



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***KLUYVEROMYCES LACTİS* TAKSONU MAYALARIN İZOLASYONU,
METABOLİK VE GENETİK ÖZELLİKLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

Nükhet KAYAKENT

Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2009

**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***KLUYVEROMYCES LACTİS* TAKSONU MAYALARIN İZOLASYONU,
METABOLİK VE GENETİK ÖZELLİKLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

Nükhet KAYAKENT

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez 28 / 12 /2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**Prof.Dr. Sezai TÜRKEL
Danışman**

Prof.Dr. Gönül KAYNAK

**Doç.Dr. Mihriban
KORUKLUOĞLU**

Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

ÖZET

Kluyveromyces lactis önemli bir endüstriyel maya türüdür. *K. lactis*'in farklı suşları laktaz enzimi ve bazı rekombinant proteinlerin üretiminde kullanılmaktadır. *K. lactis* çeşitli habitatlarda bulunabilir. *K. lactis* çoğunlukla süt ve peynir örneklerinden kolaylıkla saf kültür olarak izole edilmektedir. Bu araştırmada Bursa ilindeki yerel üreticilerden sağlanan süt ve peynir örneklerinden 6 farklı *K. lactis* suşu izole edildi. İzole edilen bu *K. lactis* suşlarında glikojen miktarı, laktaz ve invertaz aktiviteleri belirlendi. Saf kültür olarak izole edilip tanımlanan *K. lactis* suşlarının standart *K. lactis* suşuna göre laktaz ve invertaz aktivitelerinde önemli farklılıklar belirlendi. Bu *K. lactis* suşlarının *LAC4* ve *LAC9* genlerinin bazı yapısal özellikleri de incelendi. Elde edilen sonuçlar Bursa ilindeki yerel üreticilerden elde edilen süt ve peynir örneklerinden izole edilen *K. lactis* örneklerinin farklı metabolik özellikleri olan yeni *K. lactis* suşları olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Kluyveromyces lactis*, Laktaz, İnvvertaz, gen ekspresyonu, maya florası, moleküler sistematik, Ribozomal DNA.

ABSTRACT

Kluyveromyces lactis is an important industrial yeast species. Different strains of *K. lactis* are widely used in the production of lactase and also certain recombinant proteins. *K. lactis* can be found in a variety of habitats. *K. lactis* species are easily isolated from milk and cheese samples as a pure culture. In this research 6 different *K. lactis* strains from milk and cheese samples, obtained from local producers in Bursa province, are isolated. In these isolated *K. lactis* strains their glycogen amounts, lactase and invertase activities are determined. Important differences in lactase and invertase activities of *K. lactis* strains which are isolated and described as pure culture, are found as compared with standard *K. lactis* strain. Some of the structural features of *LAC4* and *LAC9* genes of these *K. lactis* strains are also examined. The results show that *K. lactis* strains isolated from milk and cheese samples obtained from local producers in Bursa province are the new *K. lactis* strains with their different metabolic properties.

Key Words: *Kluyveromyces lactis*, Lactase, Invertase, gene expression, yeast flora, molecular systematics, Ribosomal DNA.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2. 1. <i>Kluyveromyces lactis</i> 'in Genel Özellikleri.....	2
2. 2. Laktaz Enziminin Endüstriyel ve Tıbbi Önemi.....	6
2. 3. Laktaz Biosentezi ve Genetik Kontrolü	10
2. 3. 1. Laktaz enziminin özellikleri ve sentezi	10
2. 3. 2. Laktaz sentezinin genetik kontrolü	11
2. 4. Glikojen Metabolizması	18
2. 5. Glukoz Baskılaması ve Kontrol Mekanizması	19
2. 6. İnvvertaz Geninin Yapısı ve Kontrol Mekanizması.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3. 1. <i>K. lactis</i> Suşlarının İzolasyonu	24
3. 2. <i>K. lactis</i> Suşlarının Türlerinin Tayini.....	25
3. 3. <i>K. lactis</i> Türlerinden Genomik DNA Saflaştırılması	25
3. 4. <i>K. lactis</i> Türlerinin ITS1-5.8s rDNA-ITS2 Dizilerinin Belirlenmesi.....	26
3. 5. Glikojen Miktarlarının Belirlenmesi	28
3. 6. Laktaz Aktivitelerinin Ölçümü.....	28
3. 7. İnvvertaz Aktivitelerinin Ölçümü.....	30

3. 8. <i>K. lactis</i> Suşlarının Üreme Hızlarının Ölçümü.....	31
3. 9. <i>K. lactis</i> Suşlarında LAC4 Geni Promotor Bölgesinin Analizi.....	32
3. 10. <i>K. lactis</i> Suşlarında KIGAL4 Geni İşlevsel Bölgelerinin Analizi.....	33
4. BULGULAR.....	38
4. 1. <i>K. lactis</i> Suşlarının İzolasyonu.....	38
4. 2. Maya Suşlarının Metabolik Özellikleri	39
4. 3. <i>K. lactis</i> Suşlarının Tür tayinlerinin Yapılması.....	44
4. 4. <i>K. lactis</i> Suşlarının ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Bölgelerinin İncelenmesi	44
4. 5. <i>K. lactis</i> Suşlarında Glikojen Miktarlarının Belirlenmesi	48
4. 6. <i>K. lactis</i> MY Suşlarında Laktaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	50
4. 7. Laktaz Biyosentezine Glukoz baskılamasının Etkilerinin Araştırılması.....	52
4. 8. Laktaz Biyosentezine Laktoz Aktivasyonunun Etkilerinin Araştırılması	54
4. 9. <i>K. lactis</i> Suşlarında İvertaz Aktivitesinin Araştırılması.....	55
4. 10. <i>K. lactis</i> Suşlarında Laktaz Geni Promotor Bölgesinin Analizi.....	57
4. 11. <i>K. lactis</i> Suşlarında KIGAL4 Geni İşlevsel Bölgelerinin Analizi.....	58
4. 12. <i>K. lactis</i> MY Suşlarının Üreme Hızlarının Belirlenmesi	60
5. TARTIŞMA	63
6. KAYNAKLAR	68
7. EKLER.....	83
EK. 1. Üreme Ortamları ve Çözeltilerin Hazırlanması	83
EK. 2. <i>K. lactis</i> Suşlarının ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Bölgesi Nükleotid Dizileri.....	87
TEŞEKKÜR.....	91
ÖZGEÇMİŞ	92

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α : Alfa

β : Beta

⁰C: Santigrat derece

μ g: Mikrogram

μ l: Mikrolitre

μ M: Mikromolar

μ mol: Mikromol

%: Yüzde

v/w: hacim/ağırlık

AD: Aktivasyon Domaini

API: Analytical Profile Index

ATP : Adenozin Trifosfat

ATPase: Adenozin Trifosfataz

Bç: Baz çifti

Ca: Kalsiyum

CFU: Colony Forming Unit (Koloni oluşturan birim)

dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik asit

E. coli: Escherichia coli

GAL: Galaktoz

Glc: Glukoz

Glc6P: Glukoz 6 fosfat

GOD: Glukoz oksidaz

GOD-POD: Glukoz oksidaz peroksidaz

GOS: Galaktooligosakkarit

gr: Gram

GRAS: Generally Regarded As Safe (Güvenli Mikroorganizma)

GSK: Glikojen Sentaz Kinaz

HGT1: High-affinity Glucose Transporter (Yüksek afiniteli glukoz taşıyıcısı)

ITS: Internally Transcribed Spacer

Kb: Kilobaz

KHT: Düşük afiniteli glukoz taşıyıcısı
KLGSK: *K. lactis* Glycogen Synthase Kinase
K. lactis: *Kluyveromyces lactis*
K. marxianus: *Kluyveromyces marxianus*
Km: Michaelis sabiti
l: Litre
LAC: Laktaz
LPH: Laktaz/phlorizm/hidrolaz
M: Molar
Mb: Megabaz
Mbp: Megabaz çifti
MCK1: Meiotic and Centromere regulatory ser, tyr-Kinase
MDS1: Mck Dosage Supresor 1
MEL: Mellobiyoz
mg: Miligram
ml: Mililitre
mM: Milimolar
mRNA: Messenger ribonükleik asit
MU: Miller Ünitesi
MY: Milk Yeast
ONPG: O-Nitro-Phenyl- β -D- Galaktosidase
ORF: Open Reading Frame
P: Fosfat
pH: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
POD: Peroksidaz
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAG: Resistance to Antimycin on Glucose
rDNA: Ribozomal Deoksiribonükleik asit
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
rRNA: Ribozomal Ribonükleik asit
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*
Sn: Saniye

SUC: Sukroz

tRNA: Taşıyıcı Ribonükleik asit

UAS: Upstream Activation Sequence

UDP: Uridin Difosfat

V_{max}: Maksimum hız

YGC: Yeast Glucose Chloramphenicol

YNB: Yeast Nitrogen Base

YP: Yeast Pepton

YPD: Yeast extract Pepton Dextrose

YPG: Yeast extract Pepton Glycerol

YPL: Yeast extract Pepton Lactose

ZF: Zinc Finger

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1. <i>K. lactis</i> 'de kromozom uzunlukları.....	5
Şekil 2. 2. <i>K. lactis</i> 'de laktoz kullanımının genetik kontrol mekanizması.....	14
Şekil 2. 3. <i>K. lactis</i> 'de KlGal1p ve KlGal80p'nin galaktoz aktivasyonundaki işlevleri.....	16
Şekil 3. 1. <i>LAC4</i> geni (KLLA0B14883g) promotor dizisi.....	35
Şekil 3. 2. <i>KIGAL4</i> (KLLA0D12672g) (<i>LAC9</i>) geninin kodlama bölgesi.....	36
Şekil 4. 1. <i>K. lactis</i> suşlarının ITS-5.8 rDNA RFLP analizi.....	47
Şekil 4. 2. <i>K. lactis</i> suşlarının YNB glukoz ve YNB Laktoz ortamlarında glikojen içerikleri.....	49
Şekil 4. 3. <i>K. lactis</i> suşlarının YNB gliserol ve YP glukoz ortamlarında glikojen içerikleri.....	49
Şekil 4. 4. <i>K. lactis</i> suşlarının YP laktoz ve YP gliserol ortamlarında glikojen içerikleri.....	50
Şekil 4. 5. <i>K. lactis</i> suşlarının <i>LAC4</i> (laktaz) geni promotor bölgesinin jel elektroforezi ile analizi.....	58
Şekil 4. 6. <i>K. lactis</i> MY suşlarının <i>KIGAL4</i> geni DNA'ya bağlanma (ZF) ve Asidik Aktivasyon (AD) bölgelerinin jel elektroforezi ile analizi.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

Çizelge 2. 1. <i>K. lactis</i> 'de GAL/LAC regulonunu oluşturan genler.....	12
Çizelge 4. 1. Araştırmada kullanılan süt ve peynir örneklerinin alındığı yerler ve maya konsantrasyonları.....	38
Çizelge 4. 2. Seçilen maya örneklerinin karbonhidrat asimilasyon test sonuçları.....	40
Çizelge 4. 3. Seçilen maya örneklerinin azot kullanımı, ozmotik tolerans ve sıcaklığa duyarlılık testleri sonuçları.....	42
Çizelge 4. 4. Saflaştırılan maya örneklerinin API 32C kit'i ile belirlenen tür adları.....	45
Çizelge 4. 5. Saflaştırılan <i>K. lactis</i> suşlarının, YP laktoz üreme ortamındaki laktaz aktiviteleri.....	51
Çizelge 4. 6. Peynir altı suyunda üretilen <i>K. lactis</i> suşlarının laktaz aktiviteleri.....	52
Çizelge 4. 7. Laktaz biyosentezine glukoz baskılamasının etkileri.....	53
Çizelge 4. 8. <i>K. lactis</i> 'de laktaz biyosentezinin laktoz ile aktivasyonu.....	55
Çizelge 4. 9. <i>K. lactis</i> suşlarının farklı üreme ortamlarında invertaz aktiviteleri.....	56
Çizelge 4. 10. YPD ortamında üretilen <i>K. lactis</i> suşlarının ikilenme süreleri.....	61
Çizelge 4. 11. Peynir altı suyunda üretilen <i>K. lactis</i> suşlarının ikilenme süreleri.....	62

1. GİRİŞ

Kluyveromyces lactis çeşitli endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmakta olan önemli bir maya türüdür. Herhangi bir patojenik etkisi olmadığı için uzun süre önce güvenli mikroorganizma olarak kabul edilmiştir. *K. lactis* çok çeşitli habitatlarda bulunabilen fakat çoğunlukla süt ve çeşitli süt ürünlerinde doğal floraya ait bir mikroorganizma olarak bulunur (Schaffrath ve Breunig 2000). Güvenli mikroorganizma olduğu için önemli kullanım alanları olan laktaz enzimi üretiminde ve bazı terapötik enzim ve hormonların üretiminde konak organizma olarak kullanılmaktadır (van Ooyen ve ark. 2006).

K. lactis'in genom yapısı ayrıntılı olarak incelenmiştir. *K. lactis* diğer bir endüstriyel mikroorganizma olan *S. cerevisiae*'ya genetik olarak yakın olmakla birlikte genomu *S. cerevisiae*'dan daha küçük ve toplam gen sayısı da *S. cerevisiae*'dan daha azdır (Bolotin-Fukuhara ve ark. 2000, Fukuhara 2006). *K. lactis*'de gen klonlama ve heterolog gen ekspresyonu için çeşitli vektörlerin ve seçilebilir marker genlerin bulunması, kolay üretilebilmesi, stabil transformantlar oluşturabilmesi gibi özellikleri nedeni ile moleküler genetik çalışmaları için uygun bir eukaryotik organizmadır. *Kluyveromyces* genusu genetik ve metabolik özellikleri oldukça farklı *Kluyveromyces* türleri de içermektedir. Fakat *Kluyveromyces* genusunda genom yapısı ve metabolik özellikleri en iyi analiz edilmiş tür *K. lactis*'dir.

K. lactis'in farklı suşları çeşitli endüstriyel amaçlar için kullanılmaktadır. Bu nedenle farklı metabolik özellikleri olan yeni *K. lactis* türlerinin tanımlanması ve genetik özelliklerinin belirlenmesi hem temel ve hem de endüstriyel uygulamalar için önem kazanmıştır. Bu araştırmada Bursa ilinde üretilen süt ve bazı peynir örneklerinde doğal flora olarak bulunan 6 farklı *K. lactis* suşu izole edilip bazı genetik ve metabolik özellikleri incelendi. İzole edilen yeni *K. lactis* örneklerinin metabolik özelliklerinin standart *K. lactis* suşuna göre bazı metabolik özelliklerinde önemli farklılıklar belirlendi.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2. 1. *Kluyveromyces lactis*'in Genel Özellikleri

Kluyveromyces lactis doğal habitatı çok değişken olabilen Ascomycetes sınıfında yer alan bir maya türüdür. *K. lactis*'in orijinal suşu süt ve süt ürünlerinden saflaştırılmıştır. Bu nedenle daha çok süt ve süt ürünlerinden izole edilmeye çalışılmaktadır (Wesolowski-louvel ve ark. 1996, Lachance 2007). *K. lactis*'in optimum üreme sıcaklığı 28-30 °C'dir. Hayat döngüsü *S. cerevisiae*'ya benzemekle birlikte *S. cerevisiae*'dan farklı olarak diploid *K. lactis* suşları kolay ve hızlı bir şekilde spor oluşturabilir. Bu nedenle stabil diploid *K. lactis* suşlarına çok nadir olarak rastlanır. *K. lactis* ile ilgili genetik çalışmalar 1960'lı yıllarda başlamaktadır. Bu dönemlerde *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces lactis* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra endüstriyel öneminin artması nedeni ile *Kluyveromyces* genusu yoğun taksonomik çalışmaların konusu olmuştur. Bu çalışmalarda *K. lactis*'in bir diğer laktoz asimile eden ve endüstriyel alanda iyi bilinen bir maya olan *Kluyveromyces marxianus*'a önemli benzerlikler gösterdiği görülmüştür (Wesolowski-louvel ve ark. 1996, Kurtzman ve Robnet 2003).

Daha sonra yapılan ayrıntılı ve çok yönlü taksonomik analizlerde birçok moleküler kritere dayanarak *K. lactis* ve *K. marxianus*'un farklı türler olduğu gösterilmiştir (Vaughan-Martini ve Martini 1987, Fuson ve ark. 1987, Sidenberg ve Lachance 1986). Bu iki türün DNA baz bileşimlerinin (G+C içeriklerinin), kromozom yapılarının ve incelenen mitokondriyal DNA özelliklerinin tamamıyla farklı olduğu görülmüştür (Fuson ve ark. 1987, Vaughan-Martini ve Martini 1985, 1987). *Kluyveromyces* cinsinde yer alan maya türlerinin bazılarının daha erken yıllarda tanımlandığı da görülmektedir. Bu türler arasında *K. fragilis*, *K. thermotolerans*, *K. drosophilorum*, ve *K. waltii* sayılabilir (Barnette ve Lichtenthaler 2001).

K. lactis farklı alanlarda çalışan moleküler biyologların ilgisini günden güne artarak çekmektedir ve biyoteknolojide de yaygın olarak kullanılmaktadır. *K. lactis* genel olarak güvenli olduğu kabul edilen (GRAS- Generally Regarded As Safe) bir maya

türüdür. Moleküler genetik çalışmaları için klonlama vektörü olarak kullanılan kararlı plazmit vektörlerinin ve uygun tekniklerin bulunması nedeni ile *K. lactis* temel araştırmalarda da kullanılmaktadır. *K. lactis*, fonksiyonel gen gruplarının tanımlanmış olması, aerobik koşullara adapte olmuş bir tür olması nedeni ile özellikle karbon kaynaklarının metabolizması ile ilgili kontrol mekanizmalarının analizinde ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, van Ooyen ve ark. 2006).

K. lactis laktaz (Beta-galaktosidaz, E.C.3.2.1.23) üretiminde kullanılan en önemli endüstriyel mikroorganizmalardan biridir. *K. lactis* rekombinant protein üretiminde de kullanılmaya başlanmıştır (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, van Ooyen ve ark. 2006). İnsan interlökin 1 β , serum albümin, fare α -amilaz ile birçok bakteriyel ve fungal enzim *K. lactis*'de üretilen bazı heterolog proteinlerdir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, Schaffrath ve Breuning 2000, van Ooyen ve ark. 2006).

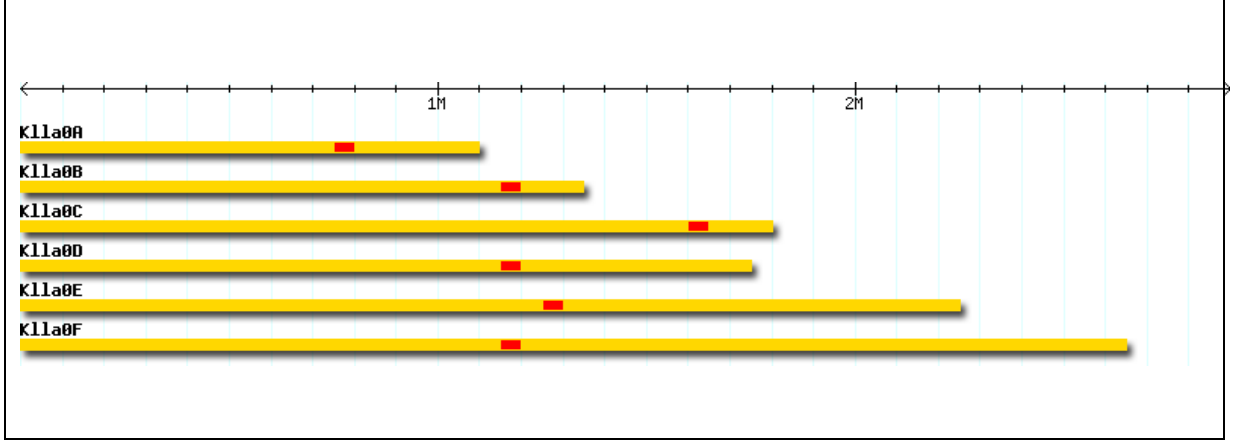
K. lactis hücreleri *S. cerevisiae*'dan daha küçük olup hücre şekilleri üreme aşaması veya hücrenin metabolik durumuna göre küresel, oval veya uzamış hücre şekillerine sahip olabilirler. Bu tür mayalar vejetatif olarak ürerler, aseksüel üremeleri multiletaral tomurcuklanma ile olur (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). Bu türün doğal yaşam alanı çeşitlilik gösterir, fakat birçok suş başlıca karbon kaynağının laktoz olduğu süt ve süt ürünlerinden izole edilmiştir. *K. lactis* laktozda üreyebildiği halde ona çok yakın bir tür olan *S. cerevisiae* laktozu kullanamaz. Fermentatif metabolizmanın baskın olduğu *S. cerevisiae*'dan farklı olarak *K. lactis*'in dahil olduğu maya türlerinin çoğu aerobik organizmalardır. *K. lactis* kültürleri organik esterlerin varlığından dolayı oluşan meyveli kokusuyla *S. cerevisiae* kültürlerinden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Mutlak aneorobik koşullarda *K. lactis* suşları ortama gerekli steroller ve yağ asitleri eklense de üreyemezler. Bazı kaynaklarda glikoz ve fruktozda aneorobik olarak üreyebildikleri rapor edilmektedir (Entian ve Barnett 1983). Aerobik koşullarda glukozu fermente ederek etanol üretir. Bu nedenle *K. lactis*'e respiro-fermentatif maya da denilmektedir. *K. lactis*'de aerobik metabolizma glukoz baskılanmasından etkilenmez (Breunig ve ark. 2000, Gonzales-Siso ve ark. 2000).

K. lactis laktozda hızlı üreyebilme özelliği ile birçok maya türünden ayırt edilebilir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). Bu sebepten dolayı *K. lactis* türü mayalar süt mayası olarak da adlandırılmaktadır. Ayrıca *K. lactis* çok çeşitli karbon kaynaklarını da asimile edebilmektedir. Glikoz, galaktoz, sukroz, maltoz, laktoz, rafinoz, etanol ve gliserol gibi birçok bileşiği karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, Breunig ve ark. 2000).

Mayaların aerobik ortamlarda etanol oluşturması işlemine Crabtree etkisi adı verilir. Mayaların küçük bir grubu bu etkiyi gösterir (Breuning ve ark. 2000). *S. cerevisiae* Crabtree pozitif mayalar arasındadır. *K. lactis* ise Crabtree negatif bir mayadır. Crabtree pozitif mayaların ATP ve biomass üretimi Crabtree negatiflere göre oldukça azdır (Breuning ve ark. 2000, Schaffrath ve Breuning 2000). Heterolog protein üretimi gibi biomass üretimine bağlı endüstriyel uygulamalarda Crabtree etkisi en önemli sorundur. Pirüvatın yaklaşık olarak tamamı dekarboksillenir ve etanole indirgenir (Breunig ve ark. 2000). Etanol oluşumunda şekerin sınırlı olduğu kültür ortamlarından kaçınılabılır, ancak bu kez de üreme ve protein sentezi oranı düşer (Schaffrath ve Breunig 2000).

Saccharomyces cerevisiae ile karşılaştırıldığında *K. lactis*'in kromozomal DNA'sı %40 GC içerir. *K. lactis*'te büyüklükleri 1 ile 3 Mb arasında olan 6 farklı kromozom bulunmaktadır (Sor ve Fukuhara 1989). *K. lactis* genomu "Genolevures Concoortium" olarak adlandırılan ve Fransa'da yer alan çeşitli üniversitelerdeki araştırma guruplarının oluşturduğu bir araştırma konsorsyumu tarafından sekanslanmıştır (Bolotin-Fukuhara ve ark., 2000). *K. lactis*'in toplam genom büyüklüğü 10.6 Mbç olarak belirlenmiştir. Bu genomda 5300 kodlama bölgesi rapor edilmiştir. *K. lactis*'in nükleer genomuna ek olarak 40 Kbç uzunluğunda halkasal yapıda bir mitokondriyel DNA içerdiği bulunmuştur. *K. lactis*'de nükleer ve mitokondriyel genomlara ek olarak ekstrakromozomal elementler de bulunmaktadır. Bazı *K. lactis* suşlarında lineer DNA yapısında olan iki sitoplazmik plazmit bulunabilir. Bu plazmitler pGKL1 (8.8 Kbç) ve pGKL2 (13.4 Kbç) olup *K. lactis*'de killer toksin üretimine neden olan plazmitlerdir. Bazı *K. lactis* suşlarında da pKD1 olarak adlandırılan ve *S. cerevisiae* 2-mikron plazmitine yapısal olarak benzeyen nükleer plazmit de bulunabilmektedir. pKD1'in

çeşitli türevleri *K. lactis*'de klonlama vektörlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır (Schaffrath ve Breunig 2000, Bolotin-Fukuhara ve ark. 2000).



Şekil 2. 1. *K. lactis*'de kromozom uzunlukları (URL1).

K. lactis'de genlerin adlandırılması da *S. cerevisiae*'dan çok farklıdır. Genoleuver konsorsyumu tarafından kabul edilen adlandırma prensibine göre gen adlandırmada hem tür adı hemde kodlama bölgesi açık şekilde belirtilmektedir (Durrens ve Sherman 2005). Bu adlandırma sistemine göre örneğin KLLA0D12672g olarak adlandırılan kodlama bölgesinin anlamı:

KLLA: maya genusu ve tür adının ilk 2 harfleri, *Kluyveromyces lactis*,

0: sekans analizinin yapıldığı kaçınıcı suş olduğu: 0 (Orijinal suş, 1., 2. Suş gibi),

D: ilgili DNA bölgesinin kaçınıcı kromozomda olduğu (A-F kadar),

12672: ilgili, verilen kromozom üzerinde tanımlanan ve sol uçtan itibaren numaralandırıldığında kaçınıcı element/bölge olduğunu göstermektedir. g ise genetik element tipini göstermektedir. Genetik element tiplerinden transle edilen kodlama bölgeleri g., transkribe edilen fakat transle edilmeyen kromozom bölgeleri r (tRNA, rRNA), cis-acting elementler (promotor bölgeleri) s., tekrarlı DNA dizileri ise t harfi ile kısaltılarak adlandırılmaktadır. Bu adlandırma sistemine göre KLLA0D12672g: *K. lactis*'de *LAC9* geni olarak bilinen ve *S. cerevisiae*'daki *GAL4* genine homolog olduğu için *KIGAL4* olarak da adlandırılan genin kodu'dur (Salmeron Jr ve Johnston 1986, Zachariae ve ark. 1993, Zachariae ve Breunig 1993)

2. 2. Laktaz Enziminin Endüstriyel ve Tıbbi Önemi

K. lactis'in farklı suşları süt içerisinde bulunan önemli bir şeker çeşidi olan laktozu kullanıma adapte olmuştur. Laktozu kullanabilme özelliklerinden dolayı farklı maya türleri, kefir gibi besin maddelerinin üretiminde gerekli olan mikroorganizmalar olarak yer alırlar (Koutinas 2003). Moleküler tekniklerdeki ilerlemeler son yıllarda *Kluyveromyces* mayaların endüstriyel kullanımındaki potansiyellerini arttırmaktadır.

Kluyveromyces mayalarının en önemli kullanım alanlarından biri biyoremediasyon amaçlı kullanımlarıdır. Dünya çapında devamlı olarak artan besin maddelerinin üretimi yüksek miktarda sıvı yapıda peynir altı suyunun oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Peynir üretimi sırasında her 1 kilogram peynir yapımı sırasında 9 kilogram peynir altı suyu oluşmaktadır (Mawson 1994, Yang ve Silva 1995). Dünya genelindeki peynir üretimi senede birkaç milyon tona ulaşmaktadır. Peynir altı suyundan hızlı bir şekilde laktozun elimine edilmesi mikroorganizmalar tarafından yapılan fermentasyon ile sağlanır. Mikroorganizmalar laktozun hızlı bir şekilde laktozun ticari açıdan değerli ürünlere dönüşmesini sağlar. Peynir altı suyunun eliminasyonu için gerekli olan uygun metodların olmaması halen endüstriyel kuruluşların bu ürünü çevre kirliliği anlamında kalıcı hasarlara sebep olabilecek şekilde boş alanlara bırakmaya zorlamaktadır (Rubio-Teixeira 2006).

Peynir altı suyunun boşaltılmasıyla ilgili yapılan düzenlemeler bu işlemin çevresel açıdan daha güvenli olması için yeni alternatifleri gündeme getirmiştir. Endüstriyel alanda bu maddeyi elimine edebilmenin en ekonomik yolu onu ticari olarak değerli başka bir ürüne çevirebilmektir. Bu işlem de peynir altı suyunun laktoz asimile edebilen mikroorganizmalarla fermentasyonu ile mümkündür. Birçok bakteri çeşitliliğine rağmen maya ve mantarlar bu özelliğe sahip olan en önemli mikroorganizma grubudur. Bunlar arasında *K. lactis* türü mayalar United States Food and Drug Administration (USDA) tarafından güvenli mikroorganizmalar olarak onaylanmıştır. Bu nedenle *K. lactis* türü mayalar peynir altı suyunun ilaç ve besin endüstrisinde kullanılan ürünlere dönüşümü için uygun olan mikroorganizmalardır (Gekas ve Lopezleiva 1985, Siso 1996).

Ticari açıdan değerli birçok ürün ve laktoz eliminasyonu *Kluyveromyces* türü mayalar kullanarak elde edilebilir. Diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında *Kluyveromyces*'teki oksidatif metabolizma besin olarak kullanılmak üzere yüksek miktardaki biokütlenin üretimine izin vermesiyle avantaj sağlamaktadır (Belem ve Lee 1998). *K. lactis* tarafından üretilen laktaz, biyoteknoloji ve besin endüstrisi için önemli bir enzimdir. Belirli besinlerden laktoz eliminasyonu ve galaktooligosakkaritlerin sentezlenmesindeki kullanımı ile *K. lactis*'in laktaz enzimi insan sağlığı ve beslenmesi için gerekli olan bir enzimdir (Yang ve Silva 1995, Rivero-Urgell ve Santamaria-Orleans 2001).

Kluyveromces ve *Saccaromyces* türü mayalar filogenetik açıdan birbirine çok yakın olan türlerdir (Kurtzman ve Robnett 2003). Bu iki maya türünün galaktozu karbon kaynağı olarak kullanmasını sağlayan benzer gen grupları bulunmaktadır (Rubio-Teixeira 2005).

Laktozun endüstriyel alanda birçok kullanımı vardır. Laktoz yiyeceklerde hafif bir tatlandırıcı, lezzet verici, boya taşıyıcı ve kıvam arttırıcı özellikleriyle katkı maddesi olarak kullanılır. Ayrıca barsakta kalsiyum emilmesine ve laktik asit üretilmesine pozitif etkide bulunmaktadır. Laktozun eczacılıkta da ilaç taşıyıcısı olarak önemli bir kullanım alanı vardır (Yang ve Silva 1995). Ancak bunların yanı sıra laktozun birçok istenmeyen etkileride mevcuttur. Diğer şekerlere göre daha az çözünürlülük, düşük konsantrasyonlarda kristalize olma eğilimi gibi etkiler dondurmada olduğu gibi bazı yiyeceklerin yapılarını etkilemektedir. Laktoz, sukroza yada kendisinin hidrolizi sonucu oluşan galaktoza göre daha az tatlandırıcı özelliğe sahiptir. En önemlisi, insan popülasyonunun büyük bir yüzdesi genetik bozukluk yüzünden laktaz enzimini sentez edememektedir. Bu durum laktoz intolerans olarak adlandırılır (Adam ve ark. 2004, Swallow 2003). Düşük oranda olmasına rağmen laktoz intoleransı bazı hayvan türlerini de özellikle süttten kesildikten sonra etkilemektedir (Moulin ve Galzy 1984, Olchoway ve ark. 1993).

Bütün bu sebeplerden dolayı laktozun hidrolizi, bu şekerin birçok seviyede kullanımını arttırmaktadır. Örneğin sütte laktozun hidroliz olmasıyla oluşan glukoz ve galaktoz karışımı spesifik mikroflora ile peynirin olgunlaşmasına önemli katkıda bulunur (Thomsan ve Gyuricsek 1974). Bu ortam *Lactobacillus*'ların metabolizmasını attırırken, yoğurtta fermentasyon zamanını azaltır, tat ve akışkanlığı artırır (Hilgendorf 1981, O'Leary ve Woychik 1976). Laktoz intoleransından dolayı ortaya çıkan birçok beslenme problemi, laktozu hidrolize olmuş süt veya hidrolize laktoz içeren peynir şuruplarının kullanımıyla çözülür (Yang ve Silva 1995). Aslında hidrolize laktoz içeren peynir şurupları daha hoş bir tada sahip olmalarından dolayı süt kökenli tatlılarda, bazı yumuşak meyve içeceklerinde veya çiftlik hayvanları yemlerinin üretiminde gerekli protein ve şeker katkıları olarak kullanılmaktadır (Gekas ve Lopezleiva 1985, Yang ve Silva 1995, Siso 1996).

Laktozun enzimatik hidrolizi genelde kimyasal hidrolize tercih edilmektedir. Kimyasal hidroliz, işlemde sonra süt ve peynir altı suyunun kalitesini düşüren etkileyici pH ve sıcaklık derecelerini gerektirir (Gekas ve Lopezleiva 1985, Siso 1996). Laktazın kolay elde edilen bir enzim olması laktoz hidrolizinde enzimatik metodların tercih edilmesine neden olmaktadır. Laktaz hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunmasına rağmen, mikroorganizmalar endüstriyel laktaz üretimi için kolay manipüle olma özelliklerinden dolayı daha fazla tercih edilirler. Bakteriler, mantarlar ve mayalar iyi bir potansiyel laktaz enzimi üreticileridir. Optimum pH'daki termostabilite ve enzimin hücre içi yada salgılanabilme durumuna göre olan farklılıklar biyoteknolojik amaçlar için hangi kaynağın uygun olduğunu belirler. Örneğin fermentasyon işleminde çok yüksek sıcaklıkların kullanımı kontaminasyondan kaçınmak için gereklidir. Bu açıdan bakteri ve mantar kökenli belirli laktazlar, mayalardaki laktazlara göre farklı sıcaklıklarda kullanılabilir. *Thermus sp.* IB-21 gibi termostabil laktazlar 70 °C'de olan fermentasyon işlemleri için idealdir (Kang ve ark. 2005). Psikrofil bakterilerden elde edilen laktazlar ise besin ürünlerinin üretimi işleminde kullanılırlar (Hoyoux ve ark. 2001). Bakteriler daha fazla çeşitlilik sunmasına rağmen besin biyoteknolojisi ve ilaç endüstrisi alanında laktaz kaynağı olarak GRAS mikroorganizma olmaları nedeni ile *K. lactis*, *K. marxianus* ve *K. fragilis* gibi mayalarla ile *Aspergillus niger* ve *A. oryzae* gibi küfler daha çok tercih edilirler (Bonekamp ve

Oosterom 1994). Kf kökenli laktazlar birçok durumda hücre dışına salgılanırlar fakat maya laktazları ile karşılaştırdıklarında genellikle daha az miktarda enzimatik birim olarak sentezlenirler (Siso 1994). Genelde kf laktazları asidik (2.5-4.5), maya ve bakteri laktazları da nötr (6.9-7.5) optimal pH'ya sahiptir. Maya laktazları fiziksel özellikleri yüzünden sütte ve peynir altı suyunda bulunan laktozu hidrolize etmede kf laktazlarına göre daha avantajlıdır. Kf laktazlarının kullanımı asidik peynir altı suyundaki laktozun hidrolizi ile sınırlıdır. Asidik peynir altı suyu, asidik tadı ve yüksek tuz miktarı ile besin amaçlı tercih edilmeyen bir üründür (Kosikowski 1979).

Maya laktazlarının kullanımı ile ilgili üstesinden gelinmesi gerekli bir diğer problem ise sitoplazmik enzim olmalarıdır. Kontrollü hücre dışı koşullar ve ortamın farklı parametrelerinin modifikasyonu maya laktaz aktivitelerinde önemli bir artışa neden olur. Örneğin, önceden ısıtılan peynir altı suyundan süt proteinlerinin denatürasyon ile çökmesi ile reaktif sülfür gruplarının ayrılmasının laktaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Jimenez-Guzman ve ark. 2002). Sadece laktaz stabilitesini arttıran değil aynı zamanda glukoz ile inhibisyonunu engelleyip, enzimatik aktivitenin tekrar kazanılmasını sağlayan spesifik metodlar da geliştirilmiştir. Bu metodların çoğu enzimin yada bütün hücrelerin katı bir destekleyici madde üzerine immobilizasyonunu gerektirir (Becerra ve Siso 1996).

Laktaz enzimleri ile laktoz hidrolizinin yararlı etkilerinin yanı sıra endüstriyel alanda ilgi çeken bazı ürünler yine laktoz hidrolizi ile elde edilmektedir. Laktazlar transgalaktosilasyon ile laktoz türevlerini üretebilme özelliğine sahiptir. β -galaktosid yapısındaki bir karbonhidrattan galaktosid birimi bir alıcı şekere transfer edilir bu da galaktooligosakkaritin (GOS) oluşumuna sebep olur. Reaksiyonda özellikle laktoz ve fruktoz karışımının kullanımı laktuloz (4- β -D galaktopyranosyl-D-fructose) oluşumuna yol açar. Günümüzde GOS ve laktulos preparatlarının prebiotik maddeler olarak çok önemli kullanım alanları vardır (Mendez ve Olano 1979, Szilagyı 2002) Sindirilmedikleri için GOS kolonda bakteriyel floraya ulaşabilir ve barsakta Bifidobakteriumların çoğalmasına sebep olur. Laktuloz ayrıca bazı karaciğer hastalıklarının tedavilerinde de kullanılır (Hallman 2000, MacFarlane ve ark. 2008).

Son yapılan çalışmalar *K. lactis* laktazının, *E. coli* laktazından 2-7 kat daha kısa zamanda, 5-10 kat daha fazla laktuloz üretebildiğini göstermiştir (Lee ve ark. 2004).

2. 3. Laktaz Biosentezi ve Genetik Kontrolü

2. 3. 1. Laktaz enziminin özellikleri ve sentezi

Laktoz kimyasal olarak O- β -D galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-glukoz olarak tanımlanan glukoz ve galaktozdan oluşan bir disakkarittir. Biosentezi sadece memeli salgı bezinde gerçekleşir. Bu işlem UDP'ye bağlı galaktozun galaktozil transferaz ile katalizlenip alıcı glukoz molekülüne aktarılmasıyla gerçekleşir. Birçok dokuda bulunan bu enzim glikoproteinlerin sentezinde gereklidir, fakat normalde laktaz aktivitesi göstermez. Laktasyon sırasında memeli salgı bezi galaktozil transferaz ve alfa-laktoglobulin'i birlikte sentezler. Bu iki proteinin etkileşimiyle laktoz sentezleme kapasitesine sahip olan laktoz sentaz kompleksi oluşur (Permyakov ve Berliner 2000).

Diğer şekerlerde olduğu gibi, laktoz barsak lümeninde monosakkarit bileşenlerine hidroliz edilir. Bu hidrolizden sorumlu olan enzim laktaz/phlorizin hidrolaz (LPH), integral glikoprotein olarak barsak epitel hücrelerinin membranında bulunur. Bu enzimin phlorizin hidrolaz aktivitesi birçok omurgalının besininde bulunan β -glikosylceramidlerin sindirimi anlamına gelir (Naim 2001). Laktoz üzerindeki hidroliz aktivitesiyle oluşan glukoz ve galaktoz daha sonra epitel hücrelerinin membranından sitozole transfer edilir, buradan da bu monosakkaritler farklı dokulara dağılır. Birçok memeli erken yaşam evrelerinde, örneğin sütün tek gıda olduğu erken gelişim aşamalarında, yüksek laktaz aktivitesine sahipken, yetişkin evrede daha düşük laktaz aktivitesine sahiptir (Flatz 1987).

Laktoz memeliler için sıra dışı bir bileşik olmasının yanı sıra, birçok mikroorganizma tarafından enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılır. *E. coli*'de laktoz metabolizmasının genetik kontrol mekanizmasının anlaşılması 20. yüzyılda laktoz operonunun keşfine sebep olmuştur (Jacob ve Monod 1961). Bakteriler laktozun alımı ve hidrolizi için farklı stratejiler geliştirmiştir (De Vos ve Vaughan 1994). En etkin yol

laktozun hücre membranından transportu sırasında fosforilasyonudur. Bakteri hücrelerine giren fosforile laktoz, fosfo-beta-galaktosidaz tarafından hidroliz edilir. Laktozun hücre içine alınması için iki alternatif mekanizma vardır. Bunlar laktoz-galaktoz antiportu ve laktoz proton simportudur. Bazı mantarlarda da dikkate değer düzeyde laktaz aktivitesi mevcuttur. Mayalardan *Kluyveromyces* genusunun farklı türleri laktozu asimile etme özellikleriyle karakterize edilmiştir. *Kluyveromyces*'den saflaştırılan sitoplazmik laktaz ile bazı *Aspergillus* türleri tarafından ortama salgılanan β -galaktosidaz enzimi laktaz gurubu enzimlerin en bilinen şeklidir (El-Gindy 2003; O'Connell ve Walsh 2008). *E. coli*'deki *LacZ* geninin homoloğu *K. lactis*'de *LAC4* genidir (Sheetz ve Dickson 1981).

İnsanlarda laktaz aktivitesinin yokluğunun sebep olduğu laktoz intoleransı probleminde çok sık rastlanır. Barsak epitel hücrelerinde besin ile alınan laktozu sindirebilecek yeterli laktaz olmaması oldukça önemli sindirim sistemi rahatsızlıklarına sebep olmaktadır (Stephens ve ark. 1983). Barsak epitel hücreleri laktoz veya diğer disakkaritleri hücre içine taşıyamazlar. Böylece sindirilemeyen laktoz, kalın barsaktaki mikroflora için fermentatif sustrat olarak kullanılıp karın ağrısı, ishal, mide bulantısı gibi şikayetlere sebep olur (Stephens ve ark. 1983). Dünyada yetişkin insanları %75'i hayatlarında laktoz intoleransla karşılaşır. Bazı insan popülasyonlarında ise laktoz intoleransına daha sık rastlanılır (Flatz 1987).

2. 3. 2. Laktaz sentezinin genetik kontrolü

K. lactis ve *S. cerevisiae* mayaları genetik açıdan önemli derecede benzerlik gösterirler. Her iki maya da GAL/LAC regülönünde bulunan ortak gen grubuyla galaktozu karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir (Johnston 1987, Schaffrath ve Breunig 2000, Rubio-Teixeira 2005). *K. lactis* ve *S. cerevisiae*'de GAL/LAC regülönündeki önemli farklılıklardan biri her iki mayanında yaşam habitatlarında karşılaştıkları farklı galaktoz kaynaklarına göre adapte olmuş spesifik permealizasyon ve hidrolitik enzim sistemlerinin evrimleşmesidir. *K. lactis* çoğunlukla galaktozu bir disakkarit olan laktoz'un bir bileşeni olarak almaktadır. *K. lactis*'in laktozu kullanımında laktozun hücre içine alınmasını sağlayan taşıyıcı protein olan laktoz permeaz *LAC12* geni, laktozun galaktoz ve glukozu hidrolizini sağlayan laktaz enzimi

ise *LAC4* geni tarafından kodlanmaktadır (Dickson ve ark. 1979, Sheetz ve Dickson 1981, Rubio-Teixeira 2005). *K. lactis*'de GAL/LAC regulonunu 7 farklı gen oluştururken *S. cerevisiae*'da bu regulon 8 farklı genden oluşmaktadır ve ayrıca GAL/MEL regulonu olarak da adlandırılmaktadır (Çizelge 2. 1) (Rubio-Teixeira 2005).

Çizelge 2. 1. *K. lactis*'de GAL/LAC regulonunu oluşturan genler.

GAL/LAC Regulonu Genleri	Gen İşlevi	UAS* KIGal4p	UAS KIMig1p
<i>LAC12</i>	Laktoz/Galaktoz Permeaz	4	0
<i>LAC4</i>	Laktaz Enzimi (β -galaktozidaz))	4	0
<i>KIGAL1</i>	Galaktokinaz, Bifonksiyonel enzim, Sensör ve İndükleyici	4	1
<i>KIGAL7</i>	Galaktoz-1-fosfat uridiltransferaz	2	0
<i>KIGAL10</i>	Uridin difosfo glukoz-4-epimeraz	4	0
<i>KIGAL4</i>	Traskripsiyonel aktivatör	1	0
<i>KIGAL80</i>	KIGal4p Represörü	2	0

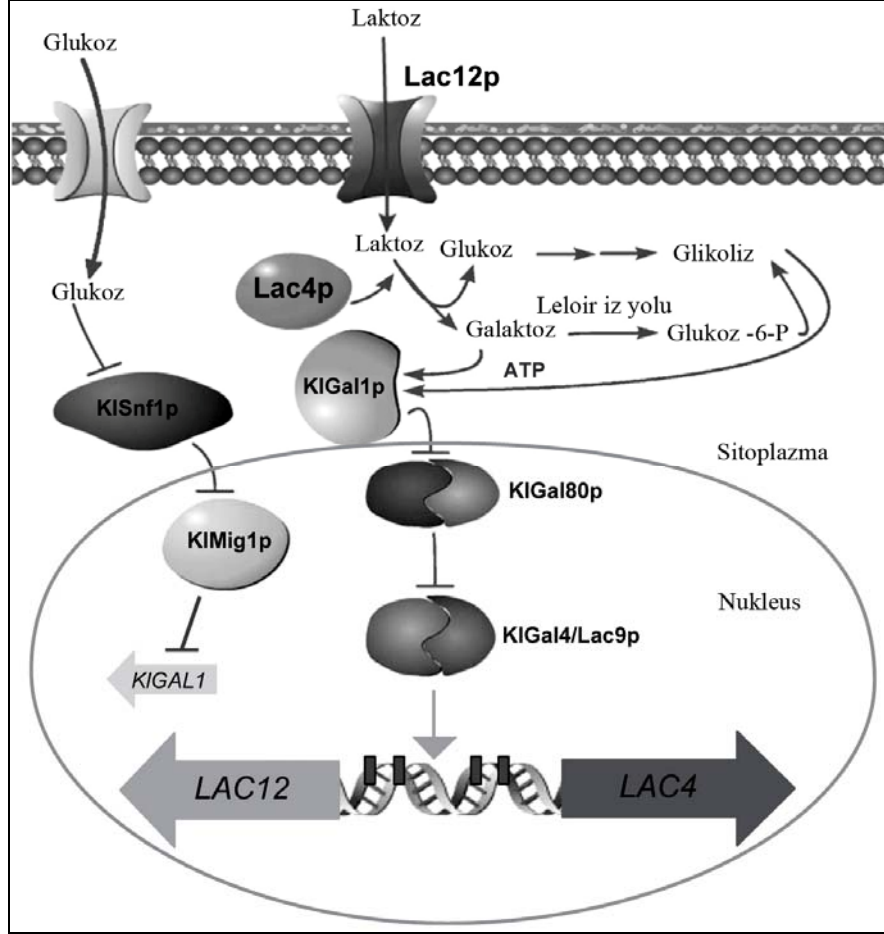
UAS KIGal4p ve UAS KIMig1p bu transkripsiyon faktörlerinin ilgili GAL/LAC regulonu genlerinin promotor bölgelerindeki bağlanma bölgelerinin sayısını göstermektedir (Rubio-Teixeira 2005).

LAC12 geni laktoz/galaktoz permeaz aktivitesi olan 422 amino asitlik bir integral membran proteinini kodlamaktadır. *K. lactis*'de, *S. cerevisiae*'da bulunan galaktoz permeazı kodlayan *GAL2* geninin homoloğu bulunmamaktadır (Chang ve Dickson 1988). *Kluyveromyces*'te Lac12p'den bağımsız galaktoz alımını sağlayan diğer heksoz permeazın varlığı da öne sürülmektedir (Schaffrath ve Breunig 2000). Lac12p'nin laktoz için K_m değeri 2.8 mM ve optimum çalışma pH'sı da 4.7'dir. Bu aktivite enerji gerektirir ve bunun için de H^+ veya Na^+ iyonları simport olarak kullanılır. İşlevsel benzerliğe rağmen Lac12p iyi karakterize edilmiş olan *E. coli* ya da

Klebsiella'daki laktoz permeazlara önemli derecede bir benzerlik göstermez. *K. lactis*'de laktozun hücre içine alımı sırasında laktozun fosforilasyonu gerçekleşmediği için Lac12p fonksiyonu bir fosfotransferaz sistemi de gerektirmez (Dickson ve Barr 1983; Boze ve ark. 1987). Lac12p, insan glukoz taşıyıcısına, *S. cerevisiae*'daki bazı amino asit permeazlarına ve *E. coli*'de xylose ve arabinoz taşıyıcılarına önemli derecede benzerlik gösterir (Chang ve Dickson 1988).

K. lactis *LAC4* geni laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizini katalizleyen laktaz enzimini (β -galaktosidaz; EC 3.2.1.23) kodlamaktadır (Dickson ve Markin 1980; Sheetz ve Dickson 1981). Lac4p 1025 amino asit uzunluğunda ve 117.6 kDa ağırlığındadır. *K. lactis*'te, Lac4p'nin aktif formu homodimerdir (Dickson ve ark. 1979). Doğal laktaz enzimi aktivite için divalent ve monovalent katyonlar gerektirir. Laktaz enziminin laktoz için K_m değeri 17-20mM ve V_{max} değeri de $600 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 'dir (Dickson ve ark. 1979; Kim ve ark. 2003). Galaktoz ve glukoz rekabetçi ve rekabetçi olmayan inhibitörler olarak davranmaktadır (Dickson ve ark. 1979; Cavaille ve Combes 1995). Lac4p, *E. coli*'de LacZ geninin kodladığı β -galaktosidaz, diğer bakteriyel ve fungal orijinli β -galaktosidazlar ve memeli β -glucuronidazlarını içeren glikozyl hidrolaz 2 ailesine aittir (Henrissat ve Bairoch 1993, 1996).

LAC4 ve *LAC12*, 2.6 kb'lik alışılmamış büyüklükte intergenik bir bölgeden zıt yönlere doğru transkribe edilirler. Bu bölgenin içinde transkripsiyonel aktivatör olan Lac9p'nin (KlGal4p) bağlanabileceği 4 upstream aktivatör sekansı (UAS) bulunmaktadır (Ruzzi ve ark. 1987; Gödecke ve ark. 1991). Fermente edilemeyen karbon kaynaklarının varlığında ve uyarıcı olmayan koşullarda *LAC4* ve *LAC12* genleri bazal seviyede transkribe edilmektedir (Sheetz ve Dickson 1981). LAC/GAL regulonunda bazal seviyedeki transkripsiyon *K. lactis*'deki KlGal4p otheregulator döngüsünün transkripsiyonundan dolayı *S. cerevisiae*'deki GAL regulonundan daha fazladır (Şekil 2. 2) (Kuzhandavolu ve ark. 1992; Zachariae ve Breunig 1993). İndüksiyonun olmadığı durumlarda KlGal80p, KlGal4p direkt etkileşimi ile transkripsiyonun çoğunu baskılamaktadır (Şekil 2. 2) (Zachariae ve Breunig 1993; Zenke ve ark. 1993). *K. lactis* galaktozda, *S. cerevisiae*'ya göre daha yüksek oranda

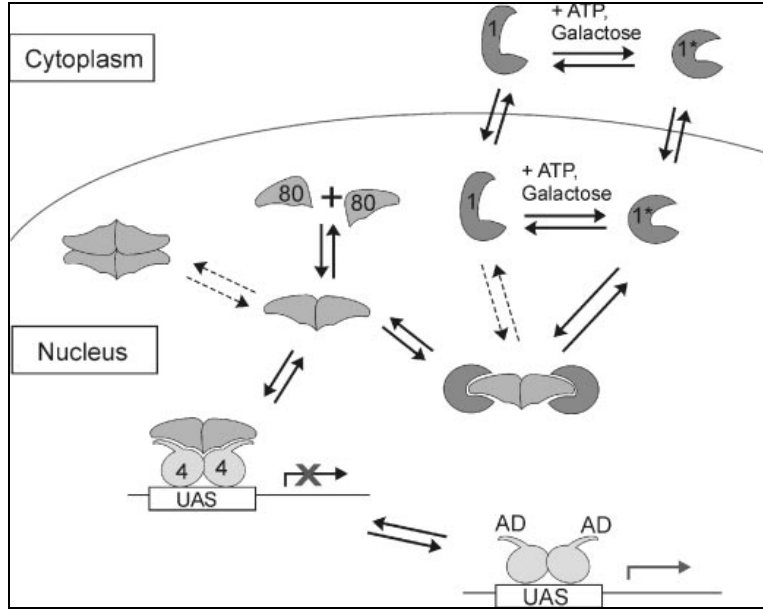


Şekil 2. 2. *K. lactis*'de laktoz kullanımının genetik kontrol mekanizması (Rubio-Teixeira 2006).

üreyebilir. Bu farklılık ScGal4p'ye göre KIGal4p'nin daha yüksek konsantrasyonda bulunmasına bağlanabilir. *K. lactis*'de galaktoz ve laktoz varlığında *KIGAL4* geninin transkripsiyonunun otoindüksiyonu bu karbonhidratlar ile uyarılmış hücrelerde Gal4p'nin konsantrasyonu arttırken *S. cerevisiae*'da bu gerçekleşmez (Czyz ve Ark. 1993; Zachariae ve Breunig 1993).

Laktoz veya galaktoz, laktaz sentezini 150 kat kadar aktive edebilirler (Sheetz ve Dickson 1981; Dickson ve Barr 1983). Bu artış galaktoz ve ATP'nin Leloir metabolik yolunda galaktozu, glikolitik ara madde olan glukoz-6-fosfata dönüştüren ilk enzim olan galaktokinaz K1Gal1p'nin sensör/indükleyici fonksiyonunu aktive etmesiyle olur (Johnston 1987; Lohr ve ark. 1995). K1Gal1p galaktokinaz aktivitesi olan bir enzim olmasına rağmen aynı zamanda K1Gal80 ile etkileşerek onun K1Gal4p'ye bağlanmasını kontrol eden iki fonksiyonlu düzenleyici bir proteindir (Anders ve ark. 2006). Ortamda galaktoz veya laktoz bulunması durumunda yapısal değişikliğe uğrayan K1Gal1p sitoplazmadan nükleusa geçerek K1Gal80 ile etkileşir. Gal4p'nin laktoz ile aktivasyonu, laktozun hücre içine alınması sonucu laktazın laktozu hidroliz etmesi ile gerçekleşir (Dickson ve Barr 1983). GAL/LAC regulonunu uyarıcısının sitoplazmik galaktoz olduğu açıkça gösterilmiştir (Cardinali ve ark. 1997). Sürekli olarak nükleusta bulunduğu gösterilen K1Gal80 ise ortamda galaktoz veya laktoz yokluğunda dimer olarak K1Gal4p'nin aktivasyon bölgesi ile etkileşerek K1Gal4p'nin aktivitesini baskılamaktadır (Şekil 2. 3). Laktoz veya galaktoz varlığında ise K1Gal1p, K1Gal80 ile etkileşerek onun K1Gal4p'ye bağlanmasını engeller ve bunun sonucu olarak da açıkta kalan K1Gal4p aktivasyon bölgesi laktoz permeaz kodlayan *LAC12* ve laktaz enzimini kodlayan *LAC4* genleri transkripsiyonunu aktive etmektedir (Anders ve ark 2006). K1Gal1p'nin iki fonksiyonlu bir protein olduğu *K1GALI* geninde yapılan mutasyonlar ile gösterilmiştir ve düzenleyici aktivite enzimatik aktiviteden ayırt edilebilir (Meyer ve ark. 1991).

Fungal transkripsiyon faktörleri ailesine ait olan Gal4p, mayalarda galaktoz ve galaktoz içeren bir disakkarit olan laktoz metabolizmasını kontrol eden genlerin transkripsiyonunu düzenler. Gal4p'nin ait olduğu protein ailesi üyelerinin %80'ninden çoğu korunmuş DNA'ya bağlanma bölgeleri ile tanımlanmıştır. Bu transkripsiyon faktörleri proteinin amino ucunda (N-terminal) ya da bu bölgeye yakın olarak bulunan DNA'ya bağlanma bölgeleri ile hedef genlerdeki bağlanma dizilerine bağlanırlar. *S. cerevisiae* Gal4p'ini ile *K. lactis* Gal4p'ninin DNA'ya bağlanma bölgeleri atomik düzeyde çözümlenmiştir (Marmorstein ve ark. 1992, 1994). Gal4p'nin DNA'ya bağlanma bölgesi 2 çinko iyonunun 6 cysteine birimiyle oluşturduğu $Cys_6Zn(II)_2$ çinko parmak (Zinc finger) yapısı şeklindedir (Marmorstein ve ark. 1994). Bu DNA bağlanma



Şekil 2. 3. *K. lactis*'de K1Gal1p ve K1Gal80p'nin galaktoz aktivasyonundaki işlevleri. Şekilde K1Gal1p 1, K1Gal80p 80, K1Gal4p ise 4 ile gösterilmiştir (Anders ve ark. 2006).

bölgelerinin bağlandığı upstream aktivasyon sekansları da iyi korunmuş DNA dizileri olup palindromik yapıdaki 5'-CGG(N)₁₁GCC3' dizileridir (Gödecke ve ark. 1991). K1Gal4p aktivasyon domeninin yapısı da iyi belirlenmiştir ve ScGal4p ile yüksek derecede homoloji göstermektedir (Kuger ve ark. 1990).

Laktozu kullanabilen mayalardan *K. lactis*'te *GAL* genleri laktoz metabolik genleriyle birlikte düzenlenir ve K1Gal4p seviyesi ortamdaki laktoz varlığına adaptasyon yüzünden *S. cerevisiae*'dan fazladır (Breunig ve Ark. 2000). Bu adaptasyon işlemiyle ilgili olarak K1Gal80p, K1Gal4p'nin baskılanmış, transkripsiyonel olarak inaktif halde kalması için daha önemli bir role sahiptir (Zenke ve ark. 1993). Ortamda glukoz bulunduğunda *K. lactis*'te Gal4p aktivasyonunu engellemek için Gal80p indüksiyonu gerekirken, *S. cerevisiae*'da durum böyle değildir. K1Gal80p promotorunda da 2 adet K1Gal4p'ye bağlanma bölgesi vardır ve K1Gal4p bu bağlanma bölgelerine yüksek afinite ile bağlanmaktadır (Perlman ve Hopper 1979, Gödecke ve ark. 1991,

Zachariae ve ark. 1993, Breunig ve ark. 2000). Bu bölgelerin delesyonu KIGal4p ile kontrol edilen genlerin düzenlenme mekanizmalarının değişmesine sebep olur.

KIGal4p'nin konsantrasyonu sıkı bir şekilde kontrol edilir. Ortama glukoz eklendiğinde *KIGAL4* mRNA'sı uyarılmış hücrelerle karşılaştırıldığında 3 kat azalır (Kuzhandaivelu ve ark.1992). Ayrıca *KIGAL4*'ün DNA bağlanma bölgesinde oluşan mutasyon veya yaban tip suşa ikinci kopya olarak yerleştirilen *KIGAL4* geni, laktaz aktivitesi ve mRNA düzeyinde incelendiğinde GAL/LAC regülununun normal işleyişini bozar (, Kuger ve ark. 1990, Kuzhandaivelu ve ark. 1992).

Laktoz ve/veya galaktoz, bazal seviyede sentezlenip hücre membranında bulunan Lac12p laktoz permeaz ile hücre içine alınır. Sitozolik laktaz laktozu glukoz ve galaktoza hidroliz eder. Glukoz, glukolize direkt girebilirken, galaktoz ilk olarak Leloir metabolik yolunda bir ara madde olan glukoz-6-fosfata dönüştürülmelidir. Galaktoz ve ATP Leloir Metabolik yolunda ilk enzim olan bifonksiyonel galaktokinaz KIGal1p'ye allosterik olarak etki eder. Bu etkileşim şekilsel bir değişikliğe sebep olup bu proteinin transkripsiyonel bir represör olan KIGal80p ile etkileşimini başlatır (Şekil 2. 3). Sonuçta KIGal80'nin KIGal4 ile etkileşimi bloke edilerek laktoz/galaktoz metabolizması ile enzim veya diğer proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonları KIGal4p tarafından aktive edilir (Anders ve ark. 2006; Rubio-Teixeira 2006). Glukoz varlığı ise alternatif karbon kaynaklarının kullanımıyla ilgili genlerde glukoz baskılamasına neden olur. Diğer etkilerinin yanı sıra glukoz, bir çeşit metabolik sensör ve ana düzenleyici protein kinaz olan KISnf1p'yi inhibe eder, bu da nukleusta aktif KIMig1p seviyesinin artmasıyla sonuçlanır. KIMig1p henüz tanımlanamamış bir ko-represör kompleksi ile birleşerek *KIGALI*'in promotor bölgesindeki represör diziye bağlanarak bu bölgeden olan transkripsiyonu engeller. Bu da KIGal1p'ye bağlı KIGal80p'nin etkileşiminin sona ermesi ve KIGal80p'nin de serbest kalarak tekrar KIGal4p'yi baskılması sonucu *GAL/LAC* regülununun kapanmasına neden olur (Şekil 2. 3) (Rubio-Teixeira 2006).

2. 4. Glikojen Metabolizması

Maya hücrelerinin endüstriyel amaçlarla fermentörlerde üretilmeleri ve üretim sonrası dayanıklılıkları büyük ölçüde üreme ortamlarındaki karbonhidratları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmalarına ve bazı metabolitleri hücre içinde depo etmelerine bağlıdır. Glikojen ve trehaloz belirli üreme ortamı şartlarında maya hücreleri tarafından sentezlenen karbonhidratlardandır (François ve Parrou 2001). Bu karbonhidratlar çevre koşullarına ve hayat döngüsü aşamalarına bağlı olarak, maya hücrelerinin kuru ağırlıklarının %1-25'ini oluşturabilirler (Lillie ve Pringle 1980). Bir tür polisakkarit olan glikojen, glukoz birimlerinin α (1-4) ve α (1-6) bağıyla bağlanmasıyla oluşmaktadır. Glikojenin *S. cerevisiae*'da suda çözünen ve çözünmeyen olmak üzere iki farklı formunun bulunduğu bilinmektedir. Suda çözünmeyen glikojen daha çok β -glukan polimerlerine bağlı olarak bulunmaktadır. Bu nedenle glikojenin *S. cerevisiae*'da sitoplazmik ve hücre duvarına bağlı olmak üzere iki farklı alanda depolandığı bulunmuştur (Gunja-Smith ve ark. 1977).

Glikojenin biyosentezi ve yıkımı ile ilgili metabolik yollar *Saccharomyces cerevisiae*'de oldukça iyi belirlenmiş olmasına rağmen *Kluyveromyces*'de bu karbonhidratın metabolizmasına ilişkin araştırmalar kısıtlı sayılardadır. *K. lactis*'te glikojen metabolizması ile ilgili olarak düzenleyici protein olan *KIGSK-3* geni izole edilip dizi analizi yapılmış ve özellikleri belirlenmiştir (Rodriguez-Belmonte ve ark. 1998). Bir glikojen sentaz protein kinaz olan KIGsk3p, Ser/Thr protein kinaz ailesine aittir. Bu tür protein kinazların eukaryotlarda gelişimsel ve hormonal düzenlenmede işlevlerinin olduğu bilinmektedir. Karbon açlığı olduğu durumlarda ve sporulasyon ortamına aktarılan diploid hücrelerde *KIGSK-3*'ün mRNA seviyesinin arttığı belirlenmiştir. *KIGSK-3*, 30 C veya 14 C'deki vejetatif üreme için gerekli değildir, ancak *Klgsk-3::URA* delesyonlu suşlar glukozlu ortamda 37 °C'de üreyememektedirler. *KIGSK-3* geninin *S. cerevisiae* *MDS1* genine homolog olduğu bulunmuştur. *MDS1* geni (Mck1 Dosage Supresor) *S. cerevisiae*'de *GSK-3* ailesi ile bağlantılı olan genlerden birisidir. *MDS1* normal vejetatif üreme sırasında gerekli olan bir gen değildir ve ısıya duyarlılığı baskılamaktadır (Rodriguez-Belmonte ve ark. 1998).

K. lactis ve *S. cerevisiae*'de sporulasyonun düzenlenmesinde farklılıklar vardır ve *KIGSK-3* geni sporulasyonla ilgili bulunan ilk genidir. Ayrıca *KIGSK-3* geni *MCK1* ile de görevleri açısından bağlantılıdır. Çünkü *KIGSK-3*'ün delesyonu glikojen depolanmasının azalmasına neden olmaktadır. *KIGSK-3*'ün ekspresyon incelemeleri bu genin ekspresyonunun vejetatif koşullarda düşük olduğunu, sporulasyonda ve karbon kaynağı eksikliğinde genin aktifleştiğini göstermektedir (Rodriguez-Belmonte ve ark. 1998). *KIGSK-3*'ün bu şekilde düzenlenmesi *K. lactis*'de glikojen metabolizmasının *S. cerevisiae*'ya benzer şekilde kontrol edildiğinin en önemli göstergesidir.

Mayaların glukoz varlığındaki diauxic gelişimleri sırasında glikojen sentezlemeleri ve besin eksikliğinin olduğu durağan safhada glikojenin yıkımı depo karbonhidratların birikimi kavramına uymaktadır. Besin yokluğunda hücresel aktiviteyi desteklemek, enerji ve karbon sağlamak hücrede biriken glikojenin en büyük fonksiyonudur (François ve Parrou 2001). *S. cerevisiae*'de glikojen glukozun bol miktarda bulunduğu eksponansiyel üreme fazında da sentezlenmektedir. Hücre dışında glukozun kalmadığı durağan safha sırasında trehaloz sentezi devam ederken glikojenin metabolize edildiği vurgulanmaktadır (Lillie ve Pringle 1980; François ve ark., 1988).

2. 5. Glukoz Baskılaması ve Kontrol Mekanizması

Tercih edilen karbon kaynağı olan glukoz varlığında alternatif karbon kaynaklarının kullanımıyla ilgili olan enzimlerin genlerinin transkripsiyonu baskılanır. Bu olay glukoz baskılaması olarak adlandırılır (Trumbly 1992; Carlson 1999). Mikroorganizmalar için oldukça önemli metabolik avantaj sağlayan bu kontrol mekanizması genellikle 3 farklı guruba ayrılabilen genlerin transkripsiyonunu etkilemektedir. Bunlar solunum ve glikoneogenez için gerekli genlerle sukroz, galaktoz ve maltoz gibi alternatif karbon kaynaklarını kullanmadan sorumlu genlerdir.

K. lactis türü mayalarda belirli sayıdaki sitoplazmik ve mitokondriyal enzimlerin glukoz baskılaması ile kontrol edildiği bilinmektedir (Breunig 1989, Lodi ve ark. 1994, Goffirini ve ark. 1995, Georis ve ark. 1999). Fakat, glukoz baskılaması ve glukoz aktivasyonu sinyal ileti yolu bileşenleri *S. cerevisiae* kadar ayrıntılı incelenememiştir.

K. lactis'teki laktoz ve galaktoz metabolizmasından sorumlu olan ve bölüm 2. 3. 2'de açıklanan GAL-LAC sistemi üzerindeki çalışmalar bu sistemin karbon kaynağıyla nasıl düzenlendiğinin anlaşılmasına sebep olmuştur (Kuzhandaivelu ve ark. 1992, Zachariae ve ark. 1993, Zenke ve ark. 1993, Dong ve Dickson 1997, Rubio-Teixeira 2005). *S. cerevisiae*'da glukoz baskılaması için gerekli olan birçok genin ortoloğu *K. lactis*'te de tanımlanmıştır (Cassart ve ark. 1995, Goffirini ve ark. 1995, 1996, Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, Rubio-Teixeira 2005). Örneğin *K. lactis*'ten *MIG1* geni *KLMIG1* klonlanmıştır ve *K. lactis*'de GAL-LAC genlerinin transkripsiyonel kontrolünü sağlayan *KIGAL1* geni transkripsiyonunun baskılanmasındaki gerekliliği gösterilmiştir (Cassart ve ark. 1995, Dong ve Dickson 1997).

Kluyveromyces suşları glukoz baskılamasına çeşitli derecelerde duyarlılık gösterirler. *KLGA4* geninin promotor bölgesindeki farklılık *KIGal4p*'nin kendi promotorundaki bağlanma dizilerine olan afinitesine etki etmektedir. Zayıf bağlanma sağlayan aleller glukoz baskılanmasına daha duyarlı olurlar (Kuzhandaivelu ve ark. 1992). Alternatif karbon kaynaklarının kullanımında görevli çeşitli genlerin de (*KHT1*, *KHT2* ve *RAG1*) glukoz baskılaması altında oldukları ve glukoz baskılamasından önemli derecede etkilendikleri bilinmektedir (Breunig 1989, Schaffrath ve Breunig 2000). *K. lactis*'de glukoz baskılamasını kontrol eden ve *S. cerevisiae* Gal83p ile *Snf1p*'nin fonksiyonel homologları olan *FOG1* ve *FOG2* genleri klonlanmış ve glukoz baskılamasındaki işlevleri de analiz edilmiştir (Goffirini ve ark. 1996, Breunig ve ark. 2000). Glukoz baskılaması nükleusun içinde aktif seviyedeki *KLMig1p* represörünün artmasına sebep olan *KISnf1p/Fog2p* ana regülatör kinazın inaktivasyonuna da bağlıdır (Goffirini ve ark. 1996; Dong ve Dickson 1997). Bu bakımdan *KLMig1p*'nin *KISnf1p* ile kontrolü *S. cerevisiae*'daki *Mig1-Snf1* sistemine benzemektedir (Carlson 1999). *S. cerevisiae*'da *Mig1p*'nin *Snf1p*'ye bağlı fosforilasyonu, *Cyc8-Tup1* ile birleşme yetisiyle engellenir bu da *Mig1p*'nin sitozole geri dönmesini sağlar (DeVit ve ark. 1997).

FOG1 de GAL/LAC regulonu genleri glukoz derepresyonunda önemli role sahiptir (Goffirini ve ark. 1996). *FOG1*, *Snf1* kinaz kompleksin hücre içi lokalizasyonunu düzenleyen 3- β alt birimden biri olan *Saccharomyces*'de Gal83p'ye

homolog olan bir protein kodlar. Gal83p, fermente edilemeyen karbon kaynaklarında, Snf1p'nin fosforilasyon ile aktif forma geçişini sağlar. Aktif Snf1p'nin de Mig1p'yi fosforlayarak nukleustan çıkışını sağladığı bilinmektedir (DeVit ve ark. 1997, Vincent ve ark. 2001). Bu metabolik yol *Kluyveromyces*'de bu kadar ayrıntılı incelenmese de bu iki maya türünün genetik yapıları arasında kuvvetli homoloji nedeni ile *Kluyveromyces*'de de benzer bir kontrol mekanizması olduğu öne sürülebilir.

KIGAL4 promotorunda bazı *K. lactis* suşlarında farklılıklar olduğu ve bununda KlGal4p'nin biyosentezini etkilediği bulunmuştur. Bunun sonucu olarak da laktaz geni gibi bazı genlerde glukoz baskılaması farklı seviyelerde oluşmaktadır. *K. lactis* suşları laktoz-galaktoz regülununun glukoz baskılamasına verdiği tepkiye göre 3 kategoriye ayrılır. Y1140 suşları düşük baskılama gösterirler, çünkü laktaz aktivitesi ölçüldüğünde ortamda glukoz varlığında laktaz aktivitesi 2 kat azalmaktadır (Dickson ve Markin 1980). CBS2360 suşunda ise hiçbir baskılama gözlenmez (Breunig 1989). JA6 ve Y1118 türü *K. lactis* suşlarında ise GAL-LAC regülonda glukoz ile 50-100 kat kadar olabilen güçlü bir baskılama görülmektedir. GAL-LAC regülondaki glukoz baskılamasındaki farklılıkların moleküler mekanizması Breunig (1989) tarafından analiz edilmiş ve glukoz baskılamasına duyarlı bir suşun *KIGAL4* yada diğer adıyla *LAC9* geninin değiştirilmesiyle glukoz baskılamasına duyarsız bir suşa dönüştürülebileceği gösterilmiştir (Breunig 1989). Bunun nedeni de *KIGAL4* transkripsiyonunun oto regülasyonundaki farklılıklardır.

Glukoz baskılamasının farklı derecelerde görüldüğü suşlarda *KIGAL4* geni yapısı incelenmiştir (Kuger ve ark. 1990). Elde edilen sonuçlar incelenen *K. lactis* suşlarında glukoz baskılamasına karşı oluşan farklı yanıtın aktivatör protein KlGal4p'nin çinko parmak yapısı şeklinde olan DNA'ya bağlanma bölgesindeki tek amino asit farklılığından kaynaklandığını göstermektedir. Glukoz baskılamasının normal olarak oluştuğu suş olan *K. lactis* JA6'da KlGalp'de inko parmak yapısını oluşturan sistein amino asitlerinin herhangi birinde değişiklik olmasının KlGal4p'nin DNA'ya bağlanma afinitesini önemli ölçüde azaltabildiği bulunmuştur (Witte ve Dickson 1988; Witte ve Dickson 1990).

2. 6. İvertaz Geninin Yapısı ve Kontrol Mekanizması

S. cerevisiae'da invertaz enziminin kodlandığı gen olan *SUC2* *S. cerevisiae*'da glukoz baskılamasının moleküler analizi ve glukoz baskılamasına neden olan faktörlerin belirlenmesinde model sistem olarak kullanılmaktadır (Trumbly 1992, Ronne 1995, Gancedo 1998). *S. cerevisiae*'ya yakın bir maya türü olan *Kluyveromyces lactis*'te de glukozun en çok tercih edilen karbon kaynağı olması daha az ifade edilse de bazı suşlarda belirli sitoplazmik ve mitokondriyal enzimlerin glukoz baskılanma mekanizmaları tanımlanmıştır (Werich ve ark. 1997). *K. lactis*'te ise invertaz geni yerine laktoz ve galaktoz metabolizmasından sorumlu GAL/LAC regulonunu oluşturan genlerin karbon kaynağına göre düzenlenmeleri incelenmiştir (Kuzhandaivelu ve ark. 1992, Zachariae ve ark. 1993, Dong ve Dickson 1997, Rubio-Teixeira 2005). *S. cerevisiae*'da birçok genin ortoloğu *K. lactis*'te de tanımlanmıştır (Wesolowski- Louvel ve ark. 1996, Cassart ve ark. 1995, Goffirini ve ark.1995, 1996). Örneğin *S. cerevisiae*'da *SUC2* ve diğer birçok genin transkripsiyonunun glukoz sinyali ile baskılanmasını sağlayan *MIG1*, *K. lactis*'den de klonlanmıştır (Cassart ve ark. 1995).

Kluyveromyces genusunda β -fruktokinaz enzimleri geniş çaplı olarak karakterize edilmiştir. Bu enzimler, yüksek moleküler ağırlıktaki oligosakkaritlere olan spesifiteleri ve inülin tipi fruktanlara göre sınıflandırılırlar. İvertaz enziminin *K. lactis*'de hücre duvarında bulunan bir hücre dışı enzimi olduğu daha önce yapılan araştırmalarda bulunmuştur (Rouwenhorst ve ark. 1990). *K. lactis*'te bulunan invertazın, yapılan enzimatik aktivite ölçümleriyle glukoz baskılanmasına maruz kaldığı da gösterilmiştir (Goffirini ve ark. 1995). *K. lactis*'te klonlanan ve invertaz sentezinden sorumlu olan *KIINV1* geninin aslında transkripsiyonel düzeyde glukoz baskılanmasına maruz kaldığı fakat *KIMig1p*'den bağımsız olarak baskılandığı gösterilmiştir. Diğer maya invertazlarıyla yapılan karşılaştırmalar ve sekans analizleri sonucu *KIInv1p*'nin yeni bir β -fruktokinaz ailesine ait olduğunu gösterir. DNA hibridizasyon analizleri *KIINV1* geninin *K. lactis*'te tek kopya olarak bulunan bir gen olduğunu göstermektedir (Georis ve ark. 1999).

Georis ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışmada *K. lactis*'te bulunan invertaz geni *KIINV1*, *K. marxianus* inülinaz geni prob olarak kullanılarak koloni hibridizasyonu ile izole edilmiştir. Elde edilen iki bağımsız klonun 1827 baz çiftlik ORF'a sahip olduğu gösterilmiştir. *K. lactis* inülinazının amino asit dizisi *K. marxianus* inülinazına %59'luk bir benzerlik gösterir. Southern blot analizleri ve gen ayrıştırma yöntemleri *KIINV1*'in *Kluyveromyces*'e özgü bir gen olduğunu göstermiştir. Northern blot analizlerine göre *KIINV1*'in transkripsiyonu, glukoz varlığında güçlü bir şekilde baskılanır fakat *S. cerevisiae*'dakine ters olarak baskılanma *KIMig1p*'den bağımsızdır. *KIMIG1* delesyonlu *K. lactis* suşlarında glukoz baskılanmasının devam etmesi *KIINV1*'in *S. cerevisiae*, *K. marxianus* ve *S. pombe* invertaz genlerinden çok farklı bir şekilde kontrol edildiğini de göstermektedir (Cassart ve ark. 1995, Tanaka ve ark. 1998).

Invertaz geni *K. lactis*'te glukozla düzenlenen *Snf1p/Mig1p*'den bağımsız tek gen değildir. *KIGAL4* ve *KICAT8* genlerinde de *S. cerevisiae*'daki homologlarından farklı olarak *KIMig1p*'nin bağlanması için potansiyel bir bölge yoktur (Dong ve Dickson 1997; Georis ve ark. 1999). *S. cerevisiae*'dan farklı olarak *K. lactis*'de *KIINV1* geninin kontrol mekanizması ile ayrıntılı araştırmalar günümüze kadar yapılmamıştır. Bu nedenle *KIINV1* geni kontrol mekanizması ile ilgili kısıtlı sayıda bilgi vardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. *K. lactis* Suşlarının İzolasyonu

Deneylerimiz süresince maya örneklerinin üretilmesinde ve enzimatik aktivitelerinin tayini için kullanılan besiyeri ve diğer çözeltilerin özellikleri Ek-1’de verildi (Rose ve ark. 1990). Bursa ili sınırlarındaki süt ve süt ürünü üreticilerinden işlenmemiş taze süt ve peynir örnekleri aseptik şartlarda 50 ml’lik steril falkon tüplerine alındı ve toplanılan bölgelere göre örneklere farklı MY (Milk Yeast) kod numaraları verildi. Süt ve peynir örnekleri laboratuvar analizleri süresince + 4 derecede bekletildi. Stok peynirlerden peynir örnekleri iç kısımlarından olacak şekilde alınıp yaklaşık 0.5 gr olarak tartıldı ve steril %2’lik 5 ml sodyum sitrat içinde çözüldü. Süt ve peynir örneklerinin çözeltilerinden her bir örnek için üçlü olarak 50 µl alınıp içerisine sodyum propionat (% 0.1 v/w) eklenmiş YGC petrilere yayma ekimi yapıldı. Örnekler 30 °C’deki etüvde 3-4 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon periyodu sonunda petrilere oluşan maya kolonilerini sayılara kayıt edildi. Elde edilen koloni sayıları ile süt ve peynir örneklerindeki toplam maya sayısı CFU/ml (koloni oluşturan birim/ml örnek) süt veya CFU/gram peynir örneği olarak kayıt edildi. Maya örneklerinin tür tayinleri için YGC petrilere iyi izole olmuş kolonilerden 150 tanesi rastgele seçilerek steril kürdan ile alındı ve YPD petrilere küçük pasaj şeklinde ekimleri yapıldı. YPD petrilere maya örneklerinin üremesi için petriyer 30 °C’deki etüvde 3-4 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

Toplanan süt ve peynir örneklerinden izole edilen 150 maya örneğinden 37 maya örneği seçilerek glukoz, laktoz, galaktoz, sukroz, maltoz, gliserol, DL laktat ve inülin gibi farklı karbon kaynakları içeren üreme ortamlarına ekilip etüvde 30 °C’de 3 gün süreyle bekletilerek bu karbon kaynaklarını kullanıp kullanamadıkları incelendi. Ayrıca Amonyum Sülfat, Sodyum Nitrat, Potasyum Nitrat ve Lizin içeren ortamlarda üretilip azot kullanımlarına, %10 NaCl ve %5 glukoz bulunan ortamlarda üretilerek de ozmotik toleranslarının olup olmadığı araştırıldı. Buna ek olarak laktoz pozitif olarak seçilen maya örneklerinin 6 °C ve 37 °C gibi farklı sıcaklıklarda üreyip üreyemedikleri de araştırıldı.

Seçilen mayalardan laktoz pozitif maya örneklerinin tekrar seçimi ve metabolik özelliklerinin test edilmesi için seçilen 37 maya örneği minimal ortam olan YNB laktoz petrilere ekildi ve petrilere örneklerin üremesi için 30 °C'deki etüvde 3 gün süreyle bekletildi. YNB laktoz üreme ortamında üreyebilen (laktoz pozitif) maya kolonilerinden steril şartlarda kürdan ile örnekler alınarak 1 ml'lik steril %20'lik gliserol'e örnekler alındı ve -70 °C'de uzun süreli olarak depo edildi.

3. 2. *K. lactis* Suşlarının Türlerinin Tayini

Farklı karbon ve azot kaynaklarını kullanma özellikleri ve farklı sıcaklıklarda üreme özellikleri ayrı ayrı incelenip, standart olarak kullanılan *K. lactis* suşuna (ATCC8585) benzer özellik gösteren maya suşları tekrar YNB laktoz ortamına ekilerek üremeleri kontrol edildi. Bu testlerden sonra laktoz pozitif özellik gösteren maya suşları seçilerek üretici firma tarafından açıklandığı şekilde API 32C (Analytical Profile Index)(katalog no: 32200) testi uygulandı (Biomérieux- Fransa). Seçilen maya suşlarının API 32C testi ölçütlerine göre çizelge 4. 4'de verilen % olasılıklarla türleri belirlendi (Tornadijo ve ark. 1998, Kurtzman ve Fell 2000).

3. 3. *K. lactis* Türlerinden Genomik DNA Saflaştırılması

Araştırmalarımızda uygulanan testlere göre %99 olasılıkla *K. lactis* olarak türleri belirlenen mayalar (MY22-25, 28, 29) ile standart suş olarak kullandığımız *K. lactis*'in (ATCC8585) rDNA bölgelerinin ve laktaz gen yapısının genetik özelliklerinin karşılaştırmalı analizleri için bu maya türlerinden genomik DNA saflaştırıldı.

Genomik DNA'ların saflaştırılmasında daha önce tanımlanan Zymolyase-Sorbitol metodu uygulandı (Rose ve ark. 1990). Bunun için *K. lactis* suşları 5 ml'lik YPD besi yerinde 30 °C'de ve 120 devir/dakika hızda çalkalamalı etüvde 16-18 saat üretildi. Üreme periyotları sonunda maya hücreleri santrifujde + 4 °C'de 5000 g de 5 dakika çöktürüldü. Çöktürülen *K. lactis* hücreleri 500 µl'lik sorbitol- EDTA (1 M sorbitol, 0.1 M EDTA) çözeltisinde süspansiyon edilerek 1.7 ml'lik steril mikrofüj tüplerine alındı. Mikrofüj tüplerindeki *K. lactis* süspansiyonlarına taze olarak Sorbitol-EDTA çözeltisinde 2.5 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış Zymolyase'dan 20 µl ilave

edilerek 10 saniye vortex ile karıştırıldı. Karışım 37 °C'deki su banyosunda 60 dakika bekletildi. Bundan sonra karışımdaki maya hücreleri mikrosantrifüjde 10 000 g'de oda sıcaklığında 5 dakika çöktürüldü, sıvı kısım atıldı. Çöktürülen maya hücrelerine steril Tris-EDTA çözeltisinden (50 mM Tris/HCl pH: 7.4., 20 mM EDTA pH:7.4) 500 µl eklenerek pipet ile hücreler süspansiyon edildi. Bu aşamadan sonra maya karışımlarına %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisinden 50 µl eklendi ve karışımlar 65 °C'lik sıcak su banyosunda 30 dakika bekletildi.

İnkübasyon periyodu sonunda SDS ile lizis edilen maya karışımlarına 200 µl soğuk 5M potasyum asetat çözeltisi ilave edildi ve mikrofüj tüpleri buz içine yerleştirilerek 60 dakika bekletildi. Bu işlemler sonunda parçalanmış maya karışımlarını içeren örnekler mikrosantrifüjde 10 000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım (üst faz) taze mikrofüj tüplerine alındı. *K. lactis* suşlarına ait genomik DNA'yı içeren bu sıvı fazdan DNA'yı çöktürmek için 1 hacim (yaklaşık olarak 600 µl) % 100 izopropanol ilave edildi ve karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Karışımlar mikrosantrifüjde 15 000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek genomik DNA'lar çöktürüldü. Sıvı kısım atılarak çöken DNA'ların oda sıcaklığında kurumaları için 5 dakika bekletildi. *K. lactis* suşlarından saflaştırılan genomik DNA'lar 250 µl'lik 1xTE'de (pH:7.4) çözüldü. DNA konsantrasyonları ve saflık dereceleri spektrofotometrede belirlendi (Rose ve ark. 1990).

3. 4. *K. lactis* Türlerinin ITS1-5.8s rDNA-ITS2 Dizilerinin Belirlenmesi

Kluyveromyces lactis türlerinden (MY 22-25, 28, 29) saflaştırılan genomik DNA örneklerinden PCR reaksiyonları için yaklaşık 100 ng alındı. *Kluyveromyces* türlerinin ITS1-5.8s rDNA-ITS2 bölgelerinin Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmasında Qiagen SYBR PZR kit'i (katalog no: 204145) ve mayalar için tanımlanan universal primerler kullanıldı (White ve ark. 1990). Bu primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir.

ITS1 primerinin nükleotid dizisi: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'.

ITS4 primerinin nükleotid dizisi: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

ITS1 ve ITS4 primerleri *Kluyveromyces* türlerindeki ribozomal DNA'nın ITS1-5.8s rDNA-ITS2 bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında 5' (forward) ve 3' (reverse) primer olarak kullanıldı. PZR'da White ve ark. (1990) tarafından önerilen reaksiyon şartları kullanıldı. PZR reaksiyonu bileşenleri ve reaksiyon şartları aşağıda verildiği gibidir.

PZR Reaksiyonu bileşenleri:

Qiagen SYBR PCR Mix :	12.5 µl
ITS1 (Forward) primer:	3 µl (1.2 µmol)
ITS4 (Reverse) primer:	3 µl (1.2 µmol)
1/10 seyreltilmiş Genomik DNA.	3 µl (yaklaşık 100ng)
Steril distile su.	3.5 µl.

PZR Şartları ise başlangıç denaturasyonu için 95 °C'de 15 dakika, daha sonra toplam 30 döngü olmak üzere; 94 °C'de 2 dk, 60 °C'de 1 dk, 72 °C'de 2.5. Döngülerin tamamlanmasından sonra da son döngü olarak 72 °C'de 5 dakika bekletildi.

PZR ile çoğaltılan DNA'lar PZR saflaştırma kit'i (Roche, Katalog No: 11732676001) kullanılarak saflaştırıldı. Sekanslama reaksiyonu için saflaştırılan DNA'lardan 10 µl alınarak rDNA RFLP analizleri için HinfI enzimi ile standard şartlarda kesilerek % 2'lik agaroz elektroforezi ile ayrıştırıldı ve SYBR Green ile görüntülenerek sonuçlar bölümünde verilen jel fotoğrafları elde edildi.

K. lactis türlerinin genomik DNA'larından ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan ve saflaştırılan ITS1-5.8s rDNA-ITS2 bölgesinin nükleotid dizisi de aynı primerleri kullanarak DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit'i (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany) ve ABI PRISM 310 Genetic Analyzer cihazı (Iontek, İstanbul) kullanılarak belirlendi. Nükleotid dizilerinin analizleri NCBI'nin sağladığı BLAST servisi kullanılarak yapıldı. Elde edilen ITS-5.8s rDNA sekansları daha önce tanımlanan ve gen bankasında bulunan maya suşlarının rDNA dizilerine olan benzerlikleri sonuçlar bölümünde verildi. *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşları ITS-5.8S rDNA bölgelerinin sekansları Ek-2'de verildi.

3. 5. Glikojen Miktarlarının Belirlenmesi

Saflaştırılan maya türlerinde glikojen sentezi ve birikimi olup olmadığı iyot boyama testi ile daha önce açıklandığı şekilde kalitatif olarak belirlendi (Chester 1968). Bunun için önce *K. lactis* suşları (MY22-29 suşları ve kontrol *K. lactis* suşu) 10 ml'lik YPD ortamında 30 °C'deki karıştırılmalı inkübatörde 140 devir/dakika hızda 16-18 saat üretildi. Sıvı kültürde üretilen *K. lactis* örneklerinden 4 µl alınarak farklı karbon kaynakları içeren (Glikolitik veya Glukoneogenik) minimal (YNB) veya zengin (YP) ortam petrilere damla şeklinde üçerli olarak ekim yapıldı. Petrilere ekilen mayaların üremeleri için örnekler 30 °C'deki etüvde 48 saat bekletildi. Üremesi tamamlanan maya kolonilerini içeren petrilere taze hazırlanmış iyot çözeltisi ile doyurulmuş 3 numara Watman kağıt içeren petrilere kapatılarak 10 dakika süresince iyoda maruz bırakılarak maya hücrelerindeki glikojenin boyanması sağlandı (Chester 1968). Petrilere fotoğraflandı ve sonuçlar bölümünde verildi.

3. 6. Laktaz Aktivitelerinin Ölçümü

Araştırmamızın birinci aşamasında saflaştırılıp fermentasyon özellikleri laktoz pozitif olarak belirlenen maya suşlarının laktaz (β -galaktozidaz) aktiviteleri belirlendi. Bu türlerin laktaz aktivitelerinin belirlenmesinde Zachariae ve Breunig (1993) tarafından geliştirilen yöntem uygulandı. Daha sonraki araştırmalarımızda laktaz biyosentezinin düzenlenmesine yönelik deneylerimiz ITS-5.8s rDNA dizilerine göre türleri *K. lactis* olarak belirlenen MY22, 23, 24, 25, 28, 29 suşları ve araştırmalarımızda kontrol *K. lactis* suşu olarak kullanılan *K. lactis* ATCC8585 suşu ile yapıldı.

Laktaz aktivitelerinin ölçümü için önce *Kluyveromyces* suşları farklı niteliklerde ve farklı konsantrasyonlarda karbonhidrat içeren (laktoz, glukoz, veya gliserol laktat) 5 ml'lik YP üreme ortamlarında 30 °C de 140 dönüş/dakika hızda çalkalamalı inkübatörde 16-18 saat üretilerek ön kültürler elde edildi. Bu maya ön kültürlerinden sonuçlar bölümünde açıklandığı şekilde karbon kaynağı olarak farklı karbonhidratları içeren YP besiyerlerine başlangıçtaki maya derişimleri OD₆₀₀: 0.2 olacak şekilde

seyreltilerek ekimleri yapıldı. Maya kültürleri 30 °C de 140 dönüş/dakika hızda çalkalamalı inkübatörde logaritmik veya durağan aşamaya kadar üretildi.

Kluyveromyces suşlarının laktaz aktiviteleri peynir altı suyunda yukarıda açıklandığı şekilde üretilerek de belirlendi. Peynir altı suyu liyofilize toz olarak bir endüstriyel süt üreticisinden sağlandı. *Kluyveromyces* suşlarının üreme ortamı olarak kullanılmasında peynir altı suyu deiyonize saf suda %2'lik sıvı çözelti olarak hazırlandı. Peyniraltı suyuna azot kaynağı olarak % 0.5 amonyum sülfat eklendi ve otoklavda steril edilip deproteinize edilerek kullanıldı. Peynir altı suyunun deproteinizasyonu için sterilizasyondan sonra 10000 g hızda 20 dakika santrifüj edilerek protein çökeltileri ayrıştırıldı ve ondan sonra direkt üreme ortamı olarak kullanıldı (Siso 1994, Becerra ve Siso 1996).

Üreme süreleri sonunda *Kluyveromyces* kültürleri 5000 g hızda 5 dakika çöktürüldü. Çöktürülen maya hücreleri 1 ml steril soğuk distile suda süspanse edilerek tekrar aynı şartlarda çöktürüldü. Çöktürülen *Kluyveromyces* hücreleri 200 µl'lik laktaz tampon çözeltisinde süspanse edilerek steril 1.7 ml'lik steril mikrofüj tüplerine transfer edildi. Bu şekilde hazırlanan *Kluyveromyces* örnekleri -70 °C'deki derin dondurucuda laktaz aktiviteleri belirleninceye kadar saklandı (Zachariae ve ark. 1993, Breunig 1989).

Laktaz aktivitelerinin ölçümü için dondurulan *Kluyveromyces* örneklerinin çözünmesi beklendi. Çözünen *Kluyveromyces* süspanسیونlarına stok % 0.1'lik SDS çözeltisinden 20 µl ve stok % 99'luk kloroformdan 20 µl ilave edilerek 10 saniye süresince en hızlı mod'ta vortekslenerek permeabilize edildi (Flores ve ark. 1994). Permeabilize edilen *Kluyveromyces* hücre örneklerinin laktaz aktiviteleri 30 °C'de ONPG (O-nitro-phenyl-β-D-galactoside) kullanılarak aşağıda verildiği şekilde belirlendi (Zachariae ve ark. 1993, Guarante 1983).

Her bir *Kluyveromyces* örneği için üçlü olarak hazırlanmış 10x100 mm'lik cam tüplere 980 µl'lik laktaz tampon çözeltisi (Z-Buffer) konuldu ve bu tampon çözelti içine SDS ve Kloroform ile permeabilize edilen *Kluyveromyces* süspanسیونlarından 20 µl'lik karışım ilave edildi. Daha sonra bu deney çözeltisinin optimum sıcaklığa ulaşabilmesi için 30 °C'de su banyosunda 2 dakika bekletildi. Bu süre sonunda da permeabilize

edilmiş hücre karışımına 200 µl ONPG eklenerek 30 °C’de açık sarı renk oluşuncaya kadar beklendi. Reaksiyon süresi sonunda reaksiyonlar 500 µl 1M sodyum karbonat ilave edilerek durduruldu. Bunun için geçen süre de kayıt edildi. Reaksiyon tüpleri masa üstü santrifüjde 1500 g’de 5 dakika süresince santrifuj edildi, hücreler çöktürüldü. Çözeltilerin absorbansları 420 nm’de Shimadzu Mini 1240 model spektrofotometrede ölçüldü. Deneyler aynı *Kluyveromyces* suşu için üçlü olarak yapıldı ve en az üç kez tekrarlandı. Bu nedenle sonuçlar bölümünde verilen tablolardaki laktaz aktiviteleri en az 18 farklı deneyin ortalamasını göstermektedir. Laktaz aktiviteleri Miller Units (MU) olarak verildi (Ek 1). Elde edilen sonuçlarda standart sapmanın % 20’nin altında olduğu bulundu.

3. 7. İnvvertaz Aktivitelerinin Ölçümü

İnvvertaz aktivitelerinin ölçümleri için MY22-25, 28, 29 ve kontrol *K. lactis* suşu (ATCC8585) bir gece önceden YPD ortama ekildi. Durağan faza ulaşan bu maya ön kültürlerinden 1 ml alınarak 9 ml YPD içeren ortama ekim yapıldı ve maya kültürlerinin logaritmik faza ulaşmaları için yaklaşık 4 saat beklendi. Logaritmik fazdaki maya kültürlerinden 5ml alınarak 1500 g hızda 5 dakika çöktürüldü. Çöktürülen maya hücreleri 5 ml’lik steril saf su ile yıkandı ve tekrar çöktürülerek derepres üreme ortamına (YP+ % 0,05 glukoz) aktarıldı (Celenza ve Carlson 1984). Maya hücreleri 3 saat daha aynı şartlarda (30 °C’de 140 devir/dakika dönüş) üretilerek hücre dışı invvertaz aktiviteleri daha önce tanımlanan standard metod ile aşağıda verildiği şekilde değişiklikler yapılarak ölçüldü (Goldstein ve Lampen 1975, Rothe ve Lehle 1998).

Sıvı besi yerinde ikişerli olarak, glukoz baskılamasının olduğu (repres) veya olmadığı (derepres) şartlarda üretilen hücreler 1500 g’de 5 dakika santrifuj edilerek çöktürüldü. Çöktürülen maya hücreleri önce 5 ml steril ve soğuk distile su ile yıkandı ve daha sonra 5 ml’lik A-tampon çözeltisiyle (50 mM Sodyum asetat, pH: 5) ile iki kez yıkandı ve yine santrifuj ile aynı şartlarda çöktürüldü. Çöktürülen hücreler 200 µl’lik B-tampon çözeltisinde (50 mM Sodyum asetat, pH: 5., 2mM PMSF) çözüldü ve 1.7 ml’lik mikrofuj tüplerine aktarıldı. Bu hücre süspansiyonundan 50 µl alınıp steril mikrofuj tüpünde 200 µl’lik 200 mM sukroz çözeltisiyle karıştırıldı. Bu karışım 30 °C’deki su

banyosunda 15 dakika bekletildi. Reaksiyon periyodu sonunda invertaz aktivitesi 50 µl, 1M Tris HCl (pH:8.8) eklenerek durduruldu. Karışım 1 dakika mikrosantrifüjde 10000 g'de santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Reaksiyon sonucu açığa çıkan glukoz miktarı ikişerli olarak 20 µl'lik örnek alınarak glukoz oksidaz-peroksidaz reaksiyonu (GOD-POD) ile belirlendi (Goldstein ve Lampen 1975, Rothe ve Lehle 1998). Glukoz oksidaz reaksiyonunda Biocon-Fluitest GLU (Biocon Diagnostik, Marienhagen-Almanya, Katalog no: 4342), GOD-POD sistemi kullanıldı. 3 kez tekrarlanan deneylerden elde edilen sonuçların ortalamaları invertaz aktivitesi sonucu açığa çıkan µM glikoz/dakika/100mg kuru ağırlık olarak hesaplandı. Mayaların kuru ağırlığı OD₆₀₀:1 için 0.5 mg olarak alındı. İvertaz deneyleri 2 kez tekrarlandı. Bundan dolayı sonuçlar bölümünde verilen invertaz aktiviteleri en az 4-6 farklı deneyin ortalamaları olarak verildi. Aynı *K. lactis* suşu için belirlenen invertaz aktiviteleri arasındaki standart sapmanın da %5'den daha az olduğu görüldü.

3. 8. *K. lactis* Suşlarının Üreme Hızlarının Ölçümü

Stok kültür olarak bulunan 6 farklı *K. lactis* (MY22-25, 28, 29) maya suşlarından her biri taze kültür başlatmak amacıyla, 5 ml'lik YPD besi yerine ekildi ve 30 C'de 140 devir/dakika hızdaki karıştırmalı inkübatörde 16-18 saat üretildi. Hazırlanan bu ön kültürlerden karbon kaynağı olarak % 2 glukoz veya %2 laktöz içeren 20 ml YP besi yerine 150 µl olarak ekimler yapıldı. Ekimler her bir maya suşu için ikili olarak gerçekleştirildi. Maya kültürleri 30 °C'de 140 devir/dakika hızdaki karıştırmalı inkübatörde üremeye bırakıldı ve 90 dakika aralıklarla 1 ml örnek alınarak maya örneklerinin OD₆₀₀ değerleri belirlendi. Elde edilen OD₆₀₀ değerleri yarı logaritmik grafik kağıdında zaman aralıklarına karşı grafiğe aktarıldı. Oluşturulan grafiklerden de maya hücrelerinin logaritmik fazdaki ikilenme süreleri belirlendi.

Aynı maya suşlarının peynir altı suyu içeren üreme ortamında ikilenme sürelerinin hesaplanması amacıyla bölüm 3. 6'da açıklandığı şekilde % 2'lik peynir altı suyu üreme ortamı olarak hazırlandı. Farklı *K. lactis* suşlarının (MY22-25, 28, 29) bu üreme ortamındaki ikilenme süreleri de yukarıda açıklandığı şekilde belirlendi.

3. 9. *K. lactis* Suşlarında *LAC4* Geni Promotor Bölgesinin Analizi

K. lactis MY22-25, 28, 29 suşlarının laktaz geni olan *LAC4*'ün promotor bölgelerini içeren DNA bölgesi bölüm 3. 3'de açıklandığı şekilde saflaştırılan bu suşların genomik DNA'larından Qiagen SYBR PZR kit'i (Katalog no: 204145) ile çoğaltıldı. PZR için kullanılan primerlerin DNA dizileri aşağıda verildiği gibidir.

LAC4-Forward primer: 5'- CTTTTCGGACTGCGATTATTC-3'

LAC4- Reverse primer : 5'- CACTAGAAATCATACCCTTCACA-3'.

Bu primerlerden forward primer *LAC4* promotor bölgesinde 1. kodon olan ATG'ye göre – 772 bç'den – 792 bç'ne kadar olan bölgeye, reverse primer ise –301 bç'den – 324 bç'ne kadar olan bölgeye homolog olup PZR ile çoğaltılacak olan *LAC4* promotor bölgesinin uzunluğu yaklaşık olarak 492 bç'dir (Şekil 3. 1). *LAC4* geni promotor bölgesi dizisi, ve bu promotor bölgesindeki K1Gal4p bağlanma bölgeleri ve PZR primerlerinin lokalizasyonu Şekil 3. 1'de verildi.

LAC4 geni promotor bölgesini PZR ile çoğaltmak için uygulanan reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir. Reaksiyon karışımı toplam hacim 25 ml olacak şekilde aşağıda verildiği gibi hazırlandı:

Qiagen SYBR PCR Mix :	12.5 µl
<i>LAC4</i> -Forward primer:	3 µl (0,6 µmol)
<i>LAC4</i> - Reverse primer:	3 µl (0,6 µmol)
1/10 seyreltilmiş Genomik DNA.	3 µl (yaklaşık 100ng)
Steril distile su.	3.5 µl.

PZR Şartları: Başlangıç denaturasyonu için 95 °C'de 15 dakika, daha sonra 35 döngü olmak üzere; 95 °C'de 40 sn, 54 °C'de 40 sn, 72 °C'de 45 sn. Döngülerin tamamlanmasından sonra da son döngü olarak 72 °C'de 5 dakika bekletildi.

PZR ile çoğaltılan ve saflaştırılan *LAC4* promotor bölgesinin uzunluğunu kontrol etmek için PZR reaksiyonundan 3 µl alınarak % 1.5'lik agaroz elektorforezinde

yürütüldü. Elektroforez sonucunda jel SYBR green ile boyanarak jel görüntüleme sisteminde fotoğraflandı. Jel fotoğrafı sonuçlar bölümünde verildi. Saflaştırılan *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının *LAC4* geni promotor bölgesinin nükleotid dizileri de aynı primerler ile DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit'i (Amersham) ve ABI PRISM 310 Genetic Analyzer cihazı (İontek, İstanbul) kullanılarak belirlendi. Nükleotid dizilerinin analizleri NCBI'nın sağladığı BLAST servisi kullanılarak yapıldı. Elde edilen *LAC4* geni promotor bölgesi sekansları daha önce tanımlanan ve gen bankasında bulunan standart *K. lactis* suşu sekansları ile karşılaştırıldı. Ayrıca elde edilen *K. lactis* maya suşlarının *LAC4* geni promotor dizileri "CHROMAS" Alignment programı kullanılarak birbiri ile karşılaştırıldı.

3. 10. *K. lactis* Suşlarında *KIGAL4* Geni İşlevsel Bölgelerinin Analizi

K. lactis'de laktaz geni aktivatör proteini KlGal4p'dir. Transkripsiyon faktörü KlGal4p'nin işlevsel bölümleri olan DNA'ya bağlanma bölgesi ve asidik aktivasyon bölgesinde standart *K. lactis* suşu ile bu çalışmada saflaştırılan *K. lactis* MY suşları KlGal4p yapısında farklılık olup olmadığı da araştırıldı. Bunun için *K. lactis* suşlarından saflaştırılan genomik DNA'dan *KIGAL4*'ün Zinc Finger (ZF) yapısında olan DNA'ya bağlanma bölgesi ve asidik aktivasyon bölgesi (AD) aşağıda verilen primerler ile Qiagen SYBR PZR Kit'i (katalog no: 204145) kullanılarak çoğaltıldı. *KIGAL4*'ün kodlama bölgesi, işlevsel bölgeleri ve PZR primerlerinin *KIGAL4*'de homolog olduğu bölgeler şekil 3. 2'de verildi.

ZF Forward primer: 5'- AAACGTTACTGCCATCGGAG -3'

ZF Reverse primer : 5'- CCCAAACTGGGAAAAGTTCTT -3'.

AD Forward primer: 5'- CGGACCTACTTTCACTGTGG -3'

AD Reverse primer : 5'- AGAAATAGAAATCTGCGGGG -3'.

KIGAL4 geni DNA bağlanma bölgelerinin PZR ile çoğaltılmasında uygulanan PZR reaksiyon u bileşimi ve reaksiyon şartları aşağıda verildiği gibidir.

PZR Reaksiyonu bileşenleri:

Qiagen SYBR PCR Mix :	12.5 µl
Forward primer:	3 µl (0,6 µmol)
Reverse primer:	3 µl (0,6 µmol)
1/10 seyreltilmiş Genomik DNA.	3 µl (yaklaşık 100 ng)
Steril distile su.	3.5 µl.

PZR Şartları: Başlangıç denaturasyonu için 95 °C’de 15 dakika, daha sonra 45 döngü olmak üzere; 95 °C’de 30 sn, 56 °C’de 40 sn, 72 °C’de 45 sn. Döngülerin tamamlanmasından sonra da son döngü olarak 72 °C’de 5 dakika bekletildi.

PZR ile çoğaltılan ve sekans analizi için saflaştırılan *KIGAL4* ZF ve AD DNA parçalarının sekanslama için uygunluklarını ve uzunluklarını kontrol etmek için 3 µl alınarak % 1.5’lik agaroz elektorforezinde ayrıştırıldı. Elektroforez sonucunda jel SYBR green ile boyanarak jel görüntüleme sisteminde fotoğraflandı. Jel fotoğrafı sonuçlar bölümünde verildi. Saflaştırılan *KIGAL4* ZF ve AD bölgesinin nükleotid dizileri de aynı primerleri ile DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit’i (Amersham) ve ABI PRISM 310 Genetic Analyzer cihazı (İontek, İstanbul) kullanılarak belirlendi. Nükleotid dizilerinin gen bankasındaki kayıtlar ile karşılaştırılması NCBI’ın sağladığı BLAST servisi kullanılarak yapıldı. Elde edilen *KIGAL4* ZF ve AD sekansları ayrıca “CHROMAS” Alignment programı kullanılarak birbiri ile de karşılaştırıldı.

TTCGCATTCC ACACCGTTAG TGTGTCAGTT TGAACAAAAA AACAATCATC ATACCAATTG -821
 ATGGACTGTG GACTGGCTTT TGGAACGGCT TTTCGGACTG CGATTATTCG TGAGGAATCA -761 (*Primer F*)
 AGGTAGGAAT TTGGTCATAT TTACGGACAA CAGTGGGTGA TTCCCATATG GAGTAGGAAA -701
 ACGAGATCAT GGTATCCTCA GATATGTTG**C GGAATTCTGT TCACCG**CAAA GTTCAGGGTG -641 (*KlGal4 Bağlanma Bölgesi 1*)
 CTCTGGTGGG TTTCGGTTGG TCTTTGCTTT GCTTCTCCCT TGTCTTGCAT GTTAATAATA -581
 GCCTAGCCTG TGAGCCGAAA CTTAGGGTAG GCTTAGTGTT GGAACGTACA TATGTATCAC -521
 GTTGACTTGG TTTAACCAGG CGACCTGGTA GCCAGCCATA CCCACACACG TTTTTTGTAT -461
 CTTCAGTATA GTTGTGAAAA GTGTAG**CGGA AATTTGTGGT CCG**AGCAACA GCGTCTTTTT -401 (*KlGal4 Bağlanma Bölgesi 2*)
 CTAGTAGTGC GGTTCGTTAC TTGGTTGACA TTGGTATTTG GACTTTGTTG CTACACCATT -341
 CACTACTTGA AGTCGAGTGT GAAGGGTATG ATTTCTAGTG GTGAACACCT TTAGTTACGT -281 (*Primer R*)
 AATGTTTTCA TTGCTGTTTT ACTTGAGATT TCGATTGAGA AAAAGGTATT TAATAGCTCG -221
 AATCAATGTG TTATCATTGT GAAGATGTTT TTCCCTAACT CGAAAGGTAT ATGAGGCTTG -161
 TGTTTCTTAG GAGAATTATT ATTCTTTTGT TATGTTGCGC TTGTAGTTGG AAAAGGTGAA -101
 GAGACAAAAG CGCTTAACAC TTGAAATTTA GGAAAGAGCA GAATTTGGCA AAAAAAATAA -41
 AAAAAAATA AACACACATA CTCATCGAGA ACTGAAAGAT **ATG** +3.

Şekil 3. 1. *LAC4* geni (KLLA0B14883g) promotor dizisi. Promotor bölgesinde transkripsiyon faktörü KlGal4p'nin bağlanma dizileri koyu olarak gösterildi. PZR reaksiyonunda kullanılan forward ve revers primerlerin bağlanma bölgelerinin altı çizili olarak gösterildi. Başlama kodonu ATG koyu italik olarak gösterildi (URL-1).

+1 ATGGGTAGTAGGGCCTCCAATTCGCCTTCTTTTTCAAGTAAGGCGG 46
AAACGTTACTGCCATCGGAGTATAAAAAGAATGC 80 (47 -66 ZF-Forward Primeri)
 GGTTAAGAAGGAAACAATACGCAATGGCAAGAAAAGGAAATTGCTGATACAGAATCCTC 140
 AGATCCTGAGTTTGCAAGTCGGCGTTTGATAGCTAATGAACTGGCACTGATGCGGTGAG 200
 TAATGGTAACAAAAATGATAGCAAT GCCAACAACAACAACAACAACAACAAGAAATC 260- (DNA bağlanma Bölgesi (225-318))
AAGTGAAGTAATGCACCAGGCGTGCGATGCTTGCAGGAAGAAGAAGTGGAAATGTTCC AA 320
 GACAGTACCGACTTGCACGAACTGTCTGAAATACAATTTAGACTGTGTCTACTCTCCGCA 380
 AGTTGTTAGGACTCCGTTGACAAGAGCACATTTAACAGAGATGGAAAATAGGGTTGCAGA 440
 GTTGGAACAGTTTTTGA**AGAACTTTCCAGTTTGGG**ATATCGATAGGTTACTTCAGCA 500 (478-458 ZF Reverse Primeri)
 AAAAGATACATACAGGATTAGGGAATTGCTTACTATGGGTTCTACAAATACTGTTCCGGG 560
 ACTTGCATCGAATAATATCGATTTCATCGTTAGAACAGCCCGTTGCCTTTGGTACTGCGCA 620
 GCCCGACAATCTTTGTCAACTGATCCAGCAGTACAATCTCAAGCCTATCCAATGCAACC 680
 GGTACCGATGACAGAGCTTCAATCTATCACCAATCTTCGACACACGCCATCACTTCTGGA 740
 TGAACAGCAAATGAACACGATTTCCACGCAACGCTGCGGAACATGTACTCTCAGGTAA 800
 CAATAATAACAACCTGGGTAACATCTCTGGTCTATCACCTGTTACAGAGGCATTCTTCCG 860
 TTGGCAGGAAGGTGAAACGTCAATCGATAATAGTTATTTTGGAAAAGGTTCAATTTTGTT 920
 TTGGTTGAACCAATTACTATCATCAGAAAAGATCGCTGGCGTTACATCAAAAGTAGGCAA 980
 TGACATTAACACTAATAATAATAATAATAAAACCATCAGAAGCTACCTCTAATACTAAACAA 1040
 TAATATTACTCATAATGTGTCGGACATAACCACAACAAGTACATCTTCAAACAAAAGGGC 1100
 AATGTCTCCTCTTTCTGCCAATGACTCTGTATATCTCGCTAAAAGAGAGACAATATCCGC 1160
 GTATATCGATGCGTACTTCAAGCACTATCATGCGCTATATCCGTTGGTCAGTAAGGAAAT 1220
 GTTTTTCGCTCAGTATAATGATCAAATTAACCAGAGAACGTTGAGATATGGCACATCTT 1280
 ACTAAACGCGGTATTAGCTTTGGGTTTCATGGTGTCTAATTCATGTTCAAGTCACCATAC 1340
 TCTCTATTACCAAAAACGCATTATCATATTTGTCCACCGCTGTATTGGAAACAGGGTCCAC 1400
 AGATTTAACCATAGCACTCATACTTTTAACGCATTATGTTCAAAAGATGCATAAGCCAAA 1460
 CACTGCATGGAGTCTCATAGGACTTTGTAGCCATATGGCTACATCGTTGGGATTACACCG 1520
 GGATCTACCAAACCTCAACGATACATGATCAGCAACTCCGTAGAGTATTGTGGTGGACTAT 1580
 TTATTGCACGGGATGCGATCTCTCATTAGAGACTGGAAGGCCCTCATTATTGCCCAATCT 1640
 TCAGGCTATTGATATACCATTACCAGCTTCATCTGCCACTATCAAAGAACCAAGCATATA 1700
 TTCCTCCATCATACAAGAATCCCAATGGTCTCAAATATTGCAACAGAAATTGTCAAATAA 1760
 CTCATATCAGCAAAGTGCAGGTGAATGTCTCTCATGGTTCGATAGTGTTCAGCATTTTT 1820
 AGACCACTGGCCTACTCTAGTACCGAAGCTGAACTCAAAGCCTTAAATGAAACTCAACT 1880

AGATTGGCTACCATTAGTGAAGTTCCGGCCATACTGGATGTTCCATTGTTCCCTAATATC 1940
 ACTTTTCTCAGTTTTTTTTGAAGAAGATGCCCCAACCGACAACAACGTCATACGGTGCAA 2000
 GGAGTTATGCCTTCAACTTTCAAGCAGAAATATATTTAGCGTGGCCACTTTTGTACGGAG 2060
 CTATGCATTCAACTCACTTTCTGTTGGTACGCGACACATTATCTTGTAGAAAGCGCATT 2120
 AGTGCCTCTACATTTTCGCATCTCGGATATCTCCACAGCACGCCTTGTGGGAGACAGTTAA 2180
 AGCGCAATTATTATCAGCCCATGAAGCGATGGGTATATTGTCACAAGAATCTTCCTTGGC 2240
 CGCTAAATTTGATGGGATATTAACCAAGAATTATTCTGAAATACTACAAAGAGAAGGCAT 2300
 CAACAAAAGCCAACCTGATGCCACCACCAACTCCATTGCTACAATCAACCAGTTTCTCGGA 2360 (2357-2376 AD Forward primeri)
CTACTTTCACTGTGGTCAGCAAACGCAGAAGACGCTCCGAGAGTCAGTAATCCCAGAT 2420
 GCCTCAATCGATCACTATCACGGACTCTTTGCTACAGTCATCAACAACTCAAATGAGACC 2480
 TCCAACCACATCTGGATGGCCTGATACCAACAACCTTCTGAATCCATCG ACCCAACAGCT 2540 (2529-2595, Asidik Aktivasyon Bölgesi, AD)
ATTCAACACCACAACAATGGACGATGTGTACAACTATATTTGATAACGACGAG TAAGA 2600
 AATCTCTTTTTCCGTAGTCAATTGGGACAGCATCAATTCATGTATTTACTTTTTGTTCA 2660
 GTAGCTATCAAATAGCTATCCAACGAGACCACTGGTACGAACAGTGTCCATCATGCACAT 2720
 GTAGGTAACCAACTCGTGGCCTTAACTACCATCCCCGCAGATTTCATTTCTATCGAA 2780 (2754-2773 AAB Reverse Primeri)

Şekil 3. 2. *KIGAL4* (KLLA0D12672g) (*LAC9*) geninin kodlama bölgesi. *KIGAL4*'ün başlangıç (ATG) ve stop (TAA) kodonları koyu harfler ile gösterildi. DNA bağlanma bölgesi (Zinc Finger, ZF) ve asidik aktivasyon bölgeleri (AD) altı çizili, koyu olarak verildi. PZR reaksiyonunda kullanılan forward ve revers primerlerin bağlanma bölgeleri koyu harflerle altı çizili olarak gösterildi ve kodlama bölgesi içindeki pozisyonları dizi sonlarında gösterildi. Rakkamlar başlangıç kodonuna göre (+1, ATG) *KIGAL4*'ün kodlama bölgesindeki nükleotid pozisyonlarını göstermektedir (URL-1).

4. BULGULAR

4. 1. *K. lactis* Suşlarının İzolasyonu

Laktoz metabolize edebilen mikroorganizmaların doğal olarak bulunabildikleri en uygun habitat süt ve süt ürünleridir. Araştırma konumuz olan laktaz enzimini sentez eden yeni *K. lactis* türü mayaların bulunabileceği en uygun kaynaklar da işlenmemiş süt ve süt ürünleridir (Schaffrath ve Breuning 2000; Fadda ve ark. 2001, 2004). Farklı özelliklerde laktaz enzimi biyosentezi yapabilen yeni *K. lactis* türü mayaları izole edebilmek için Bursa ili sınırları içinde 5 farklı bölgede bulunan süt üreticilerinden süt ve peynir örnekleri alındı. Peynir örnekleri starter kültür kullanılmadan üretilen örneklerden seçildi. Süt ve peynir örnekleri materyal ve yöntem bölümünde açıklandığı şekilde hazırlanarak seçici besiyeri olan sodyum propionat eklenmiş YGC agar petrilere ekildi.

Çizelge 4. 1. Araştırmada kullanılan süt ve peynir örneklerinin alındığı yerler ve maya konsantrasyonları.

Örneğin Alındığı Yer	Örnek Türü	Maya Konsantrasyonu ^a	Örnekten Laktoz pozitif olarak seçilen maya suşu kodları
Tahtalı Köyü-Bursa	Beyaz peynir	21717	MY1-MY6, MY30-MY34
Minareli Çavuş Köyü-Bursa	Beyaz peynir	16250	MY7-MY14, MY17, MY24
Yunuseli Köyü-Bursa	Taze süt	8060	MY15, MY16, MY26-MY29
Minareli Çavuş Köyü-Bursa	Taze süt	2120	MY18-MY21, MY35-MY37
Doğanbey Köyü-Bursa	Taze süt	3540	MY22, MY23, MY25

^aMaya konsantrasyonları 1 gram beyaz peynirden veya 1 ml taze süttten YGC agar petrilere üreyen maya kolonisi sayısını (Colony Forming Unit, CFU) göstermektedir.

İnkübasyon periyodu sonunda örneklerdeki toplam maya sayıları belirlendi (Çizelge 4. 1). Bursa'daki 5 farklı bölgeden sağlanan süt örneklerindeki maya derişiminin 2000 cfu/ml ile 8000 cfu/ml arasında değişebildiği görüldü (Çizelge 4. 1). Peynir örneklerinin ise süt örneklerine göre daha fazla miktarda maya hücresi içerdęi ve genellikle 15000- 20 000 cfu/ g peynir olduğu bulundu.

4. 2. Maya Suşlarının Metabolik Özellikleri

Saflaştırılan maya örneklerinin türlerini belirlemek ve laktaz aktivitesi olan dolayısıyla da sadece laktoz içeren ortamda üreyebilen mayaları seçmek için seçilen mayaların daha önce tanımlandığı şekilde farklı karbonhidratları kullanabilme özellikleri araştırıldı. YGC petrilerinde üreyebilen 150 maya kolonisi arasından rastgele seçilen 37 maya örneğinin glukoz, laktoz, galaktoz, sukroz, maltoz, gliserol, DL laktat ve inülin gibi farklı karbon kaynaklarında üremeleri incelendi. Seçilen maya örneklerinin bazılarının laktoz pozitif, bazılarının da laktozda üreyemeyen veya çok az üreyebilen maya türleri olduğu belirlendi. Seçilen maya örneklerinin farklı karbonhidratları ve azot kaynaklarını kullanabilme özellikleri Çizelge 4. 2 ve Çizelge 4. 3'de verildi. Seçilen 37 maya örneğinden sadece 16 örneğin (% 43'ü) laktoz pozitif özellikteki mayalar olduğu belirlendi.

Farklı karbonhidratların kullanımı gibi farklı azot kaynaklarının kullanımı ve düşük veya yüksek sıcaklıklarda üreyebilme de maya sistematüğinde kullanılan önemli taksonomik kriterlerdir (Kurtzman ve Fell 2000). Bu amaçla seçilen maya türlerinin farklı azot kaynaklarını kullanabilme, düşük ve yüksek sıcaklıklarda üreme, ozmotik strese dayanıklılık özellikleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlar araştırmamızda referans maya suşu olarak kullanılan *K. lactis* ATCC8585 suşu ile karşılaştırıldı (Çizelge 4. 3). *K. lactis* türünün azot kaynağı olarak nitratları kullanamadığı, düşük ve yüksek sıcaklıklara da duyarlı olduğu bilinmektedir (Kurtzman ve Fell 2000). Seçilen maya özelliklerinin bu özellikleri dikkate alınıp laktoz kullanım özellikleri de göz önüne alındığında az sayıda örneğin standart *K. lactis* suşuna benzer metabolik özellikleri taşıdığı görülmektedir.

Çizelge 4. 2. Seçilen Maya örneklerinin karbonhidrat asimilasyon test sonuçları

Maya Örneği Kod No:	Glukoz	Laktoz	Galaktoz	Sukroz	Maltoz	Gliserol	DL Laktat	İnülin
MY1	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY2	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY3	+	+	Z	+	+	Z	-	-
MY4 (pembe)	+	-	+	+	+	Z	+	-
MY5	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY6	+	-	Z	+	Z	+	-	-
MY7	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY8	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY9	+	-	+	+	+	+	Z	+
MY10	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY11	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY12	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY13	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY14	+	+	+	+	Z	Z	Z	+
MY15	+	+	+	+	Z	Z	+	+
MY16	+	-	+	+	Z	+	+	+
MY17	+	+	+	+	Z	+	+	+
MY18	+	-	+	+	Z	+	+	-
MY19	+	-	+	+	Z	+	+	-
MY20	+	-	+	+	Z	+	+	-
MY21	+	-	+	+	+	+	+	-

Çizelge 4. 2. (Devam)

Maya Örneği Kod No:	Glukoz	Laktoz	Galaktoz	Sukroz	Maltoz	Gliserol	DL Laktat	İnülin
MY22	+	+	+	+	+	+	+	-
MY23	+	+	+	+	+	+	+	-
MY24	+	+	+	+	+	+	+	-
MY25	+	+	+	+	+	+	+	-
MY26	+	-	+	+	+	-	-	-
MY27	+	-	+	+	+	-	-	-
MY28	+	+	+	+	+	+	+	-
MY29	+	+	+	+	+	+	+	-
MY30	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY31	+	-	+	+	Z	Z	+	-
MY32	+	-	+	+	Z	Z	+	Z
MY33	+	-	+	+	Z	Z	+	Z
MY34 (Pembe)	+	-	+	+	+	Z	-	Z
MY35	+	-	+	+	Z	Z	+	Z
MY36	+	-	+	+	Z	+	+	Z
MY37	+	-	+	+	Z	+	Z	Z
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	+	+	+	+	D	D	D	D

Değerlendirmeler Petrilerdeki 28 °C’de 2 gün sonucunda koloni oluşum sürecine göre yapılmıştır. + : İyi ve hızlı üreme. - : Üreme yok. Z: Zayıf üreme. D: Değişken, maya suşuna göre değişen özellik.

Çizelge 4. 3. Seçilen maya örneklerinin azot kullanımı, ozmotik tolerans ve sıcaklığa duyarlık testleri sonuçları.

Maya Örneği Kod No	Amonyum Sülfat	Sodyum Nitrat	Potasyum Nitrat	Lizin	10% NaCl 5% Glukoz	28 °C'de Üreme	37 °C'de Üreme	6 °C'de Üreme (7 Gün)
MY1	+	-	-	+	-	+	-	-
MY2	+	-	-	+	-	+	-	-
MY3	+	-	-	+	-	+	-	-
MY4 (pembe)	+	-	-	-	Z	+	-	-
MY5	+	-	-	+	-	+	-	-
MY6	+	-	-	+	-	+	-	+
MY7	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY8	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY9	+	-	-	+	+	+	+	+
MY10	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY11	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY12	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY13	+	-	-	+	Z	+	+	-
MY14	+	-	-	+	-	+	+	-
MY15	+	-	-	+	-	+	+	-
MY16	+	-	-	+	Z/+	+	+	-
MY17	+	-	-	+	-	+	+	-
MY18	+	-	-	+	-	+	+	+
MY19	+	-	-	+	-	+	+	+
MY20	+	-	-	+	-	+	+	+
MY21	+	-	-	+	-	+	+	+

Çizelge 4. 3. (devam)

Maya Örneği Kod No	Amonyum Sülfat	Sodyum Nitrat	Potasyum Nitrat	Lizin	10% NaCl 5% Glukoz	28 °C'de Üreme	37 °C'de Üreme	6 °C'de Üreme (7 Gün)
MY22	+	-	-	+	Z/-	+	+	-
MY23	+	-	-	Z	Z/-	+	-	-
MY24	+	-	-	Z	Z/-	+	-	-
MY25	+	-	-	+	Z/-	+	-	-
MY26	+	-	-	-	Z	+	+	-
MY27	+	-	-	-	Z	+	+	-
MY28	+	-	-	+	Z	+	Z	-
MY29	+	-	-	+	Z	+	Z	-
MY30	+	-	-	+	Z	+	-	-
MY31	+	-	-	+	Z	+	-	-
MY32	+	-	-	+	Z	+	-	-
MY33	+	-	-	+	Z	+	-	-
MY34 (Pembe)	+	-	-	-	Z	+	-	-
MY35	+	-	-	+	-	+	Z	+
MY36	+	-	-	+	-	+	Z	+
MY37	+	-	-	+	-	+	Z	+
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	+	-	-	D	-	+	D	-

Değerlendirmeler petrillerdeki 28 °C'de (37 °C ve 6 °C testleri hariç) 3 gün sonucunda koloni oluşum sürecine göre yapılmıştır. + : İyi ve hızlı üreme., - : Üreme yok., Z: Zayıf üreme.

D: Değişken, maya suşuna göre değişen özellik.

4. 3. *K. lactis* Suşlarının Tür tayinlerinin Yapılması

Farklı karbon kaynaklarında üreyebilme, azot kullanımlarına, ozmotik tolerans ve farklı sıcaklıklarda üremelerine göre incelenen 37 maya örneği laktoz pozitif özellikleri kontrol edildikten sonra API 32C testi uygulanarak tür tayinleri yapıldı. Üretici firma tarafından açıklandığı şekilde API 32C ortamında üretilen maya örneklerinin türleri Mini API cihazında belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 4'de verildi. Seçilen 37 maya örneğinin çeşitli olasılıklarla çok farklı türlere ait maya türleri olduğu belirlendi. Uygulanan API 32C testi sonucu incelenen 37 maya örneğinden sadece 6 tanesinin (MY22, MY23, MY24, MY25, MY28 ve MY29 kodlu maya örnekleri) % 99.9 olasılıkla *K. lactis* türleri olduğu belirlendi (Çizelge 4. 4). Seçilen 37 maya suşunun mikroskopik incelemeleri de ayrıca yapıldı. Bu maya türlerinden MY22-25, 28, 29'un çizelge 4. 2 ve 4. 3'de verilen farklı metabolik özellikleri, mikroskopik incelemeler sonucu belirlenen morfolojik yapıları ve API 32C sonuçları dikkate alınarak *K. lactis*'in farklı suşları olduğuna karar verildi.

4. 4. *K. lactis* Suşlarının ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Bölgelerinin İncelenmesi

Canlılarda ve özellikle mikroorganizmalarda tür tayininde yaygın olarak kullanılmakta olan diğer bir kriter de ribozomal DNA sekanslarıdır. rDNA'nın Internaly Transcribed Spacer-1 (ITS-1) ve 2 olarak (ITS-2) bilinen bölgeleri türe özeldir. ITS dizileri tek başlarına tür tayini için yeterli olmamakla birlikte yukarıda açıklanan metabolik özellikler ile birleştirildiğinde özellikle mikroorganizmaların türlerinin en az %99 olasılıkla doğru olarak belirlenmesini sağlamaktadır (Kurtzman ve Fell 2000, Kurtzman ve Robnett 2003). Araştırmamızda metabolik özelliklerine göre yeni *K. lactis* suşları olarak belirlenen maya örneklerinin türlerinin daha kesin olarak belirlenebilmesi için ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgelerinin nükleotid dizileri belirlendi ve standart *K. lactis* suşu ile kıyaslandı. Sonuçlar Ek-2'de verildi. Yapılan karşılaştırmalı analiz ve Gen bankasında yapılan BLAST analizi sonucu araştırmamız sırasında yeni suşlar olarak izole edilen *K. lactis* MY22-25 ve MY28, 29 suşlarının incelenen özelliklerine göre *K. lactis* türüne ait örnekler olduğu bulundu.

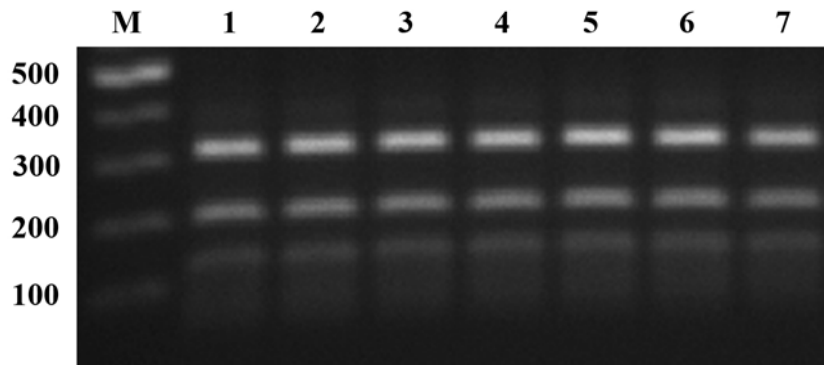
Çizelge 4. 4. Safılaştırılan maya örneklerinin API 32C kit'i ile belirlenen tür adları.

Maya Kod No	API 32c'ye Göre Adlandırma	Bazı Sinonim Adları
MY1	<i>Candida colliculosa</i> %66.9 <i>Zygosaccharomyces spp</i> %17.1	<i>Torulopsis colliculosa</i> <i>Zygosaccharomyces delbrueckii</i> <i>Torula colliculosa</i>
MY2	<i>Candida colliculosa</i> %66.9 <i>Zygosaccharomyces spp</i> %17.1	
MY3	<i>Cryptococcus albidus</i> %99.9	<i>Torulopsis albida</i> <i>Torula gelatinosa</i>
MY4 (pembe)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> %86.3 <i>Rhodotorula glutinis</i> %13.7	<i>Saccharomyces glutinis</i> <i>Rhodotorula rubra</i>
MY5	<i>Candida colliculosa</i> %66.9 <i>Zygosaccharomyces spp</i> %17.1	
MY6	<i>Candida zeylanoides</i> %99.9	<i>Mycotorula zeylanoides</i> <i>Azymocandida zeylanoides</i>
MY7	<i>Candida kefir</i> %99.9	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> <i>Dekkeromyces fragilis</i>
MY8	<i>Candida kefir</i> %99.9	
MY9	<i>Candida lusitaniae</i> %99.1	<i>Clavispora lusitinae</i>
MY10	<i>Candida kefir</i> %99.9	
MY11	<i>Candida kefir</i> %99.9	
MY12	<i>Candida kefir</i> %99.9	
MY13	<i>Candida kefir</i> %99.9	
MY14	<i>Candida kefir</i> %99.9	
MY15	<i>Candida kefir</i> %99.9	
MY16	<i>Candida krusei</i> %86 <i>Candida valida</i> %12.91	<i>Saccharomyces krusei</i> <i>Tricosporon krusei</i>

Çizelge 4. 4 (devam)

Maya Kod No	API 32c'ye Göre Adlandırma	Bazı Sinonim Adları
MY17	<i>Candida kefir</i> %99.9	
MY18	<i>Candida lambica</i> %99.9	<i>Pichia fermentans</i> <i>Zymopichia fermentans</i> <i>Candida monosa</i>
MY19	<i>Candida lambica</i> %99.9	
MY20	<i>Candida lambica</i> %99.9	
MY21	<i>Candida lambica</i> %99.9	
MY22	<i>Candida sphaerica</i> %99.9	<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces lactis</i>
MY23	<i>Candida sphaerica</i> %99.9	
MY24	<i>Candida sphaerica</i> %99.9	
MY25	<i>Candida sphaerica</i> %99.9	
MY26	<i>S. cerevisiae</i> %59.4 <i>Zygosaccharomyces spp.</i> %40.3	
MY27	<i>S. cerevisiae</i> %97.5	
MY28	<i>Candida sphaerica</i> %99.9	
MY29	<i>Candida sphaerica</i> %99.9	
MY30	<i>Candida colliculosa</i> %66.9 <i>Zygosaccharomyces spp</i> %17.1	
MY31	<i>Candida colliculosa</i> %66.9 <i>Zygosaccharomyces spp</i> %17.1	
MY32	<i>Candida colliculosa</i> %66.9 <i>Zygosaccharomyces spp</i> %17.1	
MY33	<i>Candida colliculosa</i> %66.9 <i>Zygosaccharomyces spp</i> %17.1	
MY34 (Pembe)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> %79 <i>Rhodotorula glutinis</i> %17	
MY35	<i>Candida lambica</i> %99.9	
MY36	<i>Candida lambica</i> %99.9	
MY37	<i>Candida lambica</i> %99.9	
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	<i>Candida sphaerica</i> %99.9	

Araştırmamızda elde edilen *K. lactis* suşlarının türleri rDNA RFLP analizleri yapılarak da analiz edildi. Bu analiz için *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarından saflaştırılan genomik DNA'dan ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan ITS1-5.8S rDNA ITS2 DNA bölgesi HinfI enzimi ile kesilerek jel elektroforezinde analiz edildi. rDNA RFLP analizi olarak bilinen bu yöntem de farklı türlerin ayırt edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (Naumova ve ark. 2004). Jel elektroforezinde oluşan bantların sayısı ve büyüklükleri kıyaslandığında *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının rDNA RFLP profillerinin standart *K. lactis* suşu ile aynı olduğu belirlendi (Şekil 4. 1). HinfI restriksiyon enzimi ile kesim sonucu *K. lactis* MY suşlarının ITS1 5.8S-rDNA ITS2 bölgesinden oluşan DNA parçalarının uzunluklarının daha önce Naumova ve ark. (2004) tarafından *K. lactis* için rapor edilen sonuçlar ile aynı özellikte olduğu görüldü. Bu nedenle araştırmamızın bundan sonraki aşamalarında sadece yeni suş olarak tanımladığımız *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının metabolik ve genetik özelliklerinin incelenmesi kararlaştırıldı.



Şekil 4. 1. *K. lactis* suşlarının ITS-5.8 rDNA RFLP analizi.

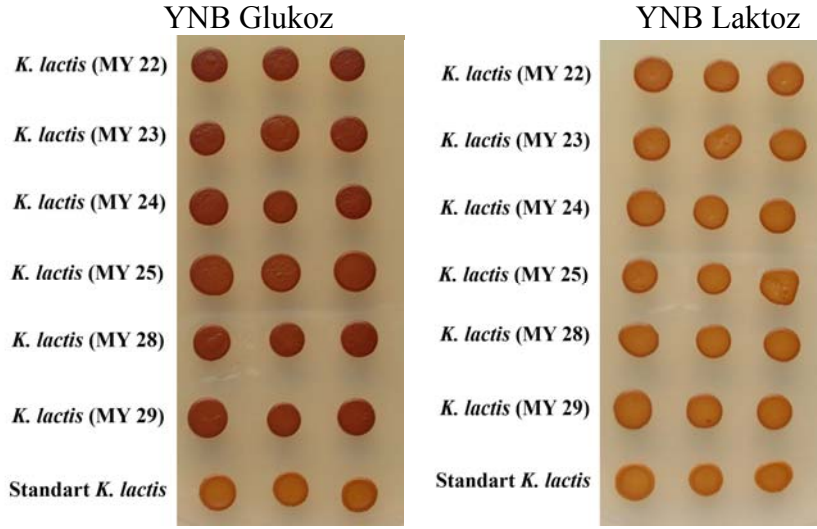
M: Marker, 1: Standart *K. lactis* (ATCC8585), 2-7: Sırasıyla MY22-25 ve MY28-29 kodları ile verilen *K. lactis* genomik DNA örneklerinden elde edilen PCR ile elde edilen rDNA'ların HinfI enzimi ile kesim sonuçları. 100-500 marker DNA uzunluklarını göstermektedir.

4. 5. *K. lactis* Suşlarında Glikojen Miktarlarının Belirlenmesi

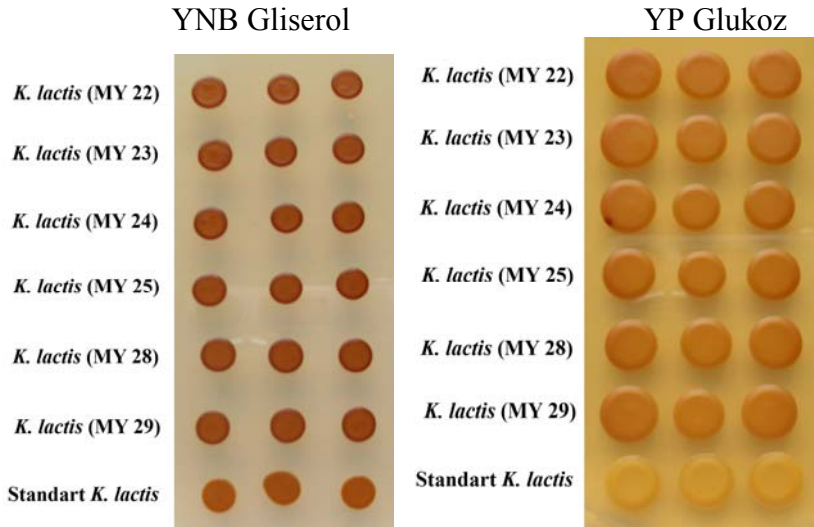
Glikojen maya hücreleri için oldukça önemli bir depo karbonhidratı olup sitozolde ve hücre dışında depo edilmektedir (François ve Parrou 2001; Gunja-Smith ve ark. 1977). Glikojen depolanması farklı maya türlerinde ve farklı üreme koşullarında farklı miktarlarda yapılmaktadır (François ve Parrou 2001; Türkel 2006). Araştırmamızda saflaştırılan yeni *K. lactis* suşlarının glikojen metabolizmalarında benzerlik veya farklılıklar olup olmadığı araştırıldı. Bunun için *K. lactis* suşları farklı karbonhidrat içeren ortamlarda üretilerek glikojen miktarları kalitatif olarak belirlendi.

Karbonhidrat kaynağı olarak glukoz içeren minimal ortamda (YNB +%2 Glukoz) üretildiklerinde *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının standart *K. lactis* suşundan çok daha fazla glikojen içerdikleri yapılan iyot boyama testi sonucu belirlendi (Şekil 4. 2). Fakat minimal üreme ortamında karbonhidrat kaynağı olarak %2 laktoz kullanıldığında *K. lactis* suşlarının glikojen içerikleri arasında herhangi bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4. 2). Karbonhidrat kaynağı olarak gliserol kullanıldığında da *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının glikojen içeriklerinin standart *K. lactis* suşuna çok yakın miktarda glikojen içerdikleri belirlendi.

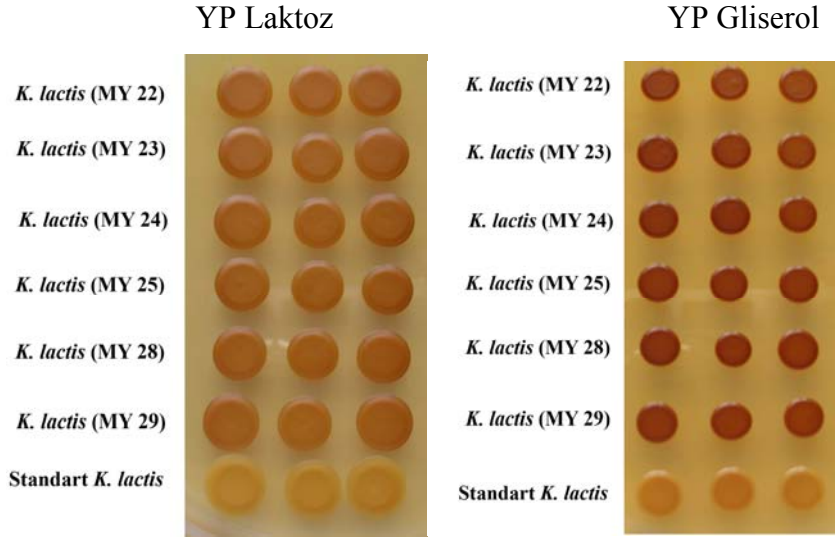
K. lactis suşlarının zengin üreme ortamı olarak kullanılan ve farklı karbonhidratlar içeren YP ortamında üretildiklerinde depo edebildikleri glikojen miktarları da aynı şekilde iyot boyama testi ile belirlendi. YP ortamında karbonhidrat kaynağı olarak glukoz, glisereol veya laktoz kullanıldı. Her 3 durumda da *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının glikojen içeriklerinin standart suştan daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4. 3, Şekil 4. 4). Elde edilen sonuçlar glikojen biyosentezi ve depolanmasında *K. lactis* MY suşları ile standart *K. lactis* suşu arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 2. *K. lactis* suşlarının YNB glukoz ve YNB Laktoz ortamlarında glikojen içerikleri.



Şekil 4. 3. *K. lactis* suşlarının YNB gliserol ve YP glukoz ortamlarında glikojen içerikleri.



Şekil 4. 4. *K. lactis* suşlarının YP laktoz ve YP gliserol ortamlarında glikojen içerikleri.

4. 6. *K. lactis* MY Suşlarında Laktaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Saflaştırılıp türleri *K. lactis* olarak belirlenen maya suşları YP laktoz üreme ortamında logaritmik faz veya durağan faza kadar üretilerek laktaz aktiviteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar çizelge 4. 5’de verildi. Laktaz aktiviteleri standart *K. lactis* suşu (ATCC8585) ile kıyaslanarak analiz edildiğinde logaritmik fazda *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının laktaz aktivitelerinin birbirine çok yakın değerlerde olduğu bulundu. İncelenen *K. lactis* suşlarında logaritmik fazdaki laktaz aktivitelerinin yaklaşık olarak 607-657 (Miller Ünitesi) aralığında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4. 5).

Araştırmamızda kullanılan *K. lactis* suşlarının durağan fazdaki laktaz enzim aktiviteleri de belirlendi. Bunun için *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşları ve standart *K. lactis* suşu YP laktoz üreme ortamında durağan faza kadar üretildi. Logaritmik fazdan farklı olarak, *K. lactis* maya suşlarının durağan fazdaki laktaz aktivitelerinde önemli farklılıklar olduğu bulundu. Araştırmamızda saflaştırılan bazı *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının laktaz aktivitelerinin standart *K. lactis* suşundan 150-250 MU kadar fazla olabildiği bulundu (Çizelge 4. 5). *K. lactis* MY29 suşu durağan fazdaki laktaz aktivitesinin 737 MU iken standart *K. lactis* suşunun laktaz aktivitesinin 491 MU olduğu görülmektedir (Çizelge 4. 5).

Standart laboratuvar ortamına ek olarak *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının endüstriyel üreme ortamı olan amonyum sülfat ilave edilmiş peynir altı suyunda üremeleri sağlanarak logaritmik ve durağan fazdaki laktaz aktiviteleri de belirlendi ve sonuçlar Çizelge 4. 6'da verildi. Peynir altı suyunda üretilen *K. lactis* suşlarında zengin besiyeri olan YP laktoz ortamında üretilen suşlara kıyasla daha az seviyede laktaz aktivitesi ölçüldü. Standart *K. lactis* suşunun laktaz aktivitesinde de peynir altı suyunda üreme sonucu az miktarda azalma görülürken araştırmamızda saflaştırılan *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşlarının laktaz aktivitelerinde peynir altı suyunda üretildiklerinde ortalama %40 kadar bir azalma olduğu gözlemlendi (Çizelge 4. 6).

Çizelge 4. 5. Saflaştırılan *K. lactis* suşlarının, YP laktoz üreme ortamındaki laktaz aktiviteleri.

<i>K. lactis</i> Suşları	Laktaz aktiviteleri ^a	
	Logaritmik faz	Durağan Faz
<i>K. lactis</i> (MY 22)	657 ±71	663 ±77
<i>K. lactis</i> (MY 23)	606 ±90	503 ±113
<i>K. lactis</i> (MY 24)	693 ±52	645 ±15
<i>K. lactis</i> (MY 25)	607 ±94	667 ±21
<i>K. lactis</i> (MY 28)	613 ±46	631 ±151
<i>K. lactis</i> (MY 29)	654 ±97	737 ±159
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	616 ±151	491 ±27

^aLaktaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verilmiştir (± Standart Sapma).

Çizelge 4. 6. Peynir altı suyunda üretilen *K. lactis* suşlarının laktaz aktiviteleri.

<i>K. lactis</i> Suşları	Laktaz aktiviteleri ^a	
	Logaritmik faz	Durağan Faz
<i>K. lactis</i> (MY 22)	289 ±8	291 ±42
<i>K. lactis</i> (MY 23)	321 ±14	306 ±24
<i>K. lactis</i> (MY 24)	267 ±52	301 ±57
<i>K. lactis</i> (MY 25)	326 ±16	385 ±42
<i>K. lactis</i> (MY 28)	292 ±20	304 ±57
<i>K. lactis</i> (MY 29)	276 ±8	292 ±21
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	444 ±16	557 ±69

^aLaktaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verilmiştir (± Standart Sapma).

4. 7. Laktaz Biyosentezine Glukoz baskılamasının Etkilerinin Araştırılması

K. lactis'de laktaz biyosentezinin glukoz baskılaması ile kontrol edildiği bilinmektedir (Breunig 1989). *K. lactis* MY suşlarında laktaz biyosentezine glukoz baskılamasının etkileri standart üreme koşulları kullanılarak test edildi. *K. lactis* suşları farklı miktarlarda glukoz ve laktoz içeren YP üreme ortamında üretilerek laktaz aktiviteleri belirlendi. Üreme ortamında %2 veya %4 glukoz bulunduğu *K. lactis* suşlarında laktoz içeren ortamdaki aktiviteler ile kıyaslandığında 4-5 kat daha az laktaz aktivitesi ölçüldü (Çizelge 4. 7). Fakat standart *K. lactis* suşu ile *K. lactis* MY suşları karşılaştırıldığında glukoz baskılamasının *K. lactis* MY suşlarına daha az etki ettiği açıkça görülmektedir. Standart *K. lactis* suşunun laktoz ve %4 glukoz içeren üreme ortamlarındaki laktaz aktiviteleri karşılaştırıldığında bu suşta glukoz baskılaması nedeni ile laktaz aktivitesinin yaklaşık 11 kat azaldığı bulundu (Çizelge 4. 7). *K. lactis* MY suşlarının laktoz ve %4 glukoz içeren ortamlardaki laktaz aktiviteleri karşılaştırıldığında ise bu suşlarda laktaz aktivitesindeki azalmanın daha düşük seviyede olduğu görüldü.

Glukoz baskılaması nedeni ile *K. lactis* MY suşlarında laktaz aktivitesinde 4-5 kat azalma olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara ek olarak %4 glukoz içeren üreme ortamındaki laktaz aktiviteleri karşılaştırıldığında ise *K. lactis* MY suşlarındaki laktaz aktivitesinin standart suştan ortalama 2 kat daha fazla olduğu bulundu. Bu sonuçlar glukoz baskılamasının araştırmalarımızda saflaştırılan *K. lactis* MY suşlarında laktaz geni transkripsiyonuna ve dolayısıyla da laktaz biyosentezine tam olarak etki etmediğini göstermektedir.

Çizelge 4. 7. Laktaz biyosentezine glukoz baskılamasının etkileri.

<i>K. lactis</i> Suşları	Laktaz aktiviteleri ^a			
	YP+2% Laktoz	YP+0.1 glukoz	YP+%2 Glukoz	YP+%4 glukoz
<i>K. lactis</i> (MY 22)	617 ±6	177 ±3	119 ±5	124 ±1
<i>K. lactis</i> (MY 23)	653 ±57	171 ±7	135 ±16	112 ±1
<i>K. lactis</i> (MY 24)	721 ±23	181 ±17	131 ±18	117 ±1
<i>K. lactis</i> (MY 25)	553 ±5	132 ±6	100 ±6	112 ±12
<i>K. lactis</i> (MY 28)	573 ±49	152 ±1	86 ±1	93 ±6
<i>K. lactis</i> (MY 29)	633 ±29	186 ±7	144 ±21	127 ±8
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	735 ±13	127 ±16	98 ±1	67 ±21

^aLaktaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verilmiştir (± Standart Sapma).

4. 8. Laktaz Biyosentezine Laktoz Aktivasyonunun Etkilerinin Araştırılması

Laktaz biyosentezi üreme ortamında bulunan laktoz ile aktive edilmektedir (Dickson ve Markin 1980). Laktozun hücre içinde laktaz tarafından hidrolizi sonucu oluşan galaktoz KIGal1p aracılığı ile KIGal80p'yi inaktive ederek laktaz geninin transkripsiyon faktörü KIGal4p tarafından tam olarak aktive edilmesini sağlamaktadır (Şekil 2. 2. ve 2. 3). *K. lactis* MY suşlarında laktaz biyosentezinin laktoz tarafından aktive edilip edilmediği daha önce tanımlanan şekilde araştırıldı.

K. lactis suşları YP ortamında glukoz ve laktoz varlığında logaritmik faza kadar üretilerek laktaz aktiviteleri belirlendi. Üreme ortamında glukoz ek olarak %2 oranında laktoz varlığının kısmen glukoz baskılamasını engellediği ve *K. lactis* suşlarında 3-4 katlık bir artış olduğu bulundu (Çizelge 4. 8). Laktoz aktivasyonunun *K. lactis* MY suşlarında standart *K. lactis* suşuna göre daha fazla olduğu da belirlendi. Laktoz aktivasyonunun en fazla görüldüğü suşların MY28 ve MY29 suşları olduğu görülmektedir.

Çizelge 4. 8. *K. lactis*'de laktaz biyosentezinin laktöz ile aktivasyonu.

<i>K. lactis</i> Suşları	Laktaz aktiviteleri ^a		
	YP + 2% Laktöz	YP + %4 Glukoz	YP + %4 Glukoz + %2 laktöz
<i>K. lactis</i> (MY 22)	617 ±6	124 ±2	317 ±5
<i>K. lactis</i> (MY 23)	653 ±55	112 ±2	345 ±30
<i>K. lactis</i> (MY 24)	721 ±22	117 ±1	388 ±8
<i>K. lactis</i> (MY 25)	553 ±4	112 ±12	299 ±5
<i>K. lactis</i> (MY 28)	573 ±48	93 ±6	375 ±4
<i>K. lactis</i> (MY 29)	633 ±28	127 ±8	406 ±5
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	735 ±12	67 ±21	213 ±3

^aLaktaz aktiviteleri Miller Ünitesi olarak verilmiştir (± Standart Sapma).

4. 9. *K. lactis* Suşlarında İnvertz Aktivitesinin Araştırılması

K. lactis'de sukrozu hidroliz eden invertz enzimi aktivitesinin bulunduğu daha önce rapor edilmiştir (Rouwenhorst ve ark. 1990; Georis ve ark. 1999). Araştırmamızda yerel kaynaklardan saflaştırdığımız *K. lactis* MY suşlarının invertz aktiviteleri de standart *K. lactis* suşu ile karşılaştırmalı olarak analiz edildi. *K. lactis*'de invertz biyosentezinin *KIINV1* geninden yapıldığı ve bu genin de laktaz geni *LAC4* gibi glukoz baskılaması ile kontrol edildiği bilinmektedir (Georis ve ark. 1999). Bu nedenle incelenen *K. lactis* suşlarının invertz aktiviteleri bu suşlar farklı miktarlarda glukoz içeren üreme ortamlarında üretilerek belirlendi (Çizelge 4. 9).

K. lactis suşlarının glukoz baskılamasının olmadığı düşük miktarda (%0.05) glukoz içeren üreme ortamlarında üretilmeleri sonucu 470 ile 700 unite arasında değişebilen miktarlarda invertz aktivitesine sahip oldukları belirlendi (Çizelge 4. 9).

Oldukça yüksek olarak değerlendirilebilen bu enzim aktivitelerinin aynı koşullarda üretilen standart *K. lactis* suşunun invertaz aktivitesinden de 3-4 kat daha yüksek olduğu belirlendi. En yüksek invertaz aktivitesi yaklaşık 700 ünite olarak *K. lactis* MY24 suşunda ölçüldü. *K.lactis* MY suşlarının invertaz aktiviteleri arasında da önemli farklılıklar olduğu belirlendi.

K. lactis suşlarında invertaz biyosentezine glukoz baskılamasının etkilerini araştırmak için maya suşları yüksek miktarda (%2 veya %4) glukoz içeren üreme ortamlarında üretildi. Glukoz baskılaması nedeni ile *K. lactis* MY suşlarında invertaz aktivitelerinde 2-3 kat azalma olduğu ve invertaz biyosentezinin glukoz baskılaması altında olduğu bulundu (Çizelge 4. 9). Fakat *K. lactis* MY suşlarında glukoz baskılaması koşullarında belirlenen invertaz aktivitelerinin standart *K. lactis* suşundan ortalama 4-5 kat daha yüksek olduğu da elde edilen sonuçlardan görülmektedir (Çizelge 4. 9).

Çizelge 4. 9. *K. lactis* suşlarının farklı üreme ortamlarında invertaz aktiviteleri.

<i>K. lactis</i> Suşları	İnvertaz aktiviteleri ^a		
	%4 Glukoz	%2 Glukoz	%0.05 Glukoz
<i>K. lactis</i> (MY 22)	205 ±23	325 ±11	537 ±35
<i>K. lactis</i> (MY 23)	213 ±43	230 ±29	523 ±4
<i>K. lactis</i> (MY 24)	262 ±65	319 ±81	700 ±180
<i>K. lactis</i> (MY 25)	216 ±13	353 ±39	561 ±14
<i>K. lactis</i> (MY 28)	241 ±43	309 ±71	622 ±95
<i>K. lactis</i> (MY 29)	260 ±25	321 ±21	472 ±27
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	56 ±4	49 ±6	154 ±1

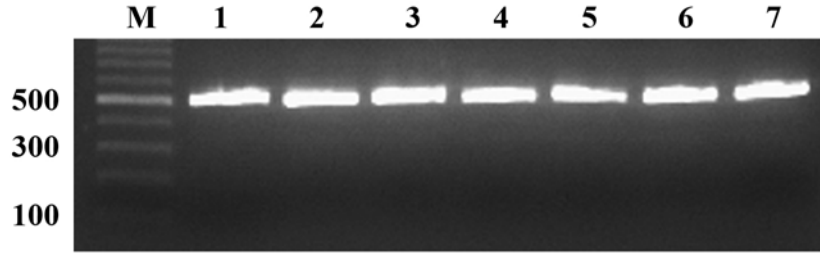
^ainvertaz aktiviteleri µm glukoz/ dakika/ 100 mg maya (kuru ağırlık) olarak verilmiştir (± Standart Sapma).

4. 10. *K. lactis* Suşlarında Laktaz Geni Promotor Bölgesinin Analizi

K. lactis'de laktaz enziminin kodlandığı gen *LAC4* genidir (Sheetz ve Dickson 1981). Laktaz biyosentezi bölüm 2, 3. 2'de de açıklandığı gibi promotor bölgesine bağlanan *KIGAL4* tarafından laktoz varlığında aktive edilmektedir. Glukoz baskılamasının *K. lactis* MY suşlarındaki laktaz biyosentezine standart suşa göre daha az etki ettiği bölüm 4. 7'de açıklandığı şekilde belirlendi. Bunun nedenlerini araştırmak için *K. lactis* MY suşlarının *LAC4* (laktaz) geni promotorunda herhangi bir farklılık olup olmadığı araştırıldı.

K. lactis MY22-25, 28, 29 suşlarından *LAC4* geni promotor bölgesinin moleküler analizi için genomik DNA saflaştırıldı. Herbir *K. lactis* MY22-25, 28, 29 suşunun *LAC4* geni promotor bölgesi bu suşların genomik DNA'larından PZR ile çoğaltıldı. *K. lactis* suşları promotor bölgesinde delesyon veya insersiyon tipi herhangi bir kromozomal farklılık olup olmadığını belirlemek için PZR ile elde edilen promotor bölgesine ait DNA parçaları jel elektroforezi ile de analiz edildi. Şekil 4. 2'de görülebildiği gibi incelenen *K. lactis* suşları promotor bölgelerinde herhangi bir delesyon veya insersiyon sonucu artma veya azalma olmadığı bulundu. *K. lactis* suşlarından PZR ile elde edilen *LAC4* geni promotor bölgeleri uzunluklarının standart *K. lactis* suşundan beklendiği gibi yaklaşık olarak 492 bp olduğu bulundu (Şekil 3.1 ve 4. 5).

K. lactis MY22-25, 28, 29 suşlarından PZR ile çoğaltılan *LAC4* geni promotor bölgelerinin nükleotid dizileri de belirlendi. Elde edilen *LAC4* geni promotor dizileri yaban tip suş ile kıyaslandığında *K. Lactis* MY suşlarının *LAC4* geni promotor bölgelerindeki *KIGal4p* bağlanma dizilerinde herhangi bir mutasyon olmadığı görüldü. Fakat *K. lactis* MY suşlarının laktaz geni promotor bölgelerinde transkripsiyon faktörü *KIGAL4* bağlanma bölgesi dışında kalan bazı bölgelerinde yaban tip *K. Lactis* suşundan farklı olarak bazı nükleotid değişiklikleri olduğu belirlendi.



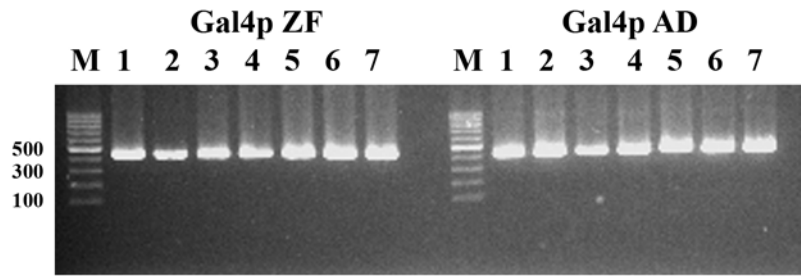
Şekil 4. 5. *K. lactis* suşlarının *LAC4* (laktaz) geni promotor bölgesinin jel elektroforezi ile analizi. M: Marker, 1: Standart *K. lactis* (ATCC8585), 2-7: Sırasıyla MY22-25 ve MY28, 29 kodları ile verilen *K. lactis* suşlarından PZR ile elde edilen *LAC4* geni promotor bölgesini göstermektedir.

4. 11. *K. lactis* Suşlarında *KIGAL4* Geni İşlevsel Bölgelerinin Analizi

KIGal4p *K. lactis*'de *GAL/LAC* regulonu aktivatör proteini olarak tanımlanan transkripsiyon faktörüdür. İzole edilip laktaz aktiviteleri karşılaştırmalı olarak analiz edile *K. Lactis* MY suşlarında standart suşa göre laktaz aktivitelerindeki farklılığın KIGal4p'nin işlevsel bölgelerindeki herhangi bir farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülerek bu faktörün işlevsel bölümleri olan DNA'ya bağlanma (Zinc Finger, ZF) ve asidik aktivasyon bölgeleri (Activation Domain, AD) de incelendi. Bölüm 3.10'da verilen primerler kullanılarak *K. lactis* suşlarından saflaştırılan genomik DNA'lardan PZR ile DNA'ya bağlanma ve Aktivasyon bölgeleri çoğaltıldı. PZR reaksiyonları sonucu genomik DNA'lardan elde edilen DNA'ya bağlanma ve aktivasyon bölgeleri uzunlukları önce jel elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 4. 3). Jel elektroforezi sonuçları incelendiğinde, *K. lactis* MY suşlarının DNA'ya bağlanma bölgesini içeren DNA'ların PZR reaksiyonu için kullanılan primerlerinin oluşturabileceği büyüklükte ve yaklaşık 431 bp uzunluğunda olduğu görüldü (Şekil 4. 3). Benzer şekilde *K. lactis* MY suşları *KIGAL4* geni aktivasyon bölgelerinin de PZR reaksiyonu için kullanılan primerlerin

oluşturabileceği uzunlukta ve 416 bç olduğu bulundu. Bu sonuçlar *K. lactis* MY suşlarının *KIGAL4* geni DNA'ya bağlanma ve asidik aktivasyon domenlerinde büyük delesyon veya insersiyon tipi mutasyonlar olmadığını göstermektedir.

K. lactis suşları genomik DNA'larından PZR ile çoğaltılıp jel elektroforezi ile analiz edilen *KIGAL4* DNA'ya bağlanma ve asidik aktivasyon bölgelerinin nükleotid dizileri de belirlendi. Belirlenen nükleotid dizileri karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde standart *K. lactis* ATCC8585 ile MY suşlarında *KIGAL4* DNA'ya bağlanma ve aktivasyon bölgesi nükleoid dizilerinde herhangi bir mutasyon olmadığı belirlendi.



Şekil 4. 6. *K. lactis* MY suşlarının *KIGAL4* geni DNA'ya bağlanma (ZF) ve Asidik Aktivasyon (AD) bölgelerinin jel elektroforezi ile analizi. M: Marker, 1: Standart *K. lactis* (ATCC8585), 2-7: Sırasıyla MY22-25, 28, 29 kodları ile verilen *K. lactis* suşlarından PZR ile elde edilen DNA bağlanma bölgesi (Gal4p ZF) ve Asidik aktivasyon bölgelerini (Gal4p AD) göstermektedir.

4. 12. *K. lactis* MY Suşlarının Üreme Hızlarının Belirlenmesi

K. lactis suşlarının endüstriyel uygulamalar için farklı üreme ortamlarındaki ikilenme süreleri oldukça önemli bir özelliktir. Araştırmamızda izole edilip *K. lactis* olarak belirlenen maya suşlarının hem laboratuvar ortamı olarak kullanılan YPD ve hem de endüstriyel amaçlar için kullanılan peynir altı suyu ortamlarındaki ikilenme süreleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 10 ve Çizelge 4. 11’de verildi. *K. lactis* (ATCC8585) suşu ile kıyaslandığında araştırmalarımızda saflaştırılan *K. lactis* MY22-24 ve MY29 suşlarının YPD ortamındaki ikilenme sürelerinin standart *K. lactis* suşundan çok farklı olmadığı ve ortalama 110-120 dakika olduğu bulundu. Fakat, *K. lactis* MY25 ve *K. lactis* MY28 suşlarının ikilenme sürelerinin araştırmalarımızda saflaştırılan diğer *K. lactis* türleri ile standart *K. lactis* suşundan çok farklı olduğu ve daha hızlı bölündükleri görüldü (Çizelge 4. 10). *K. lactis* suşlarının peynir altı suyundaki ikilenme sürelerinin de *K. lactis* MY25 suşu dışındaki suşlarda oldukça yakın değerler olduğu bulundu. *K. lactis* MY25 suşunun diğer suşlardan ve standart *K. lactis* ATCC8585 suşundan daha kısa bir ikilenme süresine sahip olduğu belirlendi.

Çizelge 4. 10. YPD ortamında üretilen *K. lactis* suşlarının ikilenme süreleri

<i>K. lactis</i> suşları	İkilenme Süreleri ^a
<i>K. lactis</i> (MY 22)	110 ±9
<i>K. lactis</i> (MY 23)	112 ±3
<i>K. lactis</i> (MY 24)	126 ±6
<i>K. lactis</i> (MY 25)	90 ±1
<i>K. lactis</i> (MY 28)	76 ±3
<i>K. lactis</i> (MY 29)	138 ±33
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	120 ±6

^aİkilenme Süreleri logaritmik aşama için ve dakika olarak verilmiştir (± Standart Sapma).

Çizelge 4. 11. Peynir altı suyunda üretilen *K. lactis* suşlarının ikilenme süreleri.

<i>K. lactis</i> suşları	İkilenme Süreleri ^a
<i>K. lactis</i> (MY 22)	122 ±3
<i>K. lactis</i> (MY 23)	104 ±15
<i>K. lactis</i> (MY 24)	106 ±18
<i>K. lactis</i> (MY 25)	92 ±9
<i>K. lactis</i> (MY 28)	120 ±6
<i>K. lactis</i> (MY 29)	110 ±7
<i>K. lactis</i> (ATCC8585)	118 ±7

^aİkilenme süresi logaritmik aşama için ve dakika olarak verilmiştir (± Standart Sapma).

5. TARTIŞMA

K. lactis endüstriyel amaçlar için yaygın olarak kullanılmakta olan ve GRAS özelliği uzun süre önce onaylanan önemli bir maya türüdür. Gerek laktaz enzimi üreticisi olması ve gerekse önemli klinik uygulamaları olan bazı rekombinant proteinlerin üretiminde artarak kullanılması *K. lactis*'in endüstriyel maya türü olarak önemini hergün arttırmaktadır (Fukuhara 2006, van Ooyen ve ark. 2006). Bu nedenle farklı enzimatik özellikleri olan yeni *K. lactis* suşlarının genetik mühendislikle geliştirilmesi veya farklı kaynaklardan yeni *K. lactis* suşlarının izolasyonu ve tanımlanması önem kazanmaktadır. Genetik yapısı değiştirilen (GDO) mikroorganizmaların kullanım alanlarının bazı yasal düzenlemeler ile kısıtlanması nedeni ile doğada doğal flora olarak bulunan *K. lactis* türlerinin izolasyonu ve tanımlanması da çeşitli endüstriyel uygulamalar için çok önemli kayıt olarak kabul edilmektedir.

Bu tez araştırmasının amacı özellikle yerel kaynaklarımızdan yeni ve farklı enzimatik özellikleri olan *K. lactis* suşları izole etmek ve bu suşlarda laktaz biyosentezi ile ilgili genetik özellikleri araştırmaktır. Bu kapsamda yapılan araştırmalarda Bursa bölgesinden bulunan üreticilerden sağlanan bazı süt ve peynir örneklerinden *K. lactis* suşları izole edildi. Araştırmalarımız için kaynak olarak kullanılan süt ve peynir örneklerinin farklı maya türleri içerdiği ve maya çeşitliliğinin çok zengin olduğu belirlendi. Araştırmamızda incelenen örneklerde toplam maya konsantrasyonunun süt veya peynir örneğine göre değişmekle birlikte 2×10^3 ile 2×10^4 CFU/ml süt veya CFU/g peynir aralığında değiştiği bulundu. Araştırmalarımızdaki örneklerde saptanan bu maya konsantrasyonlarının daha önce farklı süt veya peynir örneklerinde rapor edilen maya konsantrasyonlarına yakın değerler olduğu görüldü (Fleet ve Mian 1987, Fadda ve ark. 2001). Daha önce rapor edilen bazı çalışmalardaki süt ürünlerinde toplam maya konsantrasyonunun 10^7 kadar olabildiği de bulunmuştur (Fleet ve Mian 1987). Araştırmalarımızda kaynak olarak kullanılan süt örnekleri aseptik şartlarda direkt olarak üretim tesislerinden alınan ve herhangi bir pastörizasyon işlemi uygulanmamış süt örnekleridir. Benzer şekilde, araştırmalarımızda kaynak olarak kullanılan bu peynir

örnekleri de aseptik şartlarda üreticilerden direkt olarak alınan ve starter kültür kullanılmadan, tamamen klasik yöntemlerle üretilen peynirlerdir. Bu nedenle araştırmalarımız sırasında saflaştırılıp tanımlanan maya örnekleri Bursa bölgesinde üretilen süt ve peynir örneklerinde bulunan doğal maya popülasyonuna ait maya örnekleridir.

Araştırmamızda incelenen süt ve peynir örnekleri maya türlerinin çeşitliliği açısından değerlendirildiğinde farklı ülkelerdeki süt ürünleri için rapor edilen süt ürünlerindeki maya çeşitliliklerinden önemli farklılıklar göstermektedir (Fada ve ark. 2001, 2004). Araştırmalarımızda incelenen 5 farklı örnekte 10 farklı laktoz pozitif maya türü belirlenirken, Cosentino ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada incelenen 150 farklı peynir örneğinde maya konsantrasyonları 10^5 veya daha fazla olarak belirlenmiştir. Bu maya örneklerinin de 25 farklı türe ait olduğu bulunmuştur. Başka bir araştırmada ise 4 farklı peynir örneğinde 48 farklı maya türü saflaştırılarak tanımlanmıştır (Andrighetto ve ark. 2000). Fakat bu araştırmalarda verilen tür sayısı toplam maya çeşitliliğini göstermektedir ve hem laktoz negatif hem de laktoz pozitif maya türlerini içermektedir.

Maya örneklerinin türlerinin belirlenmesinde çok farklı kriterler kullanılmaktadır (Kurtzman ve Fell 2000). Bu kriterlerden bazıları kemotaksonomik özellikler (örneğin membran lipidlerinin çeşitliliği), fermentasyon özellikleri (bazı karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme), bazı DNA veya gen bölgelerinin (rDNA, Sitokrom oksidaz, mt-rDNA gibi) dizi analizleri'dir (Kurtzman ve Robnett 1998, Kurtzman ve Fell 2000). Genellikle tek bir tekniğe bağlı kalınarak yapılan tür tayinleri özellikle yakın türlerin ve alt türlerin ayrımı için yeterli olmamaktadır. Araştırmalarımızda maya türlerinin tayini için kullanılan API 32C kiti mayaların tür tayini için kullanılan güvenilir bir test sistemidir. Bu test sistemi saf kültür olarak izole edilen maya örneklerinin bazı karbonhidrat ve azot kaynaklarını kullanabilme özelliğine göre türlerini % 99 doğrulukla belirleyebilmektedir (Tornadijo ve ark. 1998). API 32C testi tür tayini için tek başına yeterli görülmediği için araştırmalarımızda API 32C kiti ile *K. lactis* olarak belirlenen örneklerin türleri rDNA'larının ITS bölgelerinin dizi analizleri yapılarak da belirlenmiştir (White ve ark. 1990, Kurtzman ve Fell 2000). Araştırmamızda standart *K.*

lactis suşu ile karşılaştırılarak yapılan rDNA RFLP ve ITS-rDNA dizi analizleri de API 32C ile *K. lactis* olarak tanımladığımız maya örneklerinin bu türe ait olduğunu göstermektedir. *K. lactis* MY 22-25, 28, 29 suşu olarak tanımlanan maya örneklerinin rDNA'ları ile yapılan RFLP analizlerinin daha önce rapor edilen *K. lactis* örnekleri ile aynı olduğu görülmektedir (Naumova ve ark. 2004). Bununla birlikte API 32C ve rDNA analizleri bir maya örneklerinin alt türlerini belirlemeye yönelik olmadığından ve saflaştırılan *K. lactis* türlerinin enzimatik özellikleri de farklı olduğundan saflaştırdığımız örneklerinin *K. lactis* türünün farklı alt türleri veya tür içi varyeteleri olduğu varsayılabilir. *K. lactis* MY 22-25, 28, 29 suşlarının farklı alt türler olup olmadığının daha kesin olarak belirlenebilmesi için Kurtzman ve Robnett (1998) tarafından önerilen çoklu gen analizlerinin de yapılması gerekmektedir. Bu testlere alternatif olarak, Naumova ve arkadaşlarının (2005) özellikle *Kluyveromyces* genusu türlerinin ayırt edilebilmesi için geliştirdikleri moleküler markerlar kullanılarak da araştırmalarımızda saflaştırılan *K. lactis* MY 22-25, 28, 29 suşlarının farklı alt türler olup olmadıkları bulunabilir (Naumova ve ark. 2005).

K. lactis MY 22-25, 28, 29 maya suşlarının glikojen içeriklerinin standart *K. lactis* suşundan çok fazla olduğu da araştırmalarımızda ortaya konulmuştur. Glikojen metabolizması direkt olarak karbonhidrat kullanımı ve depolanması ile ilgilidir. Bundan dolayı *K. lactis* MY suşlarında glikojen biyosentezi ve depolanması ile ilgili metabolik yolun standart *K. lactis*'den daha farklı olduğu öne sürülebilir (François ve Parrou 2001). Glikojenin gerektiği zaman hücrede glukozu hidroliz edilerek karbon kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir (François ve Parrou 2001). Glukoz metabolizmasında farklılıklar bulunmasının glikojen depolanmasını önemli derecede etkilediği de bilinmektedir. *K. lactis*'de fosfoglukoz izomeraz enziminin kodlandığı *RAG2* geninin delesyonu sonucu glikojen sentezi ve depolanmasında önemli eksikliklerin olduğu bizim araştırmamızda da kullanılan iyot boyama testi ile gösterilmiştir (Becerra ve ark. 2004). Bu nedenle *K. lactis* MY suşlarında fazla glikojen bulunmasının genetik nedenlerinin belirlenebilmesi için glukoz tüketim hızlarının, glikolitik metabolit miktarlarının, hücre içi ve hücre dışı glikojen miktarlarının da belirlenmesi gerekmektedir. Bu tür metabolik analizler *K. lactis*'de henüz tam olarak yapılmamıştır.

K. lactis MY suşlarının laktaz aktiviteleri ve özellikle invertaz aktiviteleri standart suştan oldukça farklıdır. *K. lactis*'de laktaz geninin transkripsiyonel kontrolü K1Gal4p, K1Gal1p, ve K1Gal80p ile sağlanmaktadır (Anders ve ark. 2006). Bu farklılığın moleküler nedenlerini belirlemek için araştırmalarımızda tanımlanan *K. lactis* MY suşlarının laktaz geni promotor bölgesinin ve *K1GAL4*'ün DNA'ya bağlanma bölgesi ve asidik aktivasyon bölgesinin nükleotid dizileri belirlendi ve bu bölgelerde herhangi bir mutasyon olmadığı bulundu. Bu nedenle *K. lactis* MY suşlarında laktaz ve invertaz aktivitelerinin standart suşa göre oldukça farklı olmasının nedeni bu araştırmada incelenmeyen ve *GAL/LAC* regulonu işleyişine etki eden transkripsiyon faktörleri veya protein kinazlar gibi düzenleyici faktörler olabilir. Standart *K. lactis* suşu olarak kullanılan CBS2359 suşu ile endüstriyel *K. lactis* B1 suşları kullanılarak yapılan bir araştırmada üreme ortamı koşullarına göre bu iki *K. lactis* suşunda 482 genin farklı şekilde kontrol edildiği mikroarray analizi ile belirlenmiştir (Suleau ve ark. 2005). Bu araştırmada ortamda glukoz veya laktoz bulunmasına göre *K. lactis* CBS2359 ve *K. lactis* B1 suşlarında özellikle *GAL/LAC* regulonunu oluşturan genlerin ekspresyon düzeylerinde önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur (Suleau ve ark. 2005). Suleau ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bu araştırmada *K. lactis* CBS2359 suşunda *LAC4* ve *LAC12* genlerinin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında her iki genin de *K. lactis* CBS2359 suşunda yaklaşık % 50 daha fazla ekspres edildiği gösterilmiştir. *K. marxianus* ile yapılan başka bir araştırmada ise laktoz kullanımında polimorfizm olduğu ve laktoz permeaz geni ekspresyonunda (*LAC12*) tür içi farklılıklar bulunduğu gösterilmiştir (Naumov 2006). Benzer bir deneysel yaklaşım ile *K. lactis* MY suşları laktoz içeren ortamda üretilerek bu suşlardan elde edilecek olan RNA' örneklerinin Micro-array tekniği ile analiz edilmesi *K. lactis* MY suşlarında hangi genlerin farklı miktarlarda ekspres edildiğini direkt olarak ortaya koyacaktır.

K. lactis'de üreme veya bölünme hızı (ikilenme süresi) üreme ortamındaki karbon kaynaklarının etkin kullanımına bağlıdır. Laktoz veya diğer karbonhidratların hızlı metabolize edilmesi ikilenme süresini % 30 -% 60 kadar kısaltabildiği ve bununda büyük oranda *GAL/LAC* regulonu genlerinin ekspresyonuna bağlı olduğu bilinmektedir (Czyz ve ark. 1993). Araştırmalarımızda elde edilen *K. lactis* MY suşlarının bazılarında (örneğin MY25 ve MY28) ikilenme süreleri glukoz ve peyniraltı suyu ortamlarında

standart *K. lactis* suşuna göre daha kısadır. İnkilenme sürelerindeki bu farklılık bazı *K. lactis* MY suşlarında *GAL/LAC* regulonun genlerinin ekspresyonunda önemli farklılıklar olduğunu gösteren önemli bir sonuçtur.

Bu araştırmalar sırasında Bursa'daki yerel süt üreticilerinden sağlanan örneklerden metabolik özellikleri farklı yeni *K. lactis* suşları izole edilip tanımlandı. Tanımlanan *K. lactis* suşları bu bölgedeki süt ürünlerinin doğal florasında bulunmakta olup endüstriyel amaçlar için doğal ve yerel *K. lactis* suşları olarak kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

ADAM, A.C., M. RUBIO-TEXEIRA, J. POLAINA. 2004. Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 553-557.

ANDERS, A., H. LILIE, K. FRANKE, L. KAPP, J. STELLING, E.D. GILLES, K.D. BREUNIG. 2006. The galactose switch in *Kluyveromyces lactis* depends on nuclear competition between Gal4 and Gal1 for Gal80 binding. *J. Biol. Chem.* 281: 29337-29348.

ANDRIGHETTO, C., E. PSOMAS, N. TZANETAKIS, G. SUZZI G, A. LOMBARDI. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiol.* 30: 5-9.

BARNETT, J.A., F.W. LICHTENTHALER. 2001. A history of research on yeast 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880- 1900. *Yeast.* 18: 363-388.

BECERRA, M., M.I.G SISO. 1996. Yeast β -galactosidase in solid-state fermentations. *Enzyme Microb Technol.* 19: 39-44.

BECERRA, M., N. TARRIO, M.I. GONZALES-SISO, M. ESPERANZA-CERDAN. 2004. Genome-wide analysis of *Kluyveromyces lactis* in Wild-type and *rag2* mutant strains. *Genome.* 47: 970-978.

BELEM, M.A.H., B.H. LEE. 1998. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *CRC Crit. Rev. Sci. Nutr.* 38: 565-98.

BOLOTIN-FUKUHARA, M., C. TOFFANO-NIOCHE, F. ARTIGUENAVE, G. DUCHATEAU-NGUYEN, M. LEMAIRE, R. MARMEISSE, R. MONTROCHER, C. ROBERT, M. TERMIER, P. WINCKER, M. WESOLOWSKI-LOUVEL. 2000.

Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. FEBS Lett. 487: 66-70.

BONEKAMP, F.J., J. OOSTEROM. 1994. On the safety of *Kluyveromyces lactis*. A review. Applied Microbiol. Biotechnol. 41: 1-3.

BOZE, H., G. MOULIN, P. GALZY. 1987. Uptake of galactose and lactose by *Kluyvermyces lactis*: biochemical characteristics and attempted genetical analysis. J. Gen. Microbiol. 133: 15-23.

BREUNIG, K.D. 1989. Glucose repression of *LAC* gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator *LAC9*. Mol Gen Genet. 216: 422-427.

BREUNIG, K.D, M. BOLOTIN-FUKUHARA, M.M. BIANCHI, D.BOURGAREL, C. FALCONE, I.I. FERRERO, L. FRONTALI, P. GOFFRINI, J.J. KRIJGER, C. MAZZONI, C. MILKOWSKI, H.Y. STEENSMA, M. WESOLOWSKI-LOUVEL, A.M. ZEEMAN. 2000. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. Enzyme Microb. Technol. 26: 771-780.

CARDINALI, G., V. VOLLENBROICH, M.S. JEON, A.A. DEGRAAF, C.P. HOLLENBERG. 1997. Constitutive expression in *gal7* mutants of *Kluyveromyces lactis* is due to internal production of galactose as an inducer of Gal/Lac regulon. Mol. Cell. Biol. 17: 1722-1730.

CARLSON, M. 1999. Glucose repression in yeast. Curr. Opin. Microbiol. 2: 202-207.

CASSART, J.P, I. GEORIS, J. ÖSTLING, H. RONNE, J. VANDENHAUTE. 1995. The *MIG1* repressor from *Kluyveromyces lactis*: Cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 371: 191-194.

CAVAILLE, D., D. COMBES. 1995. Characterization of β -galactosidase from *Kluyvermyces lactis*. Biotechnol. Applied. Biochem. 22: 55-64.

CELENZA, J.L., M. CARLSON. 1984. Cloning and genetic mapping of *SNF1*, a gene required for expression of glucose repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 4: 49-53.

CHANG, Y.D., R.C. DICKSON. 1988. Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis* presence of an unusual transcript structure. J. Biol. Chem. 263: 16696-703.

CHESTER, V.E. 1968. Heritable glycogen-storage deficiency in yeast and its induction by ultra-violet light. J. Gen. Microbiol. 51: 49- 56.

COSENTINO, S. M.E. FADDA, M. DEPLANO, A.F. MULARGIA, F. PALMAS. 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. Int. J. Food Microbiol. 69: 53-58.

CZYZ, M, M.M. NAGIEC, R.C. DICKSON. 1993. Autoregulation of *GAL4* transcription is essential for rapid growth of *Kluyveromyces lactis* on lactose and galactose. Nucleic Acids Res. 18: 4378-4382.

DeVIT, M.J, J.A. WADDLE, M. JOHNSTON. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. Mol. Biol. Cell. 8: 1603-1618.

DeVOS, W.M., E.E. VAUGHAN. 1994. Genetics of lactose utilization in lactis-acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. 15: 18-21

DICKSON, R.C, L.R. DICKSON, J.S. MARKIN. 1979. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. 137: 51-61.

DICKSON, R.C, J.S. MARKIN. 1980. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. 142: 777-785.

DICKSON, R.C., K. BARR. 1983. Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. 154: 1245-51.

DONG, J., R.C. DICKSON. 1997. Glucose represses the lactose-galactose regulon in *kluyveromyces lactis* through a *SNF1* and *MIG1*-dependent pathway that modulates galactokinase (*GAL1*) gene expression. Nucleic Acids Res. 25: 3657-3664.

DURRENS, P., D.J. SHERMAN. 2005. A systematic nomenclature of chromosomal elements for hemiascomycete yeasts. Yeast. 22: 337-342.

EL-GINDY, A. 2003. Production, partial purification and some properties of beta-galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. Folia Microbiol. 48: 581-584.

ENTIAN K.D., J.A. BARNETT. 1983. Some genetic and biochemical attempts to elucidate the energetics of sugar uptake and explain the Kluyver effect in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Curr. Genet. 7: 323-325.

FADDA, M.E., S. COSENTINO, M. DEPLANO, F. PALMAS. 2001. Yeast populations in Sardinian feta cheese. Int. J. Food Microbiol. 69: 153-156.

FADDA, M.E., V. MOSSA, M.B. PISANO, M. DEPLANO, S. COSENTINO. 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. Int. J. Food Microbiol. 95: 51-59.

FLATZ, G. 1987. Genetics of lactose digestion in humans. Adv. Hum. Genet. 16: 1-77.

FLEET, G.H., M.A. MIAN. 1987. The occurrence and the growth of yeasts in dairy products. Int. J. Food Microbiol. 4: 145-155.

FLORES, M.V., C.E. VOGET, R.J.J. ERTOLA. 1994. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. Enzyme Microb Technol. 16: 340-346.

FRANÇOIS, J., M.E. VILLANUEVA, H.G. HERS. 1988. The control of glycogen metabolism in yeast. 1. Interconversion in vivo of glycogen synthase and glycogen phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or uncouplers. *Eur. J. Biochem.* 174: 551-559.

FRANÇOIS, J., J.L. PARROU. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 125-145.

FUKUHARA, H. 2006. *Kluyveromyces lactis*, a retrospective. *FEMS Yeast Research.* 6: 323-324.

FUSON, G.B., H.L. PERSLEY, H.J. PHAFF. 1987. Deoxyribonucleic acid base sequence relatedness among members of the yeast genus *Kluyveromyces*. *Int. J. Bacteriol.* 37: 371-379.

GANCEDO, J.M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 11: 334-361.

GEKAS, V., M. LOPEZLEIVA. 1985. Hydrolysis of lactose, a literature review. *Process Biochem.* 20: 2-12.

GEORIS, I., J.-P. CASSART, K.D. BREUNIG, J. VANDENHAUTE. 1999. Glucose repression of the *Kluyveromyces lactis* invertase gene *KLINV1* does not require Mig1p. *Mol. Gen. Genet.* 261: 862-870.

GOFFRINI, P., A. FICARELLI, I. FERRERO. 1995. Hexokinase activity is affected in mutants of *Kluyveromyces lactis* resistant to glucose repression. *Microbiology.* 141: 441-447.

GOFFRINI, P., A. FICARELLI, I. FERRERO. 1996. FOG1 and FOG2 genes, required for the transcriptional activation of glucose repressible genes of *Kluyveromyces lactis*,

are homologous to *GAL83* and *SNF1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 29: 316-326.

GOLDSTEIN, A., J.O. LAMPEN. 1975. β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase from yeast. *Methods Enzymol.* 42c, 504-511.

GÖDECKE, A., W. ZACHARIAE, A. ARVANITIDIS, K.D. BREUNIG. 1991. Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple *LAC9* binding sites in a 2.6 Kbp divergent promoter. *Nucleic Acids Res.* 19: 5351-5358.

GONZALES-SISO, M.I., M.A. FREIRE-PICOS, E. RAMIL, M. GONZALES-DOMINGUEZ, A. RODRIGUEZ-TORRES, M.E. CERDAN. 2000. Respirofermentatif metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. *Enzyme Microb Technol.* 26: 699-705.

GUNJA-SMITH, Z., N.B. PATIL, E.E. SMITH. 1977. Two pools of glycogen in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* 130: 818-825.

GUARENTE, L., 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101: 181-191.

HALLMAN, F. 2000. Toxicity of commonly used laxatives. *Med. Sci. Monit.* 6: 618-28.

HENRISSAT, J., A. BAIROCH. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolyses based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-8.

HENRISSAT, J., A. BAIROCH. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 316: 695-696.

HILGENDORF, M.J. 1981. Optimization of fungal lactase levels in yogurt manufacturing. *Cult. Dairy. Prod.* 16: 5-7.

HOYOUX, A., I. JENNES, P. DUBOIS, S. GENICOT, F. DUBAIL, J.M. FRANÇOIS. 2001. Cold adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1529-35.

JACOB, F., J. MONAD. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356.

JIMENEZ-GUZMAN, J., A.E. CRUZ-GUERRERO, G. RODRIGUEZ SERRANO, A. LOPEZ-MUNGIA, L. GOMEZ-RUIZ, M. GARCIA-GARIBAY. 2002. Enhancement of lactase activity in milk by reactive sulphhydryl groups induced by heat treatment. *J. Dairy. Sci.* 85: 2497-502.

JOHNSTON, M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51: 458-76.

KANG, H.A., W.K. WANG, S.M. GO, A. REZAEI, S.H. KRISHNA, S.K. RHEE. 2005. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* gal1 Δ and gal Δ hvk2 Δ mutants expressing recombinant proteins from the GAL promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 619-29.

KIM, C.S., E.S. JI, D.K. OH. 2003. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Lett.* 25: 1769-1774.

KOSIKOWSKI, F. V. 1979. Whey utilization and whey products. *J. Dairy sci.* 62: 1149-60.

KOUTINAS, A.A. 2003. Kefir yeast Technology. In: Pandey A. Roussos S, Socol C. R. Augur C. Editors, *New horizons in biotechnology*, Dordrecht. Kluwer Academic Publishers, p. 297-310.

KUGER, P., A. GÖDECKE, K.D. BREUNIG. 1990. A mutation in the Zn-finger of the GAL4 homolog LAC9 results in glucose repression of its target genes. *Nucleic Acids Res.* 18: 745-751.

KURTZMAN, C.P., C.J. ROBNETT. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73: 331-371.

KURTZMAN, C.P., J.W. FELL. 2000. *The Yeasts, A Taxonomic Study.* Fourth Revised and Enlarged Edition. Elsevier Science BV. Amsterdam, The Netherland, 2000.

KURTZMAN, C.P., C.J. ROBNETT. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the *Saccharomyces* complex determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3: 417-432.

KUZHANDAIVELU, N., W.K. JONES, A.K. MARTIN, R.C. DICKSON. 1992. The signal for glucose repression of the lactose-galactose regulon is amplified through subtle modulation of transcription of the *Kluyveromyces lactis* *Kl-GAL4* activator gene. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1924-1931.

LACHANCE, M. A. 2007. Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS Yeast Research.* 7: 642-645.

LEE, Y. J., C.S. KIM, D.K. OH. 2004. Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 787-793.

LILLIE, S.H., J.R. PRINGLE. 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* 143: 1384-1394.

LODI, T., D. CONNOR, P. GOFFIRINI, I. FERRERO. 1994. Carbon catabolite repression in *Kluyveromyces lactis*: isolation and characterization of the *KIDLD* gene

encoding the mitochondrial enzyme D- lactase ferricytochrome c oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.* 244: 622-629.

LOHR, D., P. VENKOV, J. ZLATANOVA. 1995. Transcriptional regulation in the yeast GAL genes family: a complex genetic network. *FASEB J.* 9: 777-87.

MACFARLANE, G.T., H. STEED, S. MACFARLANE. 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104: 305- 344.

MARMORSTEIN, R., M. CAREY, M. PTASHNE, S.C. HARRISON. 1992. DNA recognition by *GAL4*: structure of a protein–DNA complex. *Nature.* 356: 408–414.

MARMORSTEIN, R., S.C. HARRISON. 1994. Crystal-Structure of a PPR1-DNA complex-DNA recognition by proteins containing a Zn(2)Cys(6) binuclear cluster. *Genes Development.* 8: 2504-2512.

MAWSON, A.J. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technol.* 47: 195-203.

MENDEZ, A., A. OLANO.1979. Lactulose: A review on some chemical properties and application in infant nutrition and medicine. *Dairy. Sci. Abstr.* 41: 531-5.

MEYER, J., A. WALKER-JONAH, C.P. HOLLENBERG. 1991. Galactokinase encoded by *GAL1* is a bifunctional protein required for induction of the *GAL* genes in *Kluyveromyces lactis*. And is able to supress the *gal3* phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5454-5461.

MOULIN, G., P. GALZY. 1984. Whey, a potential substrate for biotechnology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 1: 347-73.

NAIM, H.Y. 2001. Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactose-phlorizin hydrolase. *Histol. Histopathol.* 16: 553-561.

NAUMOVA, E.S, N.N. SUKHOTINA, G.I. NAUMOV. 2004. Molecular-genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. *FEMS Yeast Research.* 5: 263-269.

NAUMOVA, E.S, N.N. SUKHOTINA, G.I. NAUMOV. 2005. Molecular markers for differentiation between the closely related dairy yeast *Kluyveromyces lactis* var. *Lactis* and wild *Kluyveromyces lactis* strains from the European “Krassilnikovii” population. *Microbiology.* 74: 329-335.

NAUMOV, G.I. 2006. Genetics of lactose utilization polymorphism in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Doklady Biol. Sci.* 409: 317-319.

O’CONNELL, S., G. WALSH. 2008. Application relevant studies of fungal beta-galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. *Applied Biochem. Biotechnol.* 149: 129-138.

OLCHOWY, T.W., R.D. LINNABARY, F.M. ANDREWS, R.C. LONGSHORE. 1993. Lactose intolerance in a calf. *J. Vet. Intern. Med.* 7: 12-5.

O’LEARY, V.S., J.H. WOYCHIK. 1976. A comparison of some chemical properties of yogurts made from control and lactose treated milks. *J. Food Sci.* 41:791-3.

PERLMAN, D., J.E. HOPPER. 1979. Constitutive synthesis of the GAL4 protein, a galactose pathway regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* 16: 89-95.

PERMYAKOV, E.A., L.J. BERLINER. 2000. Alpha-lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett.* 473: 269-274.

RIVERO-URGELL, M., A. SANTAMARIA-ORLEANS. 2001. Oligosaccharides: application in infant food. *Early Hum. Dev.* 65: 43-52.

RODRIGUEZ-BELMONTE, E., I. GONZALES-SISO, E. CERDAN. 1998. The *Kluyveromyces lactis* gene *KIGSK-3* combines functions which in *Saccharomyces cerevisiae* are performed by *MCK1* and *MSD1*. *Curr. Genet.* 33: 262-267.

RONNE, H. 1995. Glucose repression in fungi. *Trends. Genet.* 11: 12-17.

ROSE, M.D., F. WINSTON, P. HIETER. 1990. *Methods in Yeast Genetics. A laboratory Course Manual.* Cold Spring Harbor Lab. Press. New York. USA. p. 119-195.

ROTHER, C., L. LEHLE. 1998. Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal recognition particle. *Eur. J. Biochem.* 252: 16-24.

ROUWENHORST, R.J., W.S. RITMEESTER, W.A. SCHEFFERS W, J.P. VAN DIJKEN. 1990. Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3329-3336.

RUBIO-TEXEIRA, M. 2005. A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research.* 5: 1115–1128.

RUBIO-TEXEIRA, M. 2006. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol. Adv.* 24: 212-225.

RUZZI, M., K.D. BREUNIG, G. FICCA, C.P. HOLLENBERG. 1987. Positive regulation of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an

upstream activation site that shows homology to the GAL upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 7: 991-997.

SALMERON Jr, J.M., S.A. JOHNSTON. 1986. Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene *LAC9* reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* *GALA* gene. Nucleic Acids Res. 14: 7767-7781.

SCHAFFRATH, R., K.D. BREUNIG. 2000. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Fungal Genet. Biol. 30: 173-190.

SHEETZ, R.M., R.C. DICKSON. 1981. *LAC4* is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. Genetics. 98: 729-745.

SIDENBERG, D.G., M.A. LACHANCE. 1986. Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* populations and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der walt. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 94-102.

SISO, M.I.G. 1994. Beta-galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey. Batch versus Fed-batch cultures. Process Biochem. 29: 565-568.

SISO, M.I.G. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. Bioresource Technol. 57: 1-11.

SOR, F., H. FUKUHARA. 1989. Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. Yeast. 5: 589-595.

STEPHENS, A. M., A.C. HADDAD, S.J. PHILLIPS. 1983. Passage of carbohydrates into the colon. Gastroenterology. 85: 589-595.

SULEAU, A., N. JACQUES, J. REITZ-AUSSEUR, S. CASAREGOLA. 2005. Intraspecific gene expression variability in the yeast *Kluyveromyces lactis* revealed by micro-array analysis. FEMS Yeast Research. 5: 595-604.

SWALLOW, D.M. 2003. Genetics of lactose persistence and lactose intolerance. *Annu. Rev. Genet.* 37: 197-219.

SZILAGYI, A. 2002. Review Article: lactose- a potential prebiotic. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 1591-1602.

TANAKA, N., N. OHUCHI, Y. MUKAI, Y. OSAKA, Y. OHTANI, M. TABUCHI, M. S.A. BHUIYAN, H. FUKUI, S. HARASHIMA, K. TAKEGAWA. 1998. Isolation and characterization of an invertase and its repressor genes from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 246-253.

THOMSON, M.P., D.M. GYURICSEK. 1974. Manufacture of cheddar cheese from hydrolyzed lactose milk. *J. Dairy. Sci.* 57: 598-602.

TORNADIJO, M.E., J.M. FRESNO, R.M. SARMIENTO, J. CARBALLO. 1998. Comparison of the classical methods and the API ATB 32C system in the identification of yeasts isolated from goat cheese. *Food Research International.* 30: 653-658.

TRUMBLY, R.J. 1992. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6: 15-21.

TÜRKEKEL, S. 2006. Comparative analysis of glycogen and trehalose accumulation in methylotrophic and nonmethylotrophic yeasts. *Microbiology.* 75: 639-643.

URL 1: WWW.GENOLEVURES.ORG (25.11. 2009).

VAN OUYEN, A.J.J., P. DEKKER, M. HUANG, M.M.A OLSTHOORN, D.I. JACOBS, P.A. COLUSSI, C.H. TARON. 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research.* 6: 381-392.

VAUGHAN-MARTINI, A., A. MARTINI. 1985. Perfect-imperfect relationship within the yeast genus *Kluyveromyces*. *Annals Microbiol.* 35: 93-97.

VAUGHAN-MARTINI, A., A. MARTINI. 1987. Taxonomic revision of the yeast genus *kluyveromyces* by nuclear deoxyribonucleic acid reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 380-385.

VINCENT, O., R. TOWNLEY, S. KUCHIN, M. CARLSON. 2001. Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose sensing mechanism. *Genes. Dev.* 15: 1104-1114.

WEIRICH, J., P. GOFFIRINI, P. KUGER, I. FERRERO, K.D. BREUNIG. 1997. Influence of mutations in hexose transporter genes on glucose repression in *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Biochem.* 249: 248-257.

WESOŁOWSKI-LOUVEL, M., K.D. BREUNIG, H. FUKUHARA. 1996. *Kluyveromyces lactis*. In Wolf K, (Editor), *Nonconventional yeast in biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, p. 139-202.

WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE, J. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Editors), *PCR Protocols, A guide to methods and applications*, Academic Press Inc. San Diego, CA., USA., p 315- 322.

WITTE, M.M., R. C. DICKSON. 1988. Cysteine residues in the zinc finger and amino acids adjacent to the finger are necessary for DNA binding by the *LAC9* regulatory protein of *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3726-3733.

WITTE, M.M., R.C. DICKSON. 1990. The C6 zinc finger and adjacent amino acids determine DNA-binding specificity and affinity in the yeast activator protein *LAC9* and *PPR1*. *Mol. Cell Biol.* 10: 5128-5137.

YANG, S.T., E.M. SILVA. 1995. Novel products and new Technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J. Dairy Sci.* 78: 2541-2562.

ZACHARIAE, W., K.D. BREUNIG. 1993. Expression of transcriptional activator LAC9 (K1GAL4) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation. *Mol. Cell Biol.* 13: 3058-3066.

ZACHARIAE, W., P. KUGER, K.D. BREUNIG. 1993. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator LA1C9 (K1GAL4). *Nucleic Acids Res.* 21: 69-77.

ZENKE, F., W. ZACHARIAE, A. LUNKES, K.D. BREUNIG. 1993. Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differentially to glucose repression of galactose regulon. *Mol. Cell Biol.* 13: 7566-7576.

7. EKLER

EK. 1. Üreme Ortamları ve Çözeltilerin Hazırlanması

1. YP (Yeast Extract, Pepton)

YP besiyeri araştırmalarımızda zengin besiyeri olarak kullanıldı. Sıvı YP besiyeri için 10 gr maya özütü, 20 gr pepton toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Karışım otoklavda 121 °C'de 25 dk. steril edildi. YP petrilere için YP ortamına 20 gr/l olacak şekilde agar agar eklendi.

2. Sodyum Propiyonat

Sodyum Propiyonat (Sigma) %1'lik stok çözelti olarak distile suda çözüldü, 45 µm'lik sterilizasyon filtresi ile steril edildi, YGC agar petrilere otoklavdan sonra son konsantrasyonu % 0,2 olacak şekilde eklendi

3. Sodyum Sitrat

Sodyum Sitrat konsantrasyon %2 olacak şekilde hazırlandı.

4. YGC Agar (Maya özütü, glukoz, Kloramfenikol)

Üretici firma (Merck, 1.16000.0500) açıklandığı şekilde 40 gr YGC agar karışımı 1 litre distile suda suspansiyon olarak hazırlanıp otoklavda standart şartlarda steril edilerek petrilere döküldü.

5. Glukoz, Laktoz ve Gliserol Stok Çözeltileri

Glukoz, laktoz ve gliserol %20'lik çözeltiler olarak distile suda hazırlandı ve otoklavda steril edildi. Sterilizasyondan sonra üreme ortamlarına karbonhidrat kaynağı olarak stok çözeltilerden son konsantrasyonları ilgili çizelgelerde belirtildiği şekilde ilave edildi.

6. YNB (Yeast Nitrogen Base)

Yeast Nitrogen Base (YNB) minimal üreme ortamı olarak maya suşlarının üretilmesi için sıvı veya son konsantrasyonu %2 olacak şekilde agar agar eklenerek katı besiyeri olarak kullanıldı. YNB ortamının hazırlanmasında; 1,7 gram YNB (Sigma

Y1251), 5 gram amonyum sülfat toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. 121 °C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. YNB üreme ortamlarına karbonhidrat kaynakları olarak stok çözeltilerden sterilizasyondan sonra verilen konsantrasyonlarda taze olarak eklendi.

7. Laktaz Aktivitesi ölçüm ve hücre lizis tamponu

Laktaz tampon çözeltisi (Z-Buffer) aşağıda verilen iyon konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde stok çözelti olarak ilgili kimyasallar kullanılarak distile suda 1 litre olarak hazırlandı.

5 mM Tris/HCl pH: 7.05

10 mM KCl

%5 Gliserol

0.1 mM PMSF

PMSF 80 mM stok çözelti olarak absolu etanolde çözüldü ve bu stok çözeltilerden son konsantrasyonu 0.1 mM olacak şekilde laktaz tampon çözeltisine ilave edildi. Laktaz tampon çözeltisi deneyler süresince +4 °C'de saklandı.

8- ONPG (O-Nitro phenyl β -D-Galactoside)

ONPG (Sigma N1127) toplam konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde taze olarak 50 ml'lik laktaz tampon çözeltisi içinde hazırlandı. ONPG Stok çözeltisi +4 °C'de saklandı.

9- 1 M sodyum karbonat

106 gr Na₂CO₃ toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Deneyler süresince oda sıcaklığında saklandı.

10- 1x TE, pH:7.4

10mM Tris.HCl, pH:7.6

1mM EDTA, pH:8.0

11. Enzim Aktivitelerinin Hesaplanması

Laktaz (β -Galaktosidaz) Aktivitesinin Hesaplanması

Kluyveromyces suşlarının laktaz enzim aktiviteleri aşağıdaki eşitliğe göre hesap edildi.

$$\text{Aktivite: } (\text{OD}_{420} \times 1000) / (\text{t} \times \text{V} \times \text{OD}_{600})$$

Bu eşitlikte;

Aktivite: Miller Ünitesi, MÜ.

OD_{420} : Laktaz reaksiyonunda oluşan sarı rengin 420nm'deki absorbanası

T: Laktaz reaksiyon süreci

(Dakika cinsinden verilmelidir)

V: $v_h \times$ Konsantrasyon faktörü

V_h : Laktaz reaksiyonunda kullanılan hücre süspansiyonu hacmi (genellikle 0.02 ml)

Konsantrasyon faktörü: 5 ml hücre çöktürüp 0.2 ml maya lizis çözeltisinde çözüldüğünden konsantrasyon faktörü 25 olacaktır. Deneylerde kullanılan hücre hacmine göre değişebilir.

OD_{600} : laktaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan 1 ml *Kluyveromyces* hücrelerinin 600 nm'deki ölçüm değeri.

İnvertaz Aktivitesinin Hesaplanması

Kluyveromyces suşlarının invertaz enzim aktiviteleri aşağıdaki eşitliğe göre hesap edildi.

$$(\Delta_A \text{Örnek} / \Delta_A \text{Standart}) \times \text{Standart konsantrasyonu} = \text{İnvertaz Aktivitesi}$$

$\Delta_A \text{Örnek}$: Örneklerin OD_{546} 'daki absorbanası

$\Delta_A \text{Standart}$: Standart glukoz çözeltisini OD_{546} 'daki absorbanası

Standart konsantrasyonu: Standart glukoz konsantrasyonu (5.55nmol/L) olarak kullanıldı. Glukoz konsantrasyonlarının ölçümünde Biocon glukoz tayin kiti kullanıldı.

İnvertaz Aktivitesi. Bir ünite invertaz enzimi, 1µmol glukoz/dakika/100mg kuru ağırlığa eşittir.

12. Glukoz-Oksidaz-Peroksidaz

Biocon Diagnostik firması tarafından üretilen glukoz ölçüm kiti (GOD-POD kiti) üretici firma tarafından önerilen ve bölüm 3. 7’de açıklandığı şekilde kullanıldı. GOD-POD kiti deneyler süresince +4 °C’de saklandı.

EK. 2. *K. lactis* Suşlarının ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Bölgesi Nükleotid Dizileri.

Nükleotid karşılaştırmaları ilgili kromatogramlarda sekansların net olarak okunabildiği altı çizili olarak verilen bölgeler arasında yapılmıştır.

1- Standart *K. lactis* suşu (ATCC8585).

GGGAAATAGAGAGTAATACTGGGGGATCGCTGAAATGGCCTGCGCTTAATTGCGCG
 GCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCGTTTTCTTCTCTCATCCTAAACACAATGGAGTT
 TTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAA
 ACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAAACTTTC
 AACACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGT
 ATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTC
 TGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTT
 TGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTCGGGTTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCTT
 CTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACGTC
 TTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCTTATAGGTGTTATAA
 AGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAATCAAAACTCTCAAAGTT
 TGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAGCGGAGGA
 A

2. *K. lactis* MY22.

GGGAAATATGATGATAATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGCG
 CGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTCTCTCATCCTAAACACAATGGA
 GTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACA
 CAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAAACT
 TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATA
 TGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
 CTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGG
 GTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTCGGGTTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCC
 TTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACG
 TCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCTTATAGGTGTTATA
 AAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAATCAAAACTCTCAAAGT
 TTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAA
 GAAAA

3. *K. lactis* MY23.

GGGAAATTGATGATAATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGCGC
 GGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCTAAACACAATGGAG
 TTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACAC
 AAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAAAACTT
 TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAT
 GTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
 TCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGG
 TTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCC
 TTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACG
 TCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCTTATAGGTGTTATA
 AAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAATCAAAAACTCTCAAAGT
 TTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAGGCCGGAA
 GAAA

4. *K. lactis* MY24.

CCCGATAATATGATGAGAGATACTGGGGGATCGCTGAAATGGCCTGCGCTTAATTG
 CGCGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCTAAACACAATG
 GAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAA
 CACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAAA
 ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCG
 ATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCCTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGC
 GCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTT
 TGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGT
 TGCCTTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACATC
 TACCTCTTAGGTTTGCGCCAATTCCTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCTTATAAGTGT
 TATAAAGACTCGCCTGTGTTTGTCTCCTGAGGCCTACGGCTAATTCAAAAACTCTCA
 AAGTTTGACCCTCGAATCAGGGTAGGAATACCCCTGAACTTTAAGACAAATCAA
 TAAACCGAAAGAAAGCTTTTTTTTTCTCCGCTCGCATGCGCAACAATTAATAATCC
 CTTACTTAGAACAACCCGGGAAACCTTTTCCCCGAGCCCGAAACAAGAGAAAA
 ACCTTCCCTACCATTTCTTGGGGGG

5. *K. lactis* MY25.

GGGAAATAGATGATAATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGCGC
GGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCCTAAACACAATGGAG
TTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACAC
AAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAT
GTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
TCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGG
TTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCC
TTCTCCCTGAACAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACCTCTACG
ACTTAAGTTTGACACCAATTCGTGGTAAGCCAGGGCCAGGGAACATAACCGTTCTA
ATAAAGAACCCCTAGGTGTTTGTCTCCCTTGAGGATTCCGGATTTATCCAAAACCT
CAAGGTTTGGACCCCAATCCAAGGTCGAAATACCCCTGGAACCTTAAAACCAAT
ATAAAAAAGGCGGAAAAAAAATTTTCCCCTGGCTGGGCCACACATGGAATAG
GAAATCCCAGGCAGTAAAAAAAATTTGGCAAATCCTCTTTCCCAGAGCCCCCCC
AGGGAAAAAACCTTCC

6. *K. lactis* MY28.

GGATAATTGATAGTGATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGCGC
GGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCCTAAACACAATGGAG
TTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACAC
AAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCAAGAAATTTAATATTCAAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAT
GTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
TCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGG
TTTGGTAGTGAGTGATACTCGTTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCC
TTCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACG
TCTTAGGTTTGCCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCTTATAGGTGTTATA
AAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAATCAAAACTCTCAAAGT
TTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGNCCGA
GGAAAA

7. *K. lactis* MY29.

GGATAATTGATGANAGATACTGGGGGATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAA
TTGCGCGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTATCAGTTTTCTTTCTCTCATCCTAA
ACACAATGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTC
CAGTGGACATAAACACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTTATCA
AGAAATTTAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTG
AATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCAT
GCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGAT
ACTCGTTTTTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCTTCTGCGTGAG
CAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGCACATCTACGTCTTAG
GTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTAGGGTCAATGAGCTTATAGGTGTTATAA
AGACTCGCTGGTGTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTAATCAAAACTCTCA
AAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgileri ve yardımları ile daima destek olan danışmanım Prof. Dr. Sezai TÜRKEL'e ve manevi yardımlarından dolayı eşime ve aileme sonsuz teşekkür ederim. Araştırmalarımızın gerçekleşmesi için proje desteği sağlayan TÜBİTAK-TOVAG'a (Proje no: TOVAG-COST-928 (104 O 270)) ve proje yürütümüz sayın Prof. Dr. Şebnem HARSA'ya (İYTE), DNA sekans analizlerindeki teknik yardımları nedeni ile biyolog Yeliz YÜCEL'e, Moleküler Genetik araştırma laboratuvarında araştırmalarım süresince deneylerimde bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkürler ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Nükhet KAYAKENT 1978 yılında Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 1995 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. Bu bölümden 2000 yılında Biyolog ünvanını alarak mezun oldu.

2000 yılında Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisansa başladı. 2003 yılında Yüksek lisansını tamamlayarak 2003 yılında Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı.