için primerler, Tablo 2 ve Tablo 3’te verilirken karışım içeriği ve reaksiyon şartları Tablo 20 ve Tablo 21’de verildi. Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri, 60 V’de 90 dk. yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 20. PCR İçin Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (µl)
gDNA (pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZαA-CalB/X-33)	1 (100 ng)
dNTP mix (10 mM)	1
MgCl ₂ (50 mM)	1
F primer (10 pmol/µl)	1
R primer (10 pmol/µl)	1
10xPCR tamponu	1,5
Nükleaz içermeyen su	7,5
DreamTaq DNA polimeraz	1
Toplam hacim	15

Tablo 21. PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)
1	94	10
	94	1
35	61	1
	72	1,5
1	72	5
	4	∞

PTVA ile Çok Kopyalı Klonların Seçilimi (pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZαA-CalB/X-33)

Genomik DNA izolasyonunun ardından PCR işlemi ile doğrulanan pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZαA-CalB/X-33 transformantlarına ait koloniler kullanılarak sıvı PTVA analizine geçildi. Bu işlem; Sunga ve arkadaşlarının yaptığı yöntem modifiye edilerek sırasıyla; 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 µg/ml konsantrasyonlarda zeosin antibiyotiği içeren YPD sıvı besiyerleri kullanılarak gerçekleştirildi (Sunga et al., 2008). Sıvı PTVA için seçilen koloniler, başlangıç antibiyotik konsantrasyonuna sahip (100 µg/ml) 5 ml YPD sıvı besiyeri içine inoküle edildikten sonra 30 °C’de çalkalanarak (250 rpm) 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kültür sıvısı, 4000 rpm’de oda şartlarında 5 dk. santrifüjlendikten sonra süpernatant (üst faz) atıldı. Peletler toplanarak bir sonraki sıralı antibiyotik konsantrasyona sahip YPD sıvı besiyerine inoküle edildi ve aynı şartlarda inkübasyona devam edildi. Bu seçim düzeneği, en yüksek antibiyotik konsantrasyonuna (3000 µg/ml) ulaşılan kadar devam etti.

Spotlama testi için; 24 saat boyunca inkübe edilen kültür sıvısından örnek alınarak fizyolojik su ile 10¹ kat dilüe edildi ve bu dilüsyon işlemine ilgili antibiyotiğin her sıralı konsantrasyonunda 10 kat artırılarak devam edildi. İlgili antibiyotiğin 3000 µg/ml

konsantrasyonundaki son üreme periyodundaki kültür sıvısından örnek alınarak 10^5 kat dilüe edildi. Her dilüsyon işleminden sonra 4 µl örnek alınarak antibiyotik içermeyen YPD katı plakasına spot yapıldı ve 30 °C’de 2-3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

Rekombinant *Candida antarctica* Lipaz B (rCalB)’nin Üretimi

PCR ile doğrulanan ve PTVA ile seçilen rekombinant maya hücreleri YPD agara ekilerek 30 °C’de 48-60 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından büyüyen hücreler öze ile toplandı ve 12,5 ml’lik BMGY ön kültür besiyerine inoküle edildi. Ardından 30 °C’de, 225 rpm’de OD₆₀₀ değeri yaklaşık 2 oluncaya kadar inkübe edildi. İstenilen OD değerine ulaşan kültür sıvısı 24 °C’de 10 dk. boyunca 4000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra toplanan hücre peleti %1 kasamino asit (proteaz inhibitörü) ve %1 sorbitol (karbon kaynağı) içeren son hacim 25 ml olan BMMY ortamına yeniden süspanse edildi. 250 ml hacimli çentikli erlenmayerlerde 30°C’de, 280 rpm’de, 120 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve promotör indüksiyonu için kültür ortamına 24 saatte bir %0,5 olacak şekilde saf metanol eklendi (Bharathiraja et al., 2016; Unver et al., 2021). 120 saat inkübasyon sonrası kültür sıvısından alınan örnekler, 4°C’de, 5000 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi ve rCalB enzimini içeren süpernatantlar, enzim aktivite tayini ve SDS-PAGE analizinde kullanıldı.

Rekombinant Lipazın Aktivite Analizi ve Görüntülenmesi

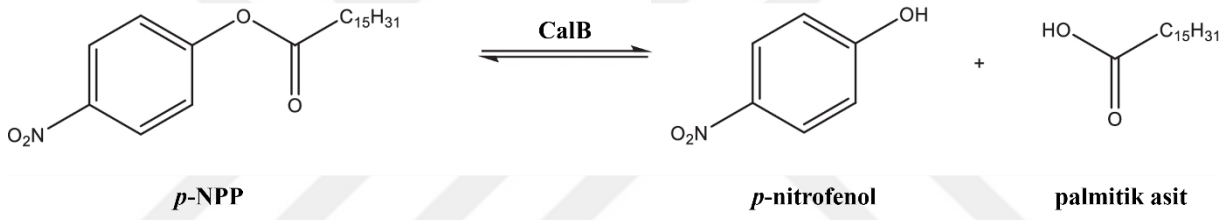
Kalitatif analiz (Kuyu difüzyon testi)

Önceki basamakta elde edilen lipaz içeren süpernatantlar, Amicon® Ultra Santrifüj filtreler (Merck Millipore; 30 kDa) kullanılarak 10 kat konsantre edildi. Önceden hazırlanmış olan Tribütirin agar plakasında (%1 tribütirin içeren) açılan kuyular 50 µl konsantre süpernatant ile dolduruldu. Kontrol grubu olarak, lipaz üretmeyen rekombinant suşa (pPICZαA) ait süpernatant kullanıldı. Daha sonra, plakalar parafilmle sarılarak 30 °C’de 3-5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

Kantitatif analiz (Spektrofotometrik analiz)

Konsantre örneklerdeki lipaz aktivitesini ölçmek için *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) hidrolize edildi ve oluşan ürün (*p*-nitrofenol) spektrofotometrik olarak analiz edildi. *p*-NPP’nin CalB katalizli reaksiyonu Şekil 15’te gösterildi (Heiligenthal et al., 2022). Aktivite deneyi kısaca şu şekilde yapıldı; Öncelikle, iki ayrı reaksiyon çözeltisi oluşturuldu. Bunlardan A çözeltisi; 0,007 g gum Arabic, %0,4 triton X-100 ve 250 mM fosfat tamponu (pH 7,0) içerirken, B çözeltisi; 8 ml izopropanol içinde 24 mg *p*-NPP içermektedir. Lipaz emülsifiye edici substrat çözeltisi (substrat reaktif) ise, bir birim B çözeltisinin dokuz birim A çözeltisi ile

homojenleştirilmesiyle hazırlandı. Daha sonra, 0,9 ml substrat reaktifine 0,1 ml lipaz çözeltisi eklendikten sonra vortekslenen karışım 40 °C’de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, enzimi denatüre etmek ve hidroliz reaksiyonunu durdurmak için reaksiyon karışımı 100 °C’de 5 dakika kaynatıldı. Karışım, 10000 rpm’de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra salınan *p*-nitrofenol miktarı 410 nm’de bir spektrofotometre (Shimadzu, UV-1800 240V) kullanılarak ölçüldü. Kör olarak kullanılan karışıma, enzim kaynağı (süpernatant) yerine 0,1 ml enzim içermeyen süpernatant eklendi (Kamel Ariffin and Idris, 2022). Gruplar arasındaki lipaz aktivitesini değerlendirmek ve karşılaştırmak amacıyla 410 nm’de ölçülen absorpsiyon değerleri temel alınarak göreceli aktivite (relative activity) hesaplandı. Göreceli aktivite, salınan *p*-nitrofenol üretiminin yüzdesi olarak gösterilir, maksimum değer %100 olarak kabul edilir (Tian et al., 2021). Deney koşulları altında, 1 µmol/dakika *p*-NPP’yi hidrolize etmek için gereken enzim miktarı bir birim (EÜ) lipaz aktivitesi olarak belirlenmektedir. *p*-nitrofenol için 13,290 M⁻¹ cm⁻¹’lik bir molar ekstinksiyon katsayısı (ε₄₁₀) kullanıldı (Hung et al., 2003; Komesli et al., 2021; Kordel et al., 1991).



Şekil 15. *p*-nitrofenil palmitatın (*p*-NPP) CalB katalizli reaksiyonu
Şekil (Heiligenthal et al., 2022)’den alıntılanmıştır.

SDS-PAGE analizi ve gümüş boyama

Toplam protein konsantrasyonu, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak bir spektrofotometrik yöntemle belirlendi ve her numune üç tekrar halinde ölçüldü (Bradford, 1976). Lipaz içeren örnekler, hazırlanan %10’luk SDS-PAGE jelindeki kuyulara yüklenerek 80 V’de 30 dk. ardından, 120 V’de 90 dk. boyunca yürütüldü (U.K. Laemmli, 1970). Son olarak, jeldeki protein bantları gümüş boyama yöntemi ile boyanarak görünür hâle getirildi (Acar et al., 2023). Gümüş boyama işlemi şu şekilde gerçekleştirildi; Protein örneklerinin olduğu jel “tespit solüsyonu (30 ml ultrapure saf su, 15 ml %96’lık etanol ve 5 ml asetik asit)” içeren bir kaba alınarak 30 dk. boyunca yavaşça çalkalanmaya bırakıldı. Süre sonunda, tespit solüsyonu uzaklaştırılarak jel önce saf su ile çalkalanarak bir kez yıkandı ve ardından üzerine “redüksiyon solüsyonu (22,5 ml saf etanolde çözünmüş 2,4 g sodyum asetat (pH 6), 40 ml ultrapure saf su, 75 mg sodyum tiyosülfat ve 1,5 ml gluteraldehit, son hacim 75 ml)” eklendi. Ardından, 30 dk. boyunca çalkalandıktan sonra saf su ile çalkalanarak yıkama işlemi yapıldı (3 kez). Yıkama işleminin ardından, jel “boyama solüsyonu (50 ml ultrapure saf su, 50 mg gümüş nitrat ve 15

μ l formaldehit)’na alınarak 20 dk. boyunca çalkalandı. Boyamanın ardından saf su ile yıkanan jel, ‘‘yıkama-1 solüsyonu (135 ml ultrapure saf su, 1,875 g sodyum karbonat ve 60 μ l formaldehit)’’na alındı ve standart olarak kullanılan protein bantları (protein markır) görünmeye başlayana kadar yavaş bir şekilde çalkalandı. ‘‘Yıkama-1 solüsyonu’’ uzaklaştırıldıktan sonra jel, ‘‘yıkama-2 solüsyonu (300 μ l gliserol, 6,25 ml asetik asit ve son hacim 125 ml)’’na alındıktan sonra rengi açılana kadar bekletildi. Ardından, jel saf su içeren başka bir kaba alındıktan sonra görüntülendi (Abul, 2019).

pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi

E. coli hücrelerinden izole edilen pGKB α -CalB, önceki basamakta elde edilen pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 (CP31) hücrelerine transfer edilmeden önce *Bsi*WI-HF enzimi (AOX *TT* bölgesinden lineer hâle getirmek için) kullanılarak lineer hâle getirildi. *Bsi*WI-HF enzimi AOX *TT* bölgesinden kestiği için lineer hâle gelen plazmit DNA, GAP promotöründen farklı bir bölgeden genoma entegre olacağı için pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerinde bulunan pGKB-PDI ekspresyon kasetinin çıkması ya da zarar görmesi ile ilgili oluşması muhtemel olan soru işaretlerini de giderecektir. Kesim işlemi, üretici firma protokolüne göre gerçekleştirildi. Tablo 22’ye göre hazırlanan karışımlar, 15 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildikten sonra 80 °C’de 20 dakika inkübe edilerek enzim inaktive edildi. Ardından, CIAP (1 μ l) eklenerek 5 dakika boyunca 50 °C’de inkübe edildi. Reaksiyon sonunda rekombinant DNA’nın (5 μ g) lineer hâle geldiğini teyit etmek için reaksiyon karışımları birleştirildi ve 3’şer μ l alınarak agaroz jelde yürütölüp UV görüntüleme cihazında görüntülendi. PCR ürünlerinin fenol-kloroform ekstraksiyonu, kompetan pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin hazırlanması ve bu kompetan hücrelerin LiCl ile transformasyonu önceki bölümde anlatıldığı şekilde yapıldı. Pozitif maya transformantlarının doğrulamasının yapılması için genomik DNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen gDNA’lar kullanılarak pGAP-F ve CalB-R primerleri ile çapraz PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR için primerler, Tablo 2 ve Tablo 3’te verilirken reaksiyon karışım içeriği ve PCR şartları Tablo 20 ve Tablo 21’de verildi. Farklı olarak primerlerin ortak bağlanma sıcaklığı olarak 56 °C seçildi. Reaksiyon sonunda PCR ürünleri, agaroz jelde yürütöldükten sonra görüntülendi.

Tablo 22. Plazmit DNA’nın Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (μl)
Nükleaz içermeyen su	41,67
1X NEB Tamponu	5
Plazmit DNA (pGKB α -CalB)	2,33 (1 μ g)
FastDigest Enzim	1
Toplam hacim	50

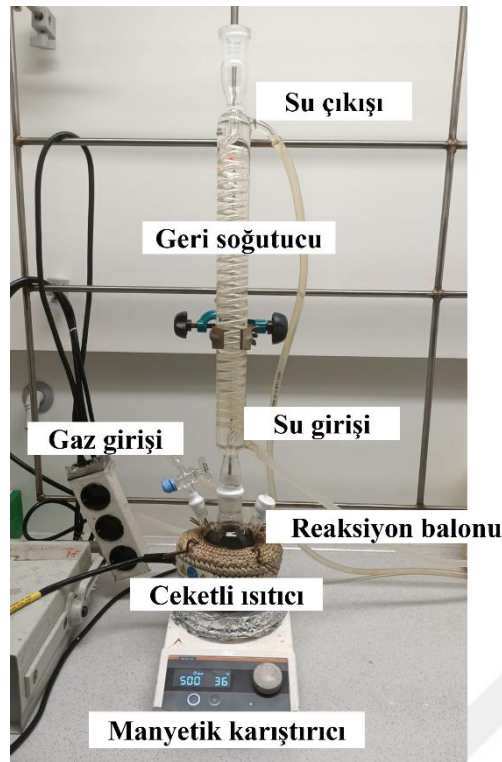
PTVA ile Çok Kopyalı Klonların Seçilimi

Genomik DNA izolasyonunun ardından, PCR işlemi ile doğrulanan pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 transformantlarına ait koloniler kullanılarak sıvı PTVA analizine geçildi. Bu işlem daha önce anlatıldığı şekilde yapıldı. Bu kez, pGKB α -CalB'nin içinde bulunan direnç geninden dolayı PTVA analizi için, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ve 4000 μ g/ml konsantrasyonlarda genetisin antibiyotiği içeren YPD sıvı besiyerleri kullanıldı. Spotlama testi önceki basamakta anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

PCR ile doğrulanan ve PTVA ile seçilen rekombinant maya hücreleri kullanılarak rCalB enziminin üretimi ve ardından lipaz aktivitesi testleri önceki basamakta anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Manyetik Nanopartikül (MNP) Sentezi ve Karakterizasyonu

1,0 g FeCl₂.4H₂O (Demir II tuzu) ve 2,4 g FeCl₃.6H₂O (Demir III tuzu) tartılarak iki boyunlu reaksiyon balonu içerisine alındı ve 29 ml deiyonize suda çözüldü. Reaksiyon düzeneği hazırlandıktan sonra reaksiyon balonu inert atmosfer altında 15 dakika bekletildi. Reaksiyon karışımı, inert atmosfer altında çözelti kaynayıncaya kadar 500 rpm'de çalkalanarak 94 °C'ye kadar ısıtıldı. Daha sonra, hızlı bir şekilde çözeltiye 5 ml amonyum hidroksit (ağırlıkça %28-32) ilave edildi ve ardından 1 ml (0,03 mol) PEI (polietilenimin; 10 kDa) çözeltisi ilave edildi (0,3 g PEI_{10kDa} tartıldı ve 25 ml'lik bir beherde 1 ml deiyonize suda çözüldü). PEI'nin eklenmesinin ardından reaksiyon 1 saat boyunca 94 °C'de 500 rpm'de karıştırılarak MNP'ler sentezlendi. Reaksiyon sonunda sentez balonu ceketten çıkarılarak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğuma işleminin ardından, reaksiyon balonundaki karışım 50 ml'lik falkon bir tüpe alındı ve miknatis ile partiküllerin toplanması sağlandı ve üst fazda kalan sıvı uzaklaştırıldı. MNP'leri yıkama işlemi, 50 ml deiyonize su ekledikten sonra 10 sn boyunca sonikatörde bekletilerek gerçekleştirildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Elde edilen Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'ler 50 ml deiyonize su içerisinde dağıtıldıktan sonra 2 dk. boyunca sonikatörde bekletildi. Elde edilen MNP'ler kullanılıncaya kadar inert gaz koruması altında +4 °C'de saklandı. Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'lerin üretildiği reaksiyon düzeneği Şekil 16'da verildi.



Şekil 16. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'lerin üretildiği reaksiyon düzeneği (Schlenk sistemi)

Sentezlenen MNP'lerin şekil ve boyut karakterizasyonu için Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM, Transmission Electron Microscopy, Hitachi HighTech HT7700, DAYTAM) kullanılırken nanopartiküllerin sahip olduğu fonksiyonel grupların belirlenmesi için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy-Bruker VERTEX 70v, DAYTAM) kullanıldı. Son olarak, elde edilen MNP'lerin yapısında bulunan Fe konsantrasyonu ise İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent 7800, DAYTAM) analizi ile belirlendi.

Rekombinant *K. phaffii* Hücrelerinin Dekorasyonu (İmmobilizasyonu)

Sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'lerin *K. phaffii* hücreleri üzerindeki toksik etkisi bir çalışmamızda incelenmişti. Sitotoksikite testi için MNP'lerle dekore edilen *K. phaffii* hücreleri YPD besiyerinde 72 saat boyunca inkübe edildi ve her 24 saatte bir örnek alınarak OD_{600} 'de ölçüm yapıldı (Dagci, Solak, et al., 2024). Elde edilen sonuçlara göre, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'lerin maya hücreleri için toksisite göstermediği gözlemlendi. Bu tez çalışmasında, 250 ppm Fe içeren MNP'ler ile rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin immobilize edilmesine karar verildi.

YPD agara transfer edilen rekombinant pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücreleri (CCP5 kolonisi), 30 °C'de 48-60 saat inkübe edildi. Ardından, büyüyen hücrelerden öze ile toplanarak BMGY besiyerine (ön kültür besiyeri) inoküle edildi ve 30 °C'de

225 rpm’de 600 nm’de 4 optik yoğunluğa (OD) ulaşınca kadar inkübe edildi. İmmobilizasyon için 5 ml kültür, 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler, 5 ml %0,9’luk fizyolojik tuzlu su ile yıkandı ve bu solüsyonun 5 ml’sinde yeniden süspanse edildi (Taghizadeh, Ebrahimezhad, et al., 2020; Taghizadeh et al., 2022). İmmobilizasyon için, maya hücrelerine (5 ml) Fe içeriği 250 ppm (son hacim konsantrasyonu) olan 5 ml MNP solüsyonu eklendi ve 30 °C’de ve 150 rpm’de, 15 dakika inkübe edildi. İmmobilize edilen hücreler 5 dk. boyunca bir miknatısla toplandı. Üstteki sıvı, immobilizasyon verimliliğini belirlemek için kullanıldı. Hücre pelletleri 25 ml BMMY besiyerinde (üretim kültürü besiyeri) süspanse edildikten sonra 30 °C ve 280 rpm’de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı (Dagci, Solak, et al., 2024). Son olarak, *P_{AOX}* indüksiyonu için kültür ortamına her 24 saatte bir %0,5 (v/v) metanol eklendi.

İmmobilizasyon etkinliği aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı (Dağcı 2024; Taghizadeh, Ebrahimezhad, et al. 2020).

$$Me = \frac{Hücre/ml\ t0 - Hücre/ml\ t1}{Hücre/ml\ t0} * 100$$

Manyetik immobilizasyon verimliliği (Me), manyetik alana maruz kalmadan önce (Hücre/ml t0) ve maruz kaldıktan sonra (Hücre/ml t1) ml başına hücre sayısı belirlenerek hesaplandı.

Dekore edilen maya hücrelerinin görüntülenmesi

MNP’lerle dekore edilen *K. phaffii* hücrelerini görüntülemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM, Scanning electron microscope, Zeiss Sigma 30, DAYTAM) kullanıldı. İlk olarak, 250 ppm Fe içeren Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP’ler kullanılarak hücreler dekore edildi ve bir cam slayt üzerine fikse edilerek görüntülendi. Fiksasyon işlemi şu şekilde gerçekleştirildi; Dekorasyondan sonra, hücreler bir cam slayta yayıldı (cam slaytlar, %1 Triton X-100, damıtılmış su ve %70 etanolde 20 dakika boyunca sonikasyonla temizlendi) ve oda sıcaklığında hava ile kurumaya bırakıldı. 45 dakika boyunca 2 ml %2,5 glutaraldehit içinde fiksasyona tabi tutuldu (Taghizadeh, Ebrahimezhad, et al., 2020). %0,9 fizyolojik tuzlu suyla (15 dakika) yıkandıktan sonra, slaytlar sırasıyla %30, %50, %70, %80 ve %90 etanolde 10 dakika inkübe edildi. Son olarak slaytlar, 20 dakika boyunca %100 etanolde inkübe edildi. Slaytlar, oda sıcaklığında bir gece inkübe edilerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Numuneler, 20 mA’da 150 saniye boyunca altınla kaplandı (sputter coater, Quorum, Q150R S). Daha sonra, dekore edilen hücrelerin SEM (Zeiss, Sigma 300) görüntüleri 5000x büyütmede yüksek vakum altında çekildi.

Dekore Edilmiş Hücreler Tarafından Üretilen rCalB Enziminin Aktivite Tayini ve SDS-PAGE Analizi

Önceki basamakta, rekombinant pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücreleri (CCP5 kolonisi) 0 (dekore edilmeyen) ve 250 ppm Fe içeren Fe₃O₄@PEI₁₀kDa MNP'lerle dekore edildikten sonra 96 saat boyunca üretim kültüründe inkübasyona bırakıldı ve her 24 saatte bir örnek alınarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Toplanan örnekler, konsantre edilmeden kullanılarak daha önceki basamaklarda anlatıldığı şekilde enzim aktivite analizleri yapıldı. Daha sonra, yapılan analiz sonucuna göre, en yüksek lipaz aktivitesinin gözlemlendiği inkübasyon süresinde toplanan örnekler 10 kat konsantre edilerek dekore edilen ve edilmeyen hücrelerden salgılanan lipaz enziminin aktivitesi karşılaştırıldı. Aynı zamanda, -20 °C'de saklanan lipaz örneklerinin stabilitesinin değerlendirilmesi için birkaç gün arayla (1-12 gün) lipaz aktivitesi ölçüldü. Diğer yandan, dekore edilen hücreler tarafından üretilen protein örneklerinden alınarak SDS-PAGE analizi ve ardından gümüş boyama yapıldı. Kontrol olarak, lipaz üretmeyen (*CalB* geni içermeyen rekombinant maya; pPICZ α A/X-33) hücrelerin kültür sıvısı kullanıldı.

Rekombinant Lipazın Transesterifikasyon Aktivitesi ve Biyodizel Üretim Optimizasyonu

Bu aşamada, dekore edilen hücreler tarafından üretilen rCalB enzimi ticari ayçiçek ve atık kızartma (ayçiçek) yağlarından biyodizel üretimi için katalizör olarak kullanıldı. Öncelikle, biyodizel üretimi için optimum şartlar belirlenirken ticari ayçiçek yağı kullanıldı. Ardından, tüm optimum şartlarda hem ticari hem de atık kızartma (ayçiçek) yağı kullanılarak transesterifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Transesterifikasyon işlemi, yağ, metanol ve enzim içeren reaksiyon karışımı elde edildikten sonra bir orbital çalkalayıcı (200 rpm) kullanılarak yapıldı (Tan et al., 2022). Optimizasyon deneylerinde; metanol:yağ molar oranı (3:1–5:1), reaksiyon sıcaklığı (25-40 °C), enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 4-12 ml; 1,2-3,6 EU) ve reaksiyon süresi (12-168 saat) sırasıyla çalışılarak optimize edildi. rCalB'nin metanole duyarlı bir lipaz olduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Bhatt et al., 2022). Bu sebeple, tüm optimizasyon deneylerinde metanolün lipaz üzerindeki toksik etkisinin önüne geçmek için metanol, reaksiyon ortamına kademeli olarak eklendi (Iyyappan et al., 2022; Xiao et al., 2023).

Metanol:yağ molar oranının biyodizel verimine etkisi

Transesterifikasyon işlemi için, ilk olarak metanol:yağ molar oranının etkisi araştırıldı. Bunun için, ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), reaksiyon sıcaklığı (30 °C), enzim miktarı (enzim

içeren kültür sıvısı: 10 ml; 3 EÜ) ve reaksiyon süresi (24 sa.) sabit tutularak metanol:yağ molar oranı 3:1, 4:1 ve 5:1 olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi.

Reaksiyon (Transesterifikasyon) sıcaklığının biyodizel verimine etkisi

En yüksek transesterifikasyon etkinliğinin gözlemlendiği metanol:yağ molar oranı belirlendikten sonra ikinci olarak, reaksiyon sıcaklığının etkisi araştırıldı. Bunun için, ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 10 ml; 3 EÜ) ve reaksiyon süresi (24 sa.) sabit tutularak reaksiyon sıcaklığı 25, 30, 35 ve 40 °C olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi.

Katalizör (enzim) miktarının biyodizel verimine etkisi

En uygun reaksiyon sıcaklığı belirlendikten sonra katalizör olarak kullanılan rCalB enzim miktarının transesterifikasyon reaksiyonuna olan etkisi araştırıldı. Bunun için, ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), reaksiyon sıcaklığı (30 °C) ve reaksiyon süresi (24 sa.) sabit tutularak ve enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı) 4 (1,2 EÜ), 8 (2,4 EÜ) ve 12 (3,6 EÜ) ml olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi.

Reaksiyon süresinin biyodizel verimine etkisi

En yüksek transesterifikasyon etkinliğinin gözlemlendiği enzim miktarı belirlendikten sonra reaksiyon süresinin biyodizel verimine olan etkisi araştırıldı. Bunun için, ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), reaksiyon sıcaklığı (30 °C) ve enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 8 ml; 2,4 EÜ) sabit tutularak 168 saat boyunca reaksiyona devam edildi. Reaksiyon süresi boyunca belirli aralıklarla örnek alındı.

Ticari ayçiçek yağı ile belirlenen optimum reaksiyon şartları kullanılarak atık kızartma (ayçiçek) yağı için de reaksiyon süresinin biyodizel verimine olan etkisi araştırıldı.

Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizi

Transesterifikasyon reaksiyonundan sonra, elde edilen karışımdan 1 ml örnek alınarak 12000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Biyodizel verimini (% FAME) ölçmek için üretilen yağ asidi metil esterleri (üst tabaka) toplandıktan sonra n-hekzan içinde 1 ml'ye seyreltildi ve GC-FID (Gaz kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör) analizi (Shimadzu QP2010 ULTRA GC-FID, DAYTAM, Erzurum) yapıldı (Xiao et al., 2023). Kısaca, 1 µl numune, alev iyonizasyon dedektörü ve bir kılcal kolon (DB-FastFAME, 30,0 m 0,25 mm, 0,25 µm) ile donatılmış Shimadzu QP2010 ULTRA GC-FID sistemine FAME analizi için enjekte edildi. Kolon sıcaklığı, 50 °C'de 0,5 dk. tutuldu ve dakikada 30 °C'lik artışlarla 194 °C'ye

ıkarıldı ve bu sıcaklıkta 3,5 dk. tutuldu. Daha sonra, dakikada 5 °C’lik artışlarla 240 °C’ye çıkarıldı ve bu sıcaklıkta 2 dk. tutuldu. Enjektör ve dedektörün sıcaklıkları sırasıyla 250 ve 260 °C’ye ayarlandı. Taşıyıcı gaz olarak helyum (He) kullanıldı. Üretilen FAME’ler, tutulma süreleri (retention time) açısından bilinen “Supelco 37 Component FAME Mix” (Merck, CRM47885) standart karışımı ile karşılaştırılarak tanımlandı. Diğer yandan, iç standart olarak n-hekzan içinde çözülen 2-metil-3-heptanon (Sigma-Aldrich, 103128) kullanılarak standart grafik oluşturuldu. GC-FID analizi sonucu elde edilen iç standarda ve oluşan FAME’lere ait toplam pik alanlarından yola çıkılarak transesterifikasyon oranları dolayısıyla üretilen FAME miktarları tahmin edildi.

İstatistiksel Analizler

Deneyssel veriler elde edildikten sonra, istatistik hesaplamalar ve ardından verilerin görselleştirilmesi amacıyla OriginPro 2025 programı kullanıldı. Deney grupları en az 3 örnek içerecek şekilde tasarlandı ve spektrofotometrik okutmalar yine en az 3 kez tekrarlandı. Gruplar arası karşılaştırma yapılırken one-way ANOVA (analysis of variance) analizi kullanıldı ve gruplar arasındaki fark Tukey testi ile belirlendi. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark; $p \geq 0.05$ (n.s, anlamlı değil), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ olarak tanımlandı. Fotoğraflara ait nicel verilerin toplanmasında ise ImageJ programı kullanıldı.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Plazmit DNA'ların Elde Edilmesi

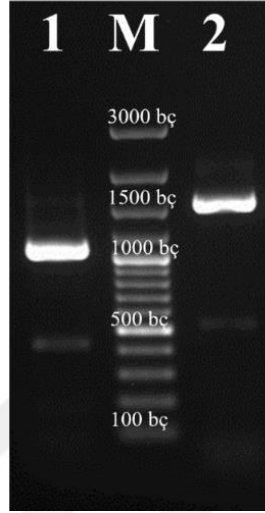
CalB geninin kodon optimizasyonu

CalB enziminin ticari önemi, yüksek enantiyoselektifliği ve çeşitli substratlara karşı seçiciliği (Anderson et al., 1998), yüksek katalitik aktivitesi (Kirk and Christensen, 2002) ve termal kararlılığından kaynaklanmaktadır (N. Zhang et al., 2003). Özgülüğü ve katalitik aktivitesi, özellikle transesterifikasyon reaksiyonlarında substrat olarak ikincil alkoller kullanıldığında, onu endüstriyel amaçlar için ilginç hâle getirmektedir (Wu et al., 2013). Ancak, Novozyme 435 gibi lipazların yüksek maliyeti endüstrileşmenin önündeki büyük bir engeldir. Bu engeli aşip yüksek verimli lipaz ekspresyonu sağlamak için yüksek kaliteli konak seçimi, kodon optimizasyonu ve kültür koşullarının optimizasyonu gibi stratejiler geliştirilmektedir (Xiao et al., 2023).

Kodon kullanım sıklığı, heterolog gen ifadesi üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir (Sinclair and Choy, 2002). Kodon optimizasyonu, orijinal diziyi içeren organizmadaki nükleotid dizilerini konak organizmanın nükleotid dizilerine dönüştürerek ifade edilecek genlerin translasyon verimliliğini artırmak için kullanılır. Bu, heterolog protein üretiminin verimliliğini artırır (Fuglsang, 2003; J. Yang and Liu, 2010). Kodon optimizasyonu yapılırken transfer RNA havuzu, kodon adaptasyon indeksi (CAI) ve haberci RNA'nın ikincil yapısı gibi ek değişkenler de hesaba katılmalıdır (Y. Tu et al., 2016). İyi bir translasyon verimliliği için, kodon adaptasyon indeksinin 1'e yakın olması önerilmektedir (Al-Hawash et al., 2017). Çünkü, yabancı *C. antarctica* LF 058 suşu *CalB* geninin ifadesi için nadir veya düşük frekanslı kodonlar kullandığından, *K. phaffii*'nin translasyonel mekanizmasının çalışmaz hâle gelmesi ve/veya ifade (ekspresyon) verimliliğinin azalması da muhtemeldir (X. Li et al., 2016).

Bu tez çalışmasında, maya hücrelerinde *CalB* geninin ifade düzeyini artırmak için, *C. antarctica* LF 058'nin orijinal nükleik asit ve amino asit dizilerine dayanarak ve *K. phaffii*'nin kodon eğilimine uygun olarak kodon optimize edildi (C. G. Park et al., 2009; J. K. Yang et al., 2013). Kodon optimizasyonunun ardından, orijinal *CalB* geninin kodon adaptasyon indeksi (CAI) %69'dan %87'ye yükseldi. Kodon optimize *CalB* dizisi pPICZαA'ya entegre edilmiş hâlde (pPICZαA-CalB) temin edildi (Şekil 14).

Rekombinant plazmitleri elde etmek için, sentetik olarak temin edilen kodon optimize *CalB* geni ve *K. phaffii*'ye ait *Pdi* geni, spesifik primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendiğinde, beklenen boyutta bant uzunlukları gözlemlendi (*CalB* geni için 1038 bp iken, *Pdi* geni için 1566 bp'dir) (Şekil 17).

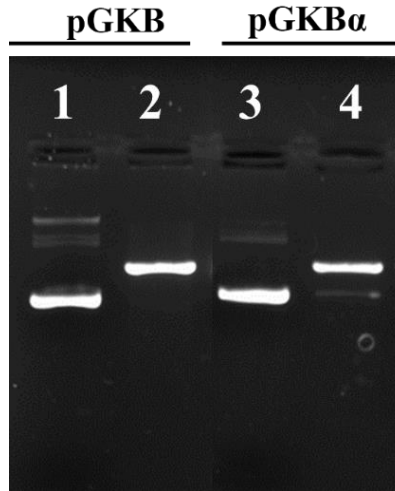


Şekil 17. PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

*(M: DNA markır; 1 ve 2 no'lu kuyular; sırasıyla, *CalB* ve *Pdi* genlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünlere ait bantları göstermektedir.)

Plazmit DNA'ların (pGKB ve pGKBα) kesilmesi ve görüntülenmesi

Spesifik enzimlerle muamele edilen plazmit DNA'ların kesilip kesilmediğini teyit etmek için hem halkasal yapıdaki plazmit DNA'lar hem de lineer hâle getirilen DNA'lar, agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntülendi. Agaroz jel elektroforez görüntüsü incelendiğinde plazmit DNA'ların kesildiği teyit edildi (Şekil 18).

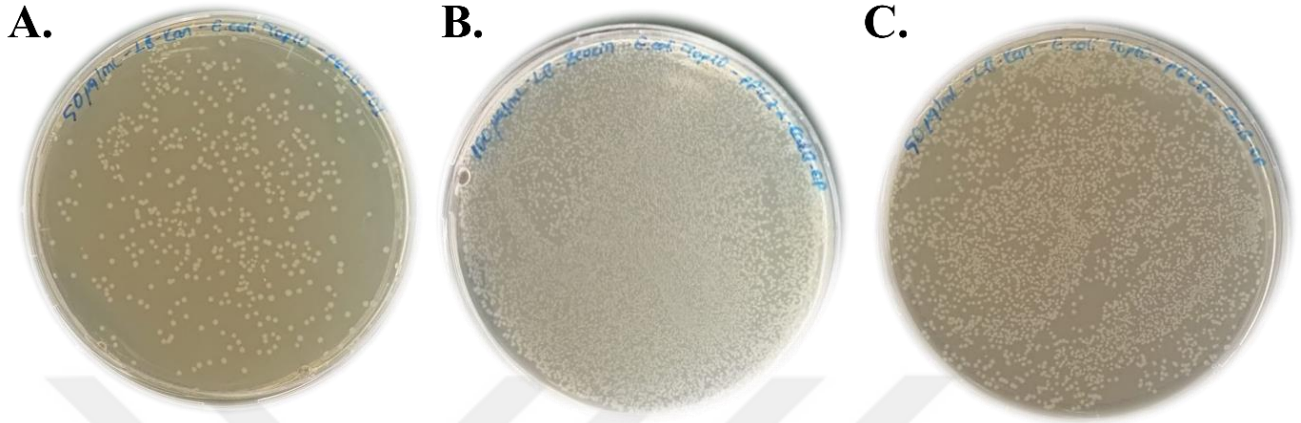


Şekil 18. Plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

*(1 ve 3 no'lu kuyular; kesilmemiş, 2 ve 4 no'lu kuyular; kesilmiş DNA'lara ait bantları göstermektedir.)

***E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinin transformasyonu**

Ligasyon reaksiyonu sonrası elde edilen ürünler, ısı şoku ile *E. coli* hücrelerine transfer edildikten sonra antibiyotik içeren seçim plakalarına yayılarak gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri Şekil 19’da gösterildi.

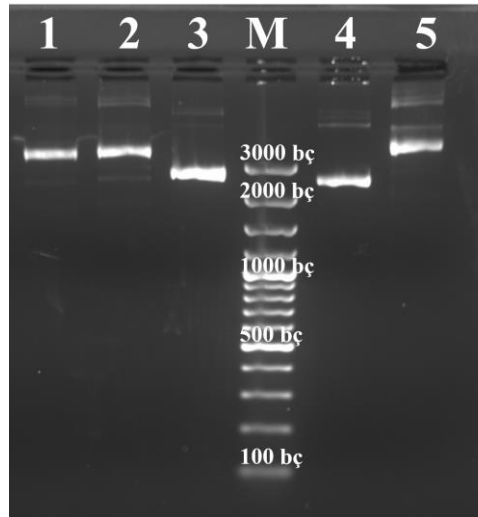


Şekil 19. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonilerine ait plaka görüntüsü

*(A; pGKB-PDI, B; pPICZαA-CalB ve C; pGKBα-CalB transfer edilen bakteri kolonileri.)

Muhtemel rekombinant plazmit DNA’ların izolasyonu ve PCR işlemi

Transformasyondan sonra antibiyotik içeren seçim plakalarında yetişen bakteri kolonilerinden birer adet seçildi ve LB sıvı besiyerinde büyütüldükten sonra plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntülendi (Şekil 20).

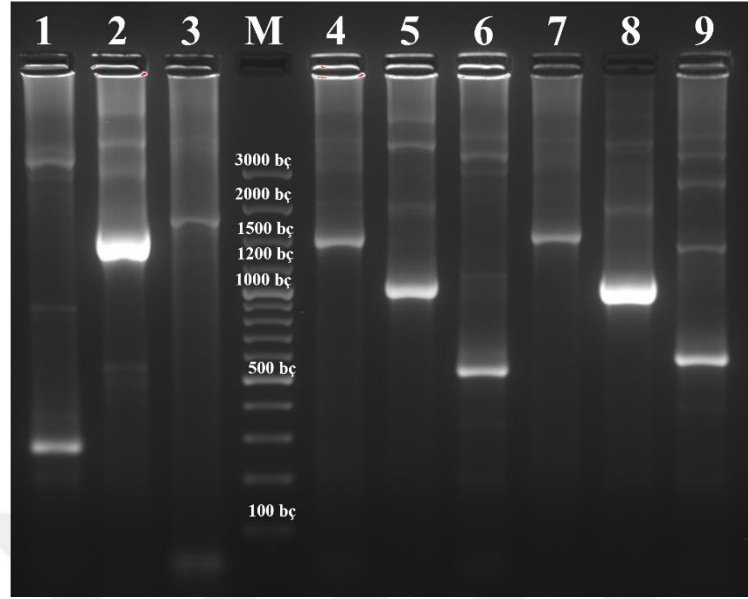


Şekil 20. Saf olarak elde edilen plazmit DNA’ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

*(M: DNA markır; 1, 2, 3, 4 ve 5 no’lu kuyular; sırasıyla pPICZαA-CalB, pGKBα-CalB, pGKBα, pGKB ve pGKB-PDI’ya ait bantları göstermektedir.)

Saflaştırılan plazmit DNA’lar PCR’da kullanıldı. Gen ve plazmit DNA’lara ait spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri agaroz jel

elektroforezinde yürütüldü ve jel, UV görüntüleme cihazında görüntüledi. Görüntüleme sonucu ürünlerin beklenen uzunlukta bant verdiği gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 21. Plazmit DNA'lara ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

*(M: DNA markır; 1: GAP-F ve 3'AOX-R ile amplifiye edilen pGKB (276 bç), 2: PDI-F ve PDI-R ile amplifiye edilen pGKB-PDI (1566 bç), 3: GAP-F ve 3'AOX-R ile amplifiye edilen pGKB-PDI (1825 bç), 4: GAP-F ve 3'AOX-R ile amplifiye edilen pGKB α -CalB (1507 bç), 5: CalB-F ve CalB-R ile amplifiye edilen pGKB α -CalB (1038 bç), 6: GAP-F ve 3'AOX-R ile amplifiye edilen pGKB α (551 bç), 7: 5'AOX-F ve 3'AOX-R ile amplifiye edilen pPICZ α A-CalB (1558 bç), 8: CalB-F ve CalB-R ile amplifiye edilen pPICZ α A-CalB (1044 bç), 9: 5'AOX-F ve 3'AOX-R ile amplifiye edilen pPICZ α A (589 bç)

Muhtemel rekombinant plazmitlerin dizi analizi

Transformasyon sonucu seçilen kolonilere ait plazmitlerin dizi analizi işlemi sonucu elde edilen nükleotid dizileri, referans alınan *Pdi* ve kodon optimize edilen *CalB* genlerinin nükleotid dizileri ile blastlandığında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benzerliklerin her iki plazmitte de %100 olduğu görüldü (Şekil 22 ve Şekil 23). Elde edilen rekombinant plazmit DNA'lar sırası ile pGKB-PDI ve pGKB α -CalB olarak adlandırıldı.

Sequence ID: Query_2711081 Length: 1554 Number of Matches: 2
Range 1: 1 to 1030

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1903 bits(1030)	0.0()	1030/1030(100%)	0/1030(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ATGCAATTCAACTGGGATATAAAACGTGGCAAGTATTTTGTCCGCTCTCACACTAGCA	60			
Sbjct 1	ATGCAATTCAAC TGGGATATAAAACGTGGCAGATATTTTGTCCGCTCTCACACTAGCA	60			
Query 61	CAAGCAAGTGATCAGGAGGCTATTGCTCCAGAGGACTCTCATGTCTCAAAATGACTGAA	120			
Sbjct 61	CAAGCAAGTGATCAGGAGGCTATTGCTCCAGAGGACTCTCATGTCTCAAAATGACTGAA	120			
Query 121	GCCACTTTTGAGTCTTTTATCACCAGTAATCTCAGCTTTTGGCAGAGTTTTTGGCCCT	180			
Sbjct 121	GCCACTTTTGAGTCTTTTATCACCAGTAATCTCAGCTTTTGGCAGAGTTTTTGGCCCT	180			
Query 181	TGGTGTGGTCACTGAAGAAGTTGGGCCCTGAACCTGTTTCTGCTGCCAGATCTTAAG	240			
Sbjct 181	TGGTGTGGTCACTGAAGAAGTTGGGCCCTGAACCTGTTTCTGCTGCCAGATCTTAAG	240			
Query 241	GACAATGAGCAGGTTAAGATTGCTCAAAATGATTGTACGGAGGAGAAGGAATATGTCAA	300			
Sbjct 241	GACAATGAGCAGGTTAAGATTGCTCAAAATGATTGTACGGAGGAGAAGGAATATGTCAA	300			
Query 301	GGCTACGAAATTAAGGGTATCTCACTTTGAAGGTGTTCATGGTGAAGTTGAGGTCCCA	360			
Sbjct 301	GGCTACGAAATTAAGGGTATCTCACTTTGAAGGTGTTCATGGTGAAGTTGAGGTCCCA	360			
Query 361	AGTGACTATCAAGGTCAAGACAGAGCCAAAGCATTTGACGATATATGCTAAAGCAGAGT	420			
Sbjct 361	AGTGACTATCAAGGTCAAGACAGAGCCAAAGCATTTGACGATATATGCTAAAGCAGAGT	420			
Query 421	TTACCCCTGTGTCAGTGAATCAATGCAACCAAGATTAGACGACACAATGCCGAGGCA	480			
Sbjct 421	TTACCCCTGTGTCAGTGAATCAATGCAACCAAGATTAGACGACACAATGCCGAGGCA	480			
Query 481	AAAGAGCCGCGTATGTCAGTACTACCGGAAGTGCATCCAACTTGGAACTAAACCC	540			
Sbjct 481	AAAGAGCCGCGTATGTCAGTACTACCGGAAGTGCATCCAACTTGGAACTAAACCC	540			
Query 541	ACATTTTACGGAGTTGCCGGTACTCTCAGAGAGAATTCACCTTTGTCTCCACTAAGTCT	600			
Sbjct 541	ACATTTTACGGAGTTGCCGGTACTCTCAGAGAGAATTCACCTTTGTCTCCACTAAGTCT	600			
Query 601	ACTGATTATGCCCCAAAATACACTAGCGACTGCACTCTGCCATTGTCTGTGACAGCT	660			
Sbjct 601	ACTGATTATGCCCCAAAATACACTAGCGACTGCACTCTGCCATTGTCTGTGACAGCT	660			
Query 661	GGCAGGAACCTAGTGTGTTTACTCTGGTGGAGGTTAGATGAGACTCAATTTGGTGCACTGG	720			
Sbjct 661	GGCAGGAACCTAGTGTGTTTACTCTGGTGGAGGTTAGATGAGACTCAATTTGGTGCACTGG	720			
Query 721	ATTGATATTGAGTCAAACTCTATTGAGGACATGACGGATCCACCTTCAAAATCATAT	780			
Sbjct 721	ATTGATATTGAGTCAAACTCTATTGAGGACATGACGGATCCACCTTCAAAATCATAT	780			
Query 781	GCTGAAGCTAACTCCCTTAGCCTACTATTCTATGAGAACAAGAAACAACTGCTGCT	840			
Sbjct 781	GCTGAAGCTAACTCCCTTAGCCTACTATTCTATGAGAACAAGAAACAACTGCTGCT	840			
Query 841	GCTGCCGATATTATTAACCTTTTGCATAAGAGCAACGTGGCAAAATTAACCTTTGTGGC	900			
Sbjct 841	GCTGCCGATATTATTAACCTTTTGCATAAGAGCAACGTGGCAAAATTAACCTTTGTGGC	900			
Query 901	TTAGATGCCGTTAAATTCGGTAAGCATGCCAAGAACTTAAACATGGATGAAGAGAAATCT	960			
Sbjct 901	TTAGATGCCGTTAAATTCGGTAAGCATGCCAAGAACTTAAACATGGATGAAGAGAAATCT	960			
Query 961	CCTCTATTGTCTATTCATGATTGGTGAGCAACAAGAAAGTTTGGAGTCTCTCAAGACCAA	1020			
Sbjct 961	CCTCTATTGTCTATTCATGATTGGTGAGCAACAAGAAAGTTTGGAGTCTCTCAAGACCAA	1020			
Query 1021	GAATTGACGA 1030				
Sbjct 1021	GAATTGACGA 1030				

Range 2: 1031 to 1554

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
968 bits(524)	0.0()	524/524(100%)	0/524(0%)	Plus/Minus	
Query 1031	ACAAAGATGTGACCGAGCTGATTGAGAAATTCATCGAGGAGAGGCAGAACCAATTGTGA	1090			
Sbjct 1554	ACAAAGATGTGACCGAGCTGATTGAGAAATTCATCGAGGAGAGGCAGAACCAATTGTGA	1495			
Query 1091	AATCAGAGCCCAATTCAGAAATTCAGAGAGAGAAAGTCTTCAAGCTAGTCGGAAAGGCC	1150			
Sbjct 1494	AATCAGAGCCCAATTCAGAAATTCAGAGAGAGAAAGTCTTCAAGCTAGTCGGAAAGGCC	1435			
Query 1151	ACGATGAAGTTGCTTCGATGAATCTAAAGATGTTCTAGTCAAGTACTACGCCCTTGGT	1210			
Sbjct 1434	ACGATGAAGTTGCTTCGATGAATCTAAAGATGTTCTAGTCAAGTACTACGCCCTTGGT	1375			
Query 1211	GTGGTCACTGAAGAGAATGGCTCTGCTTATGAGGAATGGCTACTCTTACGCCAATG	1270			
Sbjct 1374	GTGGTCACTGAAGAGAATGGCTCTGCTTATGAGGAATGGCTACTCTTACGCCAATG	1315			
Query 1271	ATGAGGATGCCTCTTCAAAAGTTGTGATTGCAAACTTGATCACACTTTGAACGATGTCG	1330			
Sbjct 1314	ATGAGGATGCCTCTTCAAAAGTTGTGATTGCAAACTTGATCACACTTTGAACGATGTCG	1255			
Query 1331	ACACGTTGATATTCAAGGTTATCTACTTTGATCCTTTATCAGCTGGTGATAATCCA	1390			
Sbjct 1254	ACACGTTGATATTCAAGGTTATCTACTTTGATCCTTTATCAGCTGGTGATAATCCA	1195			
Query 1391	ATCCTCAACTGTATGATGGATCTCGTGAACCTAGAACTATTGGCTGAGTTTGAAGAGAGA	1450			
Sbjct 1194	ATCCTCAACTGTATGATGGATCTCGTGAACCTAGAACTATTGGCTGAGTTTGAAGAGAGA	1135			
Query 1451	GAGGAACCCACAAGTGGATGCCCTAGCACTCAGACAGCTCGAGGAAGAAAGGAAGCTG	1510			
Sbjct 1134	GAGGAACCCACAAGTGGATGCCCTAGCACTCAGACAGCTCGAGGAAGAAAGGAAGCTG	1075			
Query 1511	AAGAAGAAGCTGAAGGTGAGGCAGAGCTCACCAGAGCTTTAA 1554				
Sbjct 1074	AAGAAGAAGCTGAAGGTGAGGCAGAGCTCACCAGAGCTTTAA 1031				

Şekil 22. pGKB-PDI’ya ait nükleotid dizisinin blast sonucu

*(Query: K. phaffii’ye ait *Pdi* geninin yayınlanmış dizisi, Sbjct: Elde edilen rekombinant DNA’daki *Pdi* geninin Sanger dizileme sonucu.)

Sequence ID: Query_3765133 Length: 1026 Number of Matches: 2
Range 1: 1 to 636

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1175 bits(636)	0.0()	636/636(100%)	0/636(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ATGAAGTTGTGTCTTTGACTGGTGTGCTGGTGTGTTTGGCTACTTGGCTGCTACCT	60			
Sbjct 1	ATGAAGTTGTGTCTTTGACTGGTGTGCTGGTGTGTTTGGCTACTTGGCTGCTGCTACCT	60			
Query 61	CCCTTTGGTTAAGCGTTTGCCCTCTGCTTCTGACCCAGCTTTTCTCAGCCAAAGCTGTT	120			
Sbjct 61	CCCTTTGGTTAAGCGTTTGCCCTCTGCTTCTGACCCAGCTTTTCTCAGCCAAAGCTGTT	120			
Query 121	TGGATGCTGGTTTGAAGTGAAGGCTGCTTCTCTCTCTGTTTCTAAGCCAATATTG	180			
Sbjct 121	TGGATGCTGGTTTGAAGTGAAGGCTGCTTCTCTCTCTGTTTCTAAGCCAATATTG	180			
Query 181	TGGTTCCAGGTACCGGTACAACCGGTCACAGCTTTTGTGATCTAAGTGGATCCCTTG	240			
Sbjct 181	TGGTTCCAGGTACCGGTACAACCGGTCACAGCTTTTGTGATCTAAGTGGATCCCTTG	240			
Query 241	TCTACTCAGTTGGGTTACACCCCTTGTGGATCTCTCTCCCCCTTTATGTTGAACGAT	300			
Sbjct 241	TCTACTCAGTTGGGTTACACCCCTTGTGGATCTCTCTCCCCCTTTATGTTGAACGAT	300			
Query 301	ACCCAGGTAAATACAGAATACATGGTTAATGCTAATACCGCTTTGTATGCTGGTCTGGT	360			
Sbjct 301	ACCCAGGTAAATACAGAATACATGGTTAATGCTAATACCGCTTTGTATGCTGGTCTGGT	360			
Query 361	AATAACAGTTGGCTGTTTGGCTGGTCTCAGGGTGGTTGGTTGCTCAATGGGGTTG	420			
Sbjct 361	AATAACAGTTGGCTGTTTGGCTGGTCTCAGGGTGGTTGGTTGCTCAATGGGGTTG	420			
Query 421	ACTTTTTTCCCATCTATCAGGTCTAAGGTTGACAGGTTGATGGCTTTTGTCTCGATTAC	480			
Sbjct 421	ACTTTTTTCCCATCTATCAGGTCTAAGGTTGACAGGTTGATGGCTTTTGTCTCGATTAC	480			
Query 481	AAGGGTACCGTTTGGCTGGTCCCTTGGACGCTTTGGCTGTTTCTGCTCCATCTGTTGG	540			
Sbjct 481	AAGGGTACCGTTTGGCTGGTCCCTTGGACGCTTTGGCTGTTTCTGCTCCATCTGTTGG	540			
Query 541	CAGCAAAACACGGGTTCTGCTTTGACCACTGCTTGGCTAACGCTGGTGGTTTGAACAG	600			
Sbjct 541	CAGCAAAACACGGGTTCTGCTTTGACCACTGCTTGGCTAACGCTGGTGGTTTGAACAG	600			
Query 601	ATAGTTCCAAACAACAACTTGTATTCTGCTACGGAT 636				
Sbjct 601	ATAGTTCCAAACAACAACTTGTATTCTGCTACGGAT 636				

Range 2: 637 to 1026

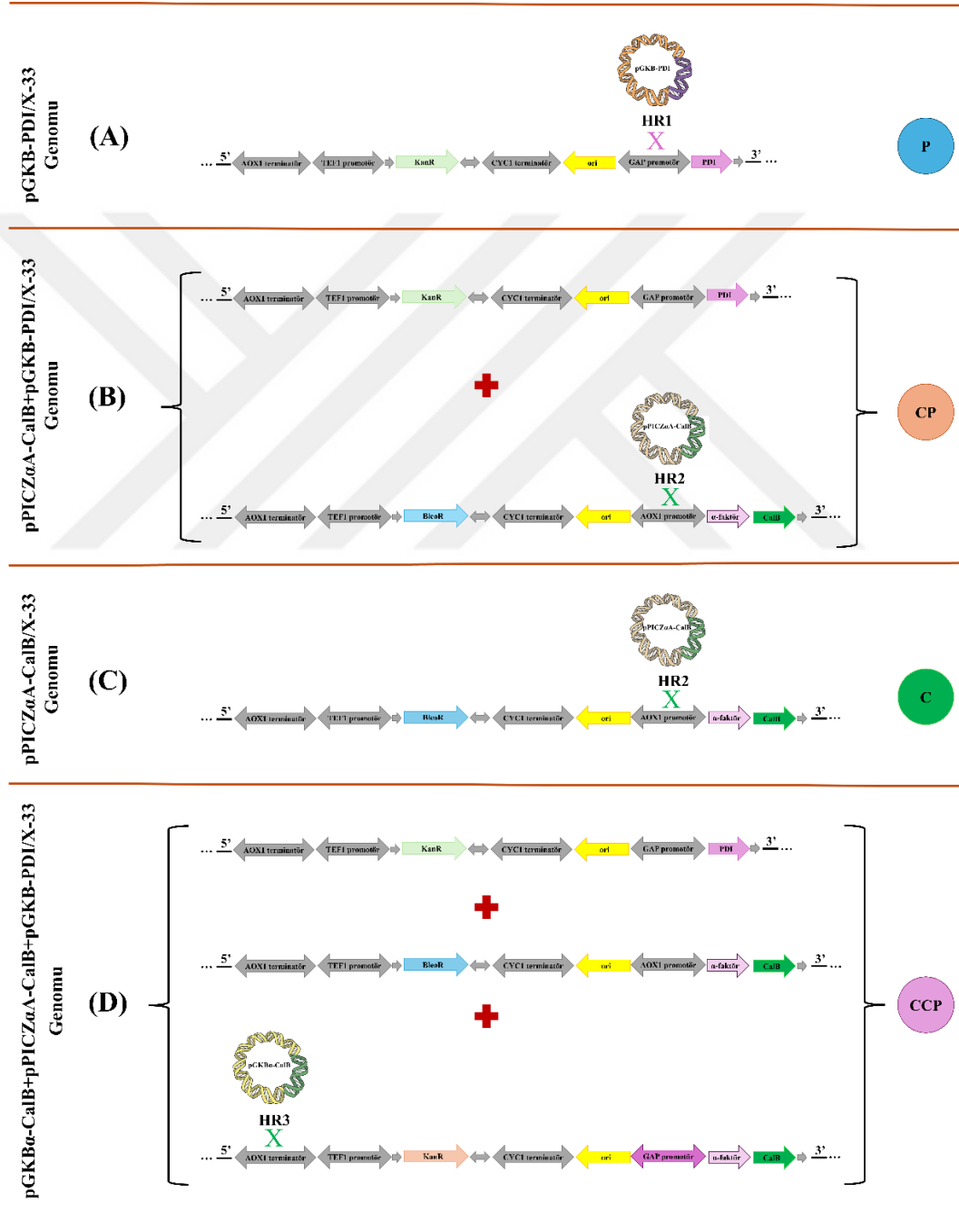
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
721 bits(390)	0.0()	390/390(100%)	0/390(0%)	Plus/Minus	
Query 637	GAGATAGTTACGCCCCAAGTTCTAACTCTCCTTTGGATTCTCTATTGTTTAAATGGT	696			
Sbjct 1026	GAGATAGTTACGCCCCAAGTTCTAACTCTCCTTTGGATTCTCTATTGTTTAAATGGT	967			
Query 697	AAAAATGTTCAAGCTCAGGCTGTGTTGGTGCATGTTGTTATAGATCAGCTGGTCTCT	756			
Sbjct 966	AAAAATGTTCAAGCTCAGGCTGTGTTGGTGCATGTTGTTATAGATCAGCTGGTCTCT	907			
Query 757	TGACTTCTCAGTTCTCTTATGTTGGTGGTCTGCTTTGGCTTCTACAACTGGTCAA	816			
Sbjct 906	TGACTTCTCAGTTCTCTTATGTTGGTGGTCTGCTTTGGCTTCTACAACTGGTCAA	847			
Query 817	GCTCGTTCTGCTGACTATGGTATTACTGATTGTAACCTTTGCTCTGAATGATTGACC	876			
Sbjct 846	GCTCGTTCTGCTGACTATGGTATTACTGATTGTAACCTTTGCTCTGAATGATTGACC	797			
Query 877	CCAGAACAGAAGGTTGCTGCTGCTTTGTTGGTCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	936			
Sbjct 786	CCAGAACAGAAGGTTGCTGCTGCTTTGTTGGTCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	727			
Query 937	GTGCTTAAGCAAAATGCGAACAGATTTGATGCCATATGCTAGACCTTTGCTGCTTGGT	996			
Sbjct 726	GTGCTTAAGCAAAATGCGAACAGATTTGATGCCATATGCTAGACCTTTGCTGCTTGGT	667			
Query 997	AAAAGGACATGCTCTGGTATAGTTACTCCT 1026				
Sbjct 666	AAAAGGACATGCTCTGGTATAGTTACTCCT 637				

Şekil 23. pGKBα-CalB’ye ait nükleotid dizisinin blast sonucu

*(Query: Kodon optimize *CalB* genine ait dizi, Sbjct: Elde edilen rekombinant DNA’daki *CalB* geninin Sanger dizileme sonucu.)

Rekombinant *K. phaffii* Hücrelerinin Elde Edilmesi

Dizi analizi ile doğrulanan rekombinant DNA'lar lineer hâle getirildikten sonra maya hücrelerinin genomuna entegrasyonu için kompetan hâle getirilen *K. phaffii* hücrelerine transfer edildi (Unver et al., 2021). Elde edilen rekombinant plazmit DNA'ların *K. phaffii* hücrelerine sıralı bir şekilde transfer edilmesiyle farklı gen kombinasyonlarına sahip rekombinant mayalar elde edildi. Rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin elde edilmesi ve isimlendirilmesine ait şematik görüntü Şekil 24'te verildi.

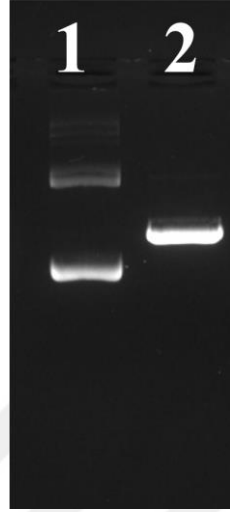


Şekil 24. Rekombinant *K. phaffii* hücrelerinin elde edilmesine ait şematik görüntü

*(HR1, HR2 ve HR3 sırasıyla; pGKB-PDI, pPICZαA-CalB ve pGKBα-CalB plazmit DNA'larının *K. phaffii* hücrelerinin genomuna homolog rekombinasyon ile entegrasyonunu ifade etmektedir.)

pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi

Rekombinant pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi için pGKB-PDI, FastDigest *Xma*II (*Avr*II) enzimi ile kesilerek lineer hâle getirildi. Kesim reaksiyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü incelendiğinde rekombinant plazmitlerin kesildiği teyit edildi (Şekil 25).



Şekil 25. Agaroz jel elektroforez görüntüsü

*(1 ve 2 no'lu kuyular; sırasıyla kesilmemiş ve kesilmiş pGKB-PDI'ya ait bantları göstermektedir.)

Lineer rekombinant plazmitin K. phaffii hücrelerine transfer edilmesi

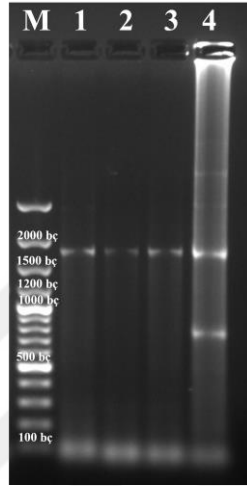
K. phaffii hücrelerine gen aktarımı gerçekleştirildikten sonra transformantları içeren kültür sıvısından 100 µl alınarak 200 µg/ml genetisin içeren YPD katı plakalarına yayıldı. Yaklaşık 72 saat sonra çekilen seçim plakalarının görüntüsü Şekil 26'da verildi.



Şekil 26. pGKB-PDI/X-33 transformantlarına ait plaka görüntüsü

Pozitif maya transformantlarının doğrulanması

Rekombinant plazmitin maya genomuna doğru bir şekilde entegre olup olmadığını tespit etmek amacıyla, rastgele seçilen kolonilere ait genomik DNA'lar kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi. PDI-F ve 3'AOX-R primerleri ile elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntülendi. Görüntüleme sonucu ürünlerin beklenen uzunlukta (1796 bp) bant verdiği gözlemlendi (Şekil 27).

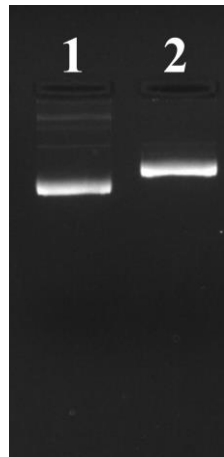


Şekil 27. PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü

*(M: DNA markır; 1, 2 ve 3 no'lu kuyular pGKB-PDI/X-33 kolonilerine, 4 no'lu kuyu ise pGKB-PDI'ya (pozitif kontrol) ait bantları göstermektedir.)

pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZ α A-CalB/X-33 hücrelerinin elde edilmesi

Rekombinant pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZ α A-CalB/X-33 hücrelerinin elde edilmesi için pPICZ α A-CalB, FastDigest MssI (*PmeI*) enzimi ile kesilerek lineer hâle getirildi. Ardından, agaroz jel elektroforezinde yürütülen kesim reaksiyon ürünlerine ait jel görüntüsü incelendiğinde rekombinant plazmitlerin kesildiği teyit edildi (Şekil 28).

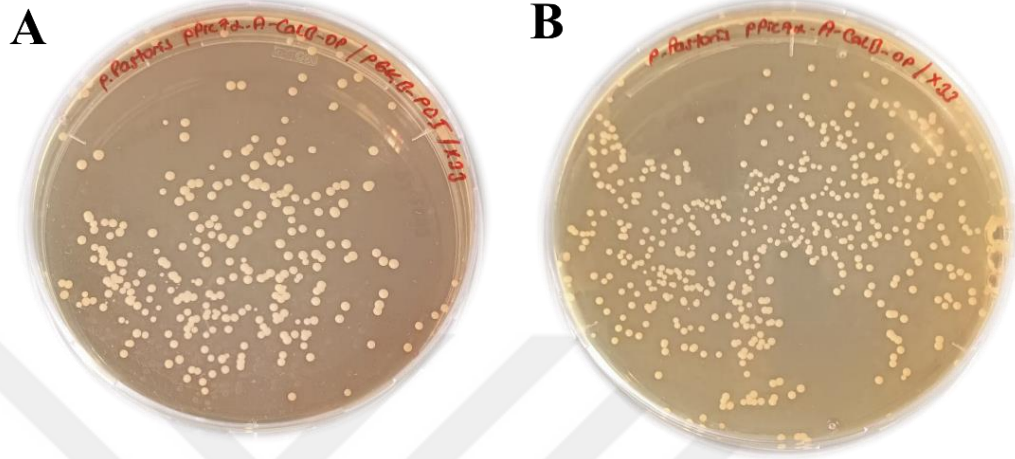


Şekil 28. Agaroz jel elektroforez görüntüsü

*(1 ve 2 no'lu kuyular; sırasıyla kesilmemiş ve kesilmiş pPICZ α A-CalB'ye ait bantları göstermektedir.)

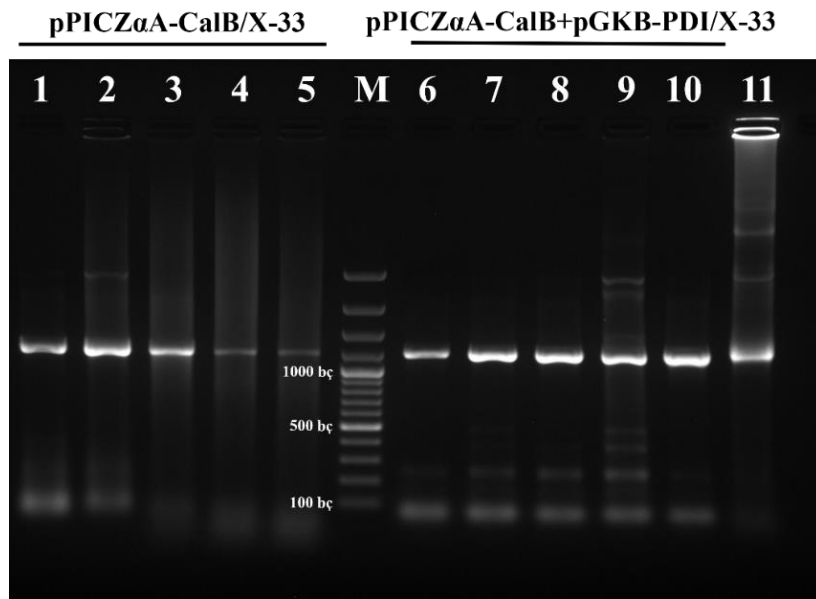
Lineer rekombinant plazmitin pGKB-PDI/X-33 ve *K. phaffii* hücrelerine transfer edilmesi

K. phaffii hücrelerine gen aktarımı gerçekleştirildikten sonra transformantları içeren kültür sıvısından 100 µl alınarak 100 µg/ml zeosin içeren YPD katı plakalarına yayıldı. Yaklaşık 72 saat sonra çekilen seçim plakalarının görüntüsü Şekil 29’da verildi.



Şekil 29. A: pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve B: pPICZαA-CalB/X-33 transformantlarına ait plaka görüntüsü

Pozitif maya transformantlarının doğrulanması için rastgele seçilen kolonilere ait genomik DNA’lar kullanılarak PCR gerçekleştirildi. CalB-F ve 3’AOX-R primerleri ile elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Görüntüleme sonucu ürünlerin beklenen uzunlukta (1205 bp) bant verdiği gözlemlendi (Şekil 30).



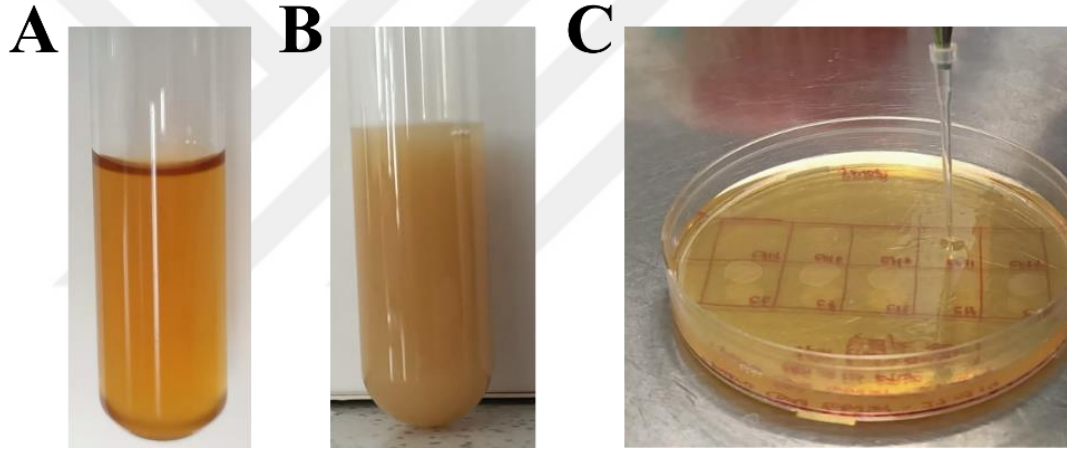
Şekil 30. PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü

* (M: DNA markırı; 1, 2, 3, 4 ve 5 no’lu kuyular sırasıyla; pPICZαA-CalB/X-33 kolonilerine ait bantları gösterirken 6, 7, 8, 9 ve 10 no’lu kuyular sırasıyla; pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerine ait bantları göstermektedir. 11 no’lu kuyu ise pPICZαA-CalB’ye (pozitif kontrol) ait bantı göstermektedir.)

PTVA ile çok kopyalı klonların seçilimi

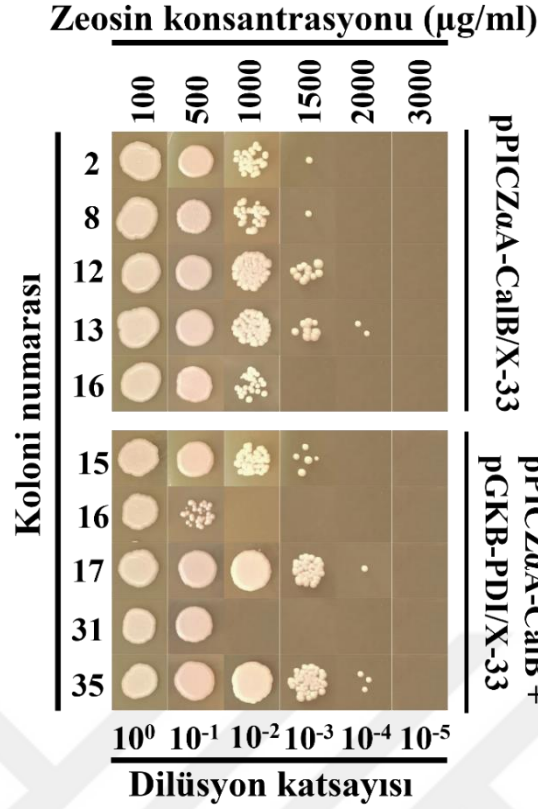
K. phaffii mayasında rekombinant protein ekspresyonunun verimini artırmak için aynı kökenli çoklu gen kopya klonları sıklıkla kullanılmaktadır. Aw ve arkadaşlarının (2016) geliştirdikleri sıvı PTVA yönteminde, geleneksel yöneme nazaran 45 gün yerine 12 günde ve yaklaşık yarı maliyetle elde edilebilen çok kopyalı klonlar oluşturmak mümkün hâle gelmektedir (Aw and Polizzi, 2016).

PCR işlemi ile doğrulanan pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 ve pPICZ α A-CalB/X-33 transformantlarına ait koloniler kullanılarak PTVA analizi gerçekleştirildi. 100-3000 μ g/ml konsantrasyonlarda zeosin antibiyotiği içeren YPD sıvı besiyerleri sıralı olarak kullanıldı. Her 24 saatlik inkübasyonun ardından toplanan kültür sıvıları ile spotlama testi yapıldı. PTVA ile çok kopyalı klonların seçilimine ve spotlama testine ait plakaların 48 saat inkübasyon sonrası çekilen görüntüleri Şekil 31 ve Şekil 32’de verildi.



Şekil 31. PTVA ile çok kopyalı klonların seçilimi ve spotlama testinin gösterimi

*(A: 0. saat, B: 168. saat inkübasyon sonrası kültür sıvısına ait tüp görüntüsü, C: Dilüsyon sonrası spotlama testine ait plaka görüntüsü.)



Şekil 32. PTVA ile çok kopyalı klonların seçilimine ait plaka görüntüsü

*(pPICZαA-CalB/X-33 ve pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerine ait spotları göstermektedir.)

Rekombinant Lipazın Aktivite Analizi ve Görüntülenmesi

PTVA ile çok kopyalı klonların seçiliminde uygulanan en yüksek dozda büyüme gösteren koloniler yeniden YPD agar plakasına ekilerek büyütüldü. Daha sonra, ön kültüre alınarak büyütülen hücreler üretim kültürüne inoküle edilerek 120 saat boyunca rCalB enziminin üretilmesi sağlandı. İnkübasyonun ardından, lipaz içeren süpernatantlar toplanarak 10 kat konsantre edildi ve farklı koloniler tarafından üretilen lipaz enziminin aktivite analizi yapıldı.

Lipaz enziminin aktivitesi iki ayrı yöntemle değerlendirildi. Bunlardan biri, lipaz enzime spesifik substratlardan biri olan tribütirin agar içeren “kuyu difüzyon testi” iken diğeri, substrat olarak p-nitrofenil palmitatın kullanıldığı “spektrofotometrik analiz”dir.

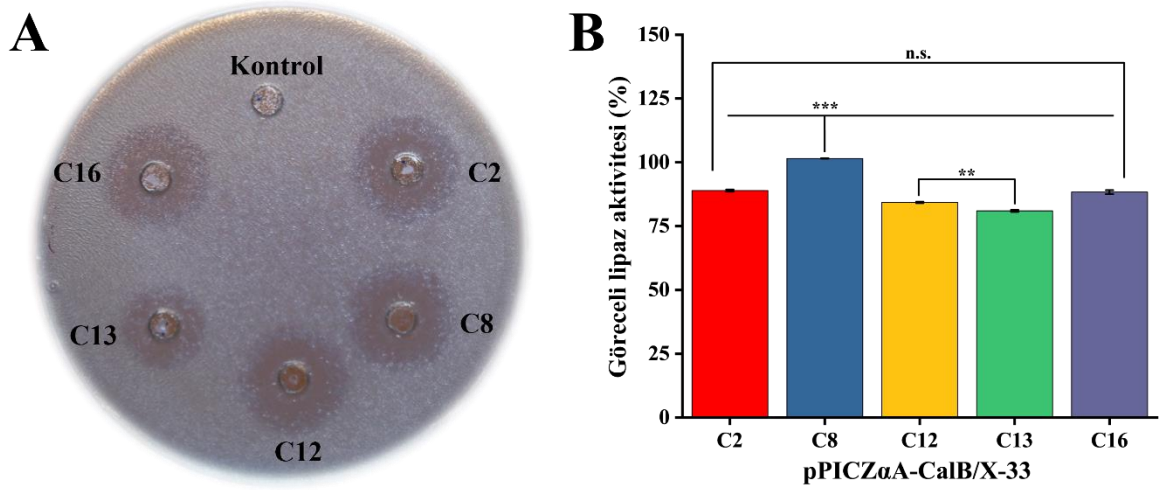
Tribütirin, *Candida antarctica* lipaz B enziminin aktivitesini belirlemek için kullanılan en iyi substrat olarak bilinmektedir (Kirk and Christensen, 2002). Kuyulardaki lipaz aktivitesi, opak tribütirin emülsiyonundaki berrak bölge (zon) ile tanımlanmaktadır (Xu et al., 2010) Su ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada CalB enzimi, MD (%4×10⁻⁵ biotin, %1,34 YNB, %2 dekstrozu, %1,5 agar) plakalarında görüntülendiğinde maya kolonilerinin etrafında bir zon gözlemlenirken, kontrol transformantlarının etrafında herhangi bir zon gözlemlenmemiştir (Su et al., 2010).

Bu tez çalışmasında da, tribütirin agar plakalarında rCalB enzimini içeren kuyuların etrafında bir zon gözlemlenirken, *CalB* genini taşımayan hücreler tarafından üretilen kültür sıvısını içeren (kontrol) kuyuların etrafında zon gözlemlenmedi (Şekil 33 A, Şekil 34 A, Şekil 35 A, Şekil 41 A, Şekil 45 B ve Şekil 46 A). Plakalardaki lipaz aktivitesi, inkübasyon sonunda kuyuların etraflarında oluşan berrak zonlar ölçülerek değerlendirildi (J. K. Yang et al., 2013; X. Yang et al., 2021). Tribütirin agar plaka analizine ait görsellerin nicel analizi ImageJ programı kullanılarak gerçekleştirildi. pPICZ α A-CalB/X-33 kolonilerinde üretilen lipaz örneklerine ait ortalama zon çapları sırasıyla; 19,24 (C2), 20,26 (C8), 18,83 (C12), 15,54 (C13) ve 18,92 mm (C16) olarak ölçüldü (Şekil 33 A). pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerinde üretilen lipaz örneklerine ait ortalama zon çapları ise sırasıyla; 18,77 (CP15), 16,20 (CP15), 15,68 (CP17), 19,14 (CP31) ve 15,89 mm (CP35) olarak ölçüldü (Şekil 34 A).

Diğer yandan, farklı yağ asidi zincir uzunluklarına sahip *p*-nitrofenil esterlerinin tipik olarak lipaz aktivitesi araştırmalarında substrat olarak kullanıldığı bilinmektedir (Huggins and Lapides, 1947). Bu sebeple tez çalışmasında, *p*-NPP ve rCalB enziminin reaksiyonu sonucu ürün olarak elde edilen *p*-nitrofenol 410 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü (Gilham and Lehner, 2005; Kamel Ariffin and Idris, 2022; Pencreac’h and Baratti, 1996; Winkler and Stuckmann, 1979). Gruplar arasındaki lipaz aktivitesi, 410 nm’de ölçülen absorbans değerleri temel alınarak göreceli aktivite olarak hesaplandı. Göreceli aktivite, salınan *p*-nitrofenol üretiminin yüzdesi olarak gösterildi ve maksimum değer %100 olarak kabul edildi (Tian et al., 2021).

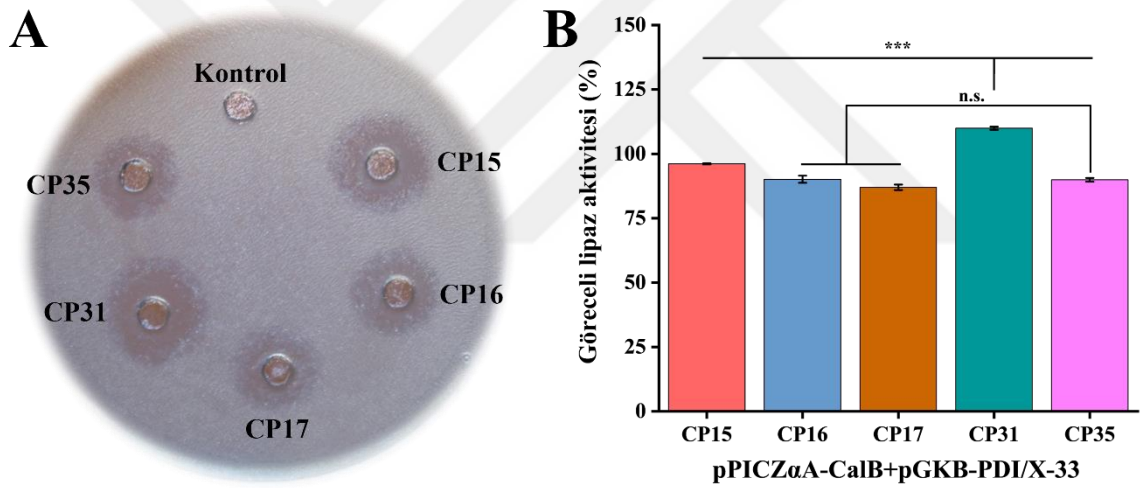
Şekil 33 ve Şekil 34’te verilen lipaz aktivite sonuçlarına göre en yüksek lipaz aktivitesine sahip kolonilerin sırasıyla, C8 ve CP31 olduğu gözlemlendi. Seçilen bu iki koloni için yapılan PTVA analizi (Şekil 32) ve lipaz aktivitesi sonuçları (Şekil 35) birlikte değerlendirildiğinde; C8 kolonisinin direnç gösterdiği antibiyotik dozunun (1500 μ g/ml) CP31 kolonisinin (500 μ g/ml) 3 katı kadar olmasına rağmen (bu durum, C8’in daha fazla *CalB* genini içeren ekspresyon kasetine sahip olduğuna işaret etmektedir) aktivite sonuçlarına göre, her iki koloniyi oluşturan hücreler tarafından üretilen enzim miktarı ve aktivitesi arasında PTVA analizinde görüldüğü gibi büyük bir fark olmadığı söylenebilir (Şekil 35 B). Diğer yandan, yeniden üretime alınan her iki koloniye ait kültür sıvıları ile yapılan tribütirin agar plakasında ortalama zon çapları C8 için 18,41 mm ve CP31 için 18,91 mm olarak ölçüldü (Şekil 35 A).

Bu durum, PDI varlığında kopya sayısından bağımsız olarak üretilen rCalB enziminin miktarında ve aktivitesinde artış olduğuna işaret etmektedir.



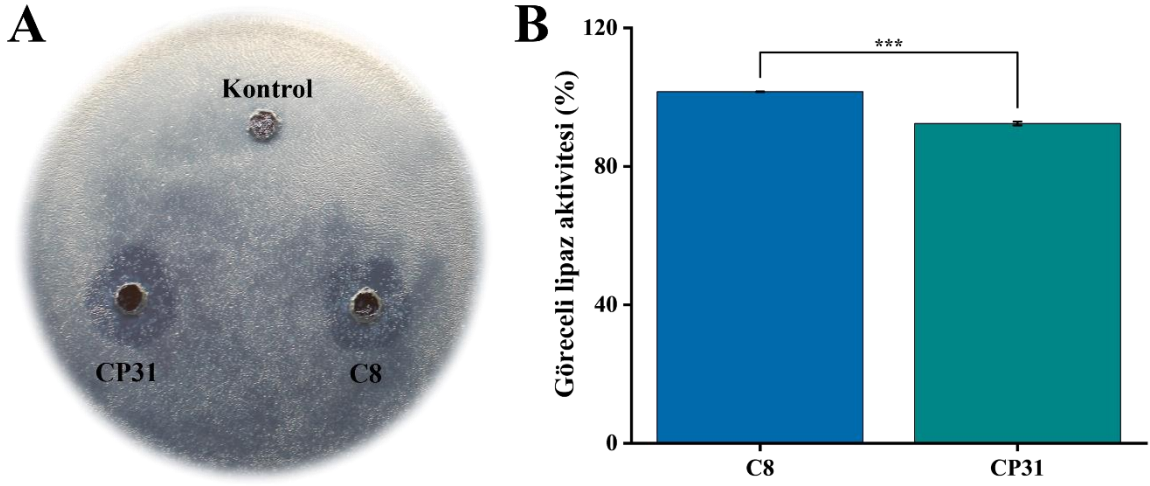
Şekil 33. pPICZαA-CalB/X-33 kolonilerini oluşturan hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları

*(A: Tribütirin agar plaka görüntüsü; B: Göreceli lipaz aktivitesi (%) sonucu.)



Şekil 34. pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerini oluşturan hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları

*(A: Tribütirin agar plaka görüntüsü; B: Göreceli lipaz aktivitesi (%) sonucu.)



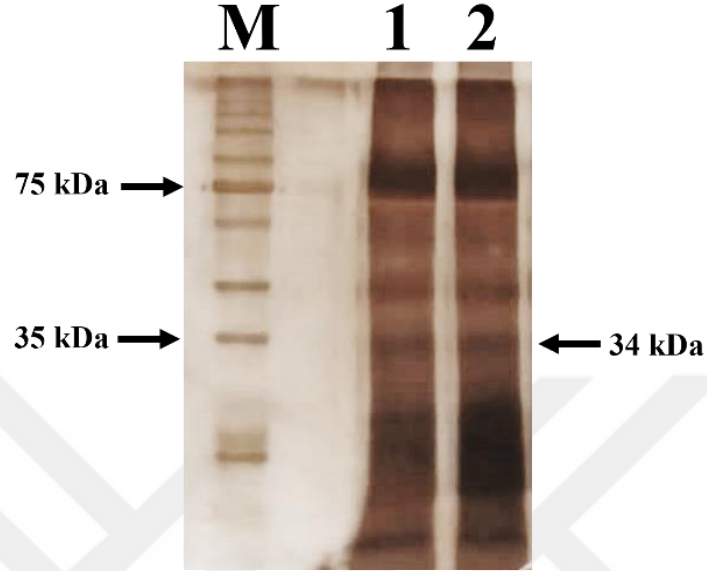
Şekil 35. C8 ve CP31 kolonilerini oluşturan hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları

*(A: Tribütirin agar plaka görüntüsü; B: Göreceli lipaz aktivitesi (%) sonucu).

Diğer yandan, seçilen C8 ve CP31 hücrelerinde üretilen örneklerde rCalB enziminin varlığını teyit etmek için SDS-PAGE yapıldı. SDS-PAGE, enzim çalışmalarında en çok kullanılan ve proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırma ilkesine dayanan bir elektroforetik yöntemdir (Copeland, 2000). Öncelikle kültür ortamından elde edilen süpernatantlar kullanılarak Bradford tayini yapıldı. Ardından, protein örneklerinden yaklaşık 90 µg alınarak Laemmli tarafından tarif edildiği gibi standart olarak molekül ağırlığı belirlenmiş olan proteinler (10-180 kDa) ile birlikte SDS-PAGE jelinde yürütüldü. Daha sonra, gümüş boyama yöntemi ile protein bantları görünür hâle getirildi (Acar et al., 2023; U.K. Laemmli, 1970). Şekil 36'da verilen gümüş boyama sonucuna ait jel görüntüsü incelendiğinde hem C8 (pPICZαA-CalB/X-33) hem de CP31 (pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33) hücrelerinde literatürle uyumlu olarak yaklaşık 34 kDa molekül ağırlığına sahip rCalB'nin başarıyla üretilerek hücre dışına salgılandığı gözlemlendi.

Kullanılan farklı hücre konakçılarında glikozilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar bazı yapısal modifikasyonlara neden olabilir ve bunlar da üretilen lipazın moleküler ağırlığı, stabilitesi ve özgülüğünde farklılıklara neden olabilir (Romanos, 1995). Gutarra ve diğerleri tarafından elde edilen ve *P. pastoris*'te ifade edilen lipaz B'nin doğal olandan daha fazla glikozile olduğu gösterilmiştir (Gutarra et al., 2011). O-glikozilasyon veya lipidasyon gibi translasyon sonrası modifikasyona atfedilen benzer farklılıklar doğal lipaz ile karşılaştırıldığında, *P. pastoris*'te üretilen rekombinant *Rhizopus oryzae* lipazında gözlenmiştir (Guillén et al., 2011). Robert ve arkadaşları tarafından (2017) yapılan bir çalışmada PGK promotörü altında ifade edilen rLIPB (rekombinant *C. antarctica* lipaz B)'nin moleküler ağırlığının (yaklaşık 36 kDa) AOX ve GAP promotörleri altında ifade edilen enzimin molekül

ağırlığına kıyasla hiçbir fark olmadığı bildirilmiştir (Robert et al., 2017; Rotticci-Mulder et al., 2001; J. K. Yang et al., 2013). Yine, Eom ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada rekombinant *P. pastoris* X-33 suşunda 34 kDa'lık görünür moleküler ağırlığına sahip CalB'nin başarıyla salgılandığı bildirilmiştir (Eom et al., 2013).



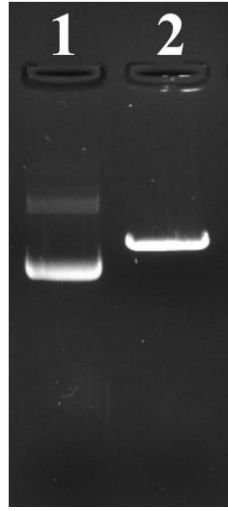
Şekil 36. SDS-PAGE analizine ait gümüş boyama sonucu

*(M: Protein markır; 1 ve 2. kuyular sırasıyla; C8 ve CP31 kolonilerinde ifade edilen lipaz enzimine ait bantları göstermektedir.)

pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi

Çoklu kopya entegrasyonunun lipaz üretimi ve aktivitesi üzerine olan etkisini görmek amacıyla, *Pdi* genini içeren CP31 kolonisinin (pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33) çok miktarda üretilmesi muhtemel olan rCalB'nin doğru bir şekilde katlanmasında ve hücre dışına salınımında C8 kolonisine (pPICZ α A-CalB/X-33) göre daha etkili olacağı düşünüldüğünden CP31 kolonisini oluşturan hücrelere ikinci bir *CalB* geni (pGKB α -CalB) transfer edildi.

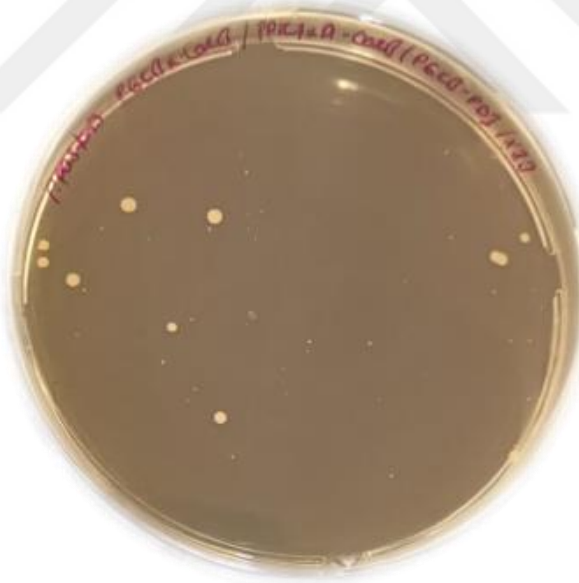
Rekombinant pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin elde edilmesi için pGKB α -CalB, *Bsi*WI-HF enzimi ile kesilerek lineer hâle getirildi. Ardından, agaroz jel elektroforezinde yürütülen kesim reaksiyon ürünlerine ait jel görüntüsü incelendiğinde plazmitlerin kesildiği teyit edildi (Şekil 37).



Şekil 37. Agaroz jel elektroforez görüntüsü

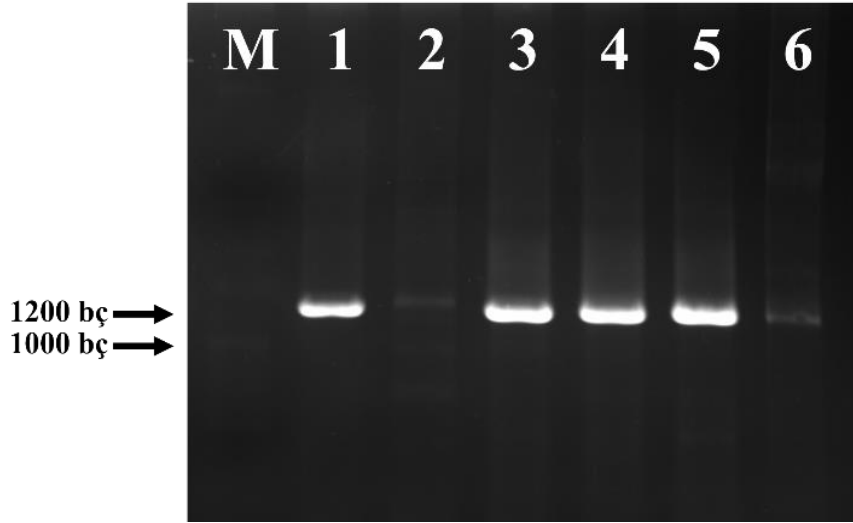
*(1 ve 2 no'lu kuyular sırasıyla; kesilmemiş ve kesilmiş pGKB α -CalB'ye ait bantları göstermektedir.)

Lineer rekombinant plazmitin kompetan hücrelere transferi gerçekleştirildikten sonra pGKB α -CalB transformantlarını içeren kültür sıvısından 100 μ l alınarak 1000 μ g/ml genetisin içeren YPD katı plakalarına yayıldı. Yaklaşık 72 saat sonra çekilen seçim plakasına ait görüntü Şekil 38'de verildi.



Şekil 38. pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 transformantlarına ait plaka görüntüsü

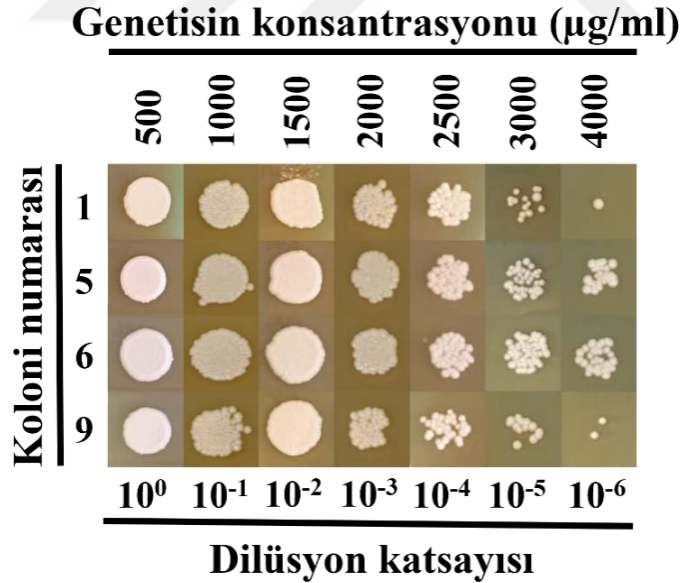
Pozitif maya transformantlarının doğrulanması için rastgele seçilen kolonilere ait genomik DNA'lar kullanılarak PCR gerçekleştirildi. pGAP-F ve CalB-R primerleri ile elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntülendi. Görüntüleme sonucu ürünlerin beklenen uzunlukta (1340 bp) bant verdiği gözlemlendi (Şekil 39).



Şekil 39. PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü

*(M: DNA markır; 1, 2, 3, 4 ve 5 no'lu kuyular sırasıyla; pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerine ait bantları gösterirken 6 no'lu kuyu, pGKB α -CalB'ye (pozitif kontrol) ait bandı göstermektedir.)

PCR işlemi ile doğrulanan pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 transformantlarına ait koloniler kullanılarak PTVA analizi gerçekleştirildi. 500-4000 μ g/ml arasındaki konsantrasyonlarda genetisin antibiyotiği içeren YPD sıvı besiyerleri sıralı olarak kullanıldı. Her 24 saatlik inkübasyonun ardından toplanan kültür sıvıları kullanılarak yapılan spotlama testine ait 48 saat inkübasyon sonrası plaka görüntüsü Şekil 40'ta verildi.

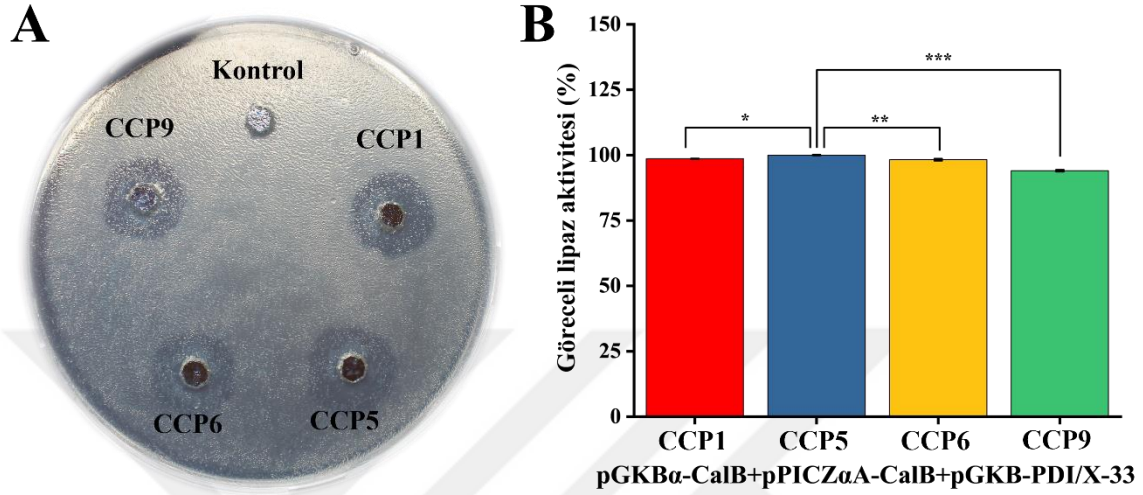


Şekil 40. PTVA ile çok kopyalı klonların seçilimine ait plaka görüntüsü

*(pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerine ait spotları göstermektedir.)

PTVA ile çok kopyalı klonların seçiliminde uygulanan en yüksek dozda büyüme gösteren koloniler YPD agar plakasına ekilerek büyütüldü. Daha sonra, ön kültüre alınarak büyütülen hücreler üretim kültürüne inoküle edilerek 120 saat boyunca rCalB enziminin üretilmesi sağlandı. Daha sonra, konsantre edilen örneklerin enzim aktiviteleri belirlendi.

pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerinde üretilen lipaz örneklerine ait ortalama zon çapları sırasıyla; 16,70 (CCP1), 18,57 (CCP5), 16,63 (CCP6) ve 15,60 mm (CCP9) olarak ölçüldü (Şekil 41 A). Tribütirin agar plaka ve spektrofotometrik olarak ölçülen lipaz aktivitesi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, CCP5 kolonisi tarafından üretilen rCalB enzimi miktarının ve aktivitesinin daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 41. pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 kolonilerini oluşturan hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları

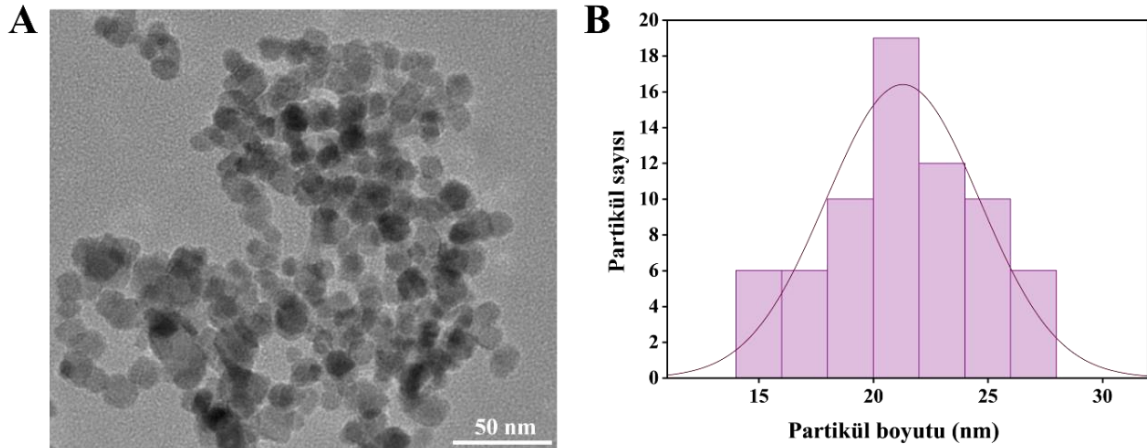
*(A: Tribütirin agar plaka görüntüsü; B: Göreceli lipaz aktivitesi (%) sonucu.)

Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Son yıllarda, nanoteknolojinin bilimde büyük ilerlemeler kaydettiği gerçeği göz önüne alındığında, biyokatalizörlerin immobilizasyonunda nanoyapıların kullanılmasına yönelik bir eğilim olmuştur. Nanopartiküller, nano lifler, nanotüpler, nano gözenekler, nano tabakalar ve nanokompozitler gibi nanomalzemeler, endüstriyel biyoteknolojide birçok uygulama alanı bulmuştur. Dekorasyon için, nanopartiküller benzersiz boyutları ve fiziksel özellikleri nedeniyle avantajlı olarak kabul edilmektedir (Amini et al., 2017; Verma et al., 2013).

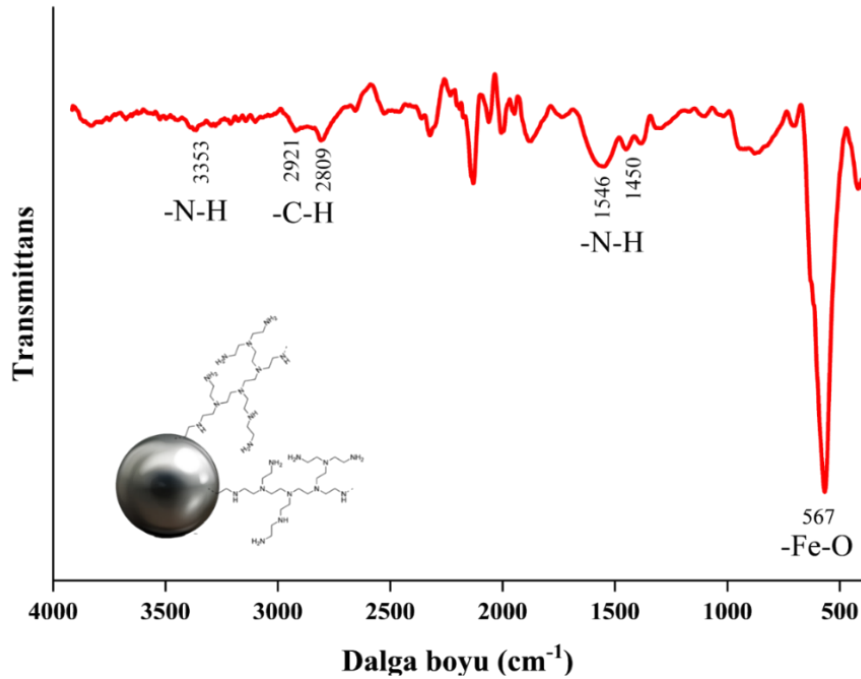
Demir (Fe) oksit manyetik nanopartiküller (MNP), biyoyumlu ve sınırlı toksisite göstermeleri nedeniyle güvenilirdir. MNP sentezinde, ferrus ve ferrik klorürün (FeCl₂ ve FeCl₃) bazık bir ortamda birlikte çöktürüldüğü kolay ve ucuz olan bir yöntem kullanılmaktadır (Steitz et al., 2007). Bu sebeple, bu tez çalışmasında MNP'ler birlikte çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlendi. MNP'lerin kararlılığını ve biyoyumluluğunu artırmak için dallı yapıya ve pozitif yüke sahip olan polietilenimin (PEI; 10 kDa) kullanıldı. Negatif yüzey yüküne sahip olan MNP'lerin yüzeyi pozitif yüklü olan PEI ile elektrostatik olarak etkileşmektedir. Sentezlenen Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'ler, suda stabil halde bulunmaktadır. Ayrıca, manyetik alan etkisi altında hareket edebilme yeteneğine sahip olduğundan hedeflenen bölgeye kolaylıkla yönlendirilebilirler (Kami et al., 2011).

Sentezlenen MNP'lerin TEM görüntüleri ve boyut dağılımı Şekil 42'de verildi. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'lerin küresel şekilde ve yaklaşık 14-28 nm aralığında olduğu belirlendi.



Şekil 42. Üretilen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ manyetik nanopartiküllerin A. Geçirimli elektron mikroskop görüntüleri ve bu görüntülerden çizilen boyut dağılımına ait B. Histogram grafiği

Diğer yandan, MNP'lerin fonksiyonel grupları ve yüzey kimyası FTIR ile belirlendi. ATR modunda, örnekler 400 ile 4000 cm^{-1} arasında tarandı ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'lerine ait FTIR spektrumu Şekil 43'te verildi. Grafikte gözlenen -N-H (3353, 1546 ve 1450 cm^{-1}) ve -C-H pikleri (2921 ve 2809 cm^{-1}), PEI varlığını göstermektedir (Han et al., 2016; Islam et al., 2014; Yıldız et al., 2021). Bunun dışında, -Fe-O etkileşimine ait pik $\sim 567 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. FTIR analizine ait sonuçlar değerlendirildiğinde, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde PEI ile modifiye edildiği anlaşılmaktadır.

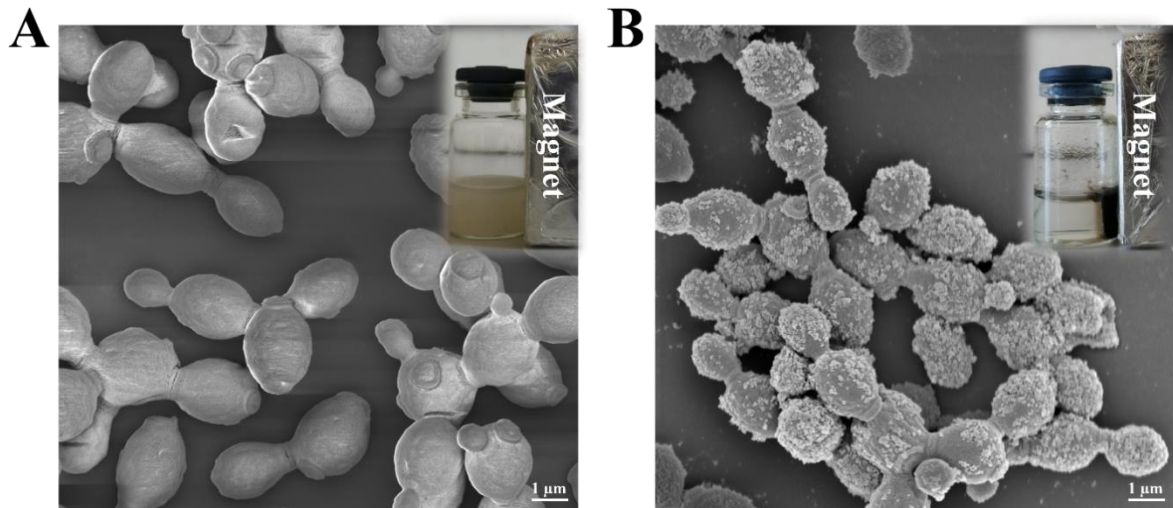


Şekil 43. Sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'lere ait FTIR spektrumu

Numunelerdeki demir içeriğini ölçmek için ise ICP-MS analizi kullanıldı. Ölçüm yapılmadan önce malzemeler asit ve mikrodalga kullanılarak parçalandı. Analiz sonucuna göre, sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'lerin yaklaşık olarak 6562379,854 ppb (6562,379854 ppm) konsantrasyonunda Fe içerdiği belirlendi.

Rekombinant *K. phaffii* Hücrelerinin Dekorasyonu (İmmobilizasyonu)

Rekombinant *K. phaffii* hücreleri (CCP5) 250 ppm Fe içeren $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'ler kullanılarak immobilize edildi ve bir cam slayt üzerine fiks edilerek görüntülendi. İmmobilize edilen ve edilmeyen (kontrol) hücrelerin SEM görüntüleri Şekil 44'te verildi. Literatürde, özellikle PEI ile modifiye edilmiş MNP'lerin mikroorganizmaların izolasyonu için kullanıldığı ve yüksek immobilizasyon verimliliği sergilediği bildirilmiştir (Jia et al., 2022; J. Li et al., 2019). MNP'lerin yüzey morfolojisi ve yapısal özellikleri hücrelerin yapışma ve büyüme yeteneğini etkileyebilir. MNP'lerin yüzey yükü, hedef hücrelerle elektrostatik etkileşimleri etkiler. Pozitif veya negatif yüklü yüzeyler hücrelerin hareketsizleştirilmesinde önemli bir rol oynar ve bu da hareketsizleştirilmiş hücrelerin kararlılığını ve verimliliğini etkiler (Dagci, Solak, et al., 2024; J. Li et al., 2019). Bu tez çalışmasında, immobilize edilen ve edilmeyen hücrelere ait SEM görüntüleri incelendiğinde, maya hücrelerinin başarılı bir şekilde immobilize edildiği gözlemlendi. Ayrıca, manyetik alan (magnet) uygulanmadan önceki ve manyetik alan uygulandıktan sonraki hücrelere ait OD₆₀₀ değerlerinden yola çıkılarak immobilizasyon etkinliği hesaplandığında, manyetik immobilizasyon verimliliğinin %96,76 olduğu görüldü.



Şekil 44. Rekombinant *K. phaffii* hücrelerine ait SEM görüntüleri

*(A: Dekore edilmeyen rekombinant hücreleri, B: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}_{10\text{kDa}}$ MNP'ler ile dekore edilen rekombinant hücreleri göstermektedir.)

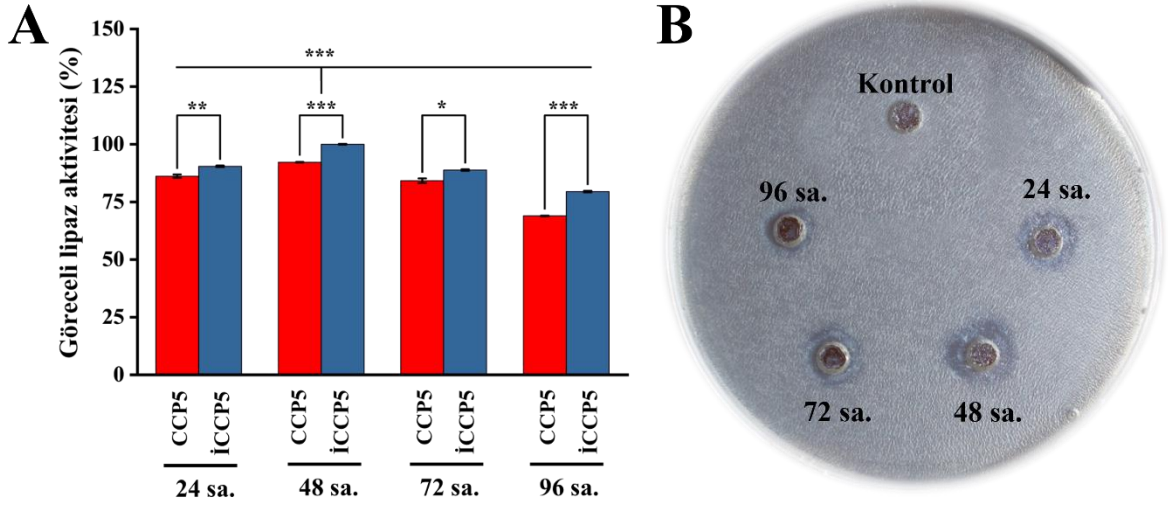
Dekore Edilen Hücreler Tarafından Üretilen rCalB Enziminin Aktivite Tayini ve SDS-PAGE Analizi

MNP'lerin maya hücrelerinin membran geçirgenliğini artırması sayesinde ekstraselüler rekombinant proteinlerin kültür ortamına salımının artırılmasına olanak tanıdığı yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (Ansari et al., 2009; Brady et al., 1997; Dagci, Solak, et al., 2024; Taghizadeh et al., 2021). Aynı şekilde, manyetik immobilizasyon (dekorasyon) işleminin *K. phaffii* hücrelerinde hedef proteinlerin kültür ortamına salgılanmasını artırdığına dair çalışmalar da bulunmaktadır (Taghizadeh, Ebrahimezhad, et al., 2020; Taghizadeh et al., 2022). Bu çalışmalara ek olarak önceki çalışmamızda, Fe₃O₄ MNP'lerin kullanılmasıyla yapılan immobilizasyon işleminde MNP'ler mayanın tüm yüzeyini kaplamış olsa da Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'lerin kullanılmasıyla yapılan daha lokalize bir immobilizasyonun protein salgılanması açısından daha yüksek bir fayda sağladığı gözlemlenmiştir (Dagci, Solak, et al., 2024).

Bu tez çalışmasında, 250 ppm Fe içeren Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'ler kullanılarak dekore edilen CCP5 (pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33) hücrelerinin rCalB enzimini hücre dışına salgılama potansiyeline bakıldı (Bundan sonraki kısımda immobilize (dekore) edilen CCP5 hücreleri İCCP5 olarak ifade edildi). 96 saatlik inkübasyonun ardından yapılan lipaz aktivitesi analiz sonuçları Şekil 45'te verildi. Hem immobilize edilen hem de edilmeyen hücrelere ait göreceli lipaz aktivitesi sonucuna bakıldığında, en iyi lipaz aktivitesinin 48 saatlik inkübasyon grubuna ait olduğu görüldü. Bunun yanı sıra, dekore edilen hücrelerde lipaz aktivitesinin tüm inkübasyon saatlerinde immobilize edilmeyen hücrelerden daha fazla olduğu görüldü (Şekil 45 A).

Diğer yandan, immobilize edilen hücrelere ait lipaz örnekleri kullanılarak yapılan tribütirin agar plaka sonucu incelendiğinde de yine inkübasyon süresine bağlı olarak zon çaplarında dolayısıyla lipaz aktivitesinde giderek azalmanın söz konusu olduğu görüldü. İCCP5 hücrelerinin kullanılmasıyla farklı inkübasyon sürelerinde üretilen lipaz örneklerine ait ortalama zon çapları sırasıyla; 11,76 (24 sa.), 13,93 (48 sa.), 11,79 (72 sa.) ve 9,79 mm (96 sa.) olarak ölçüldü (Şekil 45 B). Her iki aktivite sonucu birlikte değerlendirildiğinde, en yüksek lipaz aktivitesinin İCCP5 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon grubunda olduğu gözlemlendi. Bundan dolayı, sonraki deneylerde lipaz üretimi için inkübasyon süresinin 48 saat olmasına karar verildi.

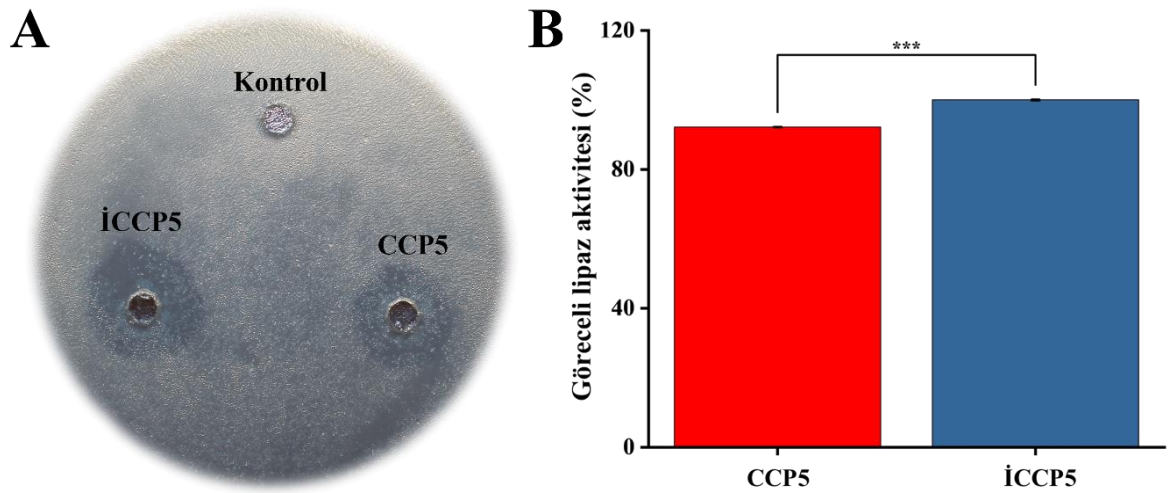
Aynı zamanda, İCCP5 hücrelerinin 48 saat inkübasyonu ile üretilen ve -20 °C'de saklanan lipaz enziminin stabilitesinin (depolama kararlılığı) değerlendirilmesi için birkaç gün arayla 12. güne kadar lipaz aktivitesi incelendiğinde, 12. günün sonunda göreceli lipaz aktivitesinde ilk güne göre yaklaşık olarak %17,12 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi.



Şekil 45. Farklı inkübasyon sürelerinde üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları

*(A: İmmobilize edilen ve edilmeyen hücelere ait göreceli lipaz aktivitesi (%) sonucu; B: İmmobilize edilen hücelere ait tribütirin agar plaka görüntüsü.)

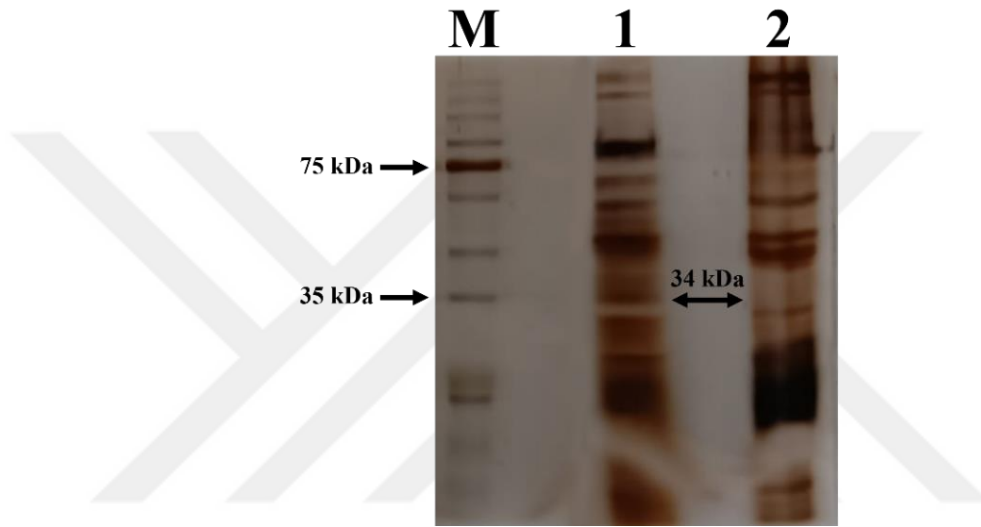
Aynı zamanda hem İCCP5 hem de CCP5 hücrelerinde en yüksek lipaz aktivitesinin gözlemlendiği 48 saatlik inkübasyonun ardından toplanan ve konsantre edilen örnekler kullanılarak lipaz aktiviteleri karşılaştırıldı. Konsantre örneklerden 50 µl alınarak tribütirin agar plakasında açılan kuyulara konuldu ve 30 °C’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İmmobilize edilen ve edilmeyen hücreler tarafından üretilen lipaz örneklerine ait ortalama zon çapları sırasıyla; İCCP5 için 22,66 mm ve CCP5 için 20,00 mm olarak ölçüldü. Her iki aktivite sonucu birlikte değerlendirildiğinde, en yüksek lipaz aktivitesinin İCCP5 grubunda olduğu gözlemlendi (Şekil 46). Bundan dolayı, sonraki deneylerde MNP’lerle dekore edilen hücrelerle lipaz üretiminin gerçekleştirilmesine karar verildi.



Şekil 46. İmmobilize edilen ve edilmeyen hücreler tarafından üretilen lipaz enzimine ait aktivite sonuçları

*(A: Tribütirin agar plaka görüntüsü; B: Göreceli lipaz aktivitesi (%) sonucu.)

Diğer yandan, lipaz üretmeyen (*CalB* geni içermeyen rekombinant maya; pPICZαA/X-33) ve lipaz üreten immobilize edilmiş hücrelerin (İCCP5; pGKBα-CalB+pPICZαA-CalB+pGKB-PDI/X-33) 48 saatlik inkübasyonunun ardından toplanan süpernatantlar kullanılarak Bradford ile total protein tayini yapıldı. Yaklaşık 22 µg protein kullanılarak SDS-PAGE analizi ve ardından gümüş boyama yapıldı. Şekil 47’de verilen gümüş boyama sonucuna ait jel görüntüsü incelendiğinde, kontrol grubundaki protein örneğinde lipaza ait beklenen boyutta (yaklaşık 34 kDa) bant varlığı gözlenmezken aynı hizadaki İCCP5 hücrelerine ait örnekte protein bandı gözlemlendi. Sonuç olarak, yaklaşık 34 kDa’lık rCalB enziminin İCCP5 hücreleri tarafından başarıyla üretilerek hücre dışına salgılandığı görüldü (Şekil 47).



Şekil 47. SDS-PAGE analizine ait gümüş boyama sonucu

*(M: Protein markır; 1 ve 2. kuyular sırasıyla; İCCP5 ve lipaz geni içermeyen (kontrol) hücreler tarafından üretilen protein örneklerine ait bantları göstermektedir.)

Lipaz Enziminin Transesterifikasyon Aktivitesi ve Biyodizel Üretimi

Literatürdeki daha önceki çalışmalar, lipaz katalizli transesterifikasyonun performansının esas olarak metanol:yağ molar oranı, sıcaklık, enzim miktarı ve reaksiyon süresinden etkilendiğini göstermektedir (Kaieda et al., 2001; Q. Li and Yan, 2010; C. H. Liu et al., 2012). Bu nedenle, rCalB katalizli transesterifikasyon reaksiyonunda bahsedilen bu dört faktörün etkisi ayrı ayrı araştırıldı.

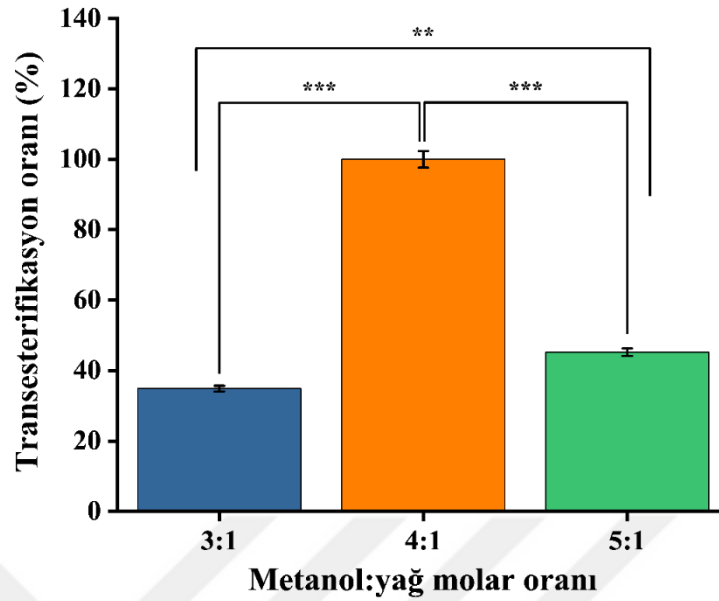
Biyodizel üretimi sırasında, transesterifikasyon verimliliğini artırmak amacıyla metanol:yağ molar oranı (3:1–5:1), sıcaklık (25–40 °C), enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 4–12 ml; 1,2–3,6 EÜ) ve reaksiyon süresi (12–168 saat) şartları sırasıyla optimize edildi. Tüm optimizasyon çalışmalarında elde edilen FAME içeren ürünlerin GC-FID analizi ile karakterizasyonu yapıldı.

GC-FID analizinde iç standart olarak kullanılan 2-Metil-3-heptanon, Tay soya sosundaki uçucu bileşik analizinde, doğrudan çözücü ekstraksiyonunda ve eş zamanlı buhar damıtma-çözücü ekstraksiyonunda örnek hazırlamada iç standart (internal standart) olarak kullanılmıştır (Wanakhachornkrai and Lertsiri, 2003). Diğer yandan, başka bir çalışmada, depolanan yağsız kuru sütün uçucu tat bileşiklerinin gaz kromatografisi-olfaktometri ve aroma özü seyreltme analizi kullanılarak tanımlanmasında iç standart olarak kullanılmıştır (Karagül-Yüceer et al., 2002). Bu tez çalışmasında ise, tüm optimizasyon deneylerinde transesterifikasyon oranları (%) her grup içerisinde göreceli olarak belirlendikten sonra (C. H. Liu et al., 2012), üretilen FAME miktarları (%) seri optimizasyon grupları arasındaki optimum transesterifikasyon oranları temel alınarak göreceli olarak tahmin edildi (Yan et al., 2014). En nihayetinde, transesterifikasyon oranı ile FAME miktarı aynı ürünü ifade etmektedir (C. H. Liu et al., 2012).

Biyodizel üretim optimizasyonu deneylerinde ilk olarak, metanol:yağ molar oranının etkisi araştırıldı. Reaksiyon karışımına, reaksiyon substratı olarak uygun miktarda metanol eklenmesi reaksiyonu biyodizel sentezine kaydırabilir ve biyodizel verimini artırabilirken, aşırı miktarda metanol lipaz aktivitesinin denatürasyonuna ve inaktivasyonuna yol açacaktır (Jun et al., 2012; Y. Liu et al., 2018). Metanolün çözünmemesi, rCalB enziminin kararlılığını etkilediğinden transesterifikasyonda bir dezavantaj olarak görülmektedir (Kamel Ariffin and Idris, 2022). Bu nedenle, yüksek biyodizel verimi için kataliz ve toksisite arasındaki metanol konsantrasyonunda denge noktasına ulaşmak gerekmektedir. Yakın zamana kadar, birçok çalışma, reaksiyon sistemine kademeli olarak metanol ekleme stratejisinin yüksek verimlilikle biyodizel üretimini başarılı bir şekilde teşvik etmek için kullanılabileceğini bildirmiştir (Amoah et al., 2016; J. Huang et al., 2015; Kuo et al., 2015; Lee et al., 2009; Tan et al., 2022; You et al., 2013).

Bu tez çalışmasında yapılan tüm optimizasyon deneylerinde metanol, reaksiyon ortamına kademeli olarak eklendi (Iyyappan et al., 2022; Xiao et al., 2023). Sonuçta, elde edilen deney verilerine göre metanolün kademeli olarak eklenmesiyle lipazın kararlılığı üzerindeki olumsuz etkisinin engellendiği sonucuna varıldı. Şekil 48'den görülebileceği gibi, metanolün ayçiçek yağına molar oranı 3:1 olduğunda biyodizel verimi en düşük seviyedeydi ve ortalama transesterifikasyon oranı %34,86 idi. Metanolün ayçiçek yağına molar oranındaki 4:1'lik artış, en yüksek transesterifikasyon oranını gösterdi. Çalışılan en yüksek molar oranı olan 5:1'deki artışın %45,20'lik biyodizel veriminde azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla, serbest lipaz olarak kullanılan rCalB'nin 4:1'lik optimum metanol:yağ molar oranında transesterifikasyon aktivitesini baskıladığı bilinen yüksek metanol konsantrasyonunu tolere

edebildiği söylenebilir (Fjerbaek et al., 2009; C. H. Liu et al., 2012). Sonuç olarak, sonraki optimizasyon deneylerinde 4:1 metanol:yağ molar oranının kullanılmasına karar verildi.



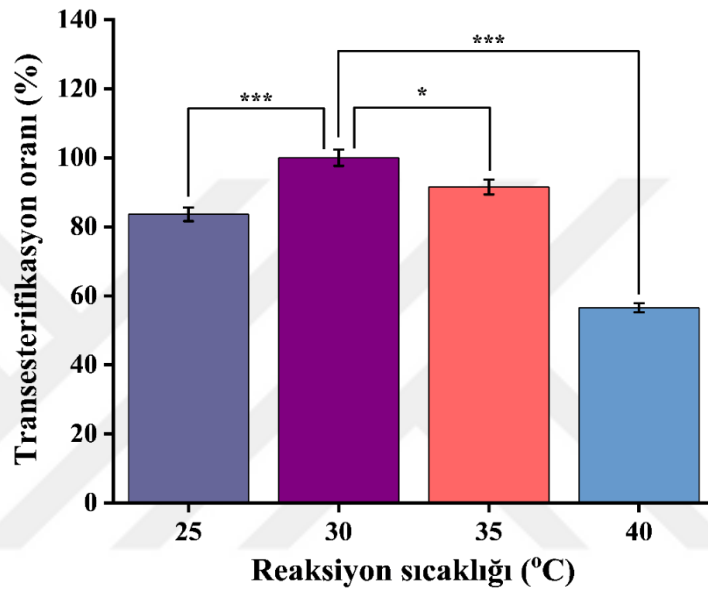
Şekil 48. Metanol:yağ molar oranının biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması

*(Ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), reaksiyon sıcaklığı (30 °C), enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 10 ml; 3 EÜ) ve reaksiyon süresi (24 sa.))

En yüksek transesterifikasyon etkinliğinin gözlemlendiği metanol:yağ molar oranı (4:1) belirlendikten sonra biyodizel üretiminde 25 °C ile 40 °C arasındaki sıcaklıkların etkisi araştırıldı. Genel olarak, daha yüksek sıcaklık lipaz aktivitesini artırabilir ve substratların enerji bariyerini aşmak için gereken enerjiyi emmesine yardımcı olarak reaksiyon hızının artmasını sağlar (Kuepethkaew et al., 2017). Ancak, daha yüksek sıcaklık lipazları denatüre etme ve dolayısıyla reaksiyon hızını düşürme potansiyeline de sahiptir. Ek olarak, biyodizel üretimi için lipaz katalizli transesterifikasyon genellikle uzun bir reaksiyon süresi boyunca gerçekleştirilir ve bu da lipaz aktivitesinin uzun bir süre korunmasını gerekli kılar. Bu nedenle, lipazların optimum sıcaklığı ve termostabilitesinin sağlanması yüksek biyodizel verimi için önemlidir (Y. Liu et al., 2018).

Şekil 49’da verilen göreceli transesterifikasyon oranları karşılaştırıldığında, en yüksek etkinliğin 30 °C’lik reaksiyon şartlarında olduğu ve 5 °C’lik artan sıcaklık farklılıklarında ise transesterifikasyon etkinliğinin giderek azaldığı gözlemlendi. Xiao ve arkadaşlarının (2023) yapmış oldukları bir çalışmada da 30 °C’deki reaksiyon şartlarında biyodizel veriminin (%) en yüksek olduğu ve sonraki sıcaklıklarda verimde azalmanın gözlemlendiği bildirilmiştir (Xiao et al., 2023). Yine başka bir çalışmada, CalB enzimi katalizörlüğünde (4:1 metanol:yağ molar oranı, 30 °C sıcaklık, 200 rpm çalkalama hızı ve 24 saat reaksiyon süresi) transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve %89 oranında biyodizel verimi elde edildiği bildirilmiştir (Tan

et al., 2022). Diğer yandan, daha düşük sıcaklıkların reaksiyon hızını azaltabileceği ve yüksek biyodizel verimi için reaksiyon süresinin uzamasına neden olabileceğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Arumugam et al., 2018; Y. Liu et al., 2018). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, daha düşük bir sıcaklıkta ve daha kısa reaksiyon süresinde biyodizel üretiminin enerji tasarrufu, daha uygun reaksiyon koşulları ve daha yüksek verimlilik gibi birçok avantaja sahip olduğunu ve böylece biyodizel üretim maliyetinin de azaltılabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak, bundan sonraki transesterifikasyon deneylerinde reaksiyon sıcaklığının 30 °C’de sabit tutulmasına karar verildi.

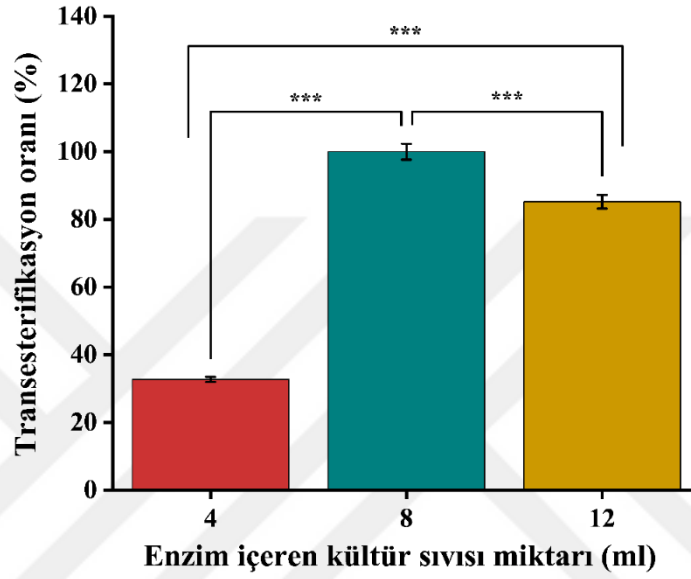


Şekil 49. Reaksiyon (Transesterifikasyon) sıcaklığının biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması

*(Ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 10 ml; 3 EÜ) ve reaksiyon süresi (24 sa.))

En uygun reaksiyon sıcaklığı belirlendikten sonra (30 °C) katalizör olarak kullanılan rCalB enzim miktarının transesterifikasyon reaksiyonuna olan etkisi araştırıldı. Şekil 50’de verilen grafik incelendiğinde transesterifikasyon için enzim içeren kültür sıvısının optimum miktarı 8 ml (2,4 EÜ) olarak belirlendi. 8 ml (2,4 EÜ)’nin üzerindeki enzim konsantrasyonunda transesterifikasyon veriminde %14,8 oranında azalma görüldü. Bu azalma, enzim miktarındaki artıştan ziyade enzim içeren kültür sıvısının su miktarındaki artışa bağlanabilir. Çünkü, su miktarındaki artışın su:metanol oranını değiştirerek transesterifikasyon verimliliğini azaltmış olması muhtemeldir. Su, biyodizel üretimi için iki fazlı sistemlerde önemli bir rol oynar. Uygun su içeriği, lipazın aktivitesi için üç boyutlu yapısını korumak ve lipaz katalizi için sulu ve organik fazlar arasındaki kullanılabilir arayüzü artırmak için esastır (J. Huang et al., 2015; You et al., 2013). Ancak, aşırı su içeriği lipazın sulu fazdaki hidrolitik aktivitesini aktive ederek transesterifikasyon veriminde bir azalmaya yol açabilir (J. Huang et al., 2015; You et al., 2013).

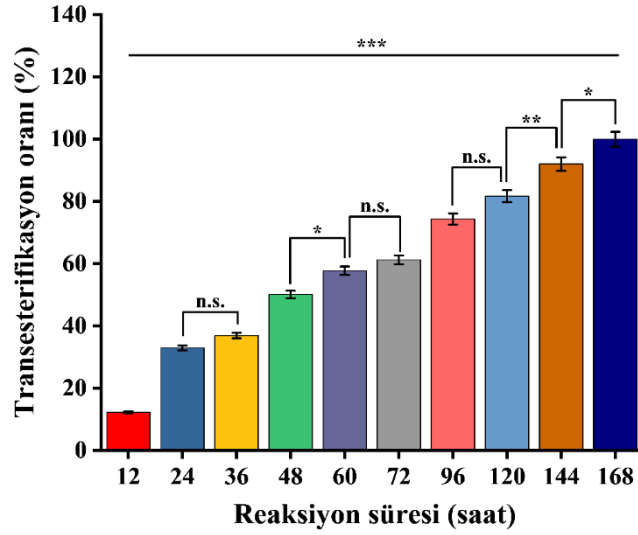
Optimum su içeriği, lipazın reaksiyonda yalnızca minimum hidroliz aktivitesiyle maksimum transesterifikasyon aktivitesini korumasına yardımcı olabilir (Y. Liu et al., 2018; You et al., 2013). Şekil 50’de elde edilen sonuçlar, enzim katalizli reaksiyonlarda transesterifikasyon verimliliğinin su:metanol oranına bağlı olduğu gerçeğiyle uyumlu olduğunu gösterdi (Altinok et al., 2023; Firdaus et al., 2016; Lotti et al., 2018; X. Wang et al., 2011; Xiao et al., 2023). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kalan deneylerde enzim içeren kültür sıvısı miktarının 8 ml (2,4 EÜ)’de sabit tutulmasına karar verildi.



Şekil 50. Katalizör (enzim içeren kültür sıvısı) miktarının biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması

*(Ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), reaksiyon sıcaklığı (30 °C) ve reaksiyon süresi (24 sa.))

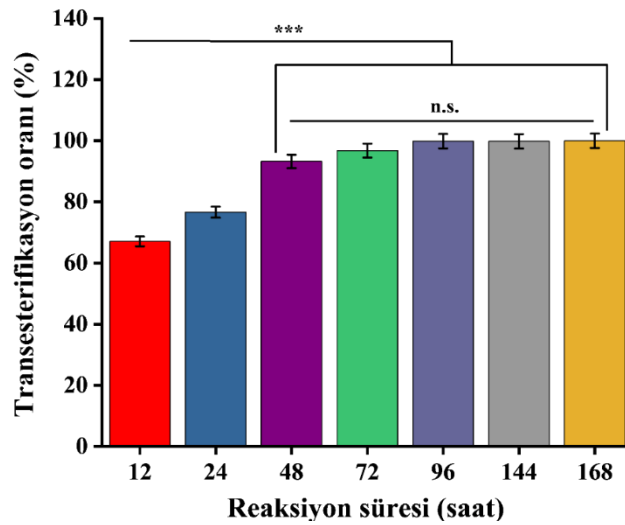
En yüksek transesterifikasyon etkinliğinin gözlemlendiği enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 8 ml; 2,4 EÜ) belirlendikten sonra reaksiyon süresinin biyodizel verimine olan etkisi araştırıldı. Biyodizel verimini etkileyen reaksiyon süresinin transesterifikasyon oranına etkisi Şekil 51’de gösterildi. Reaksiyon süresi uzadıkça, ayçiçek yağının biyodizele dönüşümünün daha yüksek olduğu gözlemlendi. Lipaz katalizli transesterifikasyonun geri dönüşümsüz olması nedeniyle, reaksiyon süresindeki artışın substrat çözünmesine doğru olumlu bir etkisi olacağı ve biyodizel dönüşümü için etkili substrat-enzim etkileşimi için daha fazla şans olacağı varsayılmıştır. Literatürde yapılan benzer çalışmalarda da aynı etki gözlemlenmiştir (Altinok et al., 2023; Kamel Ariffin and Idris, 2022; C. H. Liu et al., 2012).



Şekil 51. Reaksiyon süresinin biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması

*(Ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), reaksiyon sıcaklığı (30 °C) ve enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 8 ml; 2,4 EÜ))

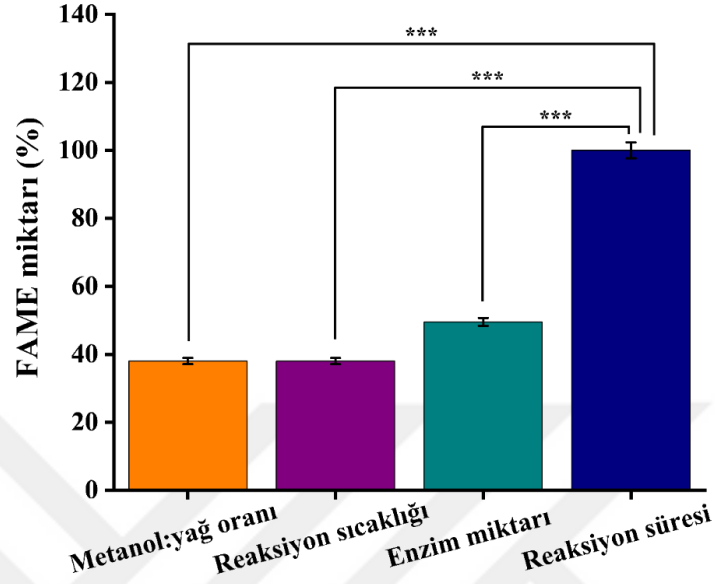
Diğer yandan, transesterifikasyon reaksiyonu için ticari yağ kullanılarak elde edilen tüm optimum şartlarda atık kızartma (ayçiçek) yağı kullanılarak reaksiyon süresinin etkisi araştırıldı. Atık yağdaki transesterifikasyon dönüşümünü etkileyen reaksiyon süresinin transesterifikasyon oranına etkisi Şekil 52’de gösterildi. Reaksiyon süresi uzadıkça, atık kızartma (ayçiçek) yağının biyodizele dönüşümünün 96 saate kadar giderek arttığı ve daha sonra ise kısmen sabit kaldığı gözlemlendi. Ticari ayçiçek yağına kıyasla atık kızartma (ayçiçek) yağında transesterifikasyon veriminin daha düşük gözlenmesinin nedenleri arasında atık kızartma (ayçiçek) yağının karmaşık bileşimi ve serbest enzimlerin bu karışım ortamındaki kararsızlığı sayılabilir (Xiao et al., 2023).



Şekil 52. Reaksiyon süresinin biyodizel verimine etkisinin transesterifikasyon oranlarıyla göreceli olarak karşılaştırılması (Atık kızartma (ayçiçek) yağı)

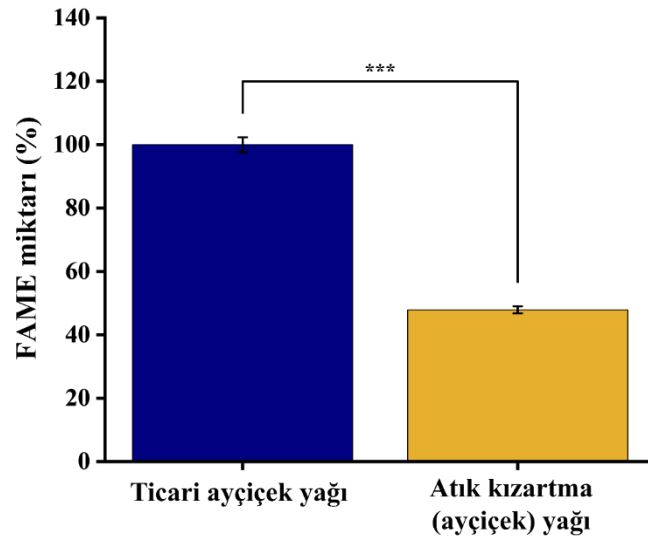
*(Atık kızartma (ayçiçek) yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), reaksiyon sıcaklığı (30 °C) ve enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 8 ml; 2,4 EÜ))

Son olarak, ticari yağ kullanılarak yapılan seri optimizasyon deneylerinde elde edilen optimum reaksiyon şartlarında oluşan FAME miktarları göreceli olarak karşılaştırıldı. Şekil 53'te verilen grafik incelendiğinde ilk optimizasyondan son optimizasyon şartlarına kadar FAME veriminde yaklaşık %62'lik bir artış olduğu gözlemlendi.



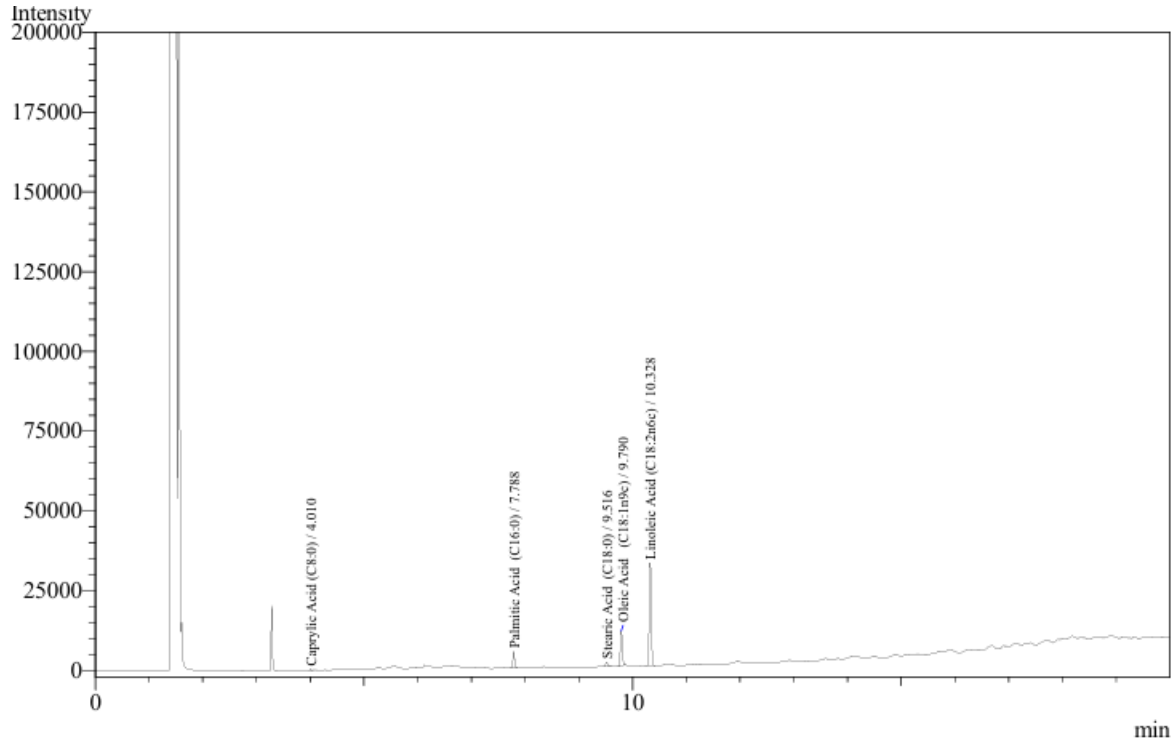
Şekil 53. Seri optimizasyon ile elde edilen optimum reaksiyon şartlarında oluşan FAME miktarlarının göreceli olarak yüzdesi (%)

Ticari ayçiçek yağı ve atık kızartma (ayçiçek) yağı kullanılarak optimum reaksiyon şartlarında (yağ miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), reaksiyon sıcaklığı (30 °C), enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 8 ml; 2,4 EÜ) ve reaksiyon süresi (168 sa.)) oluşan FAME miktarları göreceli olarak karşılaştırıldığında yaklaşık %52,12'lik bir verim farkı olduğu gözlemlendi (Şekil 54).



Şekil 54. Ticari ayçiçek yağı ve atık kızartma (ayçiçek) yağı kullanılarak optimum reaksiyon şartlarında oluşan FAME miktarlarının göreceli olarak yüzdesi (%)

Ticari ayçiçek yağı ile optimum şartlarda gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilen FAME ürünlerinin GC-FID analizine ait kromatogram grafiği incelendiğinde, 4.010, 7.788, 9.516, 9.790 ve 10.328 dakikalık alıkonma sürelerine sahip piklerin sırasıyla; kaprilik (C8:0), palmitik (C16:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1n9c) ve linoleik (C18:2n6c) asitlerin metil esterlerine karşılık geldiği gözlemlendi (Şekil 55). Elde edilen kromatogram verileri, üretilen biyodizelin yüksek oranda C16 ve C18 yağ asidi metil esterleri içerdiğini göstermektedir (%99,73) (Şekil 55).



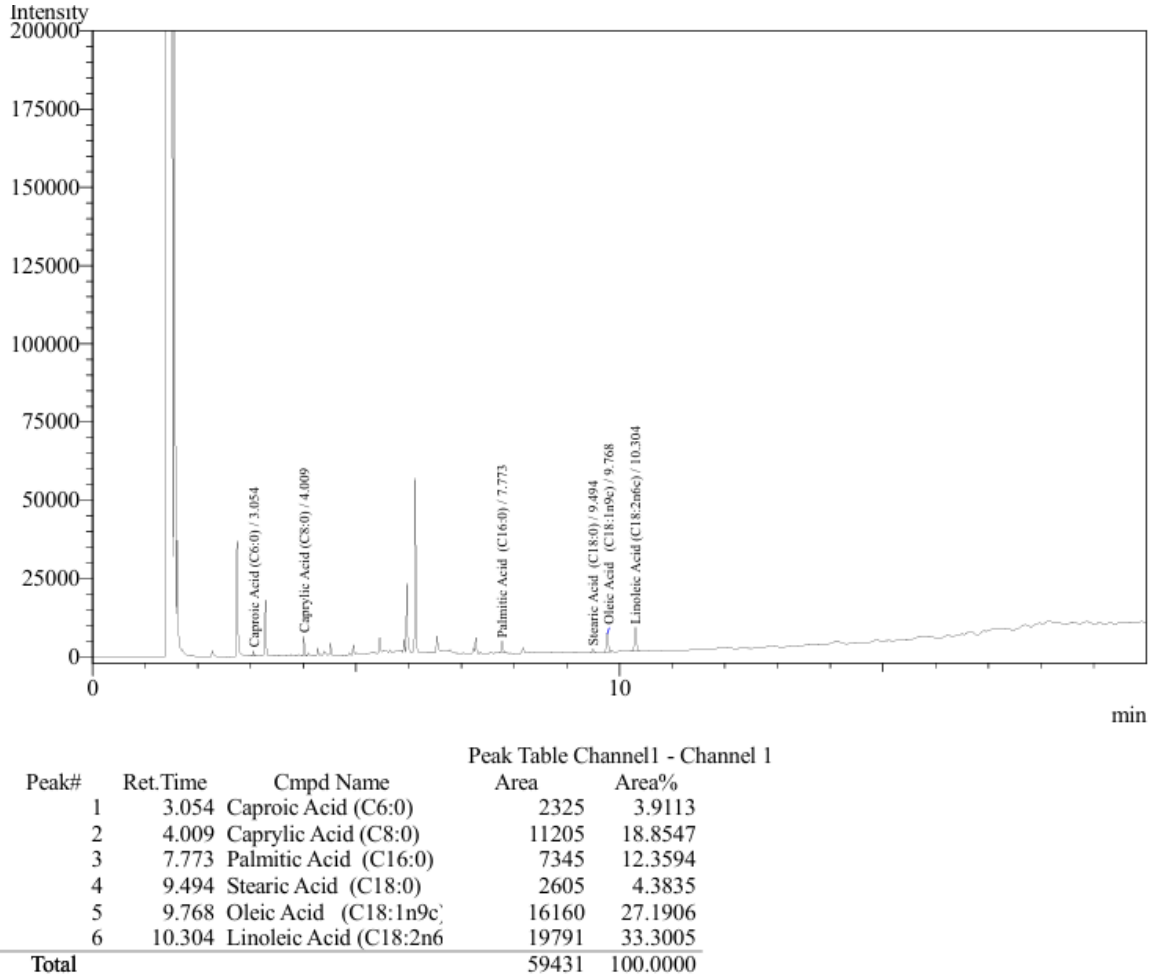
Peak Table Channel1 - Channel 1				
Peak#	Ret.Time	Cmpd Name	Area	Area%
1	4.010	Caprylic Acid (C8:0)	329	0.2651
2	7.788	Palmitic Acid (C16:0)	10254	8.2604
3	9.516	Stearic Acid (C18:0)	3891	3.1348
4	9.790	Oleic Acid (C18:1n9c)	28065	22.6087
5	10.328	Linoleic Acid (C18:2n6)	81594	65.7309
Total			124133	100.0000

Şekil 55. Ticari ayçiçek yağı ile gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucu oluşan FAME ürünlerine ait GC-FID kromatogramı

*(Ayçiçek yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), reaksiyon sıcaklığı (30 °C), enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 8 ml; 2,4 EÜ) ve reaksiyon süresi (168 sa.))

Atık kızartma (ayçiçek) yağı ile optimum şartlarda gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilen FAME ürünlerinin GC-FID analizine ait kromatogram grafiği incelendiğinde, 3.054, 4.009, 7.773, 9.494, 9.768 ve 10.304 dakikalık alıkonma sürelerine sahip piklerin sırasıyla; kaproik (C6:0), kaprilik (C8:0), palmitik (C16:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1n9c) ve linoleik (C18:2n6c) asitlerin metil esterlerine karşılık geldiği gözlemlendi (Şekil 56). Elde edilen kromatogram verileri, üretilen biyodizelin yüksek oranda C16 ve C18 yağ asidi

metil esterleri içerdiğini göstermektedir (%77,23) (Şekil 56). Üretilen biyodizelin metil ester bileşiminin daha önceki çalışmalarda atık kızartma (ayçiçek) yağlarından üretilen biyodizellerin bileşimine oldukça benzediği gözlemlendi (Altinok et al., 2023; Y. Chen et al., 2009; Chhetri et al., 2008; El-Batal et al., 2016; Karaman et al., 2024). Çalışmada ayrıca, *K. phaffii* tarafından üretilen rCalB enziminin metanol varlığında atık kızartma (ayçiçek) yağından biyodizel üretmek için katalizör olarak kullanılabileceği de gösterildi.



Şekil 56. Atık kızartma (ayçiçek) yağı ile gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucu oluşan FAME ürünlerine ait GC-FID kromatogramı

*(Atık kızartma (ayçiçek) yağı miktarı (20,0 g), metanol:yağ molar oranı (4:1), reaksiyon sıcaklığı (30 °C), enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı: 8 ml; 2,4 EÜ) ve reaksiyon süresi (168 sa.))

Biyodizel performansı için ana parametrelerden biri setan sayısıdır. Bu parametre, gecikmeli yanma süresini ve yanma kalitesini gösterdiği için dizel yakıt yanıcılığının önde gelen göstergesidir (Meher et al., 2006). Daha yüksek setan sayısı, motorun daha yüksek gücünü ve daha iyi ekonomik performansını belirler (Knothe, 2005). Esterlerdeki daha uzun yağ asidi zincirleri daha yüksek setan sayısı değerleri üretir. Örneğin, miristik (14:0), palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asitlerin metil esterleri 66,2, 74,5 ve 86,9 setan sayısına sahiptir (Folayan et al., 2019; Knothe, 2005). Setan sayıları da örneğin linoleik (C18:2) ve linolenik

(C18:3) gibi çift doymamış bileşiklerin sayısıyla birlikte daha düşüktür (Knothe et al., 2003). Biyodizelin hammaddesi uzun ve doymamış bir yağ asidi zinciri içermelidir (Bajpai and Tyagi, 2006; Demirbas, 2005; Knothe et al., 1998). Önceki çalışmalar, biyodizelin kalitesinin oleik asit gibi yüksek tekli doymamış yağ asitleri, linoleik asit gibi düşük çoklu doymamış yağ asitleri ve optimum doymuş yağ asitlerinin varlığına bağlı olduğunu belirtmiştir (Aparamarta et al., 2020; Knothe, 2009; Pinzi et al., 2009).

Bu tez çalışmasında yapılan GC-FID analizlerine göre, ticari ayçiçek ve atık kızartma (ayçiçek) yağları kullanılarak üretilen biyodizelin yüksek oranda C16 ve C18 yağ asidi metil esterleri içerdiği belirlendi. Bu bulgular, C16 ve C18 yağ asidi metil esterlerinin biyodizelin kalitesini artırdığı bilindiğinden (Katre et al., 2012; Taskin et al., 2016), üretilen biyodizelin yüksek kalitesinin bir göstergesi olabilir. Ayrıca, elde edilen sonuçlardan biyodizelin tekli doymamış yağ asitlerinden olan oleik asiti yüksek oranda içerdiği görüldü. Tekli doymamış yağ asitlerinden elde edilen metil esterlerin soğuk havalarda daha iyi akış özelliklerine sahip olması dolayısıyla (Aparamarta et al., 2020; Taskin et al., 2015) bu özellik, üretilen biyodizelin kalitesini de artırabilir (Karaman et al., 2024). Sonuç olarak, tekli doymamış yağ asitleri de dâhil olmak üzere C16 ve C18 yağ asitlerinin yüksek içeriği nedeniyle, *K. phaffii* hücreleri tarafından üretilen rCalB enziminin transesterifikasyonu ile üretimi gerçekleştirilen biyodizelin mevcut biyodizellere alternatif olabileceği sonucuna varılabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ *K. phaffii*'nin kodon kullanım eğilimine göre yapılan kodon optimizasyonu ile *C. antarctica* lipaz B geninin kodon adaptasyon indeksi %69'dan %87'ye yükseltildi. Kodon optimize *CalB* genini içeren pPICZ α A-CalB satın alındı.
- ✓ Kodon optimize *CalB* geni, pGKB α 'ya entegre edilerek pGKB α -CalB elde edildi.
- ✓ *K. phaffii*'nin *Pdi* geni, pGKB'ye entegre edilerek pGKB-PDI elde edildi. pGKB-PDI, *K. phaffii* hücrelerine transfer edilerek pGKB-PDI/X-33 hücreleri elde edildi.
- ✓ pPICZ α A-CalB, hem *K. phaffii* hücrelerine hem de pGKB-PDI/X-33 hücrelerine transfer edildi ve sırasıyla pPICZ α A-CalB/X-33 ve pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücreleri elde edildi.
- ✓ PCR ile doğrulanan maya kolonilerinden post-transformasyonel vektör amplifikasyonu (PTVA) ile (zeosin antibiyotiği ile) seçilen rekombinant hücreler tarafından CalB enziminin ekstrasellüler üretimi gerçekleştirildi.
- ✓ Çoklu kopya entegrasyonunun lipaz üretimi ve aktivitesi üzerine olan etkisini görmek amacıyla, pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerine ikinci bir *CalB* geni (pGKB α -CalB) transfer edildi ve pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücreleri elde edildi.
- ✓ PCR ile doğrulanan maya kolonilerinden PTVA ile (genetisin antibiyotiği ile) seçilen rekombinant hücreler tarafından CalB enziminin ekstrasellüler üretimi gerçekleştirildi.
- ✓ pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücrelerinin manyetik nanopartiküllerle dekorasyonu (immobilizasyonu) için sentezlenen Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'lerin küresel şekilde ve yaklaşık 14-28 nm aralığında olduğu, PEI ile modifiye edildiği ve yaklaşık olarak 6562,379854 ppm konsantrasyonunda Fe içerdiği belirlendi.
- ✓ pGKB α -CalB+pPICZ α A-CalB+pGKB-PDI/X-33 hücreleri 250 ppm Fe içeren Fe₃O₄@PEI_{10kDa} MNP'ler kullanılarak başarılı bir şekilde dekore edildi.
- ✓ Dekore (immobilize) edilen ve edilmeyen hücreler tarafından üretilen rCalB enziminin aktivite sonuçları birlikte değerlendirildiğinde en yüksek lipaz aktivitesi dekore edilen hücrelerin 48 saatlik inkübasyonu sonucu elde edildi.
- ✓ Üretilen rCalB enziminin transesterifikasyon aktivitesi sayesinde, ticari ayçiçek yağı ve atık kızartma (ayçiçek) yağının kullanılmasıyla gerçekleştirilen biyodizel üretiminde elde edilen optimum değerler; metanol:yağ molar oranı için 4:1, reaksiyon sıcaklığı için

- 30 °C, enzim miktarı (enzim içeren kültür sıvısı) için 8 ml (2,4 EÜ) ve reaksiyon süresi için ticari yağda 168 saat iken atık kızartma (ayçiçek) yağında 96 saat olarak belirlendi.
- ✓ Ticari yağ kullanılarak yapılan seri optimizasyon deneylerinde ilk optimizasyondan son optimizasyon şartlarına kadar FAME veriminde yaklaşık %62'lik bir artış olduğu gözlemlendi.
 - ✓ Ticari ve atık yağ kullanılarak optimum reaksiyon şartlarında oluşan FAME miktarları göreceli olarak karşılaştırıldığında, yaklaşık %52,12'lik bir verim farkıyla ticari yağda daha fazla olduğu gözlemlendi.
 - ✓ Hem ticari ayçiçek yağı hem de atık kızartma (ayçiçek) yağı ile optimum şartlarda gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucu üretilen biyodizelin yüksek oranda C16 ve C18 yağ asidi metil esterleri içerdiği belirlendi.
 - ✓ Sonuç olarak, dekore (immobilize) edilmiş *K. phaffii* hücreleri tarafından üretilen rCalB enziminin transesterifikasyonu ile üretilen biyodizel mevcut biyodizellere alternatif olabilir.
 - ✓ *K. phaffii* hücreleri tarafından üretilen rCalB enziminin metanol varlığında atık kızartma (ayçiçek) yağından biyodizel üretmek için katalizör olarak kullanılabileceği de gösterildi.
 - ✓ Bu tez çalışmasında başarılı bir şekilde üretilen rCalB enzimi, immobilize edilerek biyodizel üretiminde yeniden kullanılabilirliği ve bu lipazın diğer kullanım alanları üzerinde araştırmalar yapılabilir.
 - ✓ Genel olarak, elde edilen bu olağanüstü ifade sistemi, ticari öneme sahip başka enzim ve proteinlerin ifadesi için uyarlanabilir ve optimize edilebilir.

KAYNAKLAR

- Aarthy, M., Saravanan, P., Gowthaman, M. K., Rose, C., and Kamini, N. R. (2014). Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(8). <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.04.008>.
- Abigor, R. D., Uadia, P. O., Foglia, T. A., Haas, M. J., Jones, K. C., Okpefa, E., Obibuzor, J. U., and Bafor, M. E. (2000). Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochemical Society Transactions*, 28, 979–981. <https://doi.org/10.1042/0300-5127:0280979>.
- Abul, N. (2019)., Bayır turpu (*Armoracia rusticana*) peroksidaz enziminin 3-aminobenzohidrazid türevleri kullanılarak afinitekromatografisi ile saflaştırılması. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Kimya Ana Bilim Dalı / Biyokimya Bilim Dalı.
- Acar, M., Abul, N., Yildiz, S., Taskesenligil, E. D., Gerni, S., Unver, Y., Kalin, R., and Ozdemir, H. (2023). Affinity-based and in a single step purification of recombinant horseradish peroxidase A2A isoenzyme produced by *Pichia pastoris*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(4), 523–534. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02837-2>.
- Acar, M. and Unver, Y., 2022. Constitutive and extracellular expression of pectin methylesterase from *Pectobacterium chrysanthemi* in *Pichia pastoris*. 3 Biotech, 12 (9), 1-9.
- Agueiras, E. C. G., Cavalcanti-Oliveira, E. D., De Castro, A. M., Langone, M. A. P., and Freire, D. M. G. (2014). Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel*, 135, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.06.069>.
- Ahn, J., Hong, J., Lee, H., Park, M., Lee, E., Kim, C., Choi, E., Jung, J., and Lee, H. (2007). Translation elongation factor 1- α gene from *Pichia pastoris*: Molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0698-6>.
- Akoh, C. C., Chang, S. W., Lee, G. C., and Shaw, J. F. (2007). Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8995–9005. <https://doi.org/10.1021/jf071724y>.
- Al-Hawash, A. B., Zhang, X., and Ma, F. (2017). Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems. *Gene Reports*, 9(August), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.08.006>.
- Almeida, F. L. C., Castro, M. P. J., Travália, B. M., and Forte, M. B. S. (2021). Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. In *Process Biochemistry* (Vol. 110). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.07.005>.
- Altinok, F., Albayrak, S., Arslan, N. P., Taskin, M., Aygun, E., Sisecioglu, M., and Adiguzel, A. (2023). Application of *Anoxybacillus gonensis* UF7 lipase as a catalyst for biodiesel production from waste frying oils. *Fuel*, 334. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126672>.

- Al-Zuhair, S., Ling, F. W., and Jun, L. S. (2007). Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry*, 42, 951–960. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.03.002>.
- Amais, R. S., Garcia, E. E., Monteiro, M. R., Nogueira, A. R. A., and Nóbrega, J. A. (2010). Direct analysis of biodiesel microemulsions using an inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 96(1). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.017>.
- Amini, Z., Ilham, Z., Ong, H. C., Mazaheri, H., and Chen, W. H. (2017). State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 141, 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.049>.
- Amoah, J., Ho, S. H., Hama, S., Yoshida, A., Nakanishi, A., Hasunuma, T., Ogino, C., and Kondo, A. (2016). Lipase cocktail for efficient conversion of oils containing phospholipids to biodiesel. *Bioresource Technology*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.062>.
- Anastácio, G. S., Santos, K. O., Suarez, P. A. Z., Torres, F. A. G., De Marco, J. L., and Parachin, N. S. (2014). Utilization of glycerin byproduct derived from soybean oil biodiesel as a carbon source for heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*, 152, 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.042>.
- Anderson, E. M., Larsson, K. M., Kirk, O. (1998). One biocatalyst-many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16(3), 181–204. <https://doi.org/10.3109/10242429809003198>.
- Andrade, L. H., and Barcellos, T. (2009). Lipase-catalyzed highly enantioselective kinetic resolution of boron-containing chiral alcohols. *Organic Letters*, 11, 3052–3055. <https://doi.org/10.1021/ol901091f>.
- Angajala, G., Pavan, P., and Subashini, R. (2016). Lipases: An overview of its current challenges and perspectives in the revolution of biocatalysis. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.07.001>.
- Ansari, F., Grigoriev, P., Libor, S., Tothill, I. E., and Ramsden, J. J. (2009). DBT Degradation Enhancement by Decorating *Rhodococcus erythropolis* IGST8 With Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1505–1512. <https://doi.org/10.1002/bit.22161>.
- Aparamarta, H. W., Gunawan, S., Husin, H., Azhar, B., and Tri Aditya, H. (2020). The effect of high oleic and linoleic fatty acid composition for quality and economical of biodiesel from crude *Calophyllum inophyllum* oil (CCIO) with microwave-assisted extraction (MAE), batchwise solvent extraction (BSE), and combination of MAE–BSE methods. *Energy Reports*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.197>.
- Arumugam, A., Thulasidharan, D., and Jegadeesan, G. B. (2018). Process optimization of biodiesel production from *Hevea brasiliensis* oil using lipase immobilized on spherical silica aerogel. *Renewable Energy*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.021>.
- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., Abdul Aziz, A. R., and Sulaiman, N. M. N. (2012). The effects of water on biodiesel production and refining technologies: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 16, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.004>.
- Aw, R., and Polizzi, K. M. (2016). Liquid PTVA: A faster and cheaper alternative for generating multi-copy clones in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 15(29). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0432-8>.

- Ba, H., Rodríguez-Fernández, J., Stefani, F. D., and Feldmann, J. (2010). Immobilization of gold nanoparticles on living cell membranes upon controlled lipid binding. *Nano Letters*, 10(8), 3006–3012. <https://doi.org/10.1021/nl101454a>.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., and Mehrotra, R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.018>.
- Bajpai, D., and Tyagi, V. K. (2006). Biodiesel: Source, Production, Composition, Properties and its Benefits. *Journal of Oleo Science*, 55(10). <https://doi.org/10.5650/jos.55.487>.
- Balat, M. (2011). Potential alternatives to edible oils for biodiesel production-A review of current work. *Energy Conversion and Management*, 52(2). <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.10.011>.
- Bao, Z., Xiao, H., Liang, J., Zhang, L., Xiong, X., Sun, N., Si, T., and Zhao, H. (2015). Homology-Integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) System for One-Step Multigene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 4(5). <https://doi.org/10.1021/sb500255k>.
- Barsé, L. Q., Graebin, N. G., Cipolatti, E. P., Robert, J. M., Pinto, M. C. C., Pinto, J. C. C. S., Freire, D. M. G., and Rodrigues, R. C. (2019). Production and optimization of isopropyl palmitate via biocatalytic route using home-made enzymatic catalysts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.5782>.
- Basso, A., and Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes-A review. In *Molecular Catalysis* (Vol. 479). <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., and Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: A critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 133-153. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1438-9312\(200002\)102:2<133::aid-ejlt133>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/(sici)1438-9312(200002)102:2<133::aid-ejlt133>3.0.co;2-x).
- Bharathiraja, B., Ranjith Kumar, R., PraveenKumar, R., Chakravarthy, M., Yogendran, D., and Jayamuthunagai, J. (2016). Biodiesel production from different algal oil using immobilized pure lipase and tailor made *rPichia pastoris* with Cal A and Cal B genes. *Bioresource Technology*, 213, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.041>.
- Bhatt, C., Nielsen, P. M., Rancke-Madsen, A., and Woodley, J. M. (2022). Combining technology with liquid-formulated lipases for in-spec biodiesel production. In *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 69, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/bab.2074>.
- Bill, R. M. (2014). Playing catch-up with escherichia coli: Using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00085>.
- Bisen, P. S., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B. K. S. (2010). Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnology Letters*, 32(8), 1019–1030. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0275-z>.
- Borugadda, V. B., Goud, V. V. (2012). Biodiesel production from renewable feedstocks: Status and opportunities. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 16, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.010>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brady, D., Nigam, P., Marchant, R., Singh, D., McHale, A. P. (1997). The effect of Mn²⁺ on ethanol production from lactose using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in

- magnetically responsive matrices. *Bioprocess Engineering*, 17(1), 31–34. <https://doi.org/10.1007/PL00008953>.
- Brito e Cunha, D. A., Bartkevihi, L., Robert, J. M., Cipolatti, E. P., Ferreira, A. T. S., Oliveira, D. M. P., Gomes-Neto, F., Almeida, R. V., Fernandez-Lafuente, R., Freire, D. M. G., and Anobom, C. D. (2019). Structural differences of commercial and recombinant lipase B from *Candida antarctica*: An important implication on enzymes thermostability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 761–770. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.148>.
- Budisa, N., Wenger, W., and Wiltschi, B. (2010). Residue-specific global fluorination of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Molecular BioSystems*, 6, 1630–1639. <https://doi.org/10.1039/c002256j>.
- Cámara, E., Albiol, J., and Ferrer, P. (2016). Droplet digital PCR-aided screening and characterization of *Pichia pastoris* multiple gene copy strains. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(7), 1542–1551. <https://doi.org/10.1002/bit.25916>.
- Canakci, M., and Sanli, H. (2008). Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 35, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0337-6>.
- Carrasco-López, C., Godoy, C., de las Rivas, B., Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., Martínez-Ripoll, M., and Hermoso, J. A. (2009). Activation of bacterial thermo alkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 4365–4372. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808268200>.
- Cavalcante, F. T. T., Neto, F. S., Rafael de Aguiar Falcão, I., Erick da Silva Souza, J., de Moura Junior, L. S., da Silva Sousa, P., Rocha, T. G., de Sousa, I. G., de Lima Gomes, P. H., de Souza, M. C. M., and dos Santos, J. C. S. (2021). Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. In *Fuel* (Vol. 288). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119577>.
- Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 24, Issue 1, pp. 45–66). [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00029-7).
- Chaisutyakorn, P., Praiboon, J., Kaewsuralikhit, C. (2018). The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 30(1). <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1186-3>.
- Chatraei, N., and Emtiazi, G. (2019). Immobilization of phytase producing probiotics in shrimp chitosan cross-linked by zinc oxide nanoparticles and assay its antibacterial activity. *Applied Food Biotechnology*, 6(3), 139–150. <https://doi.org/10.22037/afb.v%vi%i.23398>.
- Chen, K. S., Lin, Y. C., Hsu, K. H., Wang, H. K. (2012). Improving biodiesel yields from waste cooking oil by using sodium methoxide and a microwave heating system. *Energy*, 38(1). <https://doi.org/10.1016/j.energy.2011.12.020>.
- Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., Wang, X. (2009). Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, 50(3). <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.10.011>.
- Chhetri, A. B., Watts, K. C., and Islam, M. R. (2008). Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production. *Energies*, 1(1). <https://doi.org/10.3390/en1010003>.

- Choi, N., No, D. S., Kim, H., Kim, B. H., Kwak, J., Lee, J. S., Kim, I. H. (2018). In situ lipase-catalyzed transesterification in rice bran for synthesis of fatty acid methyl ester. *Industrial Crops and Products*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.049>.
- Christopher, L. P., Hemanathan Kumar, Zambare, V. P. (2014). Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. In *Applied Energy* (Vol. 119). <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.01.017>.
- Cipolatti, E. P., Pinto, M. C. C., Robert, J. de M., da Silva, T. P., Beralto, T. da C., Santos, J. G. F., de Castro, R. de P. V., Fernandez-Lafuente, R., Manoel, E. A., Pinto, J. C., Freire, D. M. G. (2018). Pilot-scale development of core-shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids. *Journal of Applied Polymer Science*, 135, 46727. <https://doi.org/10.1002/app.46727>.
- Copeland, R. A. (2000). Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis (2nd Ed.). In Wiley-VCH (p. 416).
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M., Valero, F. (2005). Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116(4), 321–335. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.12.010>.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. In *Applied Biochemistry and Biotechnology-Part B Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>.
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., and Stillman, C. A. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), 1316–1323. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.3.1316>.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., and Raschke, W. C. (1993). Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 11(8), 905–910. <https://doi.org/10.1038/nbt0893-905>.
- Dagci, I., Acar, M., Turhan, F., Mavi, A., Unver, Y. (2024). Extracellular production of azurin by reusable magnetic Fe₃O₄ nanoparticle-immobilized *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, 394, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.08.010>.
- Dagci, I., Solak, K., Oncer, N., Yildiz Arslan, S., Unver, Y., Yilmaz, M., Mavi, A. (2024). Machine Learning-Assisted SERS Reveals the Biochemical Signature of Enhanced Protein Secretion from Surface-Modified Magnetic Nanoparticles. *ACS Applied Materials and Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c18591>.
- Dağcı, İ. (2024). Komagataella phaffii'de ısı ile indüklenebilir bir heterolog protein ekspresyon sisteminin geliştirilmesi ve azurin proteininin üretimi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- De Almeida, V. F., García-Moreno, P. J., Guadix, A., and Guadix, E. M. (2015). Biodiesel production from mixtures of waste fish oil, palm oil and waste frying oil: Optimization of fuel properties. *Fuel Processing Technology*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.01.041>.
- de Lima, L. N., Mendes, A. A., Fernandez-Lafuente, R., Tardioli, P. W., and Camargo Giordano, R. de L. (2018). Performance of different immobilized lipases in the syntheses of short- and long-chain carboxylic acid esters by esterification reactions in organic media. *Molecules*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040766>.

- De Schutter, K., Lin, Y. C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van De Peer, Y., and Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1544>.
- Demirbas, A. (2005). Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. In *Progress in Energy and Combustion Science* (Vol. 31, Issues 5–6). <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2005.09.001>.
- Demirbas, A. (2007). Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*, 35(9). <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2007.04.003>.
- Deng, J., Li, J., Ma, M., Zhao, P., Ming, F., Lu, Z., Shi, J., Fan, Q., Liang, Q., Jia, J., Li, J., Zhang, S., and Zhang, L. (2020). Co-expressing GroEL-GroES, Ssa1-Sis1 and Bip-PDI chaperones for enhanced intracellular production and partial-wall breaking improved stability of porcine growth hormone. *Microbial Cell Factories*, 19 (1)(35). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01304-5>.
- Dias Ribeiro, B., Machado de Castro, A., Zarur Coelho, M. A., and Guimaraes Freire, D. M. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: A review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, 2011, 615803.
- Dombkowski, A. A., Sultana, K. Z., and Craig, D. B. (2014). Protein disulfide engineering. In *FEBS Letters* (Vol. 588, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.024>.
- Dou, W., Feng, J., Zhang, X., Xu, H., Shi, J., and Xu, Z. (2013). Expression, purification, and bioactivity of (GLP-1A2G) 2-HSA analogs in *Pichia pastoris* GS115. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(6), 1076–1082. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0356-7>.
- El-Batal, A. I., Farrag, A. A., Elsayed, M. A., and El-Khawaga, A. M. (2016). Biodiesel production by aspergillus Niger lipase immobilized on barium ferrite magnetic nanoparticles. *Bioengineering*, 3(2). <https://doi.org/10.3390/bioengineering3020014>.
- Encinar, J. M., Sánchez, N., Martínez, G., and García, L. (2011). Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content. *Bioresource Technology*, 102(23). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.068>.
- Eom, G. T., Lee, S. H., Song, B. K., Chung, K.-W., Kim, Y.-W., and Song, J. K. (2013). High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(2), 165–170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.016>.
- Escobar, J. C., Lora, E. S., Venturini, O. J., Yáñez, E. E., Castillo, E. F., and Almazan, O. (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 13, Issues 6–7). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.08.014>.
- Fan, X. (2012). Enzymatic biodiesel production-the way of the future. *Lipid Technology*, 24(2). <https://doi.org/10.1002/lite.201200169>.
- Farooq, M., Ramli, A., and Subbarao, D. (2013). Biodiesel production from waste cooking oil using bifunctional heterogeneous solid catalysts. *Journal of Cleaner Production*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.06.015>.
- Fickers, P. (2014). *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*.
- Firdaus, M. Y., Brask, J., Nielsen, P. M., Guo, Z., and Fedosov, S. (2016). Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus*.

- Fjerbaek, L., Christensen, K. V., and Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1298–1315. <https://doi.org/10.1002/bit.22256>.
- Folayan, A. J., Anawe, P. A. L., Aladejare, A. E., and Ayeni, A. O. (2019). Experimental investigation of the effect of fatty acids configuration, chain length, branching and degree of unsaturation on biodiesel fuel properties obtained from lauric oils, high-oleic and high-linoleic vegetable oil biomass. *Energy Reports*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.06.013>.
- Franssen, M. C. R., Steunenberg, P., Scott, E. L., Zuillhof, H., and Sanders, J. P. M. (2013). Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chemical Society Reviews*, 42, 6491–6533. <https://doi.org/10.1039/c3cs00004d>.
- Fuglsang, A. (2003). Codon optimizer: A freeware tool for codon optimization. *Protein Expression and Purification*, 31(2), 247–249. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00213-4](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00213-4).
- Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 405–416. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80288-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80288-7).
- Gaffar, S., Natalia, D., Subroto, T., Suprijana, O., and Soemitro, S. (2019). Combination of genetic manipulation improved *saccharomycopsis fibuligera* α -amylase secretion by *pichia pastoris*. *Indonesian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.22146/ijc.33140>.
- Gao, J., Jiang, L., and Lian, J. (2021). Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products. In *Synthetic and Systems Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.04.005>.
- Gao, J., Shi, L., Jiang, Y., Zhou, L., and He, Y. (2013). Formation of lipase *Candida* sp. 99-125 CLEAs in mesoporous silica: Characterization and catalytic properties. *Catalysis Science and Technology*, 3(12). <https://doi.org/10.1039/c3cy00412k>.
- Gaskin, D. J. H., Romojaro, A., Turner, N. A., Jenkins, J., and Vulfson, E. N. (2001). Alteration of lipase chain length specificity in the hydrolysis of esters by random mutagenesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 73, 433–441. <https://doi.org/10.1002/bit.1077>.
- Georgogianni, K. G., Kontominas, M. G., Tegou, E., Avlonitis, D., and Gergis, V. (2007). Biodiesel production: Reaction and process parameters of alkali-catalyzed transesterification of waste frying oils. *Energy and Fuels*, 21(5), 3023–3027. <https://doi.org/10.1021/ef070102b>.
- Gerpen, J. Van, Shanks, B., Pruszko, R., and Clements, D. (2004). Biodiesel Production Technology. In *Contract* (p. NREL/SR-510-36244).
- Ghaly, A. E., Dave, D., Brooks, M. S., and Budge, S. (2010). Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(2), 54–76. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2010.54.76>.
- Gilham, D., and Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.11.003>.
- Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., and Irimie, F. D. (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. In *Renewable Energy* (Vol. 39, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.08.007>.

- Gomes, A. R., Byregowda, S. M., Veeregowda, B. M., and Balamurugan, V. (2016). An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4, 346–356. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>.
- Goswami, D., Basu, J. K., and De, S. (2013). Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: A review. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.672319>.
- Gotor-Fernandez, V., Busto, E., and Gotor, V. (2006). *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 348(7–8), 797–812. <https://doi.org/10.1002/chin.200635254>.
- Guillén, M., Benaiges, M. D., and Valero, F. (2011). Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase extract from *Rhizopus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* with a native extract. *Biochemical Engineering Journal*, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.02.008>
- Guldhe, A., Singh, B., Mutanda, T., Permaul, K., and Bux, F. (2015). Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 41). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.035>.
- Gunasekaran, V., and Das, D. (2005). Lipase fermentation: Progress and prospects. In *Indian Journal of Biotechnology* (Vol. 4, Issue 4).
- Guo, Y., Cai, Z., Xie, Y., Ma, A., Zhang, H., Rao, P., and Wang, Q. (2020). Synthesis, physicochemical properties, and health aspects of structured lipids: A review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 19, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12537>.
- Gutarra, M. L. E., Romero, O., Abian, O., Torres, F. A. G., Freire, D. M. G., Castro, A. M., Guisan, J. M., and Palomo, J. M. (2011). Enzyme surface glycosylation in the solid phase: Improved activity and selectivity of *Candida antarctica* lipase B. *ChemCatChem*, 1902–1910. <https://doi.org/10.1002/cctc.201100211>.
- Haas, M. J., Michalski, P. J., Runyon, S., Nunez, A., and Scott, K. M. (2003). Production of FAME from acid oil, a by-product of vegetable oil refining. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 97–102. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0658-4>.
- Haki, G. D., and Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 89, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6).
- Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., Noda, H., and Fukuda, H. (2007). Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, 34(3), 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.12.013>.
- Han, R., Yi, H., Shi, J., Liu, Z., Wang, H., Hou, Y., and Wang, Y. (2016). pH-Responsive drug release and NIR-triggered singlet oxygen generation based on a multifunctional core-shell-shell structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(36), 25497–25503. <https://doi.org/10.1039/C6CP05308D>.
- Hasan, F., Shah, A. A., and Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 27, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001>.

- Hatahet, F., and Ruddock, L. W. (2009). Protein disulfide isomerase: A critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(11), 2807–2850. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2466>.
- He, Y., Wang, S., and Lai, K. K. (2010). Global economic activity and crude oil prices: A cointegration analysis. *Energy Economics*, 32(4). <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2009.12.005>.
- Heiligenthal, L., van der Loh, M., Polack, M., Blaha, M. E., Moschütz, S., Keim, A., Sträter, N., and Belder, D. (2022). Analysis of double-emulsion droplets with ESI mass spectrometry for monitoring lipase-catalyzed ester hydrolysis at nanoliter scale. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(23). <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04266-2>.
- Høegh, I., Patkar, S., Halkier, T., and Hansen, M. T. (1995). Two lipases from *Candida antarctica* : cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Canadian Journal of Botany*, 73, 869–875. <https://doi.org/10.1139/b95-333>.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N., and Mattanovich, D. (2004). Effects of Gene Dosage, Promoters, and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, 367–375. <https://doi.org/10.1002/bit.10904>.
- Hosseini, S. E., and Wahid, M. A. (2012). Necessity of biodiesel utilization as a source of renewable energy in Malaysia. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 16, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.05.025>.
- Hou, X., Zaks, T., Langer, R., and Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 6, 1078–1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>.
- Huang, D., Han, S., Han, Z., and Lin, Y. (2012). Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase-displaying *Pichia pastoris* whole cells in an isooctane system. *Biochemical Engineering Journal*, 63, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.08.009>.
- Huang, J., Xia, J., Jiang, W., Li, Y., and Li, J. (2015). Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase. *Bioresource Technology*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.072>.
- Huang, J., Zhao, Q., Chen, L., Zhang, C., Bu, W., Zhang, X., Zhang, K., and Yang, Z. (2020). Improved production of recombinant *Rhizomucor miehei* lipase by coexpressing protein folding chaperones in *Pichia pastoris*, which triggered ER stress. *Bioengineered*, 11(1), 375–385. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1738127>.
- Huggins, C., and Lapides, J. (1947). Chromogenic Substrates: IV. Acyl Esters of p-Nitrophenol As Substrates For The Colorimetric Determination of Esterase. *Journal of Biological Chemistry*, 170, 467–482.
- Hung, T. C., Giridhar, R., Chiou, S. H., and Wu, W. T. (2003). Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1–2), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00167-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00167-X).
- Igbinosa, E. O., Beshiru, A., Akporehe, L. U., Oviasogie, F. E., and Igbinosa, O. O. (2016). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in raw meat samples intended for human consumption in Benin City, Nigeria: Implications for public health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(10), 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph13100949>.

- Inan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J., and Meagher, M. M. (2006). Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(4), 771–778. <https://doi.org/10.1002/bit.20762>.
- Invitrogen. (2010a). pGAPZ A, B, and C, pGAPZα A, B, and C, *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. *Invitrogen Manual*, 25, 25–0174.
- Invitrogen, L. T. (2010b). User manual-EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. Cat. No. K1740-01.
- Islam, Md. S., Choi, W. S., and Lee, H. (2014). Controlled Etching of Internal and External Structures of SiO₂ Nanoparticles Using Hydrogen Bond of Polyelectrolytes. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6, 9563–9571.
- Iyyappan, J., Jayamuthunagai, J., Bharathiraja, B., Saravanaraj, A., Praveen Kumar, R., and Balraj, S. (2022). Production of biodiesel from *Caulerpa racemosa* oil using recombinant *Pichia pastoris* whole cell biocatalyst with double displayed over expression of *Candida antartica* lipase. *Bioresource Technology*, 363(September), 127893. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127893>.
- Jaeger, K. E., and Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16, 396–403. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01195-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01195-0).
- Janaun, J., and Ellis, N. (2010). Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.12.011>.
- Jayaraman, J., Alagu, K., Appavu, P., Joy, N., Jayaram, P., and Mariadoss, A. (2020). Enzymatic production of biodiesel using lipase catalyst and testing of an unmodified compression ignition engine using its blends with diesel. *Renewable Energy*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.061>.
- Jess, A. (2010). What might be the energy demand and energy mix to reconcile the world's pursuit of welfare and happiness with the necessity to preserve the integrity of the biosphere? *Energy Policy*, 38(8). <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.04.026>.
- Jha, V., Kumari, T., Manickam, V., Assar, Z., Olson, K. L., Min, J. K., and Cho, J. (2021). ERO1-PDI Redox Signaling in Health and Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 35(13), 1093–1115. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0018>.
- Jia, N., Xiong, Y., Wang, Y., Lu, S., Zhang, R., Kang, Y., and Du, Y. (2022). A novel surface-enhanced Raman scattering method for detecting fish pathogenic bacteria with Fe₃O₄@PEI nanocomposite and concentrated Au@Ag. *Journal of Raman Spectroscopy*, 53(2). <https://doi.org/10.1002/jrs.6282>.
- Jiang, W., Wang, X., Yang, J., Han, H., Li, Q., and Tang, J. (2018). Lipase-inorganic hybrid nanoflower constructed through biomimetic mineralization: A new support for biodiesel synthesis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 514. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.12.025>.
- João, J. H., Tres, M. V., Jahn, S. L., and de Oliveira, J. V. (2020). Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67, 648–667. <https://doi.org/10.1002/bab.1835>.
- Jun, S. H., Lee, J., Kim, B. C., Lee, J. E., Joo, J., Park, H., Lee, J. H., Lee, S. M., Lee, D., Kim, S., Koo, Y. M., Shin, C. H., Kim, S. W., Hyeon, T., and Kim, J. (2012). Highly efficient enzyme immobilization and stabilization within meso-structured onion-like silica for

- biodiesel production. *Chemistry of Materials*, 24(5). <https://doi.org/10.1021/cm202125q>.
- Jung, S., and Park, S. (2008). Improving the expression yield of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by mutagenesis. *Biotechnology Letters*, 30, 717–722. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9591-3>.
- Juturu, V., and Wu, J. C. (2018). Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. In *ChemBioChem* (Vol. 19, Issue 1, pp. 7–21). <https://doi.org/10.1002/cbic.201700460>.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., and Fukuda, H. (2001). Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1). [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80103-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80103-1).
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E., and Fukuda, H. (1999). Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(6), 627–631. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87091-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87091-7).
- Kamel Ariffin, M. F., and Idris, A. (2022). Fe₂O₃/Chitosan coated superparamagnetic nanoparticles supporting lipase enzyme from *Candida Antarctica* for microwave assisted biodiesel production. *Renewable Energy*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.11.077>.
- Kamel, Y. (2020). Genotypic and Phenotypic Characterization, Antibiotic Resistance and Virulence Patterns of *Staphylococcus aureus* Isolated form Goat Mastitis. *Mansoura Veterinary Medical Journal*, 21(4), 161–166. <https://doi.org/10.21608/mvmj.2020.135264>.
- Kami, D., Takeda, S., Itakura, Y., Gojo, S., Watanabe, M., and Toyoda, M. (2011). Application of magnetic nanoparticles to gene delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(6), 3705–3722. <https://doi.org/10.3390/ijms12063705>.
- Kamini, N. R., and Iefuji, H. (2001). Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2. *Process Biochemistry*, 37, 405–410. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00220-5).
- Kapoor, M., and Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47, 555–569. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>.
- Karagül-Yüceer, Y., Cadwallader, K. R., and Drake, M. A. (2002). Volatile flavor components of stored nonfat dry milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2). <https://doi.org/10.1021/jf010648a>.
- Karaman, F., Incekara, U., Arslan, N. P., Albayrak, S., Ortucu, S., and Taskin, M. (2024). A New Enzyme for Biodiesel Production and Food Applications: Lipase of *Bacillus megaterium* F25 Isolated From an Aquatic Insect *Rhantus suturalis*. *GCB Bioenergy*, 16(12). <https://doi.org/10.1111/gcbb.70009>.
- Karaoğlu, F. E., and Karaoğlu, M. (2022). Bakteriyel Kaynaklı Lipaz Geninin *Pichia pastoris*'te Klonlanması, Ekspresyonu ve Rekombinant Enzimin Saflaştırılması. 12(4), 2209–2222. <https://doi.org/10.21597/jist.1107276>.
- Katre, G., Joshi, C., Khot, M., Zinjarde, S., and Ravikumar, A. (2012). Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-36>.

- Kerr, H., Herbert, A. P., Makou, E., Abramczyk, D., Malik, T. H., Lomax-Browne, H., Yang, Y., Pappworth, I. Y., Denton, H., Richards, A., Marchbank, K. J., Pickering, M. C., and Barlow, P. N. (2021). Murine Factor H Co-Produced in Yeast With Protein Disulfide Isomerase Ameliorated C3 Dysregulation in Factor H-Deficient Mice. *Frontiers in Immunology*, 12, 681098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.681098>.
- Khan, M. S. I., Khan, A., Adeyinka, O. S., Yousaf, I., Riaz, S., Bashir, B., Tariq, M., and Tabassum, B. (2020). Molecular cloning and expression of recombinant *Trichoderma harzianum* chitinase in *Pichia pastoris*. *Advancements in Life Sciences*.
- Khan, N. R., and Rathod, V. K. (2015). Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. In *Process Biochemistry* (Vol. 50, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.014>.
- Khatoon, H., and Rai, J. P. N. (2018). Augmentation of Atrazine biodegradation by two Bacilli immobilized on α -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36296-1>.
- Kim, E., Sun, L., Gabel, C. V., and Fang-Yen, C. (2013). Long-Term Imaging of *Caenorhabditis elegans* Using Nanoparticle-Mediated Immobilization. *PLoS ONE*, 8(1), e53419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053419>.
- Kim, J. Y., Lee, C., Love, D. C., Sedlak, D. L., Yoon, J., and Nelson, K. L. (2011). Inactivation of MS2 coliphage by ferrous ion and zero-valent iron nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 45(16), 6978–6984. <https://doi.org/10.1021/es201345y>.
- Kirk, O., and Christensen, M. W. (2002). Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research and Development*, 6, 446–451. <https://doi.org/10.1021/op0200165>.
- Knothe, G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 86(10). <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2004.11.002>.
- Knothe, G. (2009). Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. In *Energy and Environmental Science* (Vol. 2, Issue 7). <https://doi.org/10.1039/b903941d>.
- Knothe, G., Bagby, M. O., and Ryan, T. W. (1998). Precombustion of fatty acids and esters of biodiesel. A possible explanation for differing cetane numbers. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(8). <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0279-1>.
- Knothe, G., Krah, J., and Van Gerpen, J. (2010). The Biodiesel Handbook: Second Edition. In *The Biodiesel Handbook: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-02453-4>.
- Knothe, G., Matheaus, A. C., and Ryan, T. W. (2003). Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. *Fuel*, 82(8). [https://doi.org/10.1016/S0016-2361\(02\)00382-4](https://doi.org/10.1016/S0016-2361(02)00382-4).
- Ko, M. J., Park, H. J., Hong, S. Y., and Yoo, Y. J. (2012). Continuous biodiesel production using in situ glycerol separation by membrane bioreactor system. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 69–75. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0604-1>.
- Komesli, S., Akbulut, S., Arslan, N. P., Adiguzel, A., and Taskin, M. (2021). Waste frying oil hydrolysis and lipase production by cold-adapted *Pseudomonas yamanorum* LP2 under non-sterile culture conditions. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 42(20), 3245–3253. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1745297>.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D., and Schmid, R. D. (1991). Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization, and

- preliminary X-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, 173(15), 4836–4841. <https://doi.org/10.1128/jb.173.15.4836-4841.1991>.
- Koutz, P., Davis, G. R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., and Thill, G. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.320050306>.
- Krawczyk, T. (1996). Biodiesel-Alternative Fuel Makes Inroads but Hurdles Remain. *Inform*, 7, 801–829.
- Kuepethkaew, S., Sangkharak, K., Benjakul, S., and Klomklao, S. (2017). Optimized synthesis of biodiesel using lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas. *Renewable Energy*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.12.014>.
- Kumari, V., Shah, S., and Gupta, M. N. (2007). Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy and Fuels*, 21(1), 368–372. <https://doi.org/10.1021/ef0602168>.
- Kuo, T. C., Shaw, J. F., and Lee, G. C. (2015). Conversion of crude *Jatropha curcas* seed oil into biodiesel using liquid recombinant *Candida rugosa* lipase isozymes. *Bioresource Technology*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.008>.
- Larsen, M. W., Bornscheuer, U. T., and Hult, K. (2008). Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein Expression and Purification*, 62, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.07.012>.
- Lee, J. H., Kwon, C. H., Kang, J. W., Park, C., Tae, B., and Kim, S. W. (2009). Biodiesel production from various oils under supercritical fluid conditions by *Candida antartica* lipase b using a stepwise reaction method. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 156(1–3). <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8488-5>.
- Leung, D. Y. C., Wu, X., and Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. In *Applied Energy* (Vol. 87, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.10.006>.
- Li, D., Zhang, B., Li, S., Zhou, J., Cao, H., Huang, Y., and Cui, Z. (2017). A novel vector for construction of markerless multicopy overexpression transformants in *Pichia pastoris*. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01698>.
- Li, J., Wang, C., Shi, L., Shao, L., Fu, P., Wang, K., Xiao, R., Wang, S., and Gu, B. (2019). Rapid identification and antibiotic susceptibility test of pathogens in blood based on magnetic separation and surface-enhanced Raman scattering. *Microchimica Acta*, 186(7). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3571-x>.
- Li, N. W., Zong, M. H., and Wu, H. (2009). Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. *Process Biochemistry*, 44(6). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.012>.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., and Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(2), 105–124. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0003-x>.
- Li, Q., Chen, Y., Bai, S., Shao, X., Jiang, L., and Li, Q. (2020). Immobilized lipase in bio-based metal-organic frameworks constructed by biomimetic mineralization: A sustainable biocatalyst for biodiesel synthesis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110812>.

- Li, Q., and Yan, Y. (2010). Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. *Applied Energy*, 87(10). <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.02.032>.
- Li, X., Liu, Z., Wang, G., Pan, D., Jiao, L., and Yan, Y. (2016). Overexpression of *Candida rugosa* lipase Lip1 via combined strategies in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 82, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.09.003>.
- Liao, B., Chen, X., Zhou, X., Zhou, Y., Shi, Y., Ye, X., Liao, M., Zhou, Z., Cheng, L., and Ren, B. (2022). Applications of CRISPR/Cas gene-editing technology in yeast and fungi. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02723-7>.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., and Jaeger, K. E. (2000). Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chemistry and Biology*, 7, 709–718. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00015-6).
- Lima, R. N., dos Anjos, C. S., Orozco, E. V. M., and Porto, A. L. M. (2019). Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. In *Molecular Catalysis* (Vol. 466). <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.007>.
- Liu, C., Chen, K., Wang, Y., Shao, M., Xu, Z., and Rao, Z. (2022). Identification of a novel cytochrome P450 17A2 enzyme catalyzing the C17 α hydroxylation of progesterone and its application in engineered *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 177, 108264. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108264>.
- Liu, C. H., Huang, C. C., Wang, Y. W., Lee, D. J., and Chang, J. S. (2012). Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by Burkholderia lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. *Applied Energy*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.053>.
- Liu, H., Tan, X., Russell, K. A., Veenhuis, M., and Cregg, J. M. (1995). PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10940>.
- Liu, Y., Huang, L., Zheng, D., Fu, Y., Shan, M., Xu, Z., Ma, J., and Lu, F. (2018). Development of a *Pichia pastoris* whole-cell biocatalyst with overexpression of mutant lipase i PCLG47I from *Penicillium cyclopium* for biodiesel production. *RSC Advances*, 8(46). <https://doi.org/10.1039/c8ra04462g>.
- Looser, V., Lüthy, D., Straumann, M., Hecht, K., Melzoch, K., and Kovar, K. (2017). Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CALB by *P. pastoris*: functional characterisation of a novel promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3163– 3176. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8123-x>.
- Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., and Ferrer, P. (2015). Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. In *Biotechnology Journal* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/biot.201400158>.
- Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., and Ferrer, P. (2018). Enzymatic Production of Biodiesel: Strategies to Overcome Methanol Inactivation. In *Biotechnology Journal* (Vol. 13, Issue 5). <https://doi.org/10.1002/biot.201700155>.
- Lu, Y., Lv, Q., Liu, B., and Liu, J. (2019). Immobilized *Candida antarctica* lipase B catalyzed synthesis of biodegradable polymers for biomedical applications. *Biomaterials Science*, 7(12). <https://doi.org/10.1039/c9bm00716d>.
- Lv, L., Dai, L., Du, W., and Liu, D. (2021). Progress in enzymatic biodiesel production and commercialization. *Processes*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/pr9020355>.

- Manaf, I. S. A., Embong, N. H., Khazaai, S. N. M., Rahim, M. H. A., Yusoff, M. M., Lee, K. T., and Maniam, G. P. (2019). A review for key challenges of the development of biodiesel industry. In *Energy Conversion and Management* (Vol. 185). <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.02.019>.
- Manoel, E. A., Robert, J. M., Pinto, M. C. C., MacHado, A. C. O., Besteti, M. D., Coelho, M. A. Z., Simas, A. B. C., Fernandez-Lafuente, R., Pinto, J. C., and Freire, D. M. G. (2016). Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media. *RSC Advances*, 6, 4043–4052. <https://doi.org/10.1039/c5ra22508f>.
- Marchetti, J. M., Miguel, V. U., and Errazu, A. F. (2007). Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11, 1300–1311. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2005.08.006>
- Marul, B. (2007). Fabrika atıklarından izole edilen *Bacillus* sp.'den aktif ve kararlı lipaz üretim koşullarının ve üretilen enzimin deterjan endüstrisinde kullanımının araştırılması. Y. Lisans Tezi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Marx, H., Mecklenbräuer, A., Gasser, B., Sauer, M., and Mattanovich, D. (2009). Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00561.x>.
- Mata, T. M., Sousa, I. R. B. G., Vieira, S. S., and Caetano, N. S. (2012). Biodiesel production from corn oil via enzymatic catalysis with ethanol. *Energy and Fuels*, 26(5). <https://doi.org/10.1021/ef300319f>.
- Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R., and Buchner, J. (2000). BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29421–29425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002655200>.
- Meher, L. C., Vidya Sagar, D., and Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification-A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3), 248–268. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>.
- Mekonnen, K. D., Endris, Y. A., and Abdu, K. Y. (2024). Alternative Methods for Biodiesel Cetane Number Valuation: A Technical Note. In *ACS Omega* (Vol. 9, Issue 6). <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09216>.
- Melani, N. B., Tambourgi, E. B., and Silveira, E. (2020). Lipases: From Production to Applications. In *Separation and Purification Reviews* (Vol. 49, Issue 2). <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>.
- Menendez, J., Valdes, I., and Cabrera, N. (2003). The ICLI gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.1028>.
- Meng, Y., Wang, G., Yang, N., Zhou, Z., Li, Y., Liang, X., Chen, J., Li, Y., and Li, J. (2011). Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 6. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-6>.
- Mittelbach, M. (1990). Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(3), 168–170. <https://doi.org/10.1007/BF02539619>.
- Moazeni, F., Chen, Y. C., and Zhang, G. (2019). Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 216). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.181>.

- Mofijur, M., Atabani, A. E., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., and Masum, B. M. (2013). A study on the effects of promising edible and non-edible biodiesel feedstocks on engine performance and emissions production: A comparative evaluation. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.03.009>.
- Mofijur, M., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., and Atabani, A. E. (2013). Evaluation of biodiesel blending, engine performance and emissions characteristics of *Jatropha curcas* methyl ester: Malaysian perspective. *Energy*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2013.02.059>.
- Mofijur, M., Siddiki, S. Y. A., Shuvho, M. B. A., Djavanroodi, F., Fattah, I. M. R., Ong, H. C., Chowdhury, M. A., and Mahlia, T. M. I. (2021). Effect of nanocatalysts on the transesterification reaction of first, second and third generation biodiesel sources- A mini-review. *Chemosphere*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128642>.
- Mondal, M., Goswami, S., Ghosh, A., Oinam, G., Tiwari, O. N., Das, P., Gayen, K., Mandal, M. K., and Halder, G. N. (2017). Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. In *3 Biotech* (Vol. 7, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0727-4>.
- Moreira de Almeida, J. R., Pepe de Moraes, L. M., and Gonçalves Torres, F. A. (2005). Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.1243>.
- Moser, B. R. (2008). Influence of blending canola, palm, soybean, and sunflower oil methyl esters on fuel properties of biodiesel. *Energy and Fuels*, 22(6). <https://doi.org/10.1021/ef800588x>.
- Moya Joëlle Carole, A., Konan Edmond, K., Abollé, A., Esaie Kouadio Appiah, K., and Kouassi Benjamin, Y. (2023). Transesterification of vegetable oils into biodiesel by an immobilized lipase: a review. In *Biofuels* (Vol. 14, Issue 10). <https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2203433>.
- Muanruksa, P., Winterburn, J., and Kaewkannetra, P. (2019). A novel process for biodiesel production from sludge palm oil. *MethodsX*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.09.039>.
- Mustafa, A., Faisal, S., Ahmed, I. A., Munir, M., Cipolatti, E. P., Manoel, E. A., Pastore, C., di Bitonto, L., Hanelt, D., Nitbani, F. O., El-Bahy, Z. M., Inayat, A., Abdellatief, T. M. M., Tonova, K., Bokhari, A., and Abomohra, A. (2023). Has the time finally come for green oleochemicals and biodiesel production using large-scale enzyme technologies? Current status and new developments. In *Biotechnology Advances* (Vol. 69). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108275>.
- Nadi, A., Melloul, M., Boukhriss, A., El-Fahime, E., Boyer, D., Hannache, H., and Gmouh, S. (2019). Immobilization of *Bacillus licheniformis* using Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles for the development of bacterial bioreactor. *Oriental Journal of Chemistry*, 35(2), 854–862. <https://doi.org/10.13005/ojc/350249>.
- Navvabi, A., Razzaghi, M., Fernandes, P., Karami, L., and Homaei, A. (2018). Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. In *Process Biochemistry* (Vol. 70). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.018>.
- Nelson, L. A., Foglia, T. A., and Marmer, W. N. (1996). Lipase-catalyzed production of biodiesel. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1191–1195. <https://doi.org/10.1007/BF02523383>.

- Nigam, P. S., and Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. In *Progress in Energy and Combustion Science* (pp. 52–68). <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>.
- OECD-FAO. (2011). Agricultural Outlook 2011–2020. In *Organisation For Economic Co-Operation And Development*.
- Ogata, K., Nishikawa, H., and Ohsugi, M. (1969). A yeast capable of utilizing methanol. *Agricultural and Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859497>
- Okwundu, O. S., El-Shazly, A. H., and Elkady, M. (2019). Comparative effect of reaction time on biodiesel production from low free fatty acid beef tallow: a definition of product yield. *SN Applied Sciences*, 1(2). <https://doi.org/10.1007/s42452-018-0145-1>.
- Orman, M. A., Çalık, P., and Özdamar, T. H. (2009). The influence of carbon sources on recombinant-human- growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of Muts and Mut⁺ strains. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52(3), 245–255. <https://doi.org/10.1042/ba20080057>.
- Örs, İ., Ciniviz, M., and Sayın Kul, B. (2021). Atık Kızartma Yağı Biyodizelinin Performans, Emisyon ve Yanma Karakteristiklerinin Pamuk Yağı ve Aspir Yağı Biyodizelleri ile Karşılaştırılması. *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 37(3), 392–404.
- Owolabi, R., N.A, O., Amosa, M. K., and Elizabeth, O. M. (2011). Biodiesel from Household/Restaurant Waste Cooking Oil (WCO). *Journal of Chemical Engineering and Process Technology*, 02(04). <https://doi.org/10.4172/2157-7048.1000112>.
- Pace, C. N., Fu, H., Fryar, K. L., Landua, J., Trevino, S. R., Shirley, B. A., Hendricks, M. M. N., Iimura, S., Gajiwala, K., Scholtz, J. M., and Grimsley, G. R. (2011). Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Journal of Molecular Biology*, 408(3). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.053>.
- Papakonstantinou, T., Harris, S., and Hearn, M. T. W. (2009). Expression of GFP using *Pichia pastoris* vectors with zeocin or G-418 sulphate as the primary selectable marker. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.1666>.
- Park, C. G., Kim, T. W., Oh, I. S., Song, J. K., and Kim, D. M. (2009). Expression of functional *Candida antarctica* Lipase B in a cell-free protein synthesis system derived from *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 25(2), 589–593. <https://doi.org/10.1002/btpr.109>.
- Park, H. J., Park, K., Kim, Y. H., and Yoo, Y. J. (2014). Computational approach for designing thermostable *Candida antarctica* lipase B by molecular dynamics simulation. *Journal of Biotechnology*, 192, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.014>.
- Pencreac'h, G., and Baratti, J. C. (1996). Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 417–422. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00120-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00120-4).
- Pinzi, S., Garcia, I. L., Lopez-Gimenez, F. J., DeCastro, M. D. L., Dorado, G., and Dorado, M. P. (2009). The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economical and technical implications. *Energy and Fuels*, 23(5). <https://doi.org/10.1021/ef801098a>.
- Piva, L. C., Bentacur, M. O., Reis, V. C. B., De Marco, J. L., Moraes, L. M. P. de, and Torres, F. A. G. (2017). Molecular strategies to increase the levels of heterologous transcripts in *Komagataella phaffii* for protein production. *Bioengineered*, 8(5), 441–445. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1296613>.

- Potvin, G., Ahmad, A., and Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 64, pp. 91–105). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.017>.
- Putti Paludo, M., de Oliveira, K. S. D., Canton Trevisol, T., and Medeiros Burkert, J. F. de. (2018). Isolation of Lipase-Producing Yeasts from Industrial Oily Residues in Different Culture Media. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.283>.
- Qian, Z., and Lutz, S. (2005). Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. *Journal of the American Chemical Society*, 127(39), 13466–13467. <https://doi.org/10.1021/ja053932h>.
- Raei, M. J., Ebrahiminezhad, A., Gholami, A., Ghoshoon, M. B., and Ghasemi, Y. (2018). Magnetic immobilization of recombinant *E. coli* producing extracellular asparaginase: An effective way to intensify downstream process. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 53(9), 1397–1404. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1445110>.
- Raei, M. J., Ebrahiminezhad, A., Ghoshoon, M. B., Gholami, A., and Ghasemi, Y. (2018). Synthesis and Characterization of L-Lysin Coated Iron Oxide Nanoparticles as Appropriate Choices for Cell Immobilization and Magnetic Separation. *Nanoscience and Nanotechnology-Asia*, 9(4), 462–466. <https://doi.org/10.2174/2210681208666180518084730>.
- Rajendran, A., Palanisamy, A., and Thangavelu, V. (2009). Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1). <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000100026>.
- Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L., and Muthukumar, K. (2008). An overview of enzymatic production of biodiesel. In *Bioresource Technology* (pp. 3975–3981). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.060>.
- Ray, A. (2012). Application of Lipase in Industry. *Asian J. Pharm. Tech*, 2(2).
- Raza, M., Ali, L., Inayat, A., Rocha-Meneses, L., Ahmed, S. F., Mofijur, M., Jamil, F., and Azimoh, C. L. (2022). Sustainability of biodiesel production using immobilized enzymes: A strategy to meet future bio-economy challenges. In *International Journal of Energy Research* (Vol. 46, Issue 13). <https://doi.org/10.1002/er.8231>.
- Richard, R. (2010). Transestérification éthanolique d'huile végétale dans des microréacteurs : transposition du batch au continu. *Revue Internationale de Sécurité Sociale*, 63(2). <https://doi.org/10.1111/j.1752-1718.2010.01366.x>.
- Robert, J. M., Betancur, M. O., Carlos, A., Machado, O., Arruda, A., Castelo, V., Reis, B., Almeida, R. V., Araripe, F., Torres, G., Alegre, P. F., Valero, F., Maria, D., and Freire, G. (2019). Increase of *Candida antarctica* lipase B production under PGK promoter in *Pichia pastoris*: effect of multicopies. *Biotechnology and Industrial Microbiology*, 50, 405–413.
- Robert, J. M., Lattari, F. S., Machado, A. C., de Castro, A. M., Almeida, R. V., Torres, F. A. G., Valero, F., and Freire, D. M. G. (2017). Production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 118, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.018>.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., and Verger, R. (1993). Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality*, 5, 24–30. <https://doi.org/10.1002/chir.530050106>.

- Romanos, M. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 527–533. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80087-5](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80087-5).
- Rotticci-Mulder, J. C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K., and Martinelle, M. (2001). Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein Expression and Purification*, 386–392. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1387>.
- Şahin, S., Ersoy, R., and Mengeş, H. O. (2024). Determination of some fuel properties of binary biodiesel and binary biodiesel – diesel blend fuels obtained from camelina oil and waste frying oils. *International Journal of Automotive Engineering and Technologies*, 13(1). <https://doi.org/10.18245/ijaet.1374662>.
- Salihu, A., and Alam, M. Z. (2015). Solvent tolerant lipases: A review. In *Process Biochemistry* (Vol. 50, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>.
- Sallada, N. D., Harkins, L. E., and Berger, B. W. (2019). Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(8), 2029–2040. <https://doi.org/10.1002/bit.26982>.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning - Sambrook and Russel. In *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.1186.abs>.
- Sandoval, G., Casas-Godoy, L., Bonet-Ragel, K., Rodrigues, J., Ferreira-Dias, S., and Valero, F. (2017). Enzyme-Catalyzed Production of Biodiesel as Alternative to Chemical-Catalyzed Processes: Advantages and Constraints. *Current Biochemical Engineering*, 4(2). <https://doi.org/10.2174/2212711904666170615123640>.
- Sankaranarayanan, S., Antonyraj, C. A., and Kannan, S. (2012). Transesterification of edible, non-edible and used cooking oils for biodiesel production using calcined layered double hydroxides as reusable base catalysts. *Bioresource Technology*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.022>.
- Şanlı, H. (2019). Influences of biodiesel fuels produced from highly degraded waste animal fats on the injection and emission characteristics of a CRDI diesel engine. *International Journal of Automotive Engineering and Technologies*, 8(1). <https://doi.org/10.18245/ijaet.478838>.
- Segev, N., Mulholland, J., and Botstein, D. (1988). The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90433-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90433-3)
- Şen, B. (2014). *Streptomyces lienomycini* 350-2'nin Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyodizel Üretiminde Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi.
- Sharma, S., and Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/625258>.
- Shen, Q., Wu, M., Wang, H. Bin, Naranmandura, H., and Chen, S. Q. (2012). The effect of gene copy number and co-expression of chaperone on production of albumin fusion proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 763–772. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4337-0>.
- Shen, Q., Yu, Z., Lv, P. jin, Li, Q., Zou, S. P., Xiong, N., Liu, Z. Q., Xue, Y. P., and Zheng, Y. G. (2020). Engineering a *Pichia pastoris* nitrilase whole cell catalyst through the increased nitrilase gene copy number and co-expressing of ER oxidoreductin 1. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2489–2500. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10422-4>.
- Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T. W., and Cregg, J. M. (1998). A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00315-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00315-1).
- Shu, Z. Y., Jiang, H., Lin, R. F., Jiang, Y. M., Lin, L., Huang, J. Z. (2010). Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.003>.
- Sinclair, G., and Choy, F. Y. M. (2002). Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 26(1), 96–105. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00526-0](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00526-0).
- Solymár, M., Fülöp, F., and Kanerva, L. T. (2002). *Candida antarctica* lipase A-A powerful catalyst for the resolution of heteroaromatic β -amino esters. *Tetrahedron Asymmetry*, 13, 2383–2388. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00637-7](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00637-7).
- Srivastava, A., and Prasad, R. (2000). Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4(2), 111–133. [https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00013-1).
- Steitz, B., Hofmann, H., Kamau, S. W., Hassa, P. O., Hottiger, M. O., von Rechenberg, B., Hofmann-Amttenbrink, M., and Petri-Fink, A. (2007). Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1 SPEC. ISS.), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.1194>.
- Su, G. D., Huang, D. F., Han, S. Y., Zheng, S. P., and Lin, Y. (2010). Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2382-0>.
- Sun, X. xia, Dai, Y., Liu, H. ping, Chen, S. min, and Wang, C. chen. (2000). Contributions of protein disulfide isomerase domains to its chaperone activity. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1481(1), 45–54. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00122-9).
- Sundaramahalingam, M. A., Amrutha, C., Sivashanmugam, P., and Rajeshbanu, J. (2021). An encapsulated report on enzyme-assisted transesterification with an allusion to lipase. In *3 Biotech* (Vol. 11, Issue 11). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03003-3>.
- Sunga, A. J., Tolstorukov, I., and Cregg, J. M. (2008). Post-transformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 8(6), 870–876. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00410.x>.
- Szczesna Antczak, M., Kubiak, A., Antczak, T., and Bielecki, S. (2009). Enzymatic biodiesel synthesis-Key factors affecting efficiency of the process. In *Renewable Energy* (Vol. 34, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.11.013>.
- Taghizadeh, S. M., Berenjian, A., Chew, K. W., Show, P. L., Mohd Zaid, H. F., Ramezani, H., Ghasemi, Y., Raei, M. J., and Ebrahiminezhad, A. (2020). Impact of magnetic immobilization on the cell physiology of green unicellular algae *Chlorella vulgaris*. *Bioengineered*, 11(1), 141–153. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1718477>.
- Taghizadeh, S. M., Ebrahiminezhad, A., Ghoshoon, M. B., Dehshahri, A., Berenjian, A., and Ghasemi, Y. (2020). Magnetic immobilization of *Pichia pastoris* cells for the

- production of recombinant human serum albumin. *Nanomaterials*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nano10010111>.
- Taghizadeh, S. M., Ghoshoon, M. B., Berenjian, A., Ghasemi, Y., Dehshahri, A., and Ebrahimezhad, A. (2021). Impacts of Magnetic Immobilization on the Recombinant Proteins Structure Produced in *Pichia pastoris* System. *Molecular Biotechnology*, 63(1), 80–89. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00286-4>.
- Taghizadeh, S. M., Ghoshoon, M. B., Ghasemi, Y., Dehshahri, A., Berenjian, A., and Ebrahimezhad, A. (2022). Efficiency of magnetic immobilization for recombinant *Pichia pastoris* cells harvesting over consecutive production cycles. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 1-15. <https://doi.org/10.1080/01496395.2022.2121725>.
- Taghizadeh, S. M., Jafari, S., Ahmad-Kiadaliri, T., Mobasher, M. A., Lal, N., Raei, M. J., Berenjian, A., Ghasemi, Y., and Ebrahimezhad, A. (2020). Magnetic immobilisation as a promising approach against bacteriophage infection. *Materials Research Express*, 6, 1250a8. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab4dff>.
- Taghizadeh, S. M., Ebrahimezhad, A., Ghoshoon, M. B., Dehshahri, A., Berenjian, A., and Ghasemi, Y. (2022). Impacts of Magnetic Immobilization on the Growth and Metabolic Status of Recombinant *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 64, 320–329. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00420-w>.
- Taher, H., Giwa, A., Abusabiekeh, H., and Al-Zuhair, S. (2020). Biodiesel production from *Nannochloropsis gaditana* using supercritical CO₂ for lipid extraction and immobilized lipase transesterification: Economic and environmental impact assessments. *Fuel Processing Technology*, 198. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106249>.
- Talebian-Kiakalaieh, A., Amin, N. A. S., and Mazaheri, H. (2013). A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. In *Applied Energy* (Vol. 104). <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.061>.
- Tamalapudi, S., Talukder, M. D. M. R., Hama, S., Tanino, T., Suzuki, Y., Kondo, A., Fukuda, H. (2007). Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 387–395. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0814-7>.
- Tan, Z., Li, X., Shi, H., Yin, X., Zhu, X., Bilal, M., and Onchari, M. M. (2022). Enhancing the methanol tolerance of *Candida antarctica* lipase B by saturation mutagenesis for biodiesel preparation. *3 Biotech*, 12(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03095-x>.
- Tanino, T., Aoki, T., Chung, W. Y., Watanabe, Y., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. (2009). Improvement of a *Candida antarctica* lipase B-displaying yeast whole-cell biocatalyst and its application to the polyester synthesis reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 59–66. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1764-z>.
- Taskin, M., Ortucu, S., Aydogan, M. N., and Arslan, N. P. (2016). Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renewable Energy*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.06.060>.
- Taskin, M., Saghafian, A., Aydogan, M. N., and Arslan, N. P. (2015). Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5). <https://doi.org/10.1002/bbb.1560>.
- Tian, M., Yang, L., Wang, Z., Lv, P., Fu, J., Miao, C., Li, M., Liu, T., and Luo, W. (2021). Improved methanol tolerance of *Rhizomucor miehei* lipase based on N-glycosylation within the α -helix region and its application in biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02087-6>.

- Tomic, M., Micic, R., Kiss, F., Dedovic, N., and Simikic, M. (2015). Economic and environmental performance of oil transesterification in supercritical methanol at different reaction conditions: Experimental study with a batch reactor. *Energy Conversion and Management*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.04.010>.
- Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., and Gingeras, T. R. (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/15.9.3859>.
- Tu, B. P., Ho-Schleyer, S. C., Travers, K. J., and Weissman, J. S. (2000). Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, 290(5496), 1571–1574. <https://doi.org/10.1126/science.290.5496.1571>.
- Tu, Y., Wang, G., Wang, Y., Chen, W., Zhang, L., Liu, Y., Jiang, C., Wang, S., Bu, Z., and Cai, X. (2016). Extracellular expression and antiviral activity of a bovine interferon-alpha through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Microbiological Research*, 191, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.009>.
- U.K. Laemmli. (1970). Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, 68(227), 0–85.
- Ullah, Z., Bustam, M. A., Ullah, M., Mamoon-Ur-Rashid, Khan, A. S., Shah, S. N., Shah, M. U. H., Ahmad, P., Sohail, M., and Khan, K. A. (2024). Unveiling Biodiesel Production: Exploring Reaction Protocols, Catalysts, and Influential Factors. In *ChemBioEng Reviews*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cben.202400028>.
- Ünver, Y., Kurbanoglu, E. B., and Erdoğan, O. (2015). Expression, purification, and characterization of recombinant human paraoxonase 1 (rhPON1) in *Pichia pastoris*. *Turkish Journal of Biology*, 39(4). <https://doi.org/10.3906/biy-1501-43>.
- Unver, Y., Sensoy Gun, B., Acar, M., and Yildiz, S. (2021). Heterologous expression of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in the yeast *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 51(7), 723–730. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1855444>.
- Uppenberg, J., Ohmer, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., and Jones, T. A. (1995). Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols. *Biochemistry*, 34(51), 16838–16851. <https://doi.org/10.1021/bi00051a035>.
- Vakhlu, J., and Kour, A. (2006). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. In *Electronic Journal of Biotechnology* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-9>.
- Van Gerpen, J. (2005). Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, 86, 1097–1107. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2004.11.005>.
- Vardar-Yel, N., Tütüncü, H. E., and Sürmeli, Y. (2024). Lipases for targeted industrial applications, focusing on the development of biotechnologically significant aspects: A comprehensive review of recent trends in protein engineering. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 273). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132853>.
- Vasudevan, P. T., and Briggs, M. (2008). Biodiesel production-Current state of the art and challenges. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 35, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0312-2>.
- Veno, J., Rahman, R. N. Z. R. A., Masomian, M., Ali, M. S. M., and Kamarudin, N. H. A. (2019). Insight into improved thermostability of cold-adapted staphylococcal lipase by

glycine to cysteine mutation. *Molecules*, 24(17).
<https://doi.org/10.3390/molecules24173169>.

- Verma, M. L., Barrow, C. J., and Puri, M. (2013). Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (pp. 23–39).
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4535-9>.
- Vilas Bôas, R. N., and de Castro, H. F. (2022). A review of synthesis of esters with aromatic, emulsifying, and lubricant properties by biotransformation using lipases. In *Biotechnology and Bioengineering* (Vol. 119, Issue 3).
<https://doi.org/10.1002/bit.28024>.
- Vogl, T., Sturmberger, L., Fauland, P. C., Hyden, P., Fischer, J. E., Schmid, C., Thallinger, G. G., Geier, M., and Glieder, A. (2018). Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors. *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.26529>.
- Wahyuni, F. D., Fuad, A. M., and Suharsono. (2016). Constitutive Expression of *Candida antarctica* Lipase B (CALB) in *Pichia pastoris* Using pGAPZ α Vector. *Annales Bogorienses*, 20(1), 29–36.
- Wanakhachornkrai, P., and Lertsiri, S. (2003). Comparison of determination method for volatile compounds in Thai soy sauce. *Food Chemistry*, 83(4). [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00256-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00256-5).
- Wancura, J. H. C., Fantinel, A. L., Ugalde, G. A., Donato, F. F., Vladimir de Oliveira, J., Tres, M. V., and Jahn, S. L. (2021). Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations. *Journal of Cleaner Production*, 285, 124838.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124838>.
- Wancura, J. H. C., Rosset, D. V., Ugalde, G. A., Oliveira, J. V., Mazutti, M. A., Tres, M. V., and Jahn, S. L. (2019). Feeding strategies of methanol and lipase on eversa® transform-mediated hydroesterification for FAME production. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97, 1332–1339. <https://doi.org/10.1002/cjce.23404>.
- Wang, X., Liu, X., Zhao, C., Ding, Y., and Xu, P. (2011). Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. *Bioresource Technology*, 102(10). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.003>.
- Wang, Y., Hou, Y., Wang, Y., Zhang, A., and Wang, Q. (2022). Immobilization of psychrophile *Psychrobacter* sp. ANT206 onto novel reusable magnetic nanoparticles and its application for nitro-aromatic compounds biodegradation under low temperature. *Biodegradation*, 33(3), 223–237. <https://doi.org/10.1007/s10532-022-09978-x>.
- Wang, Y., Wang, J., Leng, F., Ma, J., and Bagadi, A. (2020). Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in *Pichia pastoris* and its antimicrobial activity against *Agrobacterium* and *Escherichia coli*. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.9010>.
- Warsame, A., Vad, R., Kristensen, T., and Øyen, T. B. (2001). Characterization of a gene encoding a *Pichia pastoris* protein disulfide isomerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281, 1176–1182. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4479>.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., and Tominaga, Y. (2000). Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(4), 355–359. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0058-9>.

- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V, and Cregg, J. M. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 186, 37–44.
- Weiß, R. G., Losfeld, M. E., Aebi, M., and Riniker, S. (2021). N-Glycosylation Enhances Conformational Flexibility of Protein Disulfide Isomerase Revealed by Microsecond Molecular Dynamics and Markov State Modeling. *Journal of Physical Chemistry B*, 125(33), 9467–9479. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.1c04279>.
- Werten, M. W. T., Eggink, G., Cohen Stuart, M. A., and de Wolf, F. A. (2019). Production of protein-based polymers in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Advances*, 37(5), 642–666. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.012>.
- Wilkanowicz, S. I., Hollingsworth, N. R., Saud, K., Kadiyala, U., and Larson, R. G. (2020). Immobilization of calcium oxide onto polyacrylonitrile (PAN) fibers as a heterogeneous catalyst for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106214>.
- Winkler, U. K., and Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 663–670. <https://doi.org/10.1128/jb.138.3.663-670.1979>.
- Wu, Q., Soni, P., and Reetz, M. T. (2013). Laboratory evolution of enantiocomplementary *Candida antarctica* lipase B mutants with broad substrate scope. *Journal of the American Chemical Society*, 135(5), 1872–1881. <https://doi.org/10.1021/ja310455t>.
- Xiang, Z. X., Gong, J. S., Li, H., Shi, W. T., Jiang, M., Xu, Z. H., and Shi, J. S. (2021). Heterologous expression, fermentation strategies and molecular modification of collagen for versatile applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–22. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2016599>.
- Xiao, D., Li, X., Zhang, Y., and Wang, F. (2023). Efficient Expression of *Candida antarctica* Lipase B in *Pichia pastoris* and Its Application in Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(10). <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04374-4>.
- Xie, Y., An, J., Yang, G., Wu, G., Zhang, Y., Cui, L., and Feng, Y. (2014). Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 7994–8006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.536045>.
- Xu, L., Jiang, X., Yang, J., Liu, Y., and Yan, Y. (2010). Cloning of a novel lipase gene, lipJ08, from *Candida rugosa* and expression in *Pichia pastoris* by codon optimization. *Biotechnology Letters*, 32(2). <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0141-z>.
- Yamada, R., Ogura, K., Kimoto, Y., and Ogino, H. (2019). Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: d-lactic acid production from methanol by an engineered yeast *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2610-4>.
- Yan, J., Zheng, X., and Li, S. (2014). A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: Preparation, characterization and application in biodiesel production. *Bioresource Technology*, 151(43), 48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.037>.
- Yang, J. K., Liu, L. Y., Dai, J. H., and Li, Q. (2013). de novo Design and Synthesis of *Candida antarctica* Lipase B Gene and α -Factor Leads to High-Level Expression in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053939>.

- Yang, J., and Liu, L. (2010). Codon optimization through a two-step gene synthesis leads to a high-level expression of *Aspergillus niger* lip2 gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(3), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.011>.
- Yang, X., Zhang, Y., Pang, H., Yuan, S., Wang, X., Hu, Z., Zhou, Q., He, Y., Yan, Y., and Xu, L. (2021). Codisplay of *rhizopus oryzae* and *candida rugosa* lipases for biodiesel production. *Catalysts*, 11(4), 421. <https://doi.org/10.3390/catal11040421>
- Yang, Z., and Zhang, Z. (2018). Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.002>.
- Yildiz, S., Solak, K., Acar, M., Mavi, A., and Unver, Y. (2021). Magnetic nanoparticle mediated-gene delivery for simpler and more effective transformation of *Pichia pastoris*. *Nanoscale Advances*, 3(15), 4482–4491. <https://doi.org/10.1039/D1NA00079A>.
- Yıldız, Ş., (2020). *Pichia pastoris*'e Yeni Bir Gen Aktarım Yönteminin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Yoo, H. Y., Simkhada, J. R., Cho, S. S., Park, D. H., Kim, S. W., Seong, C. N., and Yoo, J. C. (2011). A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 6104–6111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.046>.
- You, Q., Yin, X., Zhao, Y., and Zhang, Y. (2013). Biodiesel production from jatropha oil catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on modified attapulgate. *Bioresource Technology*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.143>.
- Yu, Y., and Lutz, S. (2010). Improved triglyceride transesterification by circular permuted *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 44–50. <https://doi.org/10.1002/bit.22471>.
- Yuan, Y., Jeon, Y., Ahmed, J., Park, W., and Kim, S. (2009). Use of Carbon Nanoparticles for Bacteria Immobilization in Microbial Fuel Cells for High Power Output. *Journal of The Electrochemical Society*, 156(10), B1238–B41. <https://doi.org/10.1149/1.3190477>.
- Yusuf, B. O., Oladepo, S. A., and Ganiyu, S. A. (2024). Efficient and Sustainable Biodiesel Production via Transesterification: Catalysts and Operating Conditions. *Catalysts*, 14(9), 581. <https://doi.org/10.3390/catal14090581>.
- Zerbs, S., Frank, A. M., and Collart, F. R. (2009). Chapter 12 Bacterial Systems for Production of Heterologous Proteins. In *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63012-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63012-3).
- Zhan, C., Wang, S., Sun, Y., Dai, X., Liu, X., Harvey, L., McNeil, B., Yang, Y., and Bai, Z. (2016). The *Pichia pastoris* transmembrane protein GT1 is a glycerol transporter and relieves the repression of glycerol on AOX1 expression. *FEMS Yeast Research*. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow033>.
- Zhang, A. L., Luo, J. X., Zhang, T. Y., Pan, Y. W., Tan, Y. H., Fu, C. Y., Tu, F. Z. (2009). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports*, 36(6), 1611–1619. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4>.
- Zhang, B., Weng, Y., Xu, H., and Mao, Z. (2012). Enzyme immobilization for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 61–70. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3672-x>.

- Zhang, H., Wang, Q., and Mortimer, S. R. (2012). Waste cooking oil as an energy resource: Review of Chinese policies. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 16, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.05.008>.
- Zhang, N., Suen, W. C., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V., Zaks, A. (2003). Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Engineering*, 16, 599–605. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg074>.
- Zhang, P., Zhang, W., Zhou, X., Bai, P., Cregg, J. M., and Zhang, Y. (2010). Catabolite Repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00607-10>.
- Zhang, Y., Dubé, M. A., McLean, D. D., and Kates, M. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology*, 89(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00040-3).
- Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W., and Liu, D. (2015). Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.12.021>.
- Zhong, L., Feng, Y., Wang, G., Wang, Z., Bilal, M., Lv, H., Jia, S., and Cui, J. (2020). Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 152). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258>.
- Zielińska, A., Skwarek, E., Zaleska, A., Gazda, M., and Hupka, J. (2009). Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia Chemistry*, 1(2), 1560–1566. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.11.004>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Şeyda YILDIZ ARSLAN
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lisans:	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Gen Mühendisliği Bilim Dalı
Doktora:	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı
Yayınlar	
1. Dagci, I., Solak, K., Oncer, N., Yildiz Arslan, S., Unver, Y., Yilmaz, M. and Mavi, A., 2024. Machine Learning-Assisted SERS Reveals the Biochemical Signature of Enhanced Protein Secretion from Surface-Modified Magnetic Nanoparticles. ACS Applied Materials and Interfaces. 2. Solak, K., Yildiz Arslan, S., Acar, M., Turhan, F., Unver, Y. and Mavi, A., 2024. Combination of magnetic hyperthermia and gene therapy for breast cancer. Apoptosis. 3. Unver, Y., Ari, B., Acar, M. and Yildiz Arslan, S., 2024. A self-inducible heterologous protein expression system in <i>Komagataella phaffii</i> (<i>Pichia pastoris</i>). 3 Biotech, 14 (9). 4. Sancaktutan, Ş., İspahi, B., Arslan, Y. Ş., Solak, K. and Ünver, Y., 2024. Magnetofection: A Magical Technique for Effective Gene Transfer Using Magnetic Nanoparticles. Original Article Eurasian Mol Biochem Sci (Vol. 3). Retrieved from https://dergi.erzurum.edu.tr/ejmbs 5. Kalakenger, S., Yildiz Arslan, S., Turhan, F., Acar, M., Solak, K., Mavi, A., and Unver, Y. (2023). Heterologous Expression of Codon-Optimized Azurin Transferred by Magnetofection Method in MCF-10A Cells. Molecular Biotechnology, 1-12. 6. Acar, M., Abul, N., Yildiz, S., Taskesenligil, E. D., Gerni, S., Unver, Y., Kalin, R. and Ozdemir, H., 2023. Affinity-based and in a single step purification of recombinant horseradish peroxidase A2A isoenzyme produced by <i>Pichia pastoris</i>. Bioprocess and Biosystems Engineering, 46 (4), 523–534. 7. Acar, M., Solak, K., Yildiz, S., Unver, Y., and Mavi, A. (2022). Comparative heating efficiency and cytotoxicity of magnetic silica nanoparticles for magnetic hyperthermia treatment on human breast cancer cells. 3 Biotech, 12(11), 313. 8. Unver, Y., Yildiz, S. and Acar, M., 2022. Extracellular production of azurin from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in the presence of Triton X-100 or Tween 80. Bioprocess and Biosystems Engineering, (0123456789). 9. Yildiz, S., Solak, K., Acar, M., Mavi, A., and Unver, Y. (2021). Magnetic nanoparticle mediated-gene delivery for simpler and more effective transformation of <i>Pichia pastoris</i>. Nanoscale Advances, 3(15), 4482-4491. 10. Unver, Y., Sensoy Gun, B., Acar, M. and Yildiz, S., 2021. Heterologous expression of azurin from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in the yeast <i>Pichia pastoris</i>. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 51 (7), 723–730.	