

***Aspergillus fumigatus* Alfa-Galaktosidaz Enziminin *Aspergillus sojae*' de Heterolog İfadesi ve Osmotik Stresin Etkisi**

SümeYra GürkÖk<sup>1,3\*</sup>, Betül SÖyler<sup>2</sup>, ZÜmrüt B. Ögel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Biyoteknoloji Bölümü Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara

<sup>2</sup>Gıda Mühendisliği Bölümü Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara

<sup>3</sup>Biyoloji Bölümü Atatürk Üniversitesi, Erzurum

\*sumeyra@metu.edu.tr

**Özet**

Alfa-galaktosidaz, gıda endüstrisinde, özellikle şeker yapımında, biyoteknolojide ve tıpta birçok kullanım alanına sahip, önemli bir enzimdir. *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 suşu verimli bir şekilde termostabil  $\alpha$ -galaktosidaz üretmektedir, ancak GRAS statüde değildir. Bu çalışmada, *A. fumigatus*'un  $\alpha$ -galaktosidaz geni (*aglB*), pAN52-4 (Acc. No: Z32699) ekspresyon vektörüne takılmış ve GRAS statüdeki *Aspergillus sojae* ATCC11906 suşuna aktarılmıştır. Bu sistem bir tetikleyiciye ihtiyaç duymaksızın, *A. sojae*' de *A. fumigatus*'dan daha yüksek miktarda alfa-galaktosidaz üretimine olanak sağlamıştır. Üretimi artırmak amacı ile osmotik stres uygulanmıştır. Osmotik stres ajanlarıyla transkripsiyon seviyesinde tetiklendiği gösterilen *gpdA* promotörü sayesinde alfa-galaktosidaz üretimi normal koşullarda büyütülen rekombinant suşa göre 2,25 kat artırılmıştır. Sonuç olarak, *A. fumigatus*'a göre alfa-galaktosidaz üretimi *A. sojae*' de 4 kat artırılmıştır. Alfa-galaktosidaz enzimi melas gibi ucuz kaynaklarda yüksek verimde üretilebilmiştir. Devam etmekte olan çalışmalarda, Tepki Yüzey Metodu ( Response Surface Methodology ) ile heterolog  $\alpha$ -galaktosidaz üretim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Alfa-galaktosidaz, Aspergillus, Heterolog Ekspresyon, Osmotik Stres, Tepki Yüzeyi Metodu.

**Giriş**

Alfa-galaktosidaz enzimi melibiyoz, rafinoz ve stakiyoz gibi oligosakkaritlerden, polimerik galaktomannan ve galaktolipidlerden  $\alpha$ -1,6 bağlı terminal  $\alpha$ -galaktoz birimlerinin hidrolizini gerçekleştirir. Yüksek substrat konsantrasyonlarında da transgalaktozilasyon reaksiyonunu katalizlemektedir [1]. Endüstride, biyoteknolojide ve tıpta birçok kullanım alanına sahiptir. En önemli endüstriyel kullanım alanı gıda endüstrisinde, şeker yapımındadır. Sükrozun kristalleşmesi, düşük miktarda rafinoz ve stakiyoz tarafından dahi engellenebilmektedir. Rafinoz ve stakiyozun enzimatik hidroliz ile sükroza çevrilmesi kristalleşmeyi, dolayısıyla da ürün verimini artırır. Alfa-galaktosidaz ayrıca rafinoz ve stakiyoz gibi galaktosidleri yapılarından uzaklaştırarak soya fasulyesi gibi baklagillerin sindirimini kolaylaştırabilir ve galaktomannanların jelleşme kapasitelerini artırır.

Alfa-galaktosidaz enzimi mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Mikroorganizmalar yüksek miktarda üretimleriyle diğerlerine göre daha avantajlıdır ve bunlar arasında da fungal galaktosidazlar hücre dışı salgılanmaları, asidik pH optimumları ve geniş stabilite profilleri nedeniyle endüstriyel kullanım için daha uygundur. *A. fumigatus* IMI 385708 suşu verimli bir şekilde termostabil  $\alpha$ -galaktosidaz üretmektedir ancak fırsatçı saprofitik bir küf mantarıdır. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda ölümcül aspergilloza neden olabilmektedir ve endüstriyel üretim için uygun değildir. Bu çalışmada, daha önce pUC19 klonlama vektörüne takılan, insan patojeni *A. fumigatus*'un  $\alpha$ -galaktosidaz geni pAN52-4 (Acc. No: Z32699) ekspresyon vektörüne takılmış ve genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS) *Aspergillus sojae* ATCC11906 suşuna aktarılmıştır. pAN52-4, güçlü ve devamlı üretilen *A. nidulans* gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz promotörü (*gpdA*) ile *trpC* sonlandırma sinyalinin ve *A. niger* glukoamilaz geninin preprosekansını içeren, bir üretim ve salgılama sistemidir. *gpdA* promotörünün osmotik stres ajanlarıyla transkripsiyon seviyesinde tetiklendiği gösterilmiştir [2]. pAN52-4 ekspresyon vektörünün ko-transformasyonunda seçici markör olarak kullanılan pAMDSPYG plazmidin *A. nidulans*'ın *amdS* ve *A. niger*'in *pyrG* genine sahiptir. Alfa-galaktosidaz enzimi çeşitli karbon ve azot kaynağında üretilebilmiştir ve birbirine yakın üretim gözlenmiştir. Bu yüzden, endüstriyel üretimde en ekonomik kaynaklar seçilebilecektir. Optimizasyonda Tepki Yüzey Metodu gibi istatistiksel yöntemlerle, her seferinde tek bir faktörün değiştirildiği klasik yöntemlerden daha hızlı sonuç alınabilmektedir.

### **Materyal ve Yöntem**

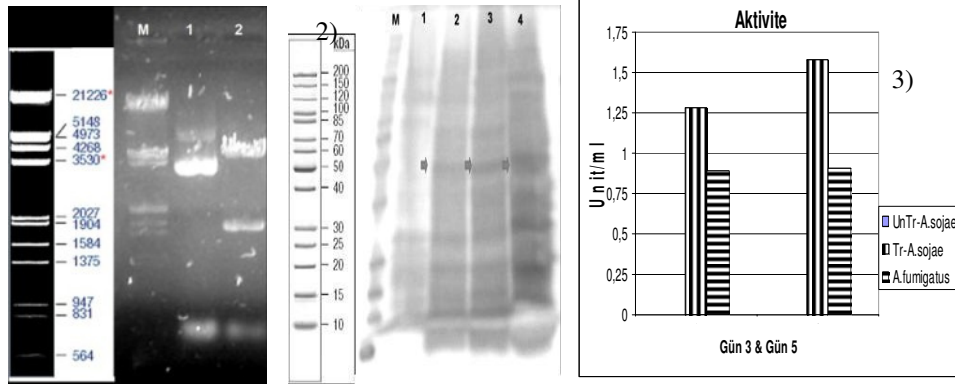
*Aspergillus fumigatus* IMI 385708 suşu Slovak Bilimler Akademisi'nden temin edilmiş olup YpSs agarda 45°C'de büyütülüp, 4°C'de saklanmaktadır. Alfa-galaktosidaz üretebilmesi için, induksiyon amaçlı 0.5-2 % oranında keçi boynuzu sakızı (LBG) sıvı YpSs ortamına eklenmektedir. *Aspergillus sojae* (ATCC11906) (*pyrG*) suşu Hollanda TNO kurumundan temin edilmiştir, üridin oksotrofu olup, düşük proteolitik aktiviteye sahiptir. Stok kültürleri üridin ve urasil içeren CM (Complete Medium)'de, [70mM NaNO<sub>3</sub>, 7mM KCl, 11mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 % glukoz, 0.5% maya özütü, 0.2% kasamino asit, 1000X İz elementler, 1000X Vitaminler, 10mM üridin, 10mM urasil] 30°C'de büyütülüp, 4°C'de saklanmaktadır. Transforme olan suşlarda üridin ve urasile gerek duyulmamaktadır. *Aspergillus sojae* suşunun rekombinant pAN52-4 ekspresyon vektörü ile ko-transformasyonu Punt ve van den Hondel tarafından uygulanan prosedüre göre yapılmıştır [3].

Osmotik stres çalışmalarında rekombinant *A. sojae* suşları kademeli olarak 0.5, 1, 1.5 ve 2 M NaCl ya da Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren ortamda osmotik stres koşullarına adapte edilmiştir.

Heterolog  $\alpha$ -galaktosidaz üretimi farklı karbon (glukoz, laktoz, sükröz, melas, fruktoz, maltoz, nişasta ve karboksimetil sellüloz), inorganik azot [(NH<sub>4</sub>CL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>)] ve organik azot (et özütü, pepton, jelatin, glisin, tripton, maya özütü) kaynaklarında çalışılmıştır. Üretim koşullarının optimizasyonu için Tepki Yüzey Metodu ( Response Surface Methology ) kullanılmaktadır. Minitab 15 programı kullanılarak yapılan TYM'de 3 faktörlü Box and Behnken modelinden yararlanılmaktadır. Parametre olarak karbon (melas) ve azot (0,5-2 NaNO<sub>3</sub>) kaynağı ile inkübatör çalkalama hızı seçilmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

Alfa-galaktosidaz geninin (*aglB*) pAN 52-4 ekspresyon vektörüne takılması ve *A. sojae* suşuna transformasyonu:



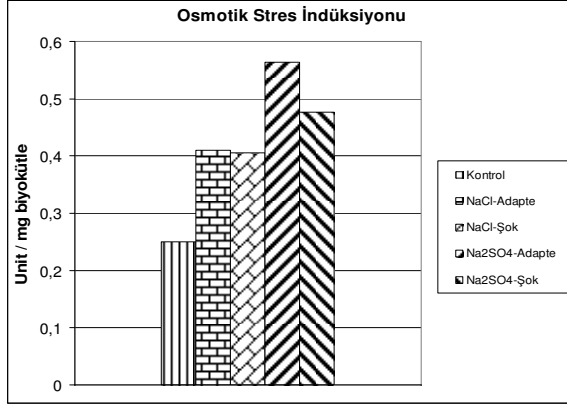
Şekil 1. Agaroz jel elektroforezi ile ligasyonun kontrolü; 1- Ligasyondan sonra rekombinant plazmit (pANaglB), 2-Rekombinant plazmitin *Hind*III enzimi ile kesimi.

Şekil 2. SDS-PAGE ile enzim üretiminin karşılaştırılması; 1- Transforme edilmeyen *A. sojae*, 2,3- Transforme edilen *A. sojae*, 4- *A.fumigatus*.

Şekil 3. Alfa-galaktosidaz aktivite tayini.

*A. fumigatus aglB* geni pAN52-4 ekspresyon vektörüne *Hind*III kesim bölgesinden takılmıştır ve rekombinant plazmitte *aglB* geninin varlığı *Hind*III enzim kesimi ile kontrol edilmiştir (Şekil 1). Ayrıca spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR ile aktarılan genin yönü tayin edilmiştir. *A. sojae* suşu rekombinant plazmit ile transforme edilmiştir ve transformant suşlar üridin prototrofisine göre seçilmiştir. Şekil 2 de görüldüğü gibi SDS-PAGE analizinde transforme *A. sojae*'de ve *A. fumigatus*'da 57 kDa büyüklüğündeki  $\alpha$ -galaktosidaz protein bandı görülürken; transforme olmayan *A. sojae*'de görülmemiştir. Enzim aktivite tayininde de transforme *A. sojae*'de ve *A. fumigatus*'da  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi görülürken; transforme olmayan *A. sojae*'de görülmemiştir. (Şekil 3).

Dereceli olarak osmotik stres koşullarına adapte olan transforme *A. sojae* suşlarında, adapte edilmeyen suşlarda gözlenen aktivitenin 2.25 kat yüksek aktivite gözlemlenmiştir (Şekil 4) .



Şekil 4. 2M NaCl ve 2M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> osmotik stresinin alfa-galaktosidaz üretimine etkisi.

### Sonuçlar

*A. fumigatus*'un  $\alpha$ -galaktosidaz geni güçlü ve devamlı üretilen *gpdA* promotörüne sahip pAN52-4 ekspresyon vektörü üzerinde güvenli bir organizma olan *Aspergillus sojae* ATCC11906 suşuna aktarılmıştır. *A. fumigatus*'un aksine herhangi bir tetikleyiciye ihtiyaç duymaksızın *A. sojae*' de *A. fumigatus*'dan daha yüksek miktarda alfa-galaktosidaz üretimi görülmüştür. Osmotik stres ajanlarıyla transkripsiyon seviyesinde tetiklendiği gösterilen *gpdA* promotörü sayesinde üretim normal koşullarda büyütülen rekombinant suşa göre 2,25 kata kadar artırılmıştır. Sonuç olarak, *A. fumigatus*'a göre alfa-galaktosidaz üretimi *A. sojae*' de 4 kat artırılmıştır. Şimdiye kadar gerçekleştirilen, üretim koşullarının optimizasyonu çalışmalarında bulunan optimum değerlerle yapılan doğrulama deneylerinde enzim üretiminin (5,2 U/ml) kontrol deneylerinde elde edilen ( 3,6 U/ml) üretimden % 44 fazla olduğu gözlemlenmiştir.

### Kaynaklar

- 1.Puchart V, Biely P. 2005. Glycosylation of internal sugar residues of oligosaccharides catalyzed by  $\alpha$ -galactosidase from *A. fumigatus*. Biochim et Biophys Acta. 1726, 206– 216
- 2.Redkar RJ, Herzog RW, Singd NK.1998. Transcriptional activation of the *A. nidulans gpdA* promoter by osmotic signals. Appl. Environ. Microbiol. 64:2229-2231
- 3.Punt PJ, Zegers ND, Busscher M, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ. 1991. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *A. nidulans gpdA* gene. J Biotechnol. 17:19–34