

ULUDAĞ UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***KLUYVEROMYCES* TÜRLERİNDE GLİKOJEN VE TREHALOZ
METABOLİZMASININ ANALİZİ**

Çiğdem EGEL

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2005

ULUDAĞ UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLUYVEROMYCES TÜRLERİNDE GLİKOJEN VE TREHALOZ
METABOLİZMASININ ANALİZİ

Çiğdem EGEL

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 19/08/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile /oy
çokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sezai TÜRKEL (Danışman)

Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU

Doç. Dr. Nazan DAĞÜSTÜ

Prof. Dr. Güher GÖRAL

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT

Sezai Türkkel

Rahmi Bilaloğlu

Nazan Dağüstü

Güher Göröl

Tülay Turgut

ÖZET

KLUYVEROMYCES TÜRLERİNDE GLİKOJEN VE TREHALOZ METABOLİZMASININ ANALİZİ

Bu çalışmada üreme ortamı şartlarının farklı *Kluyveromyces* türlerinde glikojen ve trehaloz metabolizmasına etkileri araştırıldı. *Kluyveromyces* türleri karbon kaynağı olarak glukoz veya laktoz içeren üreme ortamlarında üretildiklerinde sadece *K. lactis* var. *drosphilarum*'da glikojen birikimi gözlemlendi. Fakat aynı maya türleri gliserol içeren ortamda üretildiğinde *K. lactis* var. *drosphilarum*'da ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*'ta glikojen birikimi olduğu gözlemlendi. Glukoz veya gliserol içeren üreme ortamlarında üretilen *Kluyveromyces* türlerinden sadece *K. thermotolerans*'ta trehaloz birikimi gözlemlendi.

Azot açlığının araştırmada kullanılan *Kluyveromyces* türlerinde çok fazla miktarda glikojen ve trehaloz birikimine yol açtığı bulundu. Isı şokundan sonra *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*'ta fazla miktarda glikojen birikimi gözlemlendi. Isı şokuna maruz bırakılan *K. thermotolerans* ve *K. lactis* var. *drosphilarum*'da önemli miktarda trehaloz birikimi de görüldü. Ozmotik stresin sadece bazı *Kluyveromyces* türlerinde düşük miktarda glikojen birikimine neden olduğu gözlemlendi.

Kluyveromyces türlerinde düşük miktarda azot veya bazı alkoller ile uyarıldığında pseudohifsel üremenin olduğu bulundu. Buna ek olarak, azot açlığı veya bazı alkoller ile pseudohifsel üreme uyarıldığında *Kluyveromyces* türlerinde fazla miktarda glikojen ve trehaloz birikimi gözlemlendi. Bazı *Kluyveromyces* türlerinde glikojen ve trehalozun biyosentez veya yıkımının hızlı bir şekilde olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: *Kluyveromyces*, glikojen, trehaloz, azot açlığı, ısı şoku, ozmotik stres, pseudohifsel üreme

ABSTRACT**ANALYSIS OF GLYCOGEN AND TREHALOSE METABOLISM IN THE
KLUYVEROMYCES SPECIES**

In this study, the effects of growth conditions on the glycogen and trehalose metabolism of different *Kluyveromyces* species were investigated. When the *Kluyveromyces* species were cultivated in glucose or lactose containing rich media, glycogen accumulation was observed only in *K. lactis* var. *drospilarum*. However, when the same yeast species were cultivated in glycerol media, glycogen accumulation was detected in *K. lactis* var. *drospilarum* and *K. marxianus* var. *bulgaricus*. Trehalose accumulation was observed only in *K. thermotolerans* when it is cultivated in glucose or glycerol media.

It was found that the nitrogen starvation led to a high level of glycogen and trehalose accumulations in the some *Kluyveromyces* species used in this study. High level of glycogen accumulation were observed in *K. lactis* var. *drospilarum* and *K. marxianus* var. *bulgaricus* after the heat shock. Significant levels of trehalose accumulation were also observed in *K. thermotolerans* and *K. lactis* var. *drospilarum* when these species exposed to heat stress. Osmotic stress led to low levels of glycogen accumulation only in some *Kluyveromyces* species.

Pseudohyphal growth was also observed in *Kluyveromyces* species when it is induced by low nitrogen or by certain alcohols. Furthermore, high level of glycogen and trehalose accumulation were observed in the *Kluyveromyces* species when the pseudohyphal growth induced by low nitrogen or by alcohols. It was shown that the synthesis or degradation of glycogen and trehalose can occur rapidly in certain *Kluyveromyces* species.

Key Words: *Kluyveromyces*, glycogen, trehalose, nitrogen starvation, heat shock, osmotic stress, pseudohyphal growth

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. <i>Kluyveromyces</i> Genusunun Özellikleri.....	3
2. 1. 1. <i>Kluyveromyces</i> Genusunun Fizyolojisi ve Genetik Yapısı....	4
2. 1. 2. <i>Kluyveromyces</i> Genusunun Metabolik Özellikleri.....	5
2. 2. Trehaloz ve Glikojen Metabolizması.....	7
2. 3. Mayalarda Depo Karbonhidratlarının Fonksiyonları.....	16
2. 3. 1. Glikojen ve Trehalozun Karbon Kaynağı Olarak Kullanımı.....	16
2. 3. 2. Glikojen ve Trehalozun Glikolizin Düzenlenmesindeki Önemleri.....	17
2. 3. 3. Glikojen ve Trehalozun Stres Şartlarından Korumadaki Önemleri ve Kullanımları.....	19
2. 4. Mayalarda Pseudohifsel Üreme ve Depo Karbonhidratları.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3. 1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üretilmeleri.....	29
3. 2. Glikojen ve Trehaloz Ölçümleri.....	30
3. 2. 1. Kalitatif Glikojen Tayini.....	30
3. 2. 2. Glikojen ve Trehalozun Enzimatik Tayini.....	30
3. 3. Azot Eksikliği ve Isı Şokunun Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisi.....	32
3. 3. 1. Azot Açlığının Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi.....	32

3. 3. 2. Isı Şokunun Glikojen ve Trehaloz Metabolizmasına etkisi	32
3. 4. Ozmotik Stresin Uygulanması	33
3. 5. Pseudohifsel Üremenin Uyarılması	33
3. 6. <i>K. lactis</i> var. <i>drosophylarum</i> 'da Glikojen Biyosentez Miktarının ve Yıkım Şeklinin Belirlenmesi.....	34
3. 7. <i>K. thermotolerans</i> 'da Trehaloz Biyosentez Miktarının ve Yıkım Şeklinin Belirlenmesi.....	35
3. 8. Mikroskopik Yöntemler.....	36
4. BULGULAR.....	37
4. 1. <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Kalitatif Glikojen Tayini.....	37
4. 1. 1. YPD'de Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen Tayini.....	37
4. 1. 2. Azot Açlığında Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen Tayini.....	40
4. 2. YPD'de Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen Miktarının Belirlenmesi.....	42
4. 3. YPG'de Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen Miktarlarının Belirlenmesi.....	44
4. 4. YPD'de Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Trehaloz Miktarlarının Belirlenmesi.....	46
4. 5. YPG'de Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Trehaloz Miktarlarının Belirlenmesi.....	48
4. 6. Azot Açlığında Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Belirlenen Glikojen ve Trehaloz Miktarları.....	50
4. 6. 1. Azot Açlığında Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen Miktarlarının Belirlenmesi.....	50
4.6.2. Azot Açlığında Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Trehaloz Miktarlarının Belirlenmesi.....	52
4. 7. Isı Şokunun <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisi.....	54
4. 7. 1. Isı Şokunun <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi.....	54

4. 7. 2. Isı Şokunun <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi.....	56
4. 8. Ozmotik Şokun <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisi	57
4. 8. 1. Ozmotik Şokun <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi	57
4. 8. 2. Ozmotik Şokun <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi	59
4. 9. <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Pseudohifsel Farklılaşmanın Uyarıldığı Koşullarda Glikojen ve Trehaloz Miktarları	61
4. 9. 1. <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Pseudohifsel Farklılaşmanın Uyarıldığı Koşullarda Glikojen Miktarının Belirlenmesi	61
4. 9. 2. <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Pseudohifsel Farklılaşmanın Uyarıldığı Koşullarda Trehaloz Miktarının Belirlenmesi	63
4. 10. YPD’de Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Glikojen Sentez Miktarı ve Yıkım Şeklinin Belirlenmesi.....	65
4. 10. 1. YPD’de Üretilen <i>K. lactis</i> var. <i>drosphilarum</i> ’da Glikojen Sentez Miktarının Belirlenmesi	65
4. 10. 2. YPD’de Üretilen <i>K. lactis</i> var. <i>drosphilarum</i> ’da Glikojen Yıkım Şeklinin Belirlenmesi	66
4. 11. YPD’de Üretilen <i>Kluyveromyces</i> Türlerinde Trehaloz Sentez Miktarının ve Yıkım Şeklinin Belirlenmesi.....	67
4. 11. 1. YPD’de Üretilen <i>K. thermotolerans</i> ’ta Trehaloz Sentez Miktarının Belirlenmesi.....	67
4. 11. 2. YPD’de Üretilen <i>K. thermotolerans</i> ’ta Trehaloz Yıkım Şeklinin Belirlenmesi	68
4. 12. <i>Kluyveromyces</i> ’de Pseudohifsel Farklılaşmanın Uyarılması	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	73
6. KAYNAKLAR.....	83
7. EK	95
TEŞEKKÜR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

α	: Alfa
β	: Beta
Ca	: Kalsiyum
dk	: Dakika
γ	: Gamma
g	: Gravity
gr	: Gram
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
l	: Litre
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
μmol	: Mikromol
M	: Molar
Mb	: Megabaz
Mbp	: Megabaz çifti
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
P	: Fosfat
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
%	: Yüzde

Kısaltmalar

A	: Adenin
ATH	: Acid trehalase
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPase	: Adenozin trifosfataz
bp	: Base pair (Baz çifti)
C	: Sitozin (Cytosin)
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CDK	: Siklin bağımlı kinaz (Cyclin dependent kinase)
COX	: Cytochrom oxidase
CTT	: Katalaz T geni
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
FRE	: Filament oluşumundan sorumlu elementler (<u>F</u> ilamentation <u>R</u> esponsive <u>E</u> lements)
G	: Guanin
G ₁	: Hücre siklusu gap 1 safhası
GDP	: Guanozin difosfat
GGs	: General glucose sensor
Glc	: Glukoz
Glc6P	: Glukoz 6 fosfat
GOD	: Glukoz oksidaz
GRAS	: <u>G</u> enerally <u>R</u> egarded <u>A</u> s <u>S</u> afe
GSK	: Glikojen sentaz kinaz
GTP	: Guanozin trifosfat
HGT1	:Yüksek afiniteli glukoz taşıyıcısı (<u>H</u> igh-affinity <u>G</u> lucose <u>T</u> ransporter)
HSE	: Isı şoku elementleri (Heat shock element)
IME	: Inducer of meiosis
KHT	: Düşük afiniteli glukoz taşıyıcısı
<i>K. lactis</i>	: <i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>K. marxianus</i>	: <i>Kluyveromyces marxianus</i>

K. thermotolerans: Kluyveromyces thermotolerans

MAP	: Mitogen activated protein
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MATa	: Mating type a
MAT α	: Mating type α
MCK1	: Meiosis and centromeric regulatory kinase
MDS	: Mck1 Dosage supressor
MEK	: Map kinaz
MEKK	: Map kinaz kinaz
MEP	: Amonyum permeaz
MRK1	: Mds1 related kinase
mRNA	: Messenger ribonükleik asit
NAD	: Nikotinamit adenin dinükleotit
NTH	: Nötral trehalaz geni
PKA	: Protein kinaz A
POD	: Peroksidaz
RAG	: Resistance to antimycin on glucose
rDNA	: Ribozomal deoksiribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ser	: Serin
STRE	: Stress responsive element
T	: Timin
Thr	: Threonin
TPS	: Trehaloz fosfat sentaz
TPS1	: Trehaloz-6-fosfat sentaz geni-1
TPS2	: Trehaloz-6-fosfat fosfataz geni-2
TPS3	: Trehaloz sentaz kompleksi düzenleyici geni
TSL1	: Trehaloz sentaz kompleksi düzenleyici geni
tRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
UDP	: Üridin difosfat
UDP-Glc	: Uridin difosfat glukoz

Var	: Varyete
YNB	: Yeast nitrogen base
YPD	: Yeast extract pepton dextrose
YPG	: Yeast extract pepton glycerol
YPL	: Yeast extract pepton lactose

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Trehalozun yapısı, trehaloz biyosentezi ve yıkım yolu	11
Şekil 2.2 <i>S. cerevisiae</i> 'de trehaloz metabolizması, bu metabolizmada TPS kompleksinin rolü ve glikojen metabolizmasına ait yollar	12
Şekil 2.3 Maya filamentli üremesinde cAMP-PKA sinyal yolunun rolü.....	24
Şekil 2.4 Mayalarda filamentli üremeden sorumlu MAPK yolu bileşenleri	26
Şekil 4.1 YPD'de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinin içerdikleri glikojenin iyot boyama tekniği ile gösterilmesi.....	37
Şekil 4.2 YPG'de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinin içerdikleri glikojenin iyot boyama tekniği ile gösterilmesi.....	38
Şekil 4.3 YPL'de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinin içerdikleri glikojenin iyot boyama tekniği ile gösterilmesi.....	39
Şekil 4.4 Azot içermeyen minimal ortamda üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinin glikojen içerikleri.....	40
Şekil 4.5 Minimal ortamda üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinin glikojen içerikleri.....	41
Şekil 4.6 YPD'de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinin logaritmik ve durağan safhalarda biriktirdikleri glikojen miktarlarının karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.7 YPG'de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde logaritmik ve durağan safhalarda biriktirilen glikojen miktarlarının karşılaştırılması	45
Şekil 4.8 YPD'de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde logaritmik ve durağan safhalarda biriktirilen trehaloz miktarlarının karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.9 YPG'de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde logaritmik ve durağan safhalarda biriktirilen trehaloz miktarlarının karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.10 Minimal ortamda azot eksikliğinde üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde biriktirilen glikojen miktarlarının karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.11 Minimal ortamda azot eksikliğinde üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde biriktirilen trehaloz miktarlarının karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.12 Isı şokunun <i>Kluyveromyces</i> türlerinde glikojen birikimine etkileri	55
Şekil 4.13 Isı şokunun <i>Kluyveromyces</i> türlerinde trehaloz birikimine etkileri	57
Şekil 4.14 Ozmotik stresin <i>Kluyveromyces</i> türlerinde glikojen birikimine etkileri	58
Şekil 4.15 Ozmotik stresin <i>Kluyveromyces</i> türlerinde trehaloz birikimine etkileri	60

Şekil 4.16 Farklı SLAD ortamlarında üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde glikojen birikiminin analizi.....	62
Şekil 4.17 Farklı SLAD ortamlarında üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde biriktirilen trehaloz miktarlarının karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.18 <i>K. lactis var. drosophilarum</i> 'da glikojen sentez miktarının blirlenmesi.....	65
Şekil 4.19 <i>K. lactis var. drosophilarum</i> 'da glikojen yıkım şeklinin belirlenmesi.....	66
Şekil 4.20 <i>K. thermotolerans</i> 'ta trehaloz sentez miktarının belirlenmesi.....	67
Şekil 4.21 <i>K. thermotolerans</i> 'ta trehaloz yıkım şeklinin belirlenmesi	68
Şekil 4.22 SLAD besin ortamında üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması.....	70
Şekil 4.23 SLAD + %1 bütanol besin ortamında üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması.....	71
Şekil 4.24 SLAD + %1 isopropanol ortamında üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması.....	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan maya türleri.....	39
Çizelge 4.1 YPD’de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinin biriktirdikleri glikojen miktarları.....	43
Çizelge 4.2 YPG’de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinin glikojen miktarları	45
Çizelge 4.3 YPD’de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde trehaloz birikimi	47
Çizelge 4.4 YPG’de üretilen <i>Kluyveromyces</i> türlerinde trehaloz miktarları	49
Çizelge 4.5 <i>Kluyveromyces</i> türlerinin azotlu ve azotsuz ortamlarda biriktirdikleri glikojen miktarları.....	51
Çizelge 4.6 <i>Kluyveromyces</i> türlerinde azot açlığında trehaloz ölçümleri.....	52
Çizelge 4.7 <i>Kluyveromyces</i> türlerinde ısı şoku uygulaması glikojen ölçümleri.....	55
Çizelge 4.8 <i>Kluyveromyces</i> türlerinde ısı şoku uygulaması trehaloz ölçümleri.....	56
Çizelge 4.9 <i>Kluyveromyces</i> türlerinde ozmotik şok uygulaması glikojen ölçümleri.....	58
Çizelge 4.10 <i>Kluyveromyces</i> türlerinde ozmotik şok uygulaması trehaloz ölçümleri.....	59
Çizelge 4.11 <i>Kluyveromyces</i> türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarıldığı SLAD, SLAD + %1 bütanol ve SLAD + %1 isopropanol ortamlarında belirlenen glikojen miktarları.....	62
Çizelge 4.12 <i>Kluyveromyces</i> türlerinin pseudohifsel farklılaşmanın uyarıldığı SLAD, SLAD + %1 bütanol ve SLAD + %1 isopropanol ortamlarında belirlenen trehaloz miktarları.....	64

1. GİRİŞ

Kluyveromyces cinsine ait mayalar *Ascomycetes* sınıfında yer almaktadır. Bu cinste bulunan maya türleri oval, küresel veya uzamış hücre fenotiplerine sahip olabilirler. *Kluyveromyces* sınıfında bulunan mayalar vejetatif olarak tomurcuklanma ile ürerler. Diploid olan *Kluyveromyces* türleri ise spor oluşturabilir. Bu mayalarda gerçek hif oluşumu gözlenmez (Kurtzman 2003). *Kluyveromyces* cinsine ait mayalar endüstriyel amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu türlerden *Kluyveromyces lactis* genel olarak güvenli olduğu kabul edilen bir maya türüdür. *K. lactis* genetik yapısının iyi bilinmesi ve bazı fermentasyon özelliklerinden dolayı biyoteknolojide de yaygın olarak kullanılmaktadır. *K. lactis* laktaz üretiminde kullanılan en önemli mikroorganizmadır. Ayrıca, tıbbi değeri olan insan serum albumin, insan interlokin-1-gamma gibi bazı rekombinant proteinlerin üretiminde de *K. lactis*'in başarıyla kullanılabilceği gösterilmiştir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). *K. lactis* bazı çiftlik hayvanlarına yem olarak da verilmektedir (Spark ve ark. 2005).

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 karbonhidratlardır. 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. Trehaloz ise iki glukozun α (1-1) bağı ile bağlanmasıyla oluşan ve indirgen olmayan bir disakkarittir (François ve ark. 1997). Her iki depo karbonhidratın biyosentezi ve yıkımı ile ilgili metabolik yollar *Saccharomyces cerevisiae*'de oldukça iyi belirlenmiş olmasına rağmen *Kluyveromyces*'de bu karbonhidratların metabolizmalarına ilişkin herhangi bir araştırmaya henüz rastlanmamıştır.

Glikojen, mayalarda ve bazı hayvan hücrelerinde bulunmaktadır. Bir çeşit depo karbonhidratı ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Trehaloz ise maya, mantar, bakteri, alg, bitki, omurgasız ve omurgalılarda bulunmaktadır (Gancedo ve Flores 2004). Trehalozun maya hücrelerini çeşitli fizyolojik streslere karşı koruduğu, artan

sitoplazmik trehaloz miktarı ile maya hücrelerinin fizyolojik streslere karşı çok daha dayanıklı olabildiği gösterilmiştir. Bu hücrel işlevine ek olarak, trehaloz maya ve bitkilerde bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. Metabolik yolların işleyişine direkt olarak etki edebilir veya kontrol edici bir rol üstlenebilir (Attfield 1987).

Ortam koşullarının üreme için olumsuz olması maya hücrelerinde çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ederek alternatif farklılaşmalara neden olur. Maya hücrelerinde görülen bu pseudohifsel veya invasive farklılaşma da genellikle azot açlığının neden olduğu birçok sinyal iletim yolunun etkisi ile ortaya çıkan bir farklılaşma şeklidir (Gagiano ve ark. 2002). *S. cerevisiae*'de pseudohifsel farklılaşma iki farklı sinyal iletim yolunun birlikte çalışması ile oluşmaktadır. Bu yollar, besini algılayan cAMP protein kinaz yolu ve MAPK (mitojen aktivasyonlu protein kinaz) yoludur. Pseudohifsel üreme karmaşık bir fenotiptir ve bu tür bir üremenin oluşması için sadece üreme ortamı şartlarının olumsuz olması yeterli değildir. Buna ek olarak, hücre döngüsü, tomurcuklanma ve flokülasyon gibi çeşitli hücrel olayları kontrol eden sinyal iletim yollarının da aktive edilmesi gerekmektedir (Gagiano ve ark. 2002, Pan ve ark. 2000). *S. cerevisiae* ve bazı maya türlerinde pseudohifsel üremeye neden olan fizyolojik şartlar ve pseudohifsel üreme için gerekli olan enzim ve yapısal proteinler ile bu proteinlerin kontrol mekanizmaları moleküler seviyede çok iyi belirlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı *Kluyveromyces* cinsine ait farklı türlerde glikojen ve trehaloz metabolizmalarını analiz etmek, pseudohifsel üremenin olup olmadığını araştırmak ve *Kluyveromyces*'te pseudohifsel üremenin glikojen ve trehaloz birikimine etkilerini araştırmaktır. Bunun için *Kluyveromyces* cinsine ait *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ve *Kluyveromyces thermotolerans* türleri kullanılmıştır. Bu maya türleri farklı üreme ortamlarında üretilerek sentezlenen glikojen ve trehaloz miktarları biyokimyasal olarak analiz edilmiştir. *Kluyveromyces* türlerinde üreme ortamı koşullarına göre glikojen ve trehaloz biyosentezi olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca *Kluyveromyces* türleri üreme ortamı koşullarına göre pseudohifsel üreme bakımından da incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Kluyveromyces* Genusunun Özellikleri

Mayalarla yapılan çalışmaların başlangıcı 18. yüzyılın sonlarına dayanmaktadır. Bu dönemde mayaların canlı organizmalar olduğu düşünülmemiştir. Bu nedenle ilk bilimsel araştırmalar biyologlar tarafından değil de kimyacılar tarafından yapılmıştır. Mayalarda ilk olarak alkolik fermentasyon araştırılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda alkolik fermentasyonun kimyanın en olağanüstü olaylarından birisi olduğu belirtilmiştir (Barnett 1998).

Mayalar arasında bir tür, bilimsel araştırmalarda bazı tarihsel nedenlerden dolayı hep baskın olmuştur. Bu maya türü artık “maya” kelimesi ile eş anlamlı kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Bununla birlikte *S. cerevisiae* bilimsel incelemelerde tanımlanan 800 maya türünden bir tanesidir (Flores ve ark. 2000).

Kluyveromyces cinsinde bulunan birçok maya türü 1900'lü yılların başlarında tanımlanmıştır. Bunların arasında *Kluyveromyces lactis* (*Saccharomyces lactis*), *K. fragilis*, *K. thermotolerans*, *K. drosophilorum*, *K. waltii* sayılabilir (Barnett ve Lichtenthaler 2001).

Kluyveromyces cinsi taksonomide *Ascomycota* filumunda yer almaktadır. *Saccharomycetes* sınıfının *Saccharomycetaceae* familyasına dahildir. *Kluyveromyces* cinsi oldukça heterojen olup, bugüne kadar 16 türü tanımlanmıştır. Bu türlerin 10 tanesi filogenetik olarak *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Arxiozyma* ve *Candida* cinslerine ait olan türlerle karışmışlardır (Naumov ve Naumova 2002).

K. lactis biyoteknolojide yaygın olarak kullanılan bir maya türüdür. Genel olarak, güvenli olduğu kabul edilen (GRAS- Generally Regarded As Safe) bir maya olması, moleküler genetiği açısından yüksek derecede kararlı epizomal vektör sistemlerine sahip olması ve fermentasyon özelliklerinden dolayı endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). *K. lactis*, laktaz (β -galaktosidaz) üretiminde kullanılan en önemli kaynaklardandır. Son yıllarda rekombinant protein üretiminde de kullanılmaya başlanmıştır (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, Bitzilekis ve Barnett 1997). İnsan interlökin 1 β ve serum albumin, fare α -amilaz, birçok bakteriyel ve fungal β -laktamaz bu mayanın α , β ve γ zimocin alt

birimlerinin salgıladığı lider peptid sinyalleriyle üretilen heterolog proteinlerdir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, Schaffrath ve Breuning 2000).

2. 1. 1. *Kluyveromyces* Cinsinin Fizyolojisi ve Genetik Yapısı

Kluyveromyces cinsi mayalar vejetatif olarak ürerler ve aseksüel üremeleri multilateral tomurcuklanma ile olur. Bu cinse ait türler küresel, oval veya uzamış hücre şekillerine sahip olabilirler (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, Kurtzman 2003). *S. cerevisiae* hücrelerinden daha küçük yapıda olabilirler. Doğal yaşam alanları çeşitli olabilir, meyvelerde ve süt ürünlerinde bulunabilirler. *K. lactis*'in birçok suşu süt ürünlerinden izole edilmiştir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). Gerçek hif oluşturmazlar, ancak pseudohif oluşturabilirler. Askusları, bir hücre ile onun tomurcuğu arasında veya birbirinden bağımsız hücreler arasında birleşmelerle oluşabilir. Askuslar 1-4 arasında küresel, oval veya böbrek şeklinde askosporlar oluştururlar ve olgunlaştıklarında eriyip kaybolurlar (Kurtzman 2003).

K. lactis çok çeşitli karbon kaynaklarını asimile edebilmektedir. Glukoz, galaktoz, sukroz, maltoz, laktoz, rafinoz, etanol ve gliserol gibi birçok bileşiği karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. *K. lactis* suşları laktozda oldukça hızlı üreyebilirler (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996).

Kluyveromyces çalışmalarında kullanılan kültür ortamı *S. cerevisiae* için kullanılan ortamlarla aynıdır. Bu üreme ortamları zengin ortam olan YPD (%1 Yeast Ekstract, %2 Pepton, %2 Dextrose) ortamıdır. Ayrıca, *K. lactis*'in prototrofik suşları minimal ortam olan YNB (1.7 g/l Yeast Nitrogen Base, 5 g/l Amonyum sülfat, %2 Dextrose) ortamında da üreyebilirler. Fermente edilemeyen karbon kaynaklarından gliserol, laktat ve etanol de *K. lactis* tarafından aerobik olarak kullanılabilirler (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996).

K. lactis genellikle 25-28 °C'de üretilmektedir. Üreme için üst sınır 40 °C'dir. *S. cerevisiae* bu sıcaklığa *K. lactis*'ten daha dayanıklı olup, 50 °C'de 10 dakika tutulan *K. lactis* hücrelerinin büyük kısmı ölmektedir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996).

K. lactis suşları genellikle heterotalliktirler. Birçok *K. lactis* suşu *MATa* ve *MATα* genlerinin kodladığı a ve α eşleşme tipinde bulunmaktadır (Schaffrath ve Breuning 2000, Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). *MATα* geninin kodladığı protein

S. cerevisiae eşleşme faktörü α ile yüksek homoloji göstermektedir. *S. cerevisiae* ile hücre döngüleri oldukça benzerdir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). *S. cerevisiae*'nin tersine *K. lactis*'in mitotik üremesinde haploid safha baskındır. Diploid hücreler spontan olarak mayoz ve sporulasyona girerler (Schaffrath ve Breuning 2000, Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). Ayrıca *K. lactis*'in diploid safhası birçok hücre için geçicidir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996).

K. thermotolerans'ta 7 kromozom bulunmaktadır ve genom büyüklüğü 10,6 Mb'dir (Malpertuy ve ark. 2000). *K. marxianus*'ta ise türe göre değişen 6- 12 arasında kromozom bulunmaktadır. *K. marxianus* var. *marxianus*'un 10 kromozomu vardır ve genom büyüklüğü 14 Mb'dir (Llorente ve ark. 2000).

K. lactis'te 6 kromozom belirlenmiştir. Toplam genom büyüklüğü yaklaşık olarak 12 Mbp denebilir. Kromozomal DNA *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında % 40 oranında GC içerir. Genom büyüklüğünün 12Mb olması *S. cerevisiae* ile arasında anlamlı bir fark veya küçüklük oluşturmamaktadır. Büyük genom ve az kromozom sayısı tipik *non-Saccharomyces* mayalarının bir özelliğidir (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996, Schaffrath ve Breuning 2000).

2. 1. 2. *Kluyveromyces* Genusunun Metabolik Özellikleri

K. lactis, genetik ve fizyoloji arasındaki bağlantıyı araştırmak için mükemmel bir alternatif maya modelidir. Özellikle *S. cerevisiae*'ye göre *K. lactis*'te aerobik metabolizmanın fermentasyona baskın olması maya araştırmaları için farklı fizyolojik stratejiler geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Schaffrath ve Breuning 2000).

S. cerevisiae'den farklı olarak bu türde aerobik metabolizma baskındır. *K. lactis*'in de içinde olduğu birçok maya türü aslında aerobik organizmalardır. *K. lactis* kültürleri organik asit esterlerinin varlığından dolayı oluşan meyve kokusuyla, *S. cerevisiae* kültürlerinden kolaylıkla ayırt edilir. Mutlak anaerobik koşullarda birçok *K. lactis* suşu ortama steroller ve yağ asitleri ilave edilse bile üreyemezler. Ancak, yine de glukoz ve fruktozda anaerobik üreyebildikleri bildirilmiştir (Entian ve Barnett, 1983). Aerobik koşullarda glukozu fermente ederek etanol üretir, ancak aerobik metabolizma da üreme safhasında fonksiyoneldir. *K. lactis*'te aerobik metabolizma glukoz baskılamasından etkilenmez (Wesolowski- Louvel ve ark. 1996).

Mayaların aerobik ortamlarda etanol oluşturmaya Crabtree etkisi adı verilir. Mayaların küçük bir grubu bu etkiyi gösterir (Breuning ve ark. 2000). *S. cerevisiae* Crabtree pozitif mayalar arasındadır. Süt mayası olarak endüstride kullanılan *K. lactis* ise Crabtree negatif bir mayadır. Crabtree-pozitif mayaların ATP ve biomass üretimi Crabtree-negatif mayalara 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. Piruvatın tamamı dekarboksillenir ve etanole indirgenir (Breuning ve ark. 2000). Etanol oluşumundan şekerin sınırlı olduğu kültür ortamlarında kaçınılabılır, ancak bu kez de üreme ve protein sentezi oranı düşmektedir (Schaffrath ve Breuning 2000). Bu yüzden de biyoteknolojide Crabtree-negatif maya olan *K. lactis* tercih edilir (Breuning ve ark. 2000).

K. lactis'te, yüksek glukoz içeren besin ortamlarında glikolitik yolun oldukça sıkı kontrol edildiği görülmektedir. Mitokondriyal fonksiyonlar çeşitli antibiyotiklerle durdurulabilir. Antimycin A, oligomycin ve erithromycin gibi ilaçlar bu gruptandır. *S. cerevisiae* bu antibiyotiklerin varlığında ve fermentasyon için yeterli glukoz bulunduğu ortamlarda üreyebilmektedir. Birçok maya türü de *S. cerevisiae* gibi davranmaktadır. Ancak *K. lactis* bu mitokondriyal ilaçlara farklı bir tepki gösterir. Bazı suşları bu mitokondriyal inhibitörlerin varlığında üreyebilirlerken, bazıları üreyememektedir. Ortamda glukoz ve mitokondriyal inhibitör varken üreyebilenler Rag⁺ (glukozda antimisine dirençli) fenotip, duyarlı olup üreyemeyenler ise Rag⁻ fenotip olarak ifade edilirler. Rag⁻ suşları glukozda üremeleri mitokondriyal solunuma bağımlı olanlardır. Doğal olarak izole edilen mutantlar rag1 allelini taşırlar. Rag⁺ fenotipi fermentatif metabolizması etkilenmiş mutantları ayırmada kullanılmaktadır. Birçok *KIRAG* geninin glikolitik yolun kontrolünde yer aldığı gösterilmiştir (Goffrini ve ark. 1989, Goffrini ve ark. 1991, Wesolowski-Louvel ve ark. 1992, Prior ve ark. 1993, Schaffrath ve Breuning 2000, Breuning ve ark. 2000).

K. lactis'te glikolitik yolun iyi düzenlenmiş glukoz alınımı ile sınırlandırılabilirdiği belirtilmektedir. Sadece *HGT1* (High affinite Glucose Transporter) geni tarafından kodlanan glukoz taşıyıcılarının *K. lactis*'te sürekli olarak sentezlendiği bildirilmiştir. Ancak, bu yüksek afiniteli glukoz taşıyıcıları fermentatif üremeyi desteklemeye yeterli değildir ve düşük kapasiteli gibi görünmektedir. Bilinen diğer

taşıyıcılar transkripsiyonel seviyede kontrol edilmektedirler (Schaffrath ve Breuning 2000).

K. lactis'in kullandığı karbonhidratların çeşidi *S. cerevisiae*'den daha geniştir. Laktoz *K. lactis*'te metabolize edilebilirken *S. cerevisiae*'de edilemez. *KILAC4* geni laktaz *KILAC12* geni laktoz permeazı kodlamaktadır. Bu genlerin *S. cerevisiae*'e aktarılması ile transformantlar laktozlu ortamda üreyebilirler. *KILAC4* ve *KILAC12* genleri *GAL* genleri ile birlikte transkripsiyonel düzeyde kontrol edilir ve düzenlenirler. *KIGAL* genleri galaktoz metabolik enzimlerini kodlamaktadır. Bu birlikte düzenlenme *KIGal4p* (Lac9p) transkripsiyon aktivatör protein ile yapılır. Bu da *S. cerevisiae*'deki *Gal4p*'nin *K. lactis*'teki homologudur. *KIGal4p* proteini laktoz ile aktifleşir. Bunun için de laktoz alınması ve laktaz aktivitesi gereklidir. *K. lactis*, karbon kaynağı olarak galaktoz içeren üreme ortamlarında *S. cerevisiae*'den daha iyi üremektedir. Bu da hücredeki *KIGal4p* proteininin yüksek konsantrasyonda bulunmasına bağlanabilir. Laktoz taşıyıcılarını kodlayan *KILAC12* genindeki mutasyon, laktoz ve galaktozda üremeyi durdurmaktadır (Flores ve ark. 2000). *K. lactis*'te laktaz geni transkripsiyonu laktoz veya galaktoz ile aktive edilir. Bu aktivasyonun bazı suşlarda glukoz ile baskılandığı gösterilmiştir (Breuning 1989).

Mayalardaki gliserol metabolizmasında, NADH'ın reoksidasyonu alkol dehidrogenaz tarafından anaerobiosis devam ederken yapılmaktadır. Bununla birlikte anaerobik koşullarda gliserol üretimi ikincil, ancak önemli bir NAD⁺ üretim yoludur. *S. cerevisiae*'de alkol dehidrogenazı eksik olan mutantlarda etanol üretimi glukoz fermentasyonu sırasında devam etmektedir (Schaffrath ve Breuning 2000).

2. 2. Trehaloz ve Glikojen Metabolizması

Glikojen ve trehaloz mayalarda depolanabilen karbonhidratlardır. Stres şartlarında sentezlenen glikojen çok dallanma gösteren bir polisakkarittir. Lineer zincirli glukoz biriminin α (1-4) bağıyla bağlanmasıyla oluşur. Dallanma ise α (1-6) bağlarıyla meydana gelir. Trehaloz ise iki glukozun α (1-1) bağıyla bağlanmasıyla oluşan bir disakkarittir. Trehaloz stress koruyucusu iken, glikojenin fonksiyonu henüz tam olarak netleşmemiştir. Çevresel koşullara bağlı olarak hücrenin kuru ağırlığının %1-25'ini oluştururlar (François ve ark. 1997).

Trehaloz, ilk olarak çavdar ve diğer tahıl ürünlerini etkileyen fungal bir bitki hastalığı etmeninde tesadüfen keşfedilmiştir. Pers ve Osmanlı İmparatorluğu'nda tıbbi amaçlarla kullanılan *Larinus* böceğinin kozalarında bu şeker bulunmuş ve böceğin kozalarına verilen isim olan trehala'dan esinlenilerek bu şekere trehaloz adı verilmiştir (Singer ve Lindquist 1998).

Anhidrobiyosisin çok daha iyi anlaşılmasıyla trehalozun önemi ve hücrelerde oynadığı rol önem kazanmıştır (Riberio ve ark. 1999). Özellikle anhidrobiyontlarda çok fazla bulunmaktadır. Bu alışılmamış organizmalara yeniden canlanan bitkiler de dahildir. Bu bitkilerden *Selaginella lepidophylla* oldukça fazla miktarda trehaloz üretmektedir ve kuraklıkta kaybettiği canlılık aktivitesini hücre içine su girişinden sonra tekrar kazanmaktadır (Singer ve Lindquist 1998).

İndirgenmemiş bir disakkarit olan trehaloz iki glukoz biriminin (α,α) 1,1 glikosidik bağ ile bağlanmasıyla oluşmaktadır (Riberio ve ark. 1999, Elbein ve ark. 2003, Gancedo ve Flores 2004). Trehalozun üç anomeri bulunmaktadır. Bunlar α,β -1,1; β,β -1,1 ve α,α -1,1'dir. Ancak sadece α,α -1,1 trehaloz canlılardan izole edilmiştir ve yine sadece bu anomerin biyosentezi vardır (Argüelles 2000). Trehaloz indirgenmemiş olmasının yanında yüksek hidrofilit, kimyasal kararlılık ve internal hidrojen bağlarının olmaması gibi özelliklere de sahiptir. Bu özellikler trehalozun bir stress metaboliti olarak görev yapmasında temel etkenler olarak sayılabilirler (Argüelles 2000).

Trehaloz doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Maya, mantar, bakteri, alg, basit ve gelişmiş bitki ve omurgasızlarda, omurgalılarda bulunmaktadır (Attfield 1987, Argüelles 2000, Elbein ve ark. 2003, Gancedo ve Flores 2004). Birçok liken ve alg türünde de trehaloz bulunmaktadır. Ancak miktarları mayalarda bulunduğu konsantrasyonlardan çok daha azdır (Elbein ve ark. 2003).

Trehalozun maya ve mantarlarda oldukça yaygın olarak bulunduğu, bunların sporlarında ve vejetatif hücrelerinde oluştuğu bildirilmiştir. Örneğin, *Dictyostelium mucorides* spor ve makrositlerinin kuru ağırlıklarının %7'sinden fazla miktarda trehaloz içerdiği, *Neuspora tetrasperma* askosporlarında kuru ağırlıklarının %10'nundan fazla bulunduğu bildirilmiştir. Bu sporlar çimlendiklerinde trehaloz hızla yok olmaktadır. Bu durumda trehalozun bir karbon veya enerji kaynağı olarak depolandığı tahmin edilmektedir (Elbein ve ark. 2003). Trehaloz *S. cerevisiae*'de yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Argüelles 2000, Elbein ve ark. 2003). Bu

organizmadaki trehaloz miktarı hücrenin yapısına, büyüme aşamasına ve besinsel durumuna bağlıdır (Elbein ve ark. 2003).

Biyolojik sistemlerin incelenmesi ile trehalozun hangi amaçlar için kullanıldığı ve fonksiyonları anlaşılmaktadır. Trehaloz prokaryotik organizmalarda eksternal karbon kaynağı olarak kullanılabilen bir karbonhidrattır. Fotosentetik bakterilerde depolanmayan trehaloz, mikobakterilerde ve korinebakterlerde ise hücre duvarında yapısal bir rol oynamaktadır (Argüelles 2000, Elbein ve ark. 2003).

Trehaloz maya ve bitkilerde bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. Metabolik yollara direkt olarak etki edebilir veya kontrol edici bir rol üstlenebilir. Büyümeyi etkileyici görev yapabilir. Ayrıca, trehaloz hücre zarını ve proteinleri çeşitli stres şartlarının neden olduğu inaktivasyon veya denatürasyondan korumaktadır. Sıcak, soğuk, oksidasyon, kuruma, ağır metallerin etkisi, organik çözücüler gibi çeşitli ortam şartlarından hücre zarını koruyucu bir görev yaptığı belirtilmektedir (Attfield 1987, Riberio ve ark. 1999, Elbein ve ark. 2003).

Trehaloz glikojen ile birlikte düşünüldüğünde mayalarda bir enerji yedeği olarak görev yapmaktadır. Trehaloz glikolitik süreçte düzenleyici olarak hareket eder (Thevelein ve Hohmann 1995). Yapılan birçok çalışma, trehalozun hücre içindeki miktarı ile hücreleri çeşitli stres şartlarına karşı koruyuculuğunun birbiri ile bağlantılı olduğunu, hücrelerin hayatta kalmalarını sağladığı vurgulanmaktadır (Riberio ve ark. 1999).

Trehalozun endüstrideki önemi ise, ekmek mayasının dayanıklılığını arttırmada, stabilitesini sağlamada kullanılıyor olmasıdır. Bu özelliği oldukça uzun bir süredir bilinmekte ve kullanılmaktadır. Ayrıca büyük çaplı moleküllerin stabilizatörü olarak kullanılmakta, birçok dayanıksız ürünün dayanıklılığını arttırmaktadır. Bu ürünler arasında enzimler, yiyecekler, ilaçlar, kozmetikler sayılabilir. Bu özelliğinden dolayı yapısı önem kazanmaktadır (Çolaço ve ark. 1992, Gancedo ve Flores 2004). Trehaloz maya hücrelerinin durağan safhaya girişlerinde, azot, fosfor, sülfür gibi minerallerin eksikliğinde oldukça yüksek miktarda depolanır (Lillie ve Pringle 1980).

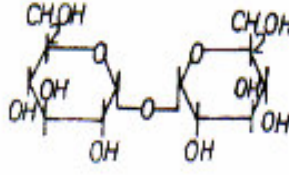
Trehaloz biyosentezi için çeşitli organizmalarda farklı yollar tanımlanmıştır. Bu yollardan en çok ve en iyi çalışılan yol trehaloz fosfat sentaz enziminin bulunduğu yoldur (Elbein ve ark. 2003). Trehaloz sentezini katalizleyen enzimler maya hücrelerinin sitozolünde bulunurlar (Singer ve Lindquist 1998).

Trehaloz biyosentezi iki aşamada gerçekleşir. Sentez üridin-di-fosfo-glukozdan glukoz-6-fosfata glikozil birimlerinin aktarılması ile başlar (Cabib ve Leloir 1958). Glikozil birimlerinin aktarımı trehaloz-fosfat sentaz (TPS) enzimi ile katalizlenmektedir. Bu aktarım sonucunda trehaloz-6-fosfat + UDP oluşmaktadır. Bu reaksiyon ilk kez mayalarda tanımlanmıştır (Cabib ve Leloir 1958). Trehaloz fosfat sentaz enzimi *E. coli*'de OtsA olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca UDP-glukoz ve glukoz-6-fosfatın *M. tuberculosis*, *Dictyostelium discoideum*'da ve böceklerde bulunduğu gösterilmiştir (Elbein ve ark. 2003). İkinci aşamada trehaloz-6-fosfat oluştuktan sonra fosfat grubu trehalozu oluşturmak üzere ayrılır ve serbest inorganik fosfat döngüsüne katılır (Cabib ve Leloir 1958). Trehalozun kimyasal yapısı, sentezi ve yıkılışı Şekil 2.1'de verilmiştir.

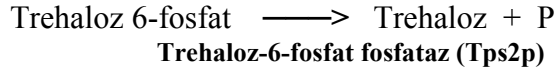
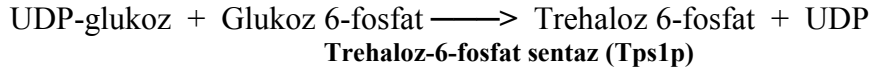
TPS1 geni trehaloz sentezinin ilk adımını katalizleyen 56 kDa'luk bir polipeptidi kodlamaktadır. Bu genin delesyonu trehaloz-6-fosfat sentaz aktivitesini ortadan kaldırmaktadır (François ve ark. 1997). Bu geni olmayan hücreler trehaloz veya trehaloz-6-fosfat üretememektedirler (Singer ve Lindquist 1998). *TPS2* geni, 102 kDa'luk bir protein olan trehaloz-6-fosfat fosfataz enzimini kodlamaktadır (François ve ark. 1997, Singer ve Lindquist 1998). *TPS2* geninin delesyonu trehaloz-6-fosfat fosfataz aktivitesini ortadan kaldırmaktadır (François ve Parrou 2001). Ayrıca *TPS1*'in delesyonu da trehaloz-6-fosfat fosfataz aktivitesini durdurur, çünkü trehaloz-6-fosfat fosfatazın aktifleşmesi için enzim kompleksinin bütünlüğü önemlidir (Vuorio ve ark. 1993). Trehaloz sentaz kompleksinin 123 kDa'luk büyük alt birimi ise *TSL1* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu protein trehaloz-6-fosfat sentaz üzerinde düzenleyici rol oynamaktadır (Vuorio ve ark. 1993). Trehaloz metabolizması ve bu metabolizmada TPS kompleksinin rolünü gösteren şema Şekil 2. 2'de verilmiştir.

In vitro deneyler *S. cerevisiae* Tps1p aktivitesinin birçok faktör aracılığıyla düzenlendiğini göstermektedir (François ve ark. 1997, Gancedo ve Flores 2004). Trehaloz-6-fosfat sentaz aktivitesi 35 °C'nin altındaki sıcaklıklarda ve yüksek fosfat konsantrasyonlarında baskılanır (Vandercammen ve ark. 1989, Londesborough ve Vuorio 1993). Enzimin aktivitesi ise fruktoz-6-fosfat ile artırılır. 50 °C'de ise fosfat ile baskılanma ve fruktoz-6-fosfat ile aktivasyon azalır. Ancak trehaloz-6-fosfat sentaz bu durumda çok daha aktiftir (Londesborough ve Vuorio 1993). Trehaloz-6-fosfat sentaz aktivitesi glukoz -6-P ve UDP-glukoza afinite gösterir (François ve Parrou 2001).

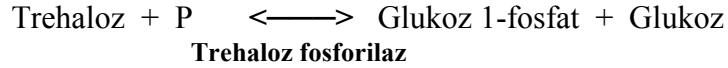
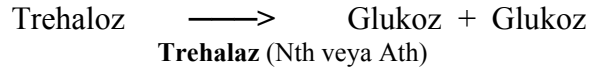
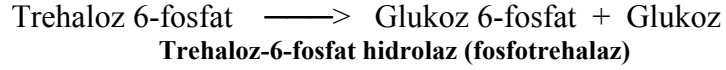
A.



B.

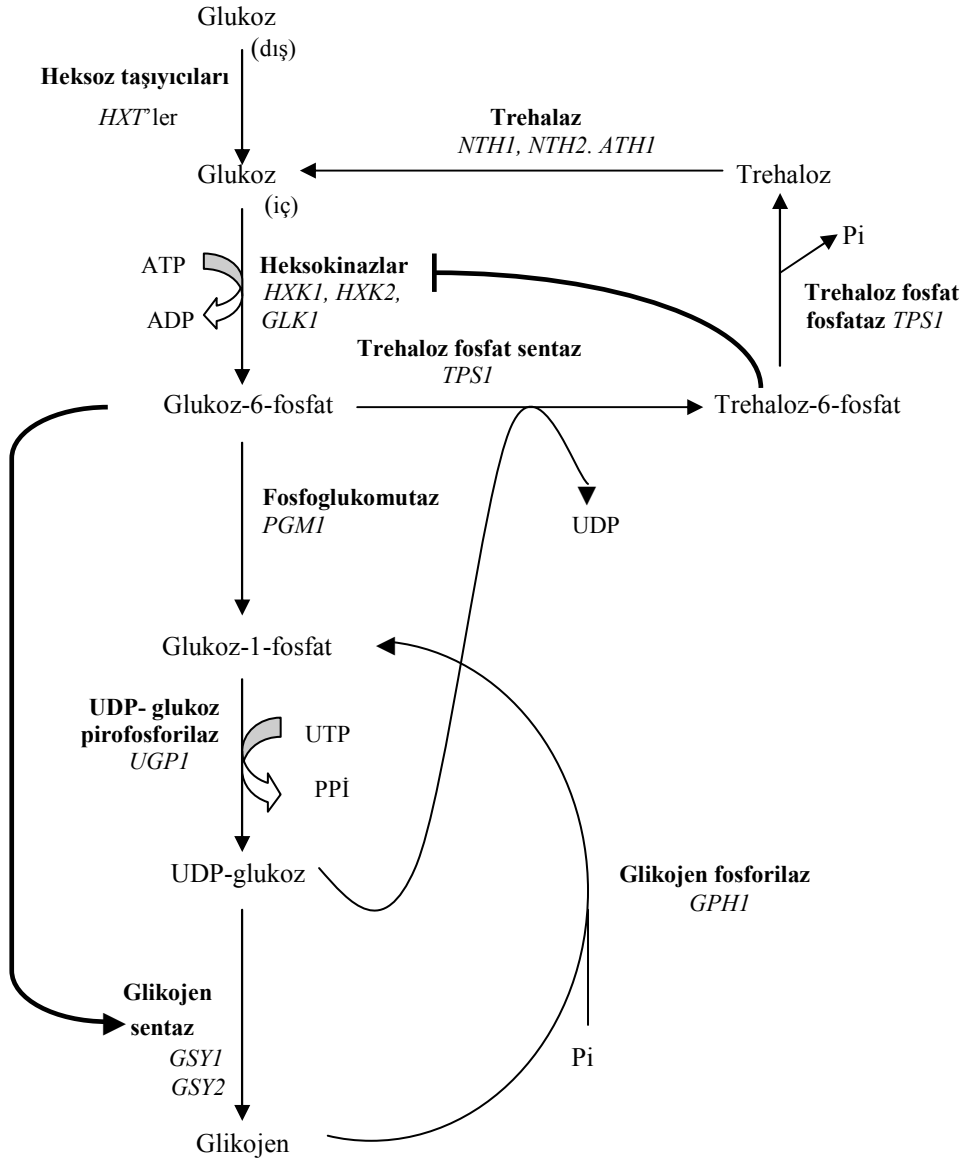


C.



Şekil 2.1. Trehalozun yapısı (A), trehaloz biyosentez (B) ve yıkım (C) yolu (Argüelles 2000).

Isı şoku sırasında trehaloz üretiminin birçok nedeni vardır. Öncelikle ısı artışı ile *TPS1* ve *TPS2*'nin transkripsiyonları artar (Singer ve Lindquist 1998). Büyüme ve ısı şoku sırasında trehaloz-6-fosfat sentaz ve fosfatazın aktivitesi post-translasyonel modifikasyonlarla düzenlenir. Isı şoku nötral trehalazı kodlayan *NTH1* ve *NTH2* genlerinin ekspresyonunu da arttırarak, nötral trehalazın aktivitesini değiştirir (Winderickx ve ark. 1996).



Şekil 2.2. *S. cerevisiae*'de trehaloz metabolizması, bu metabolizmada TPS kompleksinin rolü ve glikojen metabolizmasına ait yollar (De Silva-Udawatta ve Cannon 2001).

Trehaloz içeriği ve strese dayanıklılık arasında çok yakın bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca strese karşı dayanıklılıktan sorumlu diğer bazı faktörler de bulunmaktadır. Bu faktörler trehaloz düzeyi ile bağlantılıdır. Bu genlerin transkripsiyonel düzenlenmesine stresle aktifleşmiş ısı şoku faktörü aracılık etmektedir.

Bu faktör, cis-acting heat shock factor DNA elementi HSE (Heat Shock Elements) olarak tanınır (Winderickx ve ark. 1996).

Stresten korunmadaki potansiyel öneminden başka, trehaloz biyosentezinin hızla fermente edilebilen karbon kaynaklarında maya hücrelerinin üreyebilmeleri ile de yakın bağlantısı vardır (Winderickx ve ark. 1996). *S.cerevisiae*'de *TPS1* geninin önemini vurgulayan dört mutant belirlenmiştir. Bunlar *fdp1*, *cif1*, *byp1* ve *glc6* mutantlarıdır (Singer ve Lindquist 1998, Gancedo ve Flores 2004). *tps1* mutantları kolaylıkla fermente edilebilen karbon kaynağında örneğin glukozda üreyemezler, fakat galaktoz da üreyebilirler. Bu mutantların katabolizmaları her iki şeker için de glukoz-6-fosfattan sonra aynıdır. Glukoz içeren ortama konduklarında hücrelerin içerdikleri glukoz miktarı artar. Aşırı miktarda glukoz-6-fosfat oluşturmak üzere heksokinaz tarafından kolaylıkla fosforlanır. ATP ve serbest inorganik fosfat seviyeleri kritik olan hücresel görevleri sabit hale getirmek için artar (Winderickx ve ark. 1996, Singer ve Lindquist 1998). *K. lactis ggs* mutantları (Tre6P sentazı kodlayan gen) *S. cerevisiae tps1* mutantları ile benzer fenotip gösterir (Gancedo ve Flores 2004).

S. cerevisiae TPS1'ine homolog olan genler *K. lactis*'te (*KIGGS1*) ve *Schizosaccharomyces pombe*'de izole edilmiştir (Luyten ve ark. 1993, Blazquez ve ark. 1993). Bu genlerin delesyonu trehaloz sentezini durdurmaktadır. *S. pombe tps1*⁺ geninin *S.cerevisiae tps1* mutantlarında ekspresyonu Tre6P sentaz aktivitesinin ve trehaloz sentezinin yeniden başlamasını sağlar (François ve ark. 1997). *KIGGS1* geni, *S. cerevisiae GGS1 (TPS1)*'ine %74 nükleotid, %79 aminoasit benzerliği göstermektedir. *K. lactis GGS1*'inin delesyonu *S. cerevisiae*'deki delesyona benzer bir sonuç vermektedir. *GGS1*'i delesyona uğrayan türler glukoz ve fruktozda üreyemezler ve trehaloz içerikleri oldukça azalır. Glukozla aktifleştirilen cAMP ve cAMP bağımlı protein kinazlarla ilgili düzenleyici etkilerle (cAMP sinyalleri, trehalaz aktivasyonu, trehaloz sentez ve yıkımı ve fruktoz-1,6-bifosfatın inaktivasyonu gibi) ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu düzenleyici etkiler *S. cerevisiae*'de oldukça hızlı olarak meydana gelmektedir. *K. lactis*'te ise bu etkilerin tümü oldukça yavaş oluşur ve *Klggs1* mutantlarından etkilenmezler. *K. lactis*'te glukoz, piruvat dekarboksilaz ve potasyum taşıma sistemini aktifleştirici etki göstermektedir. *Klggs1* mutantlarında glukozun bu etkileri görülmez. Galaktozda üremekte olan *Klggs1* mutantlarının ortamına glukoz ilave edildiğinde hücre içersinde serbest glukoz ve serbest şeker fosfat birikimi

artmaktadır. Ayrıca ATP ve inorganik fosfat seviyelerinde de hızlı bir düşüş gözlenir (Luyten ve ark. 1993).

Ekspansiyel olarak üreyen hücrelerin yüksek ısı, sodyum klorid, hidrojen peroksit, çinko sülfat, yüksek etanol konsantrasyonu (> %7) ve zayıf organik asitlere maruz kalmaları bu hücrelerin trehaloz veya glikojen biriktirmelerine neden olur. Bu gibi stres koşullarında birçok gen aktifleşmektedir. Aktifleşen bu genlerin promotorlarında STRE elementi bulunmaktadır (François ve Parrou 2001).

Trehaloz metabolizmasının kontrolü glikojen metabolizması ile de benzerlikler gösterir. Trehaloz, glukozun tükenip cAMP seviyesinin düştüğü durumlarda aktif fosforlanmış formunda bulunur. Bu nedenle glikojen ve trehaloz metabolizması arasında benzerlik olduğu söylenebilir. Trehalozun direkt sentezinin yanında, glikojen yıkımı ve glikoneojenesisden gelen glikosil birimleri de kullanılmaktadır (Gancedo ve Serrano 1989). Durağan safhadaki hücreler glukozla inkübe edildiklerinde trehaloz sentezi glikojen sentezi ile aynı zamanda olmaktadır. Ortamda yalnızca glikojen olduğunda yıkım gözlenmezken, trehaloz olduğunda hem sentez hem de yıkım olmuştur (Gancedo ve Serrano 1989). Açlık sırasında trehalozun yavaş kullanımı, glikojen fosforilaz ve trehalozun bu şartlarda inaktif defosforile formlarında bulunmaları ve trehaloz defosforilasyonunun glikojen fosforilazından daha büyük bir inaktivasyona neden olmasıyla açıklanabilir (Gancedo ve Serrano 1989).

K. lactis'te *KIGSK-3* geninin dizi analizi yapılmış, özellikleri belirlenmiştir. Bir glikojen sentaz protein kinaz olan Gsk-3p, Ser/Thr kinaz protein ailesine aittir ve eukaryotlarda gelişimsel ve hormonal düzenlenmede görev yapar. Karbon açlığı olduğu durumlarda ve sporulasyon ortamına aktarılan diploidlerde *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. *KIGSK-3*'ün, *S. cerevisiae* *MDS1*'i gibi mayoz bölünme sırasında artar ve mayozu düzenleyici rolü vardır. 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 *KIGSK-3*'ün ekspresyonunun vejetatif koşullarda düşük olduğunu, sporulasyonda ve karbon kaynağı eksikliğinde genin aktifleştiğini göstermektedir (Rodriguez-Belmonte ve ark. 1998).

Trehaloz, trehalaz enzimi ile glukoza parçalanmaktadır (Elbein 1974). *S. cerevisiae*'de optimum pH'ları birbirinden farklı iki trehalaz bulunmaktadır. Vakuolde bulunan ve sürekli aktif olan asit trehalaz (Keller ve ark. 1982, Londesborough ve Varimo 1984) ve inaktif olan, cAMP bağımlı fosforilasyon ile aktive edilen, sitozolde bulunan nötral trehalazdır (Thevelein 1984). Bu iki farklı trehalaz çeşitli özellikleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır. Sitoplazmik enzimin optimum pH'sı 7'dir ve nötral trehalaz olarak adlandırılır. Vakuolar protein ise maksimum aktiviteye pH 4.5'te ulaşır ve asit trehalaz adını alır (Elbein ve ark. 2003). Nötral trehalazın aktivitesi Ca^{+2} veya Mn^{+2} iyonlarına bağımlıdır (François ve ark. 1997). Trehalaz enzimi, trehaloz seviyesini sabit tutarak veya azaltarak trehaloz metabolizmanı düzenler ve heksokinazın aktivitesini etkiler (Elbein ve ark. 2003). Asit trehalaz daha çok hücre dışındaki trehalozun katabolizması için gereklidir (Parrou ve ark. 2005).

K. lactis'te nötral trehalazı kodlayan *KINTH1* geni klonlanmıştır. Bu gen, cAMP bağımlı protein kinazlar tarafından fosforlanarak düzenlenmektedir (Amaral ve ark. 1997).

Glikojen ve trehaloz sentezi birçok faktör tarafından kontrol edilmektedir. Trehaloz ve glikojen metabolizmasının hücre döngüsüne bağlı olarak düzenlendiğini gösteren çalışmalar da vardır. Trehaloz birikiminin üreme hızına bağımlı olduğu ve G_1 - siklin CLN3'ün sürekli sentezlendiği hücrelerde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Trehaloz seviyesinin G_1 'deki duraklamaya bağlı olduğu, trehalozun sadece yaban tip ve CLN3'ün sürekli sentezlendiği hücrelerin 5 saatten fazla süren G_1 safhası sırasında biriktiği belirlenmiştir. Glikojen seviyesi ise hücre döngüsünden bağımsız olarak CLN'ün sürekli eksprese olması ile indirgenmektedir. G_1 safhasının süresine karşılık olarak besin eldesi Cln3/Cdc28 kinaz kompleksinin aktivitesine bağlıdır. Hücrelerde besinlerin elde edilmesi transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde Cln3'ün miktarı ile belirlenmektedir. Besin açlığı çeken hücrelerde glukoz veya azot ilave edilmesiyle CLN3 seviyesi hızla artmaktadır (Paalman ve ark. 2003).

2. 3. Mayalarda Depo Karbonhidratlarının Fonksiyonları

2. 3. 1. Glikojen ve Trehalozun Karbon Kaynağı olarak Kullanımı

Maya hücreleri, bir polisakkarit olan glikojeni ve bir disakkarit olan trehalozu sentezleyebilir ve hidroliz edebilirler. Glikojen ve trehaloz, üremenin sınırlandırıldığı koşullarda (azot, fosfor, sülfür, biotin vb. bulunmadığı bir karbon kaynağında üretilmekte olan maya hücrelerinde) ve glukozda üremekte olan maya hücrelerinde eksponansiyel safhanın sonunda biriktirilmektedir (Lillie ve Pringle 1980, François ve ark. 1987). Maya hücrelerinin fizyolojik durumu, üreme aşamaları ve üreme ortamlarına göre trehaloz ve glikojenin hücredeki miktarları çok değişkenlik gösterir (Lillie ve Pringle 1980).

Çevresel şartlara ve üreme aşamasına bağlı olarak bu karbonhidratlar maya hücrelerinin kuru ağırlığının %1'inden az veya %23'ünden çok daha fazla olabilirler. Glikojen ve trehaloz içeriklerinin önemli derecedeki farklılığı ve belli miktarlarda birikebilmeleri, maya hayat döngüsü süresince önemli roller oynadıklarını göstermektedir (Lillie ve Pringle 1980).

Trehaloz eksponansiyel üremede olduğu gibi, besinler bol miktarda bulunduğu sentezlenmez. Bu durumda maya hücrelerinin glikojene ilave olarak ikinci bir enerji deposuna neden ihtiyaç duyduğu sorulabilir. Enerji kaynaklarının birikiminin, besinlerin bol olarak bulunduğu zamanlarda olması beklenmektedir. Glikojen gerçekten de maya hücrelerinde eksponansiyel büyüme safhası sırasında üretilmektedir. Ancak buna ters olarak trehaloz, durağan faza kadar üretilmez. Trehaloz sentezi hücre dışı glukoz olmadığında durağan safha süresince glikojenin metabolize olduğu zaman süresince devam eder. Benzer olarak glikojen sporulasyonda askosporların son olarak olgunlaşmalarında kullanılır. Bu arada trehaloz metabolize olmayıp olgun sporlarda bulunur. Durağan safhada uzun süre devam eden inkübasyon sırasında hücreler tekrar ilk olarak glikojeni kullanırlar. Trehaloz en sonunda metabolize olur, ancak açlığı önlemede risk sınırının ne olabileceği düşünülmektedir. Trehalozun yıkımı glikojen depolarının yıkılmasından uzun süre sonra meydana gelir. Bu da hücre ölümünün başlangıcıyla aynı zaman denk gelmektedir (Singer ve Lindquist 1998). Glikojenin tükenmesinden sonra çok düşük bir oranda trehaloz yıkımı gözlenir (Lillie ve Pringle 1980). Trehalozun tamamı ancak birkaç hafta geçtikten sonra yıkılmaktadır

(Gancedo ve Serrano 1989). Trehalozun yavaş metabolizması canlılık için oldukça önemlidir. Canlılık ve fermentasyon yeteneği disakkaritlerin tükenmesinden sonra azalır (Lillie ve Pringle 1980, François ve ark. 1997). Trehaloz bu özel koşullar altında bir enerji deposu görevi yapmaktadır (Gancedo ve Serrano 1989).

Mayaların, glukoz varlığındaki diauxic gelişimleri sırasında glikojen sentezlemeleri ve besin eksikliğinin olduğu durağan safhada glikojenin yıkımı depo karbonhidratların birikimi kavramına uymaktadır. Trehaloz etanoldeki büyüme safhası sırasında oluştuğu için bu kavram tam olarak trehaloza uymaz ve stressiz koşullarda daha fazla kullanılır. Besin yokluğunda hücresel aktiviteyi desteklemek, enerji ve karbon sağlamak glikojenin en büyük fonksiyonudur (François ve Parrou 2001).

Karbonhidrat sınırlamasının olduğu sürekli maya kültürleri ile yapılan deneylerde glikojen ve trehalozun hücre döngüsünün G₁ safhasında biriktiği gösterilmiştir. Tomurcuklanmanın başlamasıyla, trehaloz ve glikojen fosforilasyon aktivitesi artmaktadır. Tomurcuklanma indeksi ile depo karbonhidrat metabolizmasının artması arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Glukoz depoları, büyüme oranı düşük olan hücre döngüsünde ilerlemek için gerekli olan enerji ve karbon kaynağı olarak görev yaparlar. Bununla birlikte, glikojen ve trehaloz sentezleyemeyen bir mutant düşük oranda da olsa bölünmeye ve büyümeye devam etmektedir (François ve Parrou 2001).

2. 3. 2. Glikojen ve Trehalozun Glikolizin Düzenlenmesindeki Önemleri

Mayalarda depo karbonhidratların birikimi ile glikolik yol arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Glukozun sınırlı, az olduğu koşullarda glikoliz yavaşlamakta ve yüksek oranda karbonhidrat birikimi olmaktadır (Larsson ve ark. 1997). Bunun yanında, aşırı miktarda karbon ve enerji kaynağının olduğu ancak azotun sınırlı olduğu durumlarda aerobik ve anaerobik şartlara bakılmaksızın hücre içinde depolanan karbonhidratların az veya çok tüketildiği görülmektedir. Ayrıca, aerobik ortamlarda trehaloz depolanan en önemli karbonhidrattır (Larsson ve ark. 1997).

Trehaloz sentezinden sorumlu enzim kompleksi olan trehaloz-fosfat sentaz (TPS) dört alt birimden oluşmaktadır. Bu altbirimler trehaloz biyosentezi için gereklidir (Elbein ve ark. 2003). Trehaloz metabolizması ile glikoliz ve fermentasyon arasında bir ilişki vardır. Trehaloz metabolizmasıyla glikoliz arasındaki ilişkiyi açıklamak için

çeşitli hipotezler öne sürülmüştür (Elbein ve ark. 2003). İlk hipoteze göre; TPS, trehaloz-fosfat sentezine ilave olarak düzenleyici bir fonksiyona sahiptir. Glukoz taşınımı ve şeker-kinaz aktiviteleri ile ilişkisi yoluyla glukoz akımını sınırlandırmaktadır (Thevelein 1992). Diğer hipoteze göre; trehaloz metabolizması glikolizin fazla çalışmasını kısıtlamaktadır. Bu kısıtlama trehaloz sentezinde şeker-fosfat kullanılması veya başka yere yönlendirilmesi ile oluşur. Bu yol daha sonra, gliseraldehit 3-P dehidrogenaz aktivitesi için gerekli olan inorganik fosfatları üretmektedir (Hohmann ve ark. 1993). Son hipoteze göre ise trehaloz-P, heksokinaz aktivitesini durdurarak glikolize şeker akımını sınırlandırır (Blazquez ve ark. 1993).

Yapılan bir çalışmada trehaloz-6-fosfatın *S. cerevisiae* heksokinazlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Elbein ve ark. 2003). Durağan safhada olan hücrelerde, ortama glukoz eklenmesinden 5 dakika sonra hücrelerarası trehaloz-6-fosfatın 7 mM'a yükseldiği bulunmuştur. Bu konsantrasyon heksokinaz aktivitesini %90 oranında azaltmaktadır (François ve Parrou 2001).

TPS1 genindeki, hızla fermente edilebilen karbon kaynağında üremeyi engelleyen bir mutasyon trehaloz ve glikolitik süreç arasındaki bağlantıyı göstermektedir (François ve Parrou 2001). *tps1* mutantlarında, fruktoz-1,6-bisfosfata kadar olan ara ürünler yüksek miktarda birikmekte, hücre içi Pi miktarı azalmakta ve glukoz eklenmesinden sonra birkaç saniye içinde ATP yıkılmaktadır. ATP'nin bu ani düşüşü, glikolizin ATP harcama ile ATP oluşturma kısmı oranı arasında bir dengesizlik oluşturur. Bunun, *TPS1*'in fonksiyon kaybına bağlı engelleyici bir etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir (François ve Parrou 2001).

Alternatif olarak, ATP döngüsünün artması stresin arttırdığı ATP dengesizliğini karşılamak için iyi bir sistem olabilir. Trehaloz dönüşümü ve hücrelerin ısı, tuz ve oksidatif strese maruz kaldıklarında biriktirdikleri glikojen bu fonksiyonu yerine getirmektedir. Glikojen ve trehaloz dönüşümünün glikolitik koruma vanası olarak işlev gördüğü öne sürülmektedir (François ve Parrou 2001).

2. 3. 3. Glikojen ve Trehalozun Stres Şartlarından Korumadaki Önemleri ve Kullanımları

S. cerevisiae'de trehalozun fonksiyonunu anlamak için gerekli ipucu, bu disakkaritin sadece nükleer-sitozolik bölmede yerleşmiş olmasıyla bulunmuştur. Trehalozun bu bölgelerde sınırlandırılmasıyla sitozolik trehaloz konsantrasyonu 0,5 M olarak bulunur. Yüksek miktardaki glukoz sitoplazma bileşenlerini etkiler. Isı aralığının geniş tutulduğu *in vitro* deneylerde proteinlerin doğal yapılarının bozulmaması için trehalozun yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu gösterilmiştir. Trehaloz seviyeleri zor koşullar altında hayatta kalabilen hücreler ile ilişkilendirildiğinde, bu etkilerin strese dayanıklılıkta önemli olduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir (Singer ve Lindquist 1998, Riberio ve ark. 1999). Örneğin, trehalozun yüksek olduğu fizyolojik durumlarda (durağan safha ve sporlar) hayatta kalan hücreler ısıya dayanıklıdırlar. Buna ek olarak, yüksek sıcaklık, etanol, kuruma ve hidrojen peroksida karşı hücresel yanıtın bir parçası olarak trehaloz konsantrasyonu artar. Diğer mantar, prokaryot ve nematodlardaki gözlemler, mayada strese dayanıklılıkla yüksek trehaloz konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (Singer ve Lindquist 1998).

Yüksek miktardaki trehaloz içeriği hücreleri otolizden korumaktadır. Trehaloz maya ve bitkilerde bir sinyal molekülü olarak da görev yapmaktadır. Trehaloz hücre zararını ve proteinleri çeşitli stres şartlarının neden olduğu inaktivasyon veya denatürasyondan korumaktadır. Sıcak, soğuk, oksidasyon, kuruma, ağır metallerin etkisi, organik çözücüler gibi çeşitli ortam şartlarından hücre membran sistemlerini ve proteinlerini koruyucu bir görev yaptığı belirtilmektedir (Attfield 1987, Riberio ve ark. 1999, Sillje ve ark. 1999, Jorgensen ve ark. 2002, Elbein ve ark. 2003). Endüstride özellikle ekmek ve içecek yapımında kullanılan mayalar için fermentatif kapasite yani glikolizde etanol ve karbondioksit üretimi oldukça önemlidir. Ancak mayaların bu özelliği besinsel streslere karşı hassas olup, besin eksikliği fermentasyon kapasitesini düşürmektedir. Besinsel streslere karşı oluşturulan toleransın hücrelerin fizyolojik evrelerine bağımlı olduğu bilinmektedir (Albers ve ark. 2002).

2. 4. Mayalarda Pseudohifsel Üreme ve Depo Karbonhidratları

Mantar aleminin birçok üyesi ayırt edici bir özellik olan dimorfizme sahiptirler. Yani bir morfolojik yapıdan diğer yapıya değişebilme yetenekleri vardır. Bu yapılar bir hücreli maya formu ve çok hücreli saldırgan (invasive) filamentli yapıdır. Filamentli yapı farklı çevresel sinyallere tepki olarak hücreler tarafından oluşturulmaktadır (Pan ve ark. 2000, Cullen ve Sprauge 2000).

Heterotrofik organizmalar enerji ve biomass üretimi için çevrelerinden aldıkları organik molekülleri veya besin maddelerini kullanmaktadırlar. Kendiliğinden hareket edemeyen tek hücreli organizmalar aldıkları besinleri depolamakta oldukça sınırlı bir yeteneğe sahiptirler. Bu organizmalar çoğunlukla yakın çevrelerindeki besinlerin alınımına ve kullanımına direkt olarak bağımlıdırlar. Bu nedenle, bu canlılar çevrelerindeki besin değişikliği durumlarına adapte olabilmek ve canlılıklarını sürdürebilmek için birçok seçenek geliştirmişlerdir. Pseudohifsel farklılaşma ve sporulasyon canlıların çevrelerindeki değişime ayak uydurmalarını sağlayan farklılaşmalardır (Gagiano ve ark. 2002).

Mantarlarda görülen pseudohif oluşumuna ait ilk gözlemler 1800'lü yıllara dayanmaktadır (Barnett ve Robinow 2002). Levan 1946'da yaşlı kültürlerdeki pseudohif oluşumu ile kültürlerin kendi ürettikleri bazı dallanmış yapı gösteren alkoller arasındaki bağlantıyı incelemiştir (Barnett ve Robinow 2002). İsoamil alkolün *Brettanomyces anomalus*, *Candida albicans* ve *Candida boidinii*'de pseudohif oluşumunu arttırdığı bulunmuştur (Dickinson 1996).

Maya kültürleri yaşlandıkça ve yoğunlaştıkça üreme ortamındaki oksijen konsantrasyonları azalmaktadır. Ayrıca alkolik fermentasyon sırasında kısa zincirli alkollerin oluştuğu bilinmektedir (Barnett ve Robinow 2002). *Candida lodderi*'nin filamentli büyümesinde yüksek konsantrasyonlarda CO₂'in etkisini vurgulanmış ve filament oluşumunun, etanol ve kısa zincirli alkollerin oluştuğu anaerobiosis ve fermentasyon ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (Barnett ve Robinow 2002).

Genç ve yaşlı *S. cerevisiae* hücrelerinin pseudohif oluşturabilme özelliklerinin incelendiği bir çalışmada maya hücreleri 3-15 °C ile 20-35 °C'de üretilmiştir. Optimum sıcaklığın altında üretilen hücrelerde ve yaşlı kültürlerde pseudohif yapısı gözlenmiştir.

S. cerevisiae'nin pseudohif oluşumuna hassas olduğu belirtilmiştir (Barnett ve Robinow 2002).

Ustilago maydis gibi patojenik türlerde miselyum dokulara saldırabilir ve fagositoz yapan hücrelerin dışındaki hücrelerde de büyüyebilir diyebiliriz. Bununla bağlantılı olarak maya filamentlerinin rolü hakkındaki bilgilerimiz gün geçtikçe artmaktadır (Madhani ve Fink 1998). Kısa filamentli üreme gösteren mayaların bu filamentleri diğer maya türlerine saldırıda kullanabilecekleri belirlenmiştir. Bu mayalar metiyonin gibi organik sülfür bileşiklerinin karşılanmasını bu yolla sağlamaktadırlar (Lachance ve Pang 1997).

Mikroorganizmalar için çevrelerindeki besinlerin ve elde edilebilirliklerinin algılanması ve besinsel değişimlere yanıtın hızlı olması gereklidir. Organizmaların çevresindeki besinler azaldığı veya bittiği durumlarda çok fazla enerji gerektiren hücresel süreçlerin devam ettirilmeye çalışılması veya hızla çoğalmaya teşebbüs etme gibi yollar organizmalara zararlı olabilir, hayatta kalmalarını zorlaştırır. Bunun için organizmalar, kendileri için gerekli olan besinlerin ne kadarını yakın çevrelerinden sağlayabileceklerini algılamalı (sensing), bu bilgileri nükleusa iletmeli (signaling) ve bununla ilgili gen grupları aktif veya inaktif (transkripsiyon) olmalıdır. Bu düzenlenme, özel koşullara karşı yanıtta rol alan hücresel programların başlatılmasında gereklidir (Gagiano ve ark. 2002).

Birçok bitki patojeni örneğin *U. maydis* ve insan patojeni çeşitli *Candida* türleri filamentli ve saldırgan yapı oluşturmaktadır (Lorenz ve Heitman 1998-a, Madhani ve Fink 1998). Bu formların oluşumu patojeniteleri, virulansları için oldukça önemlidir (Lorenz ve Heitman 1998-a, Madhani ve Fink 1998, Pan ve ark. 2000). Bu patojenlerdeki filamentli yapı oluşumunda bölünmeden sonraki hücre birleşmelerinde boğumlanmış yapılar oluşmamakta, hif adı verilen düzgün bir tüp meydana gelmektedir. Oluşan bu filamentler invazive yani saldırgan olabilirler. Bunun anlamı, hiflerin büyüdüğü yüzey içersine geçebiliyor olmalarıdır. Bitki ve hayvanlardaki fungal patojenitenin maya yapısı ile filamentli yapı arasında değişebilme yeteneği ile bağlantılı olduğuna ait birçok kanıt bulunmaktadır (Madhani ve Fink 1998).

Normalde maya yapısındaki hücreler mitotik bölünerek tomurcuklanır ve ayrılırlar. Sonuçta birbirinden bağımsız iki yavru hücre oluşur. Filamentli üremede ise, filamentli üreme devam ederken hücreler nükleus bölünmesinin ardından ayrılmazlar ve

fiziksel olarak bağı kalırlar (Lorenz ve Heitman 1997, Madhani ve Fink 1998, Pan ve ark. 2000, Rua ve ark. 2001).

Pseudohifsel üreme veya sporulasyon gibi hücrel programlar *S. cerevisiae*'de oldukça iyi karakterize edilmiştir ve maya hücrelerinin çevrelerindeki değişimlere dayandığı görülmektedir (Gimeno ve ark. 1992).

S. cerevisiae diploid hücreleri azotun sınırlı olduğu koşullarda, bireysel oval hücrelerden filamentli üreme için tipik olan uzamış hücrelerine dönüşürler. Filamentli üreme, üreme modelindeki köklü değişimi temsil etmektedir. Hücreler iki kutuplu (bipolar) tomurcuklanma modelinden tek kutuplu (unipolar) tomurcuklanma modeline geçerler. Ana ve yavru hücreler arasında onları birbirinden ayıran bir hücre zarı bulunmaktadır, ancak bu hücreler fungal hücreleri hatırlatan ve pseudohif olarak adlandırılan uzamış hücrelerden oluşan zincir yapısını oluşturmak üzere birbirleriyle bağı kalmaktadırlar. Oluşan bu yapılar üreme ortamındaki substratın içine girebilirler (Gimeno ve ark. 1992, Lorenz ve Heitman 1997, Madhani ve Fink 1998, Pan ve ark. 2000, Rua ve ark. 2001, Gancedo 2001). Pseudohifleri gerçek hiflerden ayırmak bazen oldukça zordur. Rastgele yapılan mikroskop çalışmaları ile ayrımları oldukça zordur (Barnett ve Robinow 2002).

Filamentli üremenin önemli bir adaptif yanıt olduğu düşünülmektedir. Filamentli üreme fonksiyonu, besin açlığı çeken fungal bir koloninin besin araması, toplaması için gerekli olan hücre hareket yeteneği ile benzerdir. Dallanan filamentler, filamentsiz üremeden daha az enerji harcayarak daha geniş alanları araştırabilirler (Lee ve Elion 1999). İki hücrenin birbirine yapışması ve aşırı derecede kutuplu üreme, üreme ortamına geçişi kolaylaştırmaktadır (Gancedo 2001). Yüzeyin, filament yoğunluğuna oranının yüksek olması besinlerin taşınmasını kolaylaştırabilir. Aslında dimorfik değişim hareket için gereklidir ve fungusların yaşam tarzlarına uygun uyarıların çokluğuyla aktiveşebilir (Palecek ve ark. 2002).

Genel olarak pseudohifsel üreme terimini diploid suşlar, invasive üreme terimini ise haploid suşlar için kullanmak doğrudur. Ancak bu diploidlerin invasive, haploidlerin de pseudohif oluşturamadığı anlamına gelmemektedir (Gancedo 2001, Gagiano ve ark. 2002). Hem diploidler hem de haploidler pseudohif oluştururlar. Diploidlerin filamentleri kolonilerden agar yüzeyine doğru yayılırken, zengin ortamda uzun süren üreme sırasında haploidlerin filamentleri agar içersine girer (Lorenz ve ark. 2000-a, Liu

ve ark. 1996, Möschi ve Fink 1997, Bardwell ve ark. 1998). Buna ek olarak, diploidler bazen haploidlerden çok daha kuvvetli olarak agarın içine geçerler. Bunların filamentleri agar yüzeyinden hücrelerin sertçe yıkanmasına dayanıklıdır (Liu ve ark. 1996, Möschi ve Fink 1997, Bardwell ve ark. 1998). Ayrıca haploid invaziv büyüme *BUD* genlerine gereksinim duymamaktadır. Bu genler, haploid ve diploid hücrelerin tomurcuklanma modellerini düzenleyen ürünleri kodlamaktadırlar (Gagiano ve ark. 2002). Hücrelerin uzadığı ve tomurcuklanma modellerine alternatiflerin geliştirildiği filamentli büyüme sürecinde pseudohifsel farklılaşmayı düzenleyen mitojen aktivasyonlu protein kinaz (MAPK) yolunun elemanlarına ihtiyaç vardır (Lorenz ve ark. 2000-b).

S. cerevisiae'daki bu morfogenetik değişim yani pseudohifsel farklılaşma iki farklı sinyal yolunun birlikte çalışması ile oluşmaktadır. Bu yollar;

- Besini algılayan (sensing) cAMP protein kinaz A (PKA) yolu,
- Mitojen aktivasyonlu protein (MAP) kinaz yoludur (Madhani ve Fink 1998, Pan ve ark. 2000, Lorenz ve ark. 2000-b, Gancedo 2001, Gagiano ve ark. 2002).

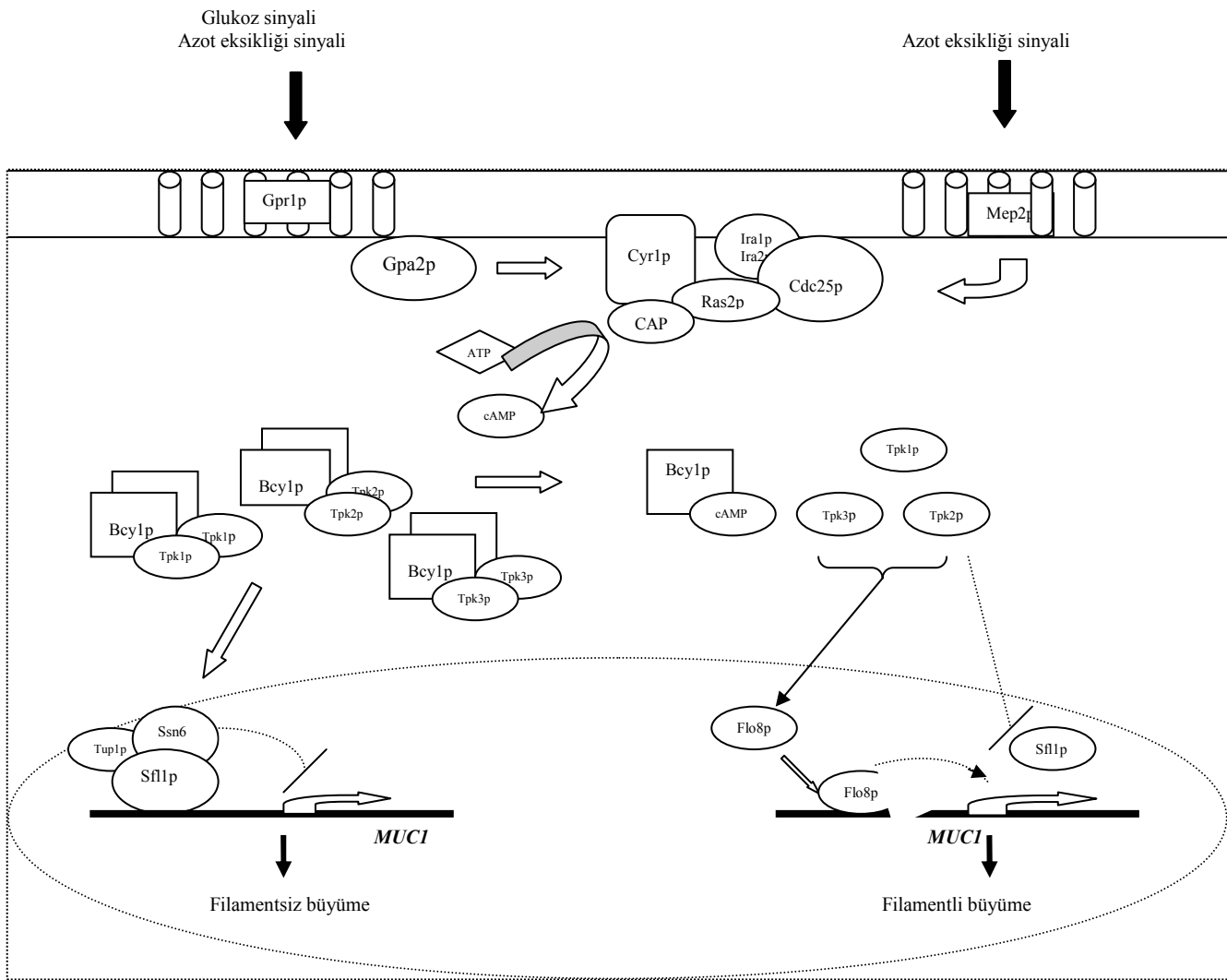
Filamentli üreme, beslenmenin yanında diğer birçok çevresel sinyal, hücre döngüsü, tomurcuklanma, hücre yüzeylerinin yapışması, hücre zarının kalıcılığı gibi çeşitli hücresel süreçte görevli çok sayıda genin ekspresyonuyla düzenlenir (Pan ve ark. 2000, Gagiano ve ark. 2002). Filamentli üremenin, cAMP-PKA yolu ile düzenlenmesinde birçok gen ve gen ürünü görev yapmaktadır. cAMP-PKA yolunun işleyişi Şekil 2.3'te verilmiştir.

Pseudohifsel farklılaşma ve saldırgan üreme, azot kaynağı sınırlılığına (özellikle amonyum) yanıt olarak oluşabilir. Ancak prolin gibi zayıf azot kaynaklarında (Gimeno ve ark. 1992, Lorenz ve Heitman 1998-b) ve amilopektin gibi zayıf karbon kaynaklarındaki üreme sırasında da filamentli üremenin arttığı belirtilmiştir (Lorenz ve ark. 2000-a).

Heterotrimerik G proteinleri, eukaryotik hücrelerde hücre üremesi ve gelişiminin en önemli düzenleyicileridir. Bu protein kompleksleri yüksek ökaryotik sistemlerde hormonlar, neurotransmitterler, feromonlar, ışık ve kokular gibi hücre dışı işaretlere karşı oluşturulan yanıtta hücre içi sinyallerin üretiminden sorumludurlar (Pan ve ark. 2000, Gagiano ve ark. 2002). α alt birimi gerçek GTPase aktivitesine sahiptir ve GTP'yi

GDP'ye hidrolizler. GTP'nin hidrolizi, heterotrimerik G protein kompleksinin yeniden birleşmesini iletir ve sinyal iletimini sonlandırır (Lorenz ve Heitman 1997).

G proteinine bağlı sinyal iletimi moleküler mekanizması ve fonksiyonu evrimsel olarak korunmuştur. Yüksek eukaryotların GPCR'leri mayalarda fonksiyonel olarak ifade edilebilir. İnsan β -adrenerjik reseptör ve G proteinini α alt birimi, *S. cerevisiae*'de fonksiyonel olarak ifade edilmektedir (Gagiano ve ark. 2002).



Şekil 2.3. Maya filamentli üremesinde cAMP-PKA sinyal yolunun rolü (Gagiano ve ark. 2002).

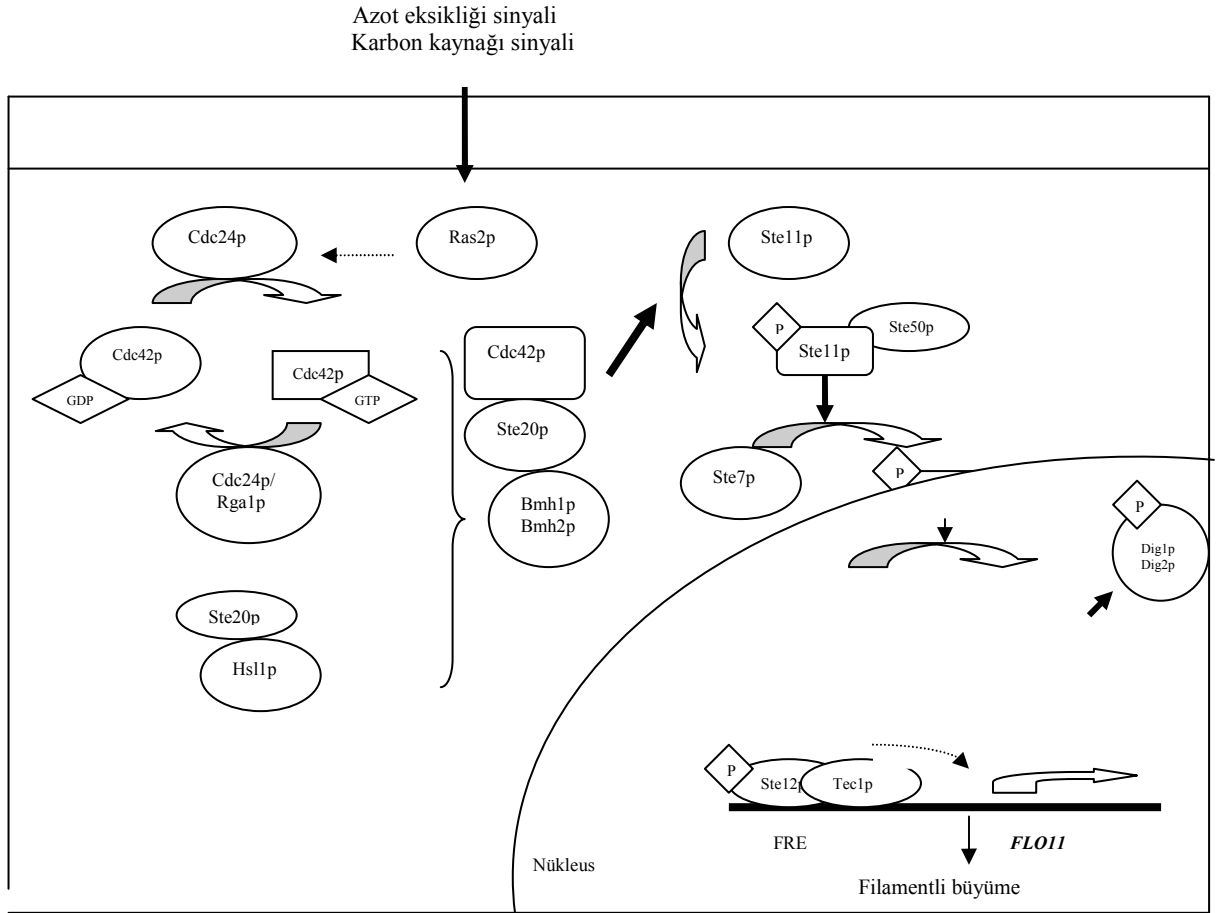
Hücrelerin besin içerikleri ile hücre içi cAMP miktarı arasındaki bağlantı oldukça iyi çalışılmıştır. Sürekli olarak ve bol miktarda cAMP içeren hücreler strese ve besin eksikliğine oldukça duyarlıdır. Bu hücreler fermente edilemeyen karbon kaynaklarında üreyemezler, diploid hücreler sporulasyon yapamazlar ve yalnızca düşük konsantrasyonlarda depo karbonhidratları depolayabilirler. Üreme ortamına hızla metabolize olan, fermente edilebilir şekerlerin (glukoz, fruktoz, mannoz, galaktoz) ilave edilmesi cAMP sinyal geçişini artırır. Bu fermente edilebilir şekerlerle arttırılan cAMP sinyali farklı bir sinyal oluşturma yolu cAMP-PKA ile aktarılır. Maya metabolizmasındaki bu yolun esas rolünden ve çeşitli memeli kanser ve tümörlerindeki korunmuş bileşenlerden dolayı cAMP-PKA yolu dikkat çekici bir yol olmuştur. Bunun sonucunda da bu yola ait birçok bileşen bulunmuştur (Gagiano ve ark. 2002).

Ras2 proteini *S. cerevisiae*'de filamentli üremeyi düzenleyen ilk anahtar proteindir. *MUC1* geninin ekspresyonunu kontrol ederek filamentli üremeyi en az iki farklı yolla düzenlemektedir. Bunlardan ilki eşleşmeden sorumlu MAPK yolu (Gimeno ve ark. 1992), ikincisi ise cAMP-PKA yoludur (Mösch ve ark. 1999). *S. cerevisiae*'de Ras proteinlerinin hedefi adenilat siklazdır. Ras proteininin aktifleşmesi ile hücre içi cAMP miktarı artar ve adenilat siklaz, protein kinaz A'yı (PKA) aktifleştirir. PKA'nın aktifleşmesiyle karbonhidrat depoları kaybolur ve sporulasyon engellenir (Mösch ve ark. 1996).

PKA'nın katalitik alt birimleri olan Tpk proteinleri filamentli üremede oldukça farklı roller oynamaktadır (Pan ve ark. 2000). *TPK2* genindeki delesyon pseudohifsel farklılaşmayı durdururken, *TPK3* genindeki delesyon pseudohifsel farklılaşmayı arttırmaktadır (Robertson ve Fink 1998, Gancedo 2001). *TPK1* geninin filamentli üreme üzerine negatif etkisi olduğu gösterilmiştir (Robertson ve Fink 1998, Pan ve Heitman 1999). Sonuçta Tpk2 proteininin pseudohifsel üremeyi aktive ettiği, Tpk1 ve Tpk3 proteinlerinin filamentasyonu baskıladığı söylenebilir (Pan ve ark. 2000).

MAPK yolu *S. cerevisiae*'de çeşitli sinyallerin (azot sınırlaması gibi) iletimine katılan ve filamentli üremeye neden olan bir sinyal oluşturma yoludur. Filamentli üreme için gerekli olan bu yolun bileşenleri, Ste20p, Ste11p, Ste7p proteinleri ve Kss1 kinazdır (Liu ve ark. 1993, Pan ve ark. 2000). Ras2p proteini besin durumuna ait sinyal oluşumunun temel elemanıdır. Azot ve karbon kaynaklarının azalma sinyallerinin MAP

kinaz yolu ile iletilmesinde gereklidir (Gagiano ve ark. 2002). Filamentli üremeden sorumlu MAPK yolu bileşenleri Şekil 2.4’te verilmiştir.



Şekil 2.4. Mayalarda filamentli üremeden sorumlu MAPK yolu bileşenleri (Gagiano ve ark. 2002).

Haploid maya hücreleri de diploid pseudohifsel gelişime benzer olarak zengin ortamda uzun süreli üreme sırasında filament oluşturarak üreme ortamını işgal ederler. Bu süre içinde haploid hücreler uzar, tomurcuklanma modelleri eksenselden tek kutupluya dönüşür ve hücre zincirlerinden oluşan filamentleri meydana getirirler.

Diploid pseudohifsel üremeyi denetleyen MAP kinaz yolunun bileşenleri aynı zamanda haploid saldırgan yapı oluşumu için de gereklidir (Pan ve ark. 2000).

Azot bakımınca fakir ortamlardaki üreme sırasında aminoasit metabolizmasının son ürünü olarak oluşan kısa zincirli alkoller haploid pseudohifsel üremeyi başlatırlar (Lorenz ve ark. 2000-b). Alkollerle başlatılan filamentli üreme için MAP kinaz yolunun bileşenleri olan kutuplaşma ve tomurcuklanmayı düzenleyen genlerin aktivitesi gereklidir. Bu genler *BUD8*, *BEM1*, *BEM2* ve *FIG1* genleridir (Lorenz ve ark. 2000-b). İsoamil alkol ve butanol gibi birçok alkol katı besin ortamlarında filamentli üremeyi başlatmakta, sıvı besin ortamlarında ise uzamış ve filamentli yapıları oluşturmaktadır. En fazla etki ise normalde baskılanmış olan haploid hücrelerin filamentasyonunda görülmüştür. Mayalar tarafından üretilen etanol diploid hücrelerdeki filamentli üremeyi arttırmaktadır. Her iki durumda da MAP kinaz yolunda meydana gelen bir mutasyon alkolle indüklenen filament oluşumunu, pseudohifsel üremeyi durdurmaktadır (Lorenz ve ark. 2000-b).

Lorenz ve ark. yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae*'nin haploid ve diploid suşlarını azotun sınırlı olduğu SLAD besin ortamına çeşitli alkoller ilave ederek büyütmüşlerdir. Etanol, methanol, 1-propanol, isopropanol, 1-bütanol, isobütanol, isoamil alkol ve tersiyer amil alkolü çeşitli konsantrasyonlarda besin ortamına ilave ederek filamentli üremeyi incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, isoamil alkol ve bütanol gibi birçok alkol katı besin ortamlarında filamentli üremeyi başlattığı, sıvı besin ortamlarında ise uzamış ve filamentli yapıları oluşturduğu gözlenmiştir. En fazla etki ise normalde baskılanmış olan haploid hücrelerin filamentasyonunda görülmüştür. Mayalar tarafından üretilen etanol, diploid hücrelerdeki filamentli üremeyi arttırmaktadır. Her iki durumda da MAP kinaz yolunda meydana gelen bir mutasyon alkolle aktive edilebilen filament oluşumunu, pseudohifsel büyümeyi durdurmaktadır (Lorenz ve ark. 2000-b).

Filamentli üremenin kontrol mekanizmasıyla ilgili genetik ve biyokimyasal bilgilerin yaklaşık tamamı *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır. *Kluyveromyces* de filamentli üremenin moleküler mekanizması henüz tam olarak analiz edilmemiştir.

Hücre içi cAMP seviyeleri ile hücrenin besinsel durumu arasındaki ilişki oldukça iyi çalışılmıştır. Sürekli olarak yüksek seviyede cAMP içeren hücreler stres ve besin eksikliğine hassastırlar. Fermente edilemeyen karbon kaynaklarında

büyüyemezler, diploidler sporulasyon yapamaz ve sadece düşük konsantrasyonlarda glikojen ve trehaloz gibi depo karbonhidratları biriktirebilirler. Ayrıca, glukoz, fruktoz ve galaktoz gibi fermente edilebilen şekerlerin hızla metabolize edildiği üreme substratı cAMP düzeyini artırır. Bu fermente edilebilen şekerlerle artırılan cAMP sinyali, farklı bir sinyal yolu ile yani cAMP-PKA yolu ile iletilir (Gagiano ve ark. 2002). Fermentasyon yapan maya hücrelerinin glikoliz metabolizması oldukça aktiftir, fermentasyon yapamayan hücrelerden daha hızlı ürerler, trehaloz ve glikojeni oldukça az biriktirirler ve çevresel streslere hassastırlar. Glukoz fermentatif yaşama dönüşümü teşvikler. Bu dönüşümü de kısa süreli cAMP sentezi ve buna bağlı olarak PKA'nın aktifleşmesi gerçekleştirir. Mayalarda cAMP etkisi ile PKA'nın aktifleşmesi üreme ve pseudohifsel farklılaşmayı arttırmakta, strese dayanıklılığı, trehaloz ve glikojen kaybına neden olmakta ve yaşam süresini azaltmaktadır (Versele ve ark. 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Araştırmada Kullanılan Maya Suşları ve Üretilmeleri

Bu araştırmada *Kluyveromyces* genusuna ait farklı maya türlerinin glikojen ve trehaloz metabolizmaları araştırıldı. *Kluyveromyces* genusundan üç tür ve iki varyete ile çalışıldı. Bu araştırmada kullanılan maya türleri Çizelge 3.1' de verildi. Araştırmada kullanılan üreme ortamlarının ve diğer çözümlerin hazırlanması Ek-1'de verildi.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan maya türleri.

MAYA TÜRLERİ	Kaynak/Orijinal Adı
<i>Kluyveromyces lactis</i>	DBVPG 6731/ CBS 2359
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilorum</i>	DBVPG 6112/CBS 4372
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DBVPG6072/CBS 4857
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	DBVPG6071/ CBS 2762
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	DBVPG6256/ CBS 137

Çizelge 3.1'de belirtilen *Kluyveromyces* türlerinin tümü Perugia Üniversitesi (Perugia- İtalya) maya koleksiyonundan liyofilize stoklar olarak satın alındı. Liyofilize kültürler steril şartlarda 1 ml YPD (%1 maya özütü, %2 pepton, %2 glukoz) eklenerek çözümleri sağlandı. YPD sıvı ortamında çözünen bu kültürler YPD petrilere ekim yapılarak 25-26 °C'de etüvde üremeleri beklendi. Araştırmalar süresince stok kültür olarak YPD petrilere 4 °C'de bekletilen kültürler kullanıldı.

Kluyveromyces türleri rutin amaçlar için standart yöntem kullanılarak çalkalamalı inkübatörde 25-26 °C'de, 130 dönüş/dakika hızda üretildi. Zengin besiyeri olarak YPD kullanıldı (Ek-1) (Rose ve ark. 1990). Yapılan araştırmalar farklı karbon kaynakları gerektirdiğinde YPG (%1 maya özütü, %2 pepton, %2 gliserol) ve YPL (%1

maya özütü, %2 pepton, %2 laktoz) ortamları kullanıldı (Rose ve ark. 1990). Glukoz, gliserol ve laktoz ayrıca steril edilerek sterilizasyondan sonra üreme ortamına ilave edildi.

Bazı araştırmalar maya hücreleri minimal ortamda üretilerek yapıldı. Minimal ortam için YNB kullanıldı (Ek-1) (Rose ve ark. 1990). Pseudohifsel farklılaşmayla ilgili yapılan çalışmalarda SLAD besin ortamı kullanıldı (Ek-1) (Gimeno ve ark. 1992). Çalışmanın amacına uygun olarak SLAD besin ortamına son konsantrasyonu %1 olacak şekilde isopropanol veya bütanol eklendi (Lorenz ve ark. 2000-b).

3. 2. Glikojen ve Trehaloz Ölçümleri

3. 2. 1. Kalitatif Glikojen Tayini

Steril ortamda stok *Kluyveromyces* kültürlerinden alınan maya hücreleri sıvı YPD, YPG ve YPL üreme ortamlarına ekildi (Rose ve ark. 1990). Maya kültürleri 25-26 °C de 18 saat üretilerek bir gecelik kültürler elde edildi. Bu kültürlerden YPD, YPG ve YPL petrilere 5'er µl'lik damlalar şeklinde üçlü olarak ekim yapıldı. Hücreler 25-26 °C'de etüvde 48 saat bekletilerek üremeleri sağlandı. Maya türlerinin biriktirdiği glikojeni kalitatif olarak belirlemek için iyot ile boyama tekniği kullanıldı (Chester 1968). Bunun için taze hazırlanan lugol çözeltisi kullanıldı (Ek-1). Önce petrilere içine yerleştirilen Whatman No:3 kağıtlarına birkaç ml lugol eklenerek, kağıtların lugol ile doymuş hale gelmeleri sağlandı. Petrilere üretilip koloni oluşturan hücreler iyot buharına maruz bırakıldı. Maya hücreleri tarafından biriktirilen glikojenin iyot ile boyanabilmesi için 30 dakika beklendi. Glikojen depo eden maya hücrelerinin oluşturduğu kolonilerin kahverengi, biriktirmeyenlerin sarı renkte boyandıkları gözlemlendi. Petrilere fotoğrafları çekildi.

3. 2. 2. Glikojen ve Trehalozun Enzimatik Tayini

Glikojen ve trehalozun enzimatik tayini için Parrou ve François (1997) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemde göre ilk aşamada logaritmik safhadaki hücrelerin elde edilmesi için stok kültürlerden alınan maya hücreleri hazırlanan 10 ml'lik YPD veya YPG besin yerlerine ekildi. 25-26 °C'de çalkalamalı etüvde 18 saat üretilerek bir gecelik kültürler elde edildi. Durağan aşamadaki bu

hücrelerden 1 ml örnek alındı ve santrifüj ile çöktürülerek glikojen ve trehaloz miktarlarının belirlenmesi için aşağıda açıklandığı şekilde hazırlandı. Logaritmik aşamadaki maya hücrelerinde biriktirilen glikojen ve trehaloz miktarlarını belirlemek için durağan faz hücrelerinden 10 ml'lik taze YPD ve YPG ortamlarına $OD_{600} \approx 0.2$ olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler yaklaşık 3 saat üretilerek logaritmik aşamaya gelmeleri sağlandı. $OD_{600} \approx 1$ olması beklendi. Logaritmik aşamadaki hücreler santrifüj ile çöktürüldü.

Santrifüj ile çöktürülen hücreler önce 10 ml soğuk steril distile su ile iki kez yıkandı. 24400- 24500 g'de santrifüj edilerek tekrar çöktürülen hücrelerin yaş ağırlıkları belirlendi. Bu hücelere 0.25 M Na_2CO_3 çözeltisinden 250 μ l ilave edildi. Na_2CO_3 ilave edilen hücreler parçalanma ve lizat oluşumu için 95 $^{\circ}C$ de 2 saat kaynatıldı. Hücre lizatının pH'ını 5.2 ye ayarlamak için 150 μ l 1M asetik asit ve 600 μ l 0.2M NaOAC ilave edildi ve toplam 1 ml'lik hücre lizatı elde edildi.

Glikojenin glukoz birimlerine parçalanması için α -amiloglikosidaz enzimi (Sigma, A-7420) kullanıldı (Ek-1). pH'ı 5.2'ye ayarlanan hücre lizatından 500 μ l alınarak taze hazırlanmış α -amiloglikosidaz (100 μ g) ilave edildi ve 57 $^{\circ}C$ 'de 18 saat bekletildi. Paralel deneyde aynı hücre lizatındaki trehaloz miktarını belirlemek için ise trehalaz (Sigma T-8778) enzimi kullanıldı. Aynı hücre lizatından 500 μ l alınarak 3 mU trehalaz enzimi ilave edildi ve 37 $^{\circ}C$ 'de 18 saat bekletildi. Her iki ölçüm için de hücre lizatı-enzim karışımları inkübasyondan sonra 24500 g'de santrifüj edildi. Sıvı faz glikojen veya trehalozdan açığa çıkan glukoz miktarlarının belirlenmesi için aşağıda verildiği şekilde kullanıldı.

Trehalaz ve α - amiloglikosidaz reaksiyonları sonucu trehaloz veya glikojenden açığa çıkan glukoz miktarı glukoz oksidaz-peroksidaz yöntemi ile belirlendi (Goldstein ve Lampen 1975). Bu yöntemde göre toplam hacim 1 ml olacak şekilde (900-980 μ l) glukoz oksidaz-peroksidaz enzim karışımı alındı ve bu karışıma hücre lizatlarının sıvı fazından 20-100 μ l eklendi. Reaksiyon karışımları 37 $^{\circ}C$ 'de 15 dakika bekletildi. Oluşan renkli ve çözünür kompleksin spektrofotometrede 540 nm'de absorbansı belirlendi. Standart glukoz çözeltisine göre glukoz konsantrasyonları belirlendi. Hesaplanan glukoz konsantrasyonları maya yaş ağırlığına göre normalize edildi.

3. 3. Azot Eksikliği ve Isı Şokunun Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisi

3. 3. 1. Azot Açlığının Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

Üreme ortamında oluşturulan azot eksiliğinin *Kluyveromyces* türlerinde glikojen ve trehaloz metabolizmasına etkileri araştırıldı. Araştırmada kullanılan *Kluyveromyces* türleri 10 ml sıvı YPD besiyerlerine ekilerek bir gecelik hücre kültürleri elde edildi. Bu hücreler tekrar 20 ml taze YPD sıvı besiyerlerine ekilerek logaritmik aşamaya gelmeleri sağlandı. Bu aşamada üretilen hücreler santrifujde çöktürüldü. Elde edilen hücreler iki kez 20 ml steril distile su ile yıkanarak ortamdaki azot uzaklaştırıldı. Tekrar çöktürülen hücreler 20 ml YN ortamına alındı. Bu aşamada hücre kültürleri 10 ml'lik iki kısma bölündü. Hücrelerin bir bölümü amonyum içermeyen YNB ortamında üretildi. Kontrol grubu olarak kullanılacak olan YNB ortamındaki aynı *Kluyveromyces* kültürlerinin ikinci 10 ml'lik kısımlarına ise 5gr/lt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilave edildi. Bu şekilde hazırlanan *Kluyveromyces* kültürleri 25-26 °C'de çalkalamalı etüvde 130 devir/dakika hızda yaklaşık 3 saat bekletildi. Bu süre sonunda hücreler 5000 g'de 3 dakika santrifuj edilerek çöktürüldü ve bölüm 3.2.2'de açıklanan yöntem uygulanarak glikojen ve trehaloz miktarları belirlendi.

3. 3. 2. Isı Şokunun Glikojen ve Trehaloz Metabolizmasına Etkisi

Bu deneyde ısı şoku ile *Kluyveromyces* türlerinde glikojen ve trehaloz birikimlerinde artış olup olmadığı araştırıldı. Bunun için önce *Kluyveromyces*'e ait beş tür 10 ml YPD besiyerine ekildi ve 25-26 °C'de çalkalamalı etüvde 18 saat üretildi. Durağan safhada olan bu hücrelerden tekrar 20 ml'lik taze YPD ortamına $\text{OD}_{600} \approx 0.2$ olacak şekilde ekim yapıldı, aynı üreme koşullarında üretilerek logaritmik aşamaya gelmeleri sağlandı. Daha sonra bu hücre kültürlerinden 10'ar ml'lik kısımlar alınarak ısı şokunun oluşması için 37 °C'deki sıcak su banyosuna aktarıldı (Parrou ve ark. 1997, Parrou ve ark. 1999). Deneyde kontrol gurubunu oluşturacak olan hücreler 25 °C'de üremeye bırakıldı. Hücreler 25 °C veya 37 °C'de 3 saat bekletildi. Bu süre sonunda maya hücreleri 5000 g'de 3 dakika santrifuj edilerek çöktürüldü. Maya hücrelerin

içerdiği glikojen ve trehaloz miktarları bölüm 3.2.2’de açıklandığı şekilde enzimatik yöntem ile belirlendi.

3. 4. Ozmotik Stresin Uygulanması

Ozmotik stresin *Kluyveromyces* türlerinde glikojen ve trehaloz birikimine etkileri de araştırıldı. Bunun için bu araştırmada analiz edilen *Kluyveromyces* türleri 10 ml’lik YPD besiyerine ekilerek bir gecelik kültürler elde edildi. Daha sonra bu hücreler 20 ml’lik taze YPD besiyerine $OD_{600} \approx 0.2$ olacak şekilde ekildi ve maya kültürleri logaritmik aşamaya kadar üretildi. YPD ortamında bulunan kültürler 10 ml’lik iki gruba ayrıldı. Bir gruba ozmotik stres uygulamak amacıyla son konsantrasyonu 0.8M NaCl olacak şekilde steril NaCl ilave edildi. Aynı hücre kültürlerinin kontrol grubu olarak kullanılacak olan 10 ml’lik ikinci kısımlarına NaCl ilave edilmedi. Her iki grup 3 saat 25-26 °C’de çalkalamalı etüvde bekletildi. İnkübasyon süreleri sonunda maya hücreleri 5000 g’de 3 dakika santrifuj edilerek çöktürüldü. Elde edilen hücrelerdeki glikojen ve trehaloz miktarları bölüm 3.2.2’de açıklandığı şekilde belirlendi.

3. 5. Pseudohifsel Üremenin Uyarılması

Maya hücrelerinde pseudohifsel büyümenin uyarılması amacıyla sıvı SLAD (Synthetic Low Ammonium Dextrose) besin ortamı kullanıldı (Ek-1) (Gimeno ve ark. 1992). Ayrıca, bu ortama son konsantrasyonları %1 olacak şekilde bütanol veya iso-propanol ilave edildi (Lorenz ve ark. 2000-b).

Stok kültürlerden alınan hücreler 20 ml’lik SLAD besiyerlerine ekildi ve 25-26 °C’de çalkalamalı etüvde üretildi. İso-propanol veya bütanol içeren SLAD ortamlarına bu alkollerin üreme ortamlarındaki konsantrasyonlarını sabit tutmak için son konsantrasyonları %1 olacak şekilde 24. ve 36. saatlerde tekrar bütanol veya iso-propanol ilave edildi (Lorenz ve ark. 2000-b). SLAD ortamında üretilmekte olan kültürlerden 24, 36 ve 72. saatlerde örnekler alınarak ışık mikroskobunda incelendi. Zeiss marka ışık mikroskobunda maya hücrelerinin fotoğrafları çekildi.

Farklı *Kluyveromyces* türlerinde pseudohifsel üremenin glikojen ve trehaloz depolanmasına etkileri de araştırıldı. Bunun için 72 saat SLAD üreme ortamında üretilen maya hücreleri 5000 g'de 3 dakika santrifuj edilerek çöktürüldü. Maya hücrelerindeki glikojen ve trehaloz miktarları bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde belirlendi (Parrou ve François 1997).

3. 6. *K. lactis* var. *drosophylarum*'da Glikojen Biyosentez Miktarının ve Yıkım Şeklinin Belirlenmesi

Kluyveromyces türlerinde glikojen sentez miktarlarının belirlenebilmesi için sıvı YPD ve azot içermeyen YN ortamları kullanıldı. Araştırmanın bu bölümü için *K. lactis* var. *drosophylarum* türü kullanıldı. Bu maya türü önce 10 ml'lik YPD besin ortamına ekildi. Hücreler 25-26 °C'de çalkalamalı etüvde 18 saat üretilip durağan faz hücreleri elde edildi. Elde edilen durağan faz hücreleri stok kültür olarak kullanılarak 50 ml'lik YPD ortamına OD₆₀₀≈0.2 olacak şekilde ekim yapıldı ve bu hücrelerin standart üreme ortamı koşullarında erken logaritmik aşamaya (OD₆₀₀≈0.6-0.7) kadar üremeleri beklendi. Erken Logaritmik aşamaya gelen hücre kültüründen 5 ml alındı, 24500 g'de 3 dakika santrifuj edilip çöktürüldü ve yaş ağırlıkları belirlendi. Elde edilen bu maya örnekleri 250µl 0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek donduruldu. Kalan hücreler iki kez steril saf su ile yıkanarak 45 ml'lik azotsuz, sıvı YN + %2 glukoz ortamına aktarıldılar. Bu üreme ortamındaki hücreler 25-26 °C'de çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı ve bu hücrelerden her 30 dakikada 5 ml örnek alınıp, santrifuj ile çöktürüldü ve çöktürülen hücrelere de 250µl 0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek donduruldu. Elde edilen hücrelerdeki glikojen miktarları bölüm 3.2.2'de açıklanan yöntem kullanılarak belirlendi (Parrou ve François 1997). Glikojen miktarları deneyde kullanılan mayaların yaş ağırlığına göre normalize edildi ve buradan elde edilen trehaloz miktarları zaman aralıklarına karşı grafiğe aktarıldı.

Glikojen yıkım şeklinin belirlenebilmesi için önce logaritmik aşamadaki *K. lactis* var. *drosophylarum*'da glikojen birikimi bu maya suşu azot içermeyen sıvı YN + %2 glukoz ortamında 3 saat üretilerek glikojen birikimi uyarıldı. Üreme süresi sonunda maya kültüründen başlangıç örneği olarak 5 ml örnek alınıp santrifuj ile çöktürüldü ve bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde glikojen miktarının belirlenmesi için

kullanıldı. Kalan hücreler de santrifuj ile çöktürülerek glikojen yıkım hızını belirlemek için 45 ml'lik taze YPD ortamına aktarıldı. Bu üreme ortamında üremeye bırakılan maya kültüründen 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda 5'er ml maya örneği alındı. Alınan maya örnekleri santrifuj ile çöktürülerek bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde enzimatik yöntem ile glikojen miktarlarının belirlenmesinde kullanıldı. Belirlenen glikojen miktarları maya hücrelerinin yaş ağırlıklarına göre normalize edilip zaman aralıklarına karşı grafikte gösterildi.

3. 7. *K. thermotolerans*'da Trehaloz Biyosentez Miktarının ve Yıkım Şeklinin Belirlenmesi

Kluyveromyces türlerinde trehaloz sentez miktarlarının belirlenebilmesi için sıvı YPD ve azot içermeyen YNB ortamları kullanıldı. Araştırmanın bu bölümü için *Kluyveromyces* türü olarak *K. thermotolerans* türü kullanıldı. *K. thermotolerans* önce 10 ml'lik YPD besin ortamına ekildi. Hücreler 25-26 °C'de çalkalamalı etüvde 18 saat üretilip durağan faz hücreleri elde edildi. Elde edilen durağan faz hücreleri stok kültür olarak kullanılarak OD₆₀₀≈0.2 olacak şekilde 50 ml'lik YPD ortamına ekim yapıldı ve bu hücrelerin standart üreme ortamı koşullarında erken logaritmik aşamaya kadar üremeleri beklendi. Erken logaritmik aşamaya gelen hücre kültüründen 5 ml alındı, 24500 g'de 3 dakika santrifuj edilip çöktürüldü ve yaş ağırlıkları belirlendi. Elde edilen hücreler 250 µl 0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek donduruldu. Kalan hücreler iki kez steril saf su ile yıkanarak 45 ml'lik azot içermeyen sıvı YN + %2 glukoz ortamına aktarıldılar. Bu üreme ortamındaki hücreler 25-26 °C'de çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı ve bu hücrelerden her 30 dakikada 5 ml örnek alınıp, santrifuj ile çöktürüldü ve çöktürülen hücrelere de 250 µl 0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek donduruldu. Elde edilen hücrelerdeki trehaloz miktarları bölüm 3.2.2'de açıklanan yöntem kullanılarak belirlendi (Parrou ve François 1997). Trehaloz miktarları deneyde kullanılan mayaların yaş ağırlığına göre normalize edildi ve buradan elde edilen trehaloz miktarları zaman aralıklarına karşı grafiğe aktarıldı.

Trehaloz yıkım şeklinin belirlenmesinde de *K. thermotolerans* model tür olarak kullanıldı. *K. thermotolerans* önce 10 ml YPD'de durağan faza kadar standart üreme koşullarında üretildi. *K. thermotolerans* hücrelerinin trehaloz depo edebilmesi için

hücreler bölüm 3. 6'da açıklandığı şekilde amonyumsuz minimal üreme ortamında üretilerek hazırlandı. Bu süre sonunda *K. thermotolerans* kültüründen 5 ml'lik ilk örnek alınarak santrifüj ile çöktürüldü ve elde edilen hücreler 250 µl 0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek donduruldu. Kalan hücreler de santrifüj ile çöktürülüp trehaloz yıkım hızını belirlemek için 45 ml'lik taze YPD ortamına aktarıldı. YPD ortamında standart üreme koşullarında üremeye bırakılan *K. thermotolerans* kültüründen 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda 5'er ml örnekler alındı. Alınan bu örnekler de santrifüj ile çöktürüldü ve 250 µl 0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek donduruldu. Elde edilen *K. thermotolerans* örneklerdeki trehaloz miktarları bölüm 3. 2. 2'de açıklanan standart yöntem ile belirlendi. Trehaloz miktarları maya hücrelerinin yaş ağırlıklarına göre normalize edildi ve zaman aralıklarına karşı grafiğe aktarıldı.

3. 8. Mikroskopik Yöntemler

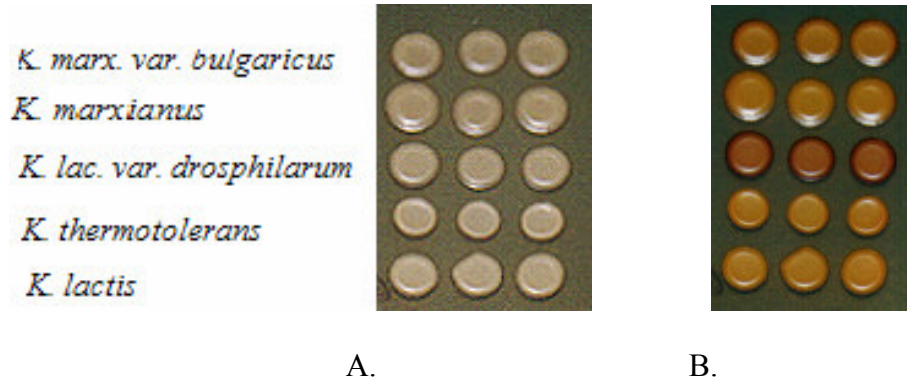
Kluyveromyces türlerinin pseudohifsel yapıları hücrelerin mikroskopik yöntemle incelenmesiyle belirlendi. Bunun için SLAD besiyeri, SLAD+ %1 bütanol veya SLAD+ %1 iso-propanol ortamlarında üretilen hücreler kullanıldı. Bu kültürlerden 0- 24- 48 ve 72. saatlerde 1 ml örnekler alındı. Bu örneklerden lam-lamel arası preparat hazırlandı. Preparatlar Zeiss marka ışık mikroskopunda 10, 20 ve 40 lık objektiflerde incelendi. Hazırlanan preparatlardan elde edilen fotoğraflar sonuçlar bölümünde verildi.

4. BULGULAR

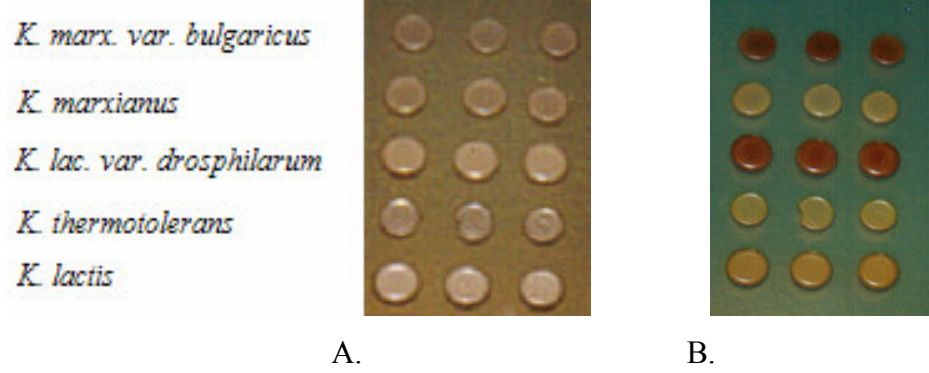
4. 1. *Kluyveromyces* Türlerinde Kalitatif Glikojen Tayini

4. 1. 1. YPD’de Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen Tayini

Araştırmanın bu bölümünde çeşitli karbon kaynaklarında üretilen *Kluyveromyces* türlerinin glikojen içerikleri kalitatif yöntemle belirlendi. Maya hücreleri YPD, YPG ve YPL ortamlarında üretilerek, glikojen içerikleri iyot boyama tekniği ile belirlendi. İyotla boyama sonucunda YPD ortamında üretilen maya türlerinden *K. lactis* var. *drosphilarum* koyu kahverengi boyandığı için en fazla glikojen biriktiren tür olarak belirlendi. *K. marxianus* var. *bulgaricus*’un açık kahverengi boyandığı ve daha az glikojen biriktirdiği belirlendi. Diğer türler iyot ile daha açık renk boyandıkları için çok az glikojen biriktirdikleri gözlemlendi. YPD ortamında üretilen mayaların boyama öncesi ve boyama sonrasına ait fotoğrafları Şekil 4.1’de verildi.

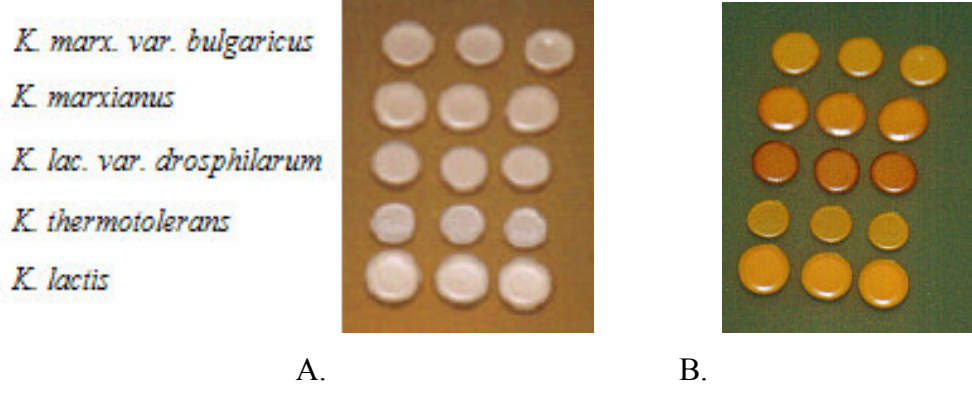


Şekil 4.1 YPD’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinin içerdikleri glikojenin iyot boyama tekniği ile gösterilmesi. İyot boyama yapılmamış (A) ve iyot ile 30 dk boyanmış *Kluyveromyces* kolonilerinin görünüşü (B).



Şekil 4.2 YPG’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinin içerdikleri glikojenin iyot boyama tekniği ile gösterilmesi. İyot boyama yapılmamış (A) ve iyot ile 30 dk boyanmış *Kluyveromyces* kolonilerinin görünüşü (B).

YPG ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde iyot boyama tekniği ile glikojen birikimi araştırıldığında en fazla glikojen birikimi *K. marxianus* var. *bulgaricus* ile *K. lactis* var. *drosphilarum*’da belirlendi. *K. lactis*’te ise iyot ile belirlenebilen az miktarda glikojen birikimi olduğu görüldü. YPG ortamında üretilen *K. marxianus* ve *K. thermotolerans*’da ise iyot boyama tekniği ile glikojen birikimi belirlenemedi. YPG ortamındaki glikojen içeriklerini ve boyanma öncesi, sonrası renk değişimlerini gösteren fotoğraflar Şekil 4.2’de verildi.



Şekil 4.3 YPL’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinin içerdikleri glikojenin iyot boyama tekniği ile gösterilmesi. İyot boyama yapılmamış (A) ve iyot ile 30 dk boyanmış petrilerin görünüşü (B).

YP laktozlu üreme ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde de glikojen birikimi önce kalitatif bir yöntem olan iyot boyama tekniği ile araştırıldı. YPL katı besiyerinde üretilen *Kluyveromyces* türlerinden sadece *K. lactis* var. *drosphilarum*’da orta düzeyde glikojen birikimi olabileceği bulundu. *Kluyveromyces*’in bu araştırmada kullanılan diğer türlerinde de karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığında iyot boyama testi ile glikojen birikimi belirlenemedi. YPL besiyerine ait iyot boyama sonuçları Şekil 4.3’te verildi.

4. 1. 2. Azot Açlığında Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen Tayini

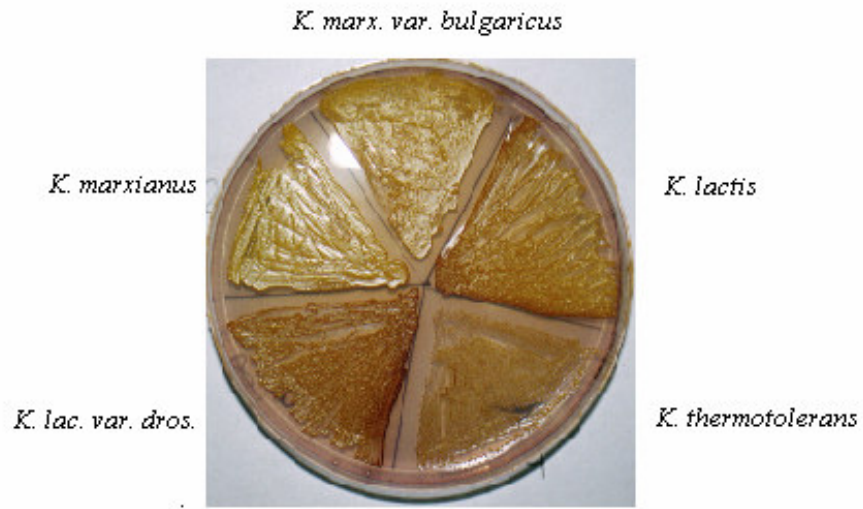
Farklı *Kluyveromyces* türlerinin karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı minimal ortamda azot eksikliğinde üretilmelerinden sonra glikojen içerikleri belirlendi. Herbir petride beş tür olacak şekilde azot içermeyen YN petrilere ekim yapıldı. 72 saat sonunda besin ortamlarına ait petrilere 10 dakika iyot buharına tutularak glikojen içerikleri belirlendi.



Şekil 4.4 Azot içermeyen ve minimal ortamda üretilen *Kluyveromyces* türlerinin glikojen içerikleri. İyot buharına 10 dakika tutulan petride glikojen depolayan suşlar iyot ile kahverengi boyandı.

Azot içermeyen minimal ortamda üreyen *Kluyveromyces* türlerinden *K. marxianus* var. *bulgaricus* en koyu renge boyanan ve glikojen içeriği en fazla olan maya olarak belirlendi. Daha sonra *K. marxianus* ve *K. lactis*'in glikojen içeriği

nedeniyle kahverengi boyandığı belirlendi. En az boyanma *K. lactis* var. *drosphilarum*'da tespit edildi. Azot içermeyen minimal ortama ait boyama öncesi ve sonrası petrilere ait fotoğraflar Şekil 4.4'te verildi.



Şekil 4.5 Minimal ortamda üretilen *Kluyveromyces* türlerinin glikojen içerikleri. İyot buharına 10 dk tutulan petride glikojen depolayan suşlar iyot ile kahverengi boyandı.

Azot ilave edilen minimal ortamda üretilen mayalardan 10. dakikada iyot ile en fazla boyanan yani en fazla glikojen depolayan tür *K. lactis* var. *drosphilarum* olarak belirlendi. Onu *K. thermotolerans* ve *K. lactis* izledi. En az boyanma *K. marxianus*'ta gözlemlendi. Petrilerin fotoğrafları Şekil 4.5'te verildi.

4. 2. YPD'de Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen Miktarının Belirlenmesi

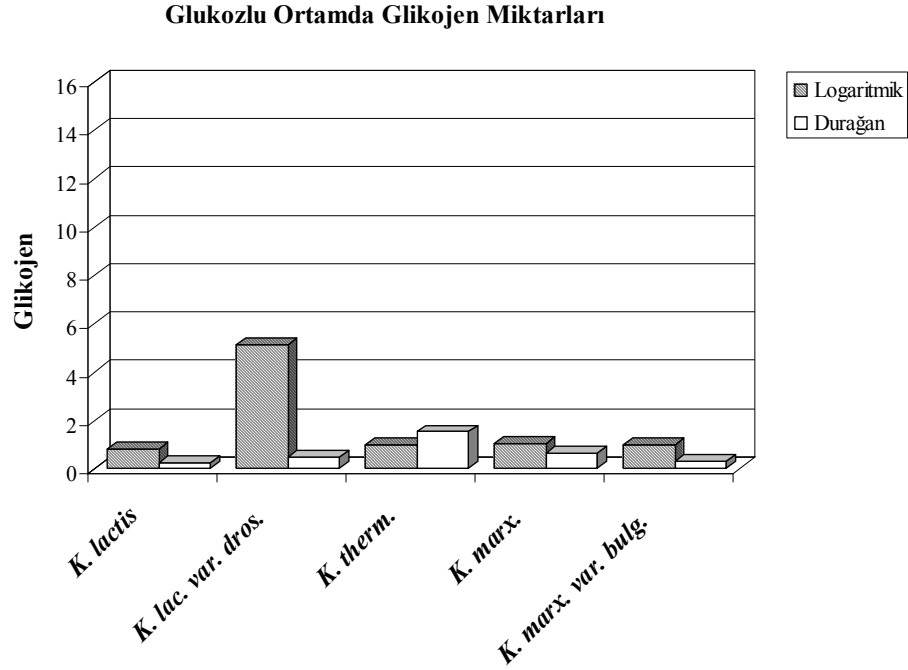
Bu çalışmada kullanılan *Kluyveromyces* türlerinin sıvı besiyerinde karbon kaynağı olarak glukozu kullandıkları koşullarda glikojen birikimleri araştırıldı. Bu amaçla bu maya türleri glukoz içeren sıvı zengin ortamda üretildiler. Maya hücrelerinin logaritmik ve durağan safhalara gelmeleri sağlanarak bu aşamalarda biriktirdikleri glikojen miktarları kantitatif olarak enzimatik yöntem ile bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde belirlendi.

Kluyveromyces türlerinin logaritmik ve durağan safhalarda biriktirdikleri glikojenlere ait ortalama değerler ve standart sapma değerleri μg glukoz/mg yaş ağırlık olarak Çizelge 4.1'de verildi. Çalışmada kullanılan *Kluyveromyces* türlerinden *K. lactis*, *K. lactis* var. *drosophilarum*, *K. marxianus* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*'da glikojen miktarları logaritmik safhada durağan safhaya göre daha yüksek bulundu. *K. thermotolerans* da durağan safhada daha yüksek olarak belirlendi. Logaritmik aşamadaki en yüksek glikojen değeri *K. lactis* var. *drosophilarum*'da ($5,11 \pm 2,43 \mu\text{g}$ glukoz /mg yaş ağırlık) bulundu. Durağan safhadaki en yüksek glikojen değerleri *K. thermotolerans*'ta $1,53 \pm 0,11 \mu\text{g}$ glukoz /mg yaş ağırlık, en düşük glikojen değeri *K. lactis*'te $0,26 \pm 0,08 \mu\text{g}$ glukoz /mg olarak belirlendi. Glukoz içeren ortamda biriktirilen glikojen miktarlarının kullanılan türler arasında karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.6'da verildi. Verilen çizelge ve grafikten de görüldüğü gibi, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı ortamlarda bazı *Kluyveromyces* türlerinde logaritmik aşamada glikojen depolandığı bulundu.

Çizelge 4.1 YPD’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinin biriktirdikleri glikojen miktarları

Maya Türü	Glikojen Miktarları ^a	
	Logaritmik Safha	Durağan Safha
<i>K. lactis</i>	0,83 ± 0,62	0,26 ± 0,08
<i>K. lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	5,11 ± 2,43	0,49 ± 0,21
<i>K. thermotolerans</i>	0,97 ± 0,31	1,53 ± 0,11
<i>K. marxianus</i>	1,05 ± 0,03	0,63 ± 0,33
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	0,98 ± 0,18	0,29 ± 0,11

^a Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.6 YPD’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinin logaritmik ve durağan safhalarda biriktirdikleri glikojen miktarlarının karşılaştırılması. Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 3. YPG'de Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen Miktarlarının Belirlenmesi

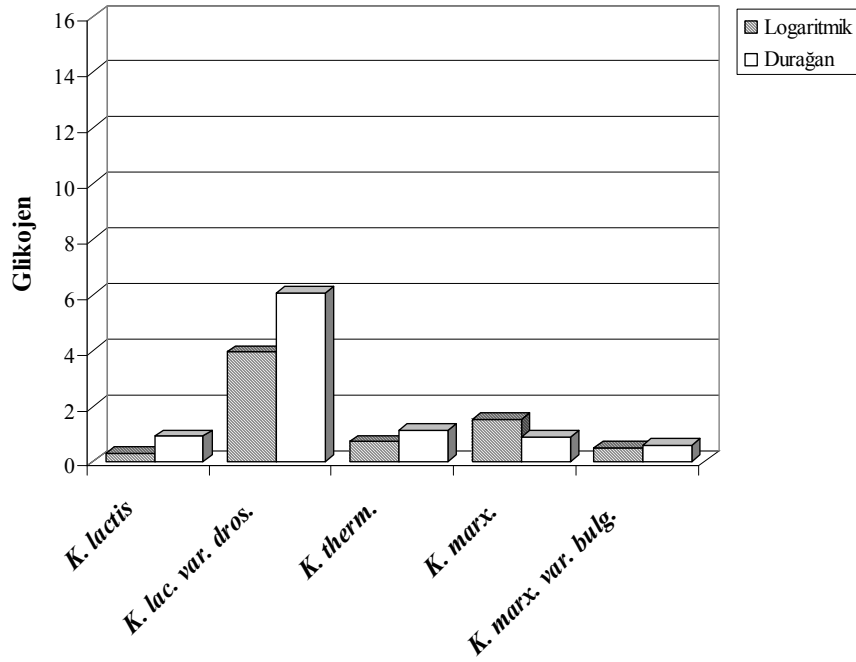
Bu çalışmada kullanılan *Kluyveromyces* türlerinin glikoneojenik ortamlarda biriktirdikleri glikojen miktarlarını belirlemek amacıyla karbon kaynağı olarak gliserolün kullanıldığı zengin ortamda üretildiler. Hücreler logaritmik veya durağan safhaya kadar üretilip biriktirdikleri glikojen miktarları belirlendi. Gliserol içeren zengin ortamda üretilen *Kluyveromyces* türlerinde belirlenen glikojen miktarlarının ortalama değerleri ve standart sapmaları Çizelge 4.2'de verildi. *K. lactis* var. *drosphilarum* logaritmik safhada $3,95 \pm 0,70$ µg glukoz/mg, durağan safhada ise $6,08 \pm 0,81$ µg glukoz/mg glikojen miktarları ile en fazla glikojen depo edebilen suş olarak belirlendi. Logaritmik aşamada ikinci yüksek glikojen miktarı ise *K. marxianus*'da belirlendi ve glikojen miktarı $1,53 \pm 1,06$ µg glukoz/mg olarak ölçüldü. Durağan safhada *K. lactis* var. *drosphilarum*'dan sonra en yüksek glikojen birikimi ise *K. thermotolerans*'ta $1,12 \pm 0,23$ µg glukoz/mg olarak bulundu. *Kluyveromyces* türlerinin glikojen miktarlarına ait grafik Şekil 4.7'de verildi. Grafikte *Kluyveromyces* türlerinden *K. lactis* var. *drosphilarum*'un her iki gelişim safhasında da en fazla glikojen miktarına sahip olduğu açıkça görülmektedir.

Çizelge 4.2 YPG’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinin glikojen miktarları

Maya Türü	Glikojen Miktarları ^a	
	Logaritmik Safha	Durağan Safha
<i>K. lactis</i>	0,30 ± 0,14	0,91 ± 0,27
<i>K. lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	3,95 ± 0,70	6,08 ± 0,81
<i>K. thermotolerans</i>	0,72 ± 0,17	1,12 ± 0,23
<i>K. marxianus</i>	1,53 ± 1,06	0,90 ± 0,56
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	0,49 ± 0,09	0,61 ± 0,31

^a Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.

Gliserollü Ortamda Glikojen Miktarları



Şekil 4.7 YPG’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinde logaritmik ve durağan safhalarda biriktirilen glikojen miktarlarının karşılaştırılması. Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 4. YPD’de Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Trehaloz Miktarlarının Belirlenmesi

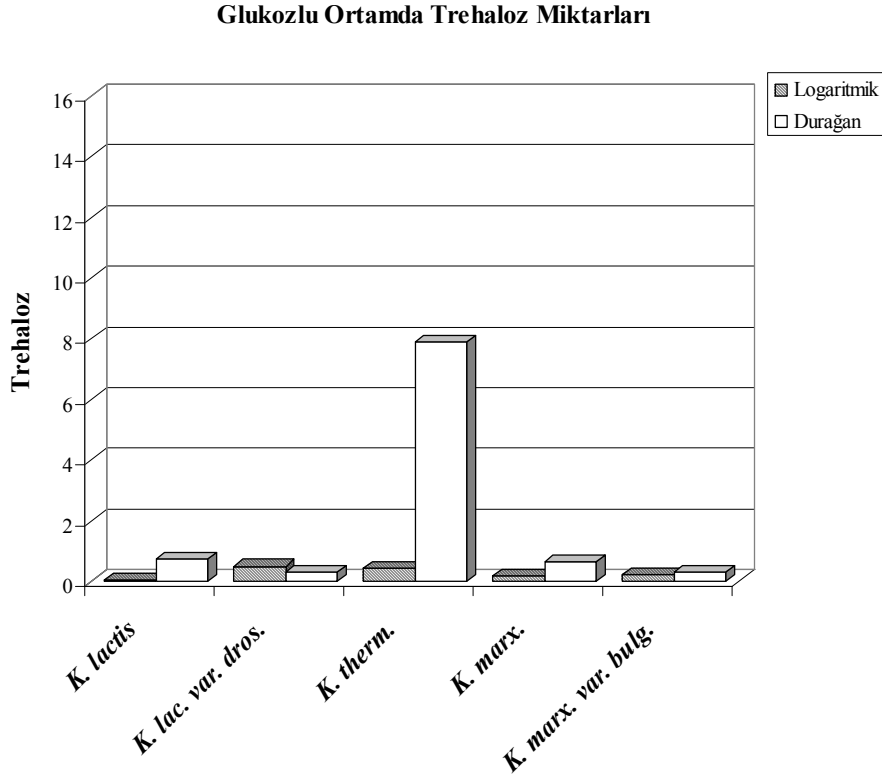
Kluyveromyces türleri glukozda üremeleri sırasında depolanan trehaloz miktarlarını belirlemek amacıyla sıvı YPD ortamda üretildiler. Maya hücreleri sıvı YPD ortamında logaritmik faza ($OD_{600} \approx 1$) veya durağan faza kadar üretilip bölüm 3.2.2’de açıklandığı şekilde trehaloz miktarları enzimatik yöntem ile belirlendi. Logaritmik ve durağan safhalardaki mayalarda ölçülen trehaloz miktarları Çizelge 4.3’te verildi. Tabloda da verilen trehaloz değerleri incelendiğinde logaritmik aşamaya kadar üretilen *Kluyveromyces* türlerinde önemli miktarda trehaloz birikimi gözlenmedi. Logaritmik safha değerlerinden en yüksek değer *K. lactis* var. *drosophilarum*’a ait olup $0,50 \pm 0,21$ μg glukoz/mg’dur. En düşük trehaloz birikimi *K. lactis*’te $0,06 \pm 0$ μg glukoz/mg olarak belirlendi.

Durağan safhada ise *K. thermotolerans* $7,88 \pm 2,04$ μg glukoz/mg trehaloz değeriyle en fazla trehaloz birikiminin gözlendiği tür olarak belirlendi. Bu safhaya ait en düşük değerler ise *K. lactis* var. *drosophilarum* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*’a ait olup yaklaşık $0,30 \pm 0,17$ μg glukoz/mg’dur. Diğer türlerin trehaloz miktarları $0,74 \pm 0,04$ ile $0,29 \pm 0,24$ μg glukoz/mg arasında dağılım göstermektedir. *Kluyveromyces* türleri arasında trehaloz verilerinin karşılaştırılmasının yapıldığı grafik Şekil 4.8’de verildi. Grafikte *K. thermotolerans*’ın durağan fazda en çok trehaloz depo edebilen tür olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3 YPD’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz birikimi

Maya Türü	Trehaloz Miktarları ^a	
	Logaritmik Safha	Durağan Safha
<i>K. lactis</i>	0,06 ± 0	0,74 ± 0,04
<i>K. lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	0,50 ± 0,21	0,29 ± 0,24
<i>K. thermotolerans</i>	0,43 ± 0,02	7,88 ± 2,04
<i>K. marxianus</i>	0,17 ± 0,06	0,65 ± 0,31
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	0,23 ± 0,06	0,30 ± 0,17

^a Ölçülen trehaloz miktarları μg glukoz/ mg yaş ağırlık \pm standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.8 YPD’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinde logaritmik ve durağan safhalarda biriktirilen trehaloz miktarlarının karşılaştırılması. Ölçülen trehaloz miktarları μg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 5. YPG'de Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Trehaloz Miktarlarının Belirlenmesi

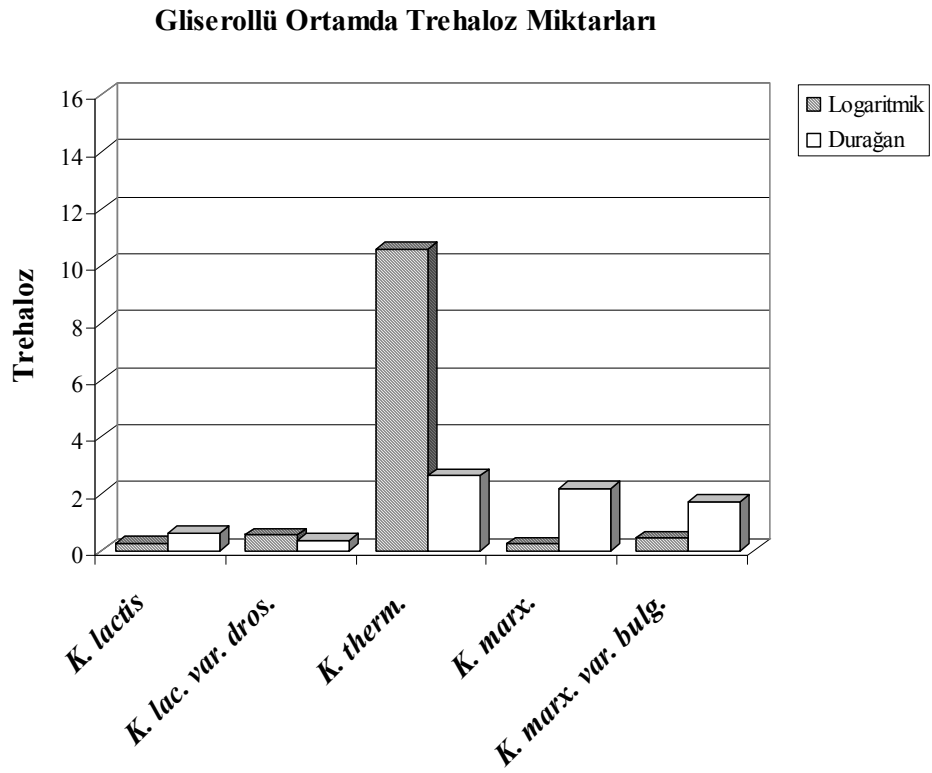
Kluyveromyces türlerinin glikoneojenik ortamlarda biriktirdikleri trehaloz miktarları bu mayaların gliserol içeren zengin ortamda üretilmesiyle belirlendi. Bu üreme ortamında da *Kluyveromyces* türleri hem logaritmik hem de durağan safhaya kadar ayrı ayrı üretildi. Üreme ortamlarından elde edilen *Kluyveromyces* türlerinin logaritmik veya durağan faza kadar depo ettikleri trehaloz miktarları bölüm 3.2.2'de verildiği şekilde belirlendi. *Kluyveromyces* türlerinin logaritmik ve durağan safhalardaki ortalama trehaloz miktarları ve standart sapmaları Çizelge 4.4'te verildi. Logaritmik aşamada bu türlerden *K. thermotolerans* da $10,58 \pm 0,76$ µg glukoz/mg ile en yüksek trehaloz birikimi olduğu bulundu.

Durağan safhaya ait trehaloz miktarları belirlendiğinde yine *K. thermotolerans*'ın $2,63 \pm 0,78$ µg glukoz/mg ile en fazla trehaloz biriktiren tür olduğu belirlendi. Çizelgeden *K. marxianus*'un $2,19 \pm 0,25$ µg glukoz/mg değerlerine sahip olduğu belirlendi. En düşük trehaloz değeri *K. lactis* var. *drosophilum*'a ait olup $0,37 \pm 0,09$ µg glukoz/mg olarak belirlendi. *Kluyveromyces* türlerinin trehaloz miktarlarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.9'da verildi.

Çizelge 4.4 YPG’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz miktarları

Maya Türü	Trehaloz Miktarları ^a	
	Logaritmik Safha	Durağan Safha
<i>K. lactis</i>	0,26 ± 0,01	0,61 ± 0,32
<i>K. lactis var. drosophilarum</i>	0,55 ± 0,35	0,37 ± 0,09
<i>K. thermotolerans</i>	10,58 ± 0,76	2,63 ± 0,78
<i>K. marxianus</i>	0,22 ± 0,21	2,19 ± 0,25
<i>K. marxianus var. bulgaricus</i>	0,43 ± 0,57	1,71 ± 0,23

^a Ölçülen trehaloz miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.9 YPG’de üretilen *Kluyveromyces* türlerinde logaritmik ve durağan safhalarda biriktirilen trehaloz miktarlarının karşılaştırılması. Ölçülen trehaloz miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 6. Azot Açlığında Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen ve Trehaloz Miktarları

4. 6. 1. Azot Açlığında Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen Miktarlarının Belirlenmesi

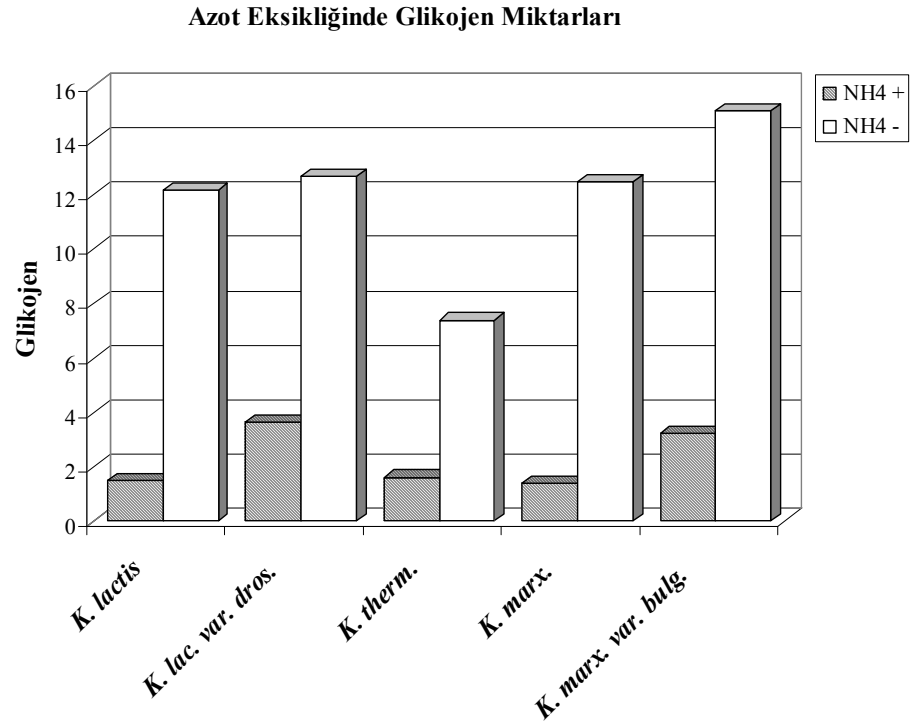
Kluyveromyces türlerinin azot içermeyen, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı minimal ortamda üremeleri sağlanarak azot eksikliğinin glikojen sentezine etkileri araştırıldı. Kontrol amacıyla aynı maya türleri azot ilave edilen minimal ortamda da üretildi ve bu ortamlarda üretilen *Kluyveromyces* türlerinin glikojen miktarları belirlendi.

Azotlu ve azotsuz üreme ortamlarında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde belirlenen glikojen değerleri ve standart sapma değerleri Çizelge 4.5'te verildi. *K. marxianus* var. *bulgaricus*'un azot varlığındaki glikojen miktarı $3,21 \pm 0,35$ µg glukoz/mg iken azot eksikliğinde bu miktar $15,07 \pm 0,23$ µg glukoz/mg olarak belirlendi. *K. lactis* var. *drosophilarum*'un azot varlığında $3,63 \pm 0$ µg glukoz/mg, azot eksikliğinde ise $12,69 \pm 0,23$ µg glukoz/mg glikojen içerdiği belirlendi. *K. thermotolerans*'da ise azot eksikliğinde biriktirilen glikojen miktarı $7,39 \pm 1,62$ µg glukoz/mg olarak ölçüldü. Azot varlığında bu mayanın $1,61 \pm 0$ µg glukoz/mg glikojen biriktirdiği tespit edildi. *Kluyveromyces* türlerinin azotlu ve azotsuz ortamlarda biriktirdikleri glikojen miktarlarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.10'da verildi. Bu grafikte de görüldüğü gibi *Kluyveromyces* türleri azot eksikliğinde azot varlığına oranla çok daha fazla glikojen içermektedirler.

Çizelge 4.5 *Kluyveromyces* türlerinin azotlu ve azotsuz ortamlarda biriktirdikleri glikojen miktarları

Maya Türü	Glikojen Miktarları ^a	
	Minimal ortam (+ NH ₄)	Minimal ortam (-NH ₄)
<i>K. lactis</i>	1,5 ± 0,40	12,18 ± 1,44
<i>K. lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	3,63 ± 0	12,69 ± 5,78
<i>K. thermotolerans</i>	1,61 ± 0	7,39 ± 1,62
<i>K. marxianus</i>	1,37 ± 0	12,45 ± 6,72
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	3,21 ± 0,35	15,07 ± 0,23

^a Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.10 Minimal ortamda azot eksikliğinde üretilen *Kluyveromyces* türlerinde biriktirilen glikojen miktarlarının karşılaştırılması. Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 6. 2. Azot Açlığında Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Trehaloz Miktarlarının Belirlenmesi

Kluyveromyces türleri azot içermeyen ve karbon kaynağı glukoz olan minimal ortamda üretilerek azot eksikliğinde biriktirdikleri trehaloz miktarları da belirlendi. Kontrol amacıyla aynı maya türleri azot ilave edilen minimal ortamda da üretilerek bunlara ait trehaloz miktarları ölçüldü.

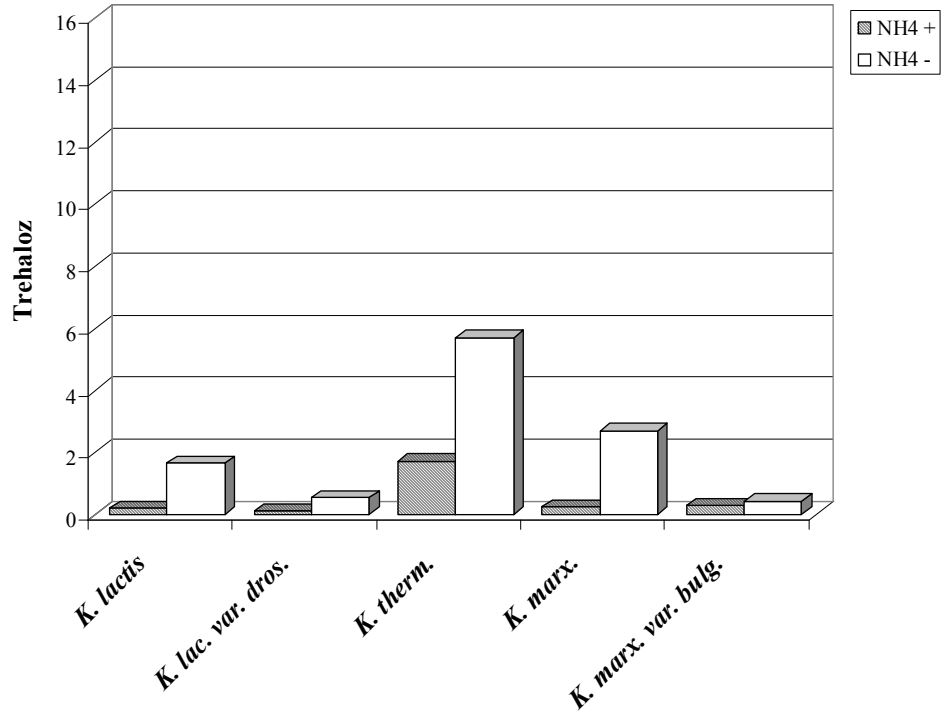
Azotlu veya azotsuz ortamlarda üretilen *Kluyveromyces* türlerinde ölçülen trehaloz miktarları ve standart sapma değerleri Çizelge 4.6'da verildi. *K. thermotolerans*'ın azotlu (minimal) ortamda $1,7 \pm 0,07$ µg glukoz/mg, azotsuz ortamda $5,69 \pm 0,11$ µg glukoz/mg trehaloz biriktirdiği bulundu. Bu değer azot içermeyen ortamda belirlenen en yüksek trehaloz değeri olarak ölçüldü. En düşük trehaloz miktarı ise *K. marxianus* var. *bulgaricus*'un $0,43 \pm 0,01$ µg glukoz /mg değeridir. Elde edilen verilere genel olarak bakıldığında bazı maya türlerinde azot eksikliğinde trehaloz birikiminin çok belirgin olarak artmadığı gözlemlendi. Maya türlerinin azotlu ve azotsuz ortama ait trehaloz miktarlarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.11'de verildi.

Çizelge 4.6 *Kluyveromyces* türlerinde azot açlığında trehaloz ölçümleri

Maya Türü	Trehaloz Miktarları ^a	
	Minimal ortam (+ NH ₄)	Minimal ortam (-NH ₄)
<i>K. lactis</i>	$0,19 \pm 0,02$	$1,65 \pm 0,47$
<i>K. lactis</i> var. <i>drosphilarum</i>	$0,11 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,40$
<i>K. thermotolerans</i>	$1,7 \pm 0,07$	$5,69 \pm 0,11$
<i>K. marxianus</i>	$0,24 \pm 0,07$	$2,69 \pm 1,27$
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	$0,28 \pm 0,24$	$0,43 \pm 0,01$

^a Ölçülen trehaloz miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık \pm standart sapma olarak verildi.

Azot Eksikliğinde Trehaloz Miktarları



Şekil 4.11 Minimal ortamda azot eksikliğinde üretilen *Kluveromyces* türlerinde biriktirilen trehaloz miktarlarının karşılaştırılması. Ölçülen trehaloz miktarları μg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 7. Isı Şokunun *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisi

4. 7. 1. Isı Şokunun *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

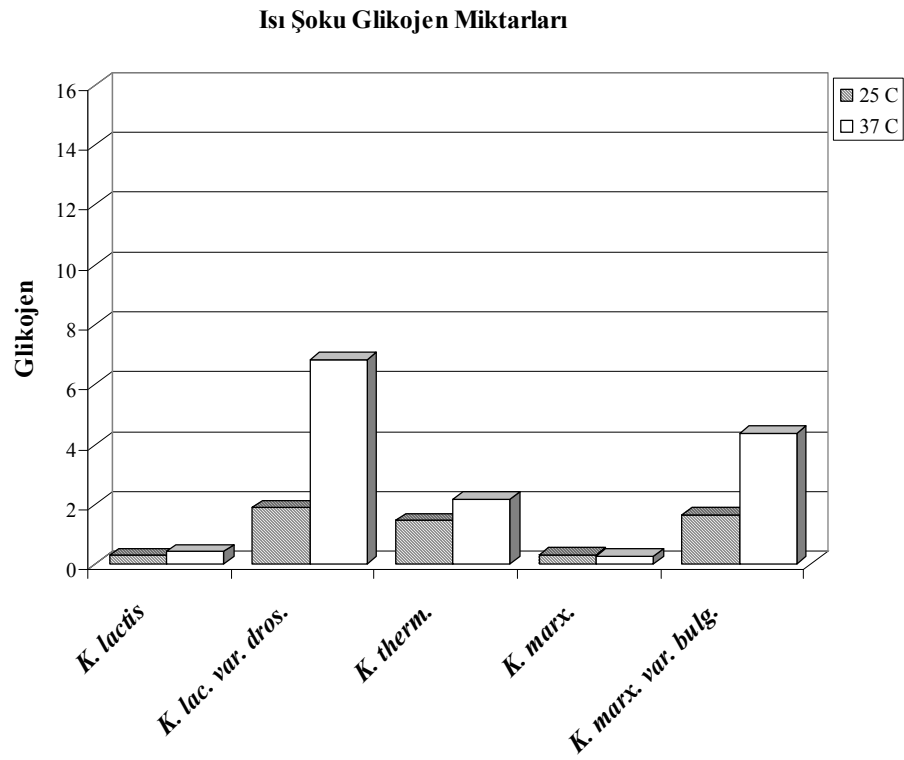
Isı şokunun bazı mayalarda trehaloz ve glikojen sentezini aktive edebildiği bilinmektedir. Isı şokunun farklı *Kluyveromyces* türlerinde depo karbonhidratlarının birikimine neden olup olmadığı araştırıldı. Bunun için *Kluyveromyces* türleri önce 25 °C’de üretilip maya kültürlerinin bir bölümü 37 °C’deki ortama aktarıldı. Isı şoku süresi sonunda *Kluyveromyces* türlerindeki depo karbonhidratları karşılaştırmalı olarak belirlendi.

Isı şokunun bazı *Kluyveromyces* türlerinde glikojen birikimine neden olduğu bulundu. 25 °C’de ve 37 °C’de üretilen mayalarda belirlenen glikojen miktarları Çizelge 4.7’de verildi. Bu verilerden de görüldüğü gibi 25 °C’de üretilen *K. lactis* var. *drosphilarum*’daki glikojen miktarı $1,90 \pm 0,04$ µg glukoz/mg olarak ölçüldü. Fakat 37 °C’de ısı şokuna maruz bırakılan *K. lactis* var. *drosphilarum*’da glikojen miktarı $6,84 \pm 0,64$ µg glukoz/mg glikojen olarak belirlendi. *K. marxianus* 25 °C’de üretildiğinde glikojen miktarı $0,32 \pm 0,15$ µg glukoz/mg glikojen olarak ölçüldü. Fakat 37 °C’de ısı şokunun bu *Kluyveromyces* türünde glikojen birikimine neden olmadığı görüldü ve glikojen miktarı $0,28 \pm 0,11$ µg glukoz/mg glikojen olarak ölçüldü. *K. marxianus*’a benzer şekilde, *K. lactis*’te de ısı şokunun glikojen birikimine neden olmadığı görüldü. Normal ortamda üretilen ve ısı şokuna uğratılan *K. lactis*’te glikojen miktarları $0,30 \pm 0,16$ µg glukoz/mg ve $0,42 \pm 0,15$ µg glukoz/mg glikojen olarak ölçüldü. *Kluyveromyces* türlerinin normal ortamda ve ısı şokundan sonra ölçülen glikojen miktarları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.12’de verildi.

Çizelge 4. 7 *Kluyveromyces* türlerinde ısı şoku uygulaması glikojen ölçümleri

Maya Türü	Glikojen Miktarları ^a	
	25 °C	37 °C
<i>K. lactis</i>	0,30 ± 0,16	0,42 ± 0,15
<i>K. lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	1,90 ± 0,04	6,84 ± 0,64
<i>K. thermotolerans</i>	1,46 ± 0,39	2,16 ± 0,16
<i>K. marxianus</i>	0,32 ± 0,15	0,28 ± 0,11
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	1,65 ± 0	4,37 ± 0,57

^a Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.12 Isı şokunun *Kluyveromyces* türlerinde glikojen birikimine etkileri. Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

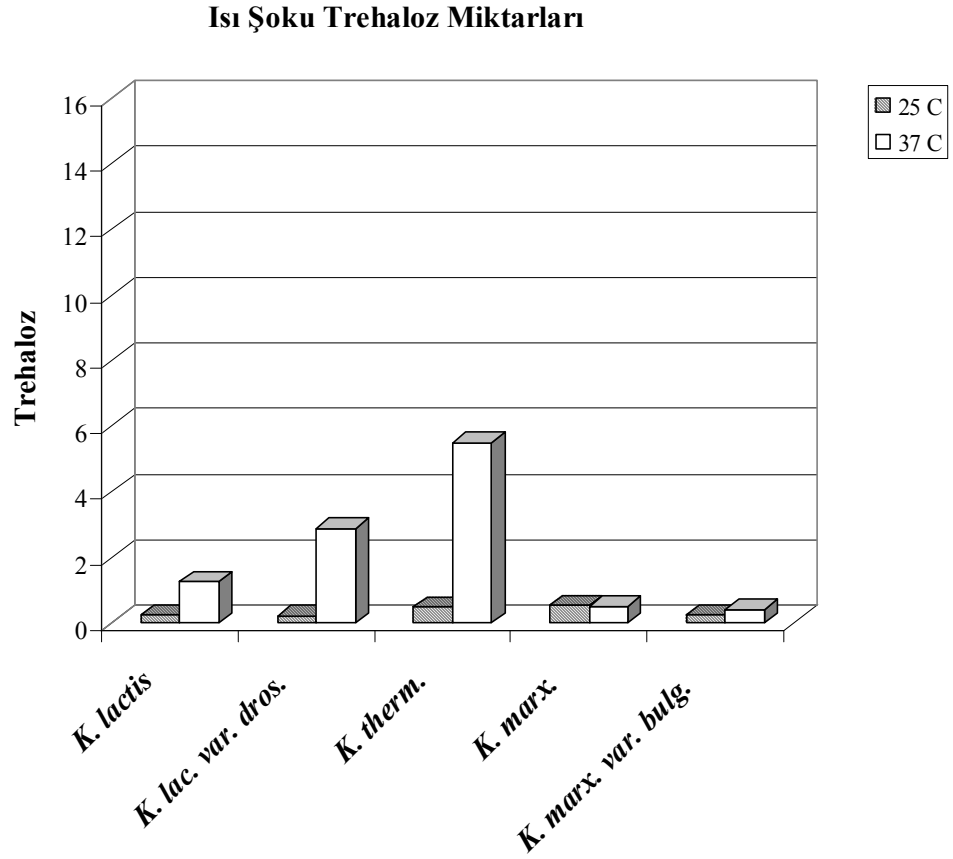
4. 7. 2. Isı Şokunun *Kluyveromyces* Türlerinde Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

Isı şokunun *Kluyveromyces* türlerindeki trehaloz metabolizmasına etkileri de araştırıldı. 25 °C'de ve 37 °C'de üretilen *Kluyveromyces* türlerinde ölçülen trehaloz miktarları Çizelge 4.8'de verildi. Çizelgede görülen değerlerden de anlaşılacağı gibi *K. thermotolerans* 25 °C'de $0,49 \pm 0,19$ µg glukoz/mg, 37 °C'de $5,50 \pm 3,62$ µg glukoz/mg trehaloz değeriyle en fazla trehaloza sahip türdür. Isı şokunun *K. lactis* var. *drosphilarum*'da da önemli miktarda (yaklaşık 10 kat) trehaloz artışına neden olduğu ve trehaloz miktarlarının $0,22 \pm 0,06$ µg glukoz/mg'dan $2,89 \pm 1,35$ µg glukoz/mg trehaloza kadar yükseldiği bulundu. Benzer şekilde ısı şoku etkisiyle *K. lactis*'te de önemli miktarda trehaloz birikimi ($1,25 \pm 0,13$ µg glukoz/mg) olduğu belirlendi. Fakat ısı şoku etkisiyle *K. marxianus*'un her iki türünde de önemli miktarda trehaloz artışı gözlenmedi. 25 °C ve ısı şoku uygulamasına ait trehaloz miktarlarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.13'te verildi.

Çizelge 4.8 *Kluyveromyces* türlerinde ısı şoku uygulaması trehaloz ölçümleri

Maya Türü	Trehaloz Miktarları ^a	
	25 °C	37 °C
<i>K. lactis</i>	$0,24 \pm 0,16$	$1,25 \pm 0,13$
<i>K. lactis</i> var. <i>drosphilarum</i>	$0,22 \pm 0,06$	$2,89 \pm 1,35$
<i>K. thermotolerans</i>	$0,49 \pm 0,19$	$5,50 \pm 3,62$
<i>K. marxianus</i>	$0,54 \pm 0,12$	$0,52 \pm 0,51$
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	$0,24 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,17$

^a Ölçülen trehaloz miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.13 Isı şokunun *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz birikimine etkileri. Ölçülen trehaloz miktarları μg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 8. Ozmotik Şokun *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen ve Trehaloz Birikimine Etkisi

4. 8. 1. Ozmotik Şokun *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

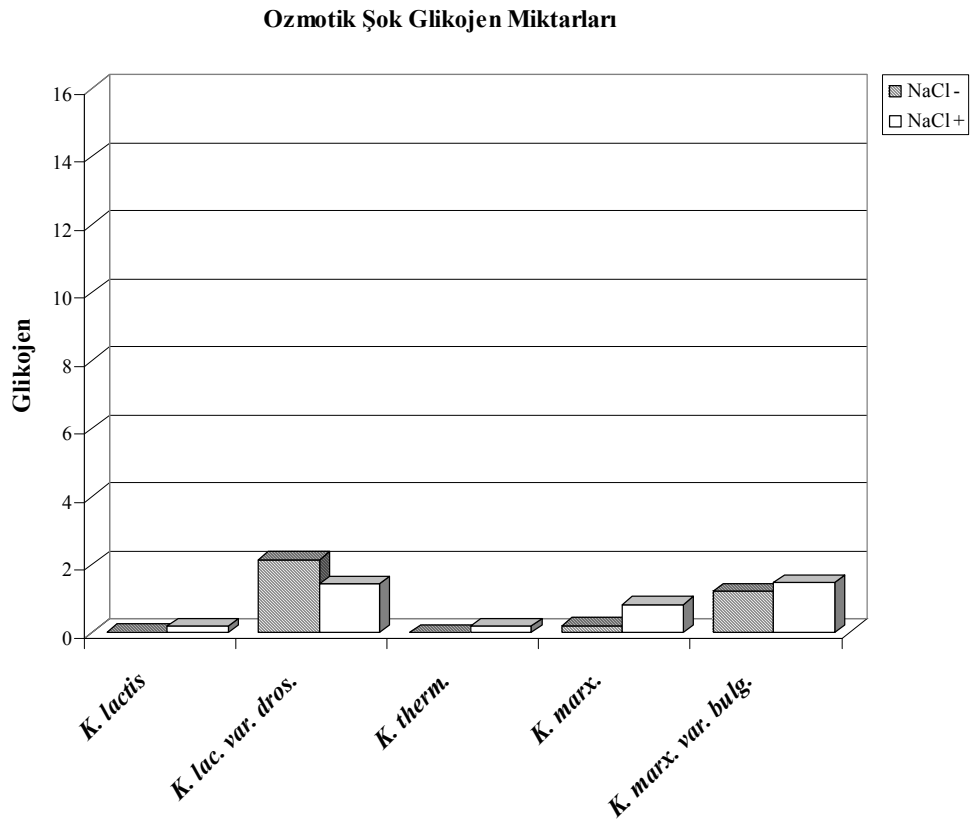
Üreme ortamında oluşturulan ozmotik stresin *Kluyveromyces* türlerinde depo karbonhidrat birikimine etkilerini analiz edebilmek için üreme ortamına 0.8 M NaCl ilave edildi. Ozmotik streste ve normal koşullarda üretilen *Kluyveromyces* türlerinde ölçülen glikojen miktarları Çizelge 4.9'da verildi. *Kluyveromyces* türlerinin sıvı üreme ortamlarında oluşturulan ozmotik stresin bu maya türlerinde glikojen birikimine yol açmadığı görüldü. Normal ortamda ve 0.8 M NaCl içeren ortamda üretilen beş farklı

Kluyveromyces türlerinde ölçülen glikojen miktarları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.14'te verildi.

Çizelge 4.9 *Kluyveromyces* türlerinde ozmotik şok uygulaması glikojen ölçümleri

Maya Türü	Glikojen Miktarları ^a	
	YPD	YPD + 0,8M NaCl
<i>K. lactis</i>	0,02 ± 0,02	0,18 ± 0,25
<i>K. lactis</i> var. <i>drosphilarum</i>	2,15 ± 0,06	1,43 ± 0,63
<i>K. thermotolerans</i>	0	0,19 ± 0,26
<i>K. marxianus</i>	0,21 ± 0,20	0,83 ± 0
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	1,21 ± 0,43	1,48 ± 0,08

^a Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.14 Ozmotik stresin *Kluyveromyces* türlerinde glikojen birikimine etkileri. Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 8. 2. Ozmotik Şokun *Kluyveromyces* Türlerinde Trehaloz Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

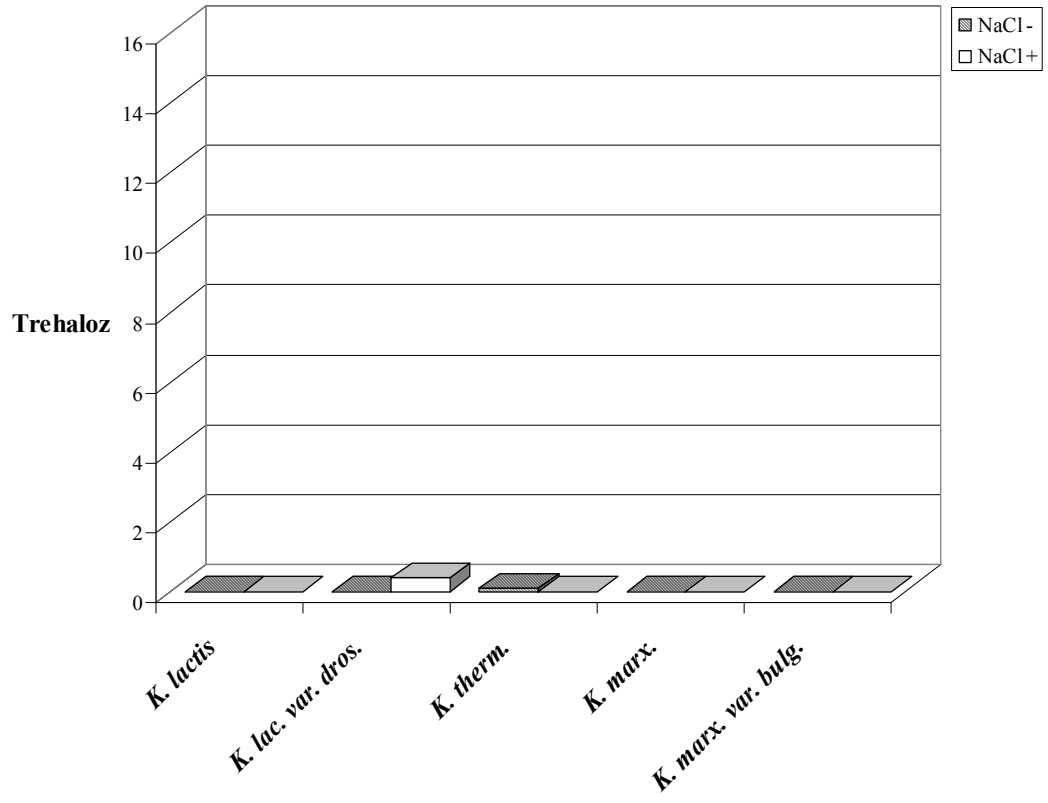
Ozmotik strese ve zengin ortamda üretilen maya hücrelerden elde edilen trehaloz değerleri belirlendi ve bu değerler Çizelge 4.10'da verildi. Çizelgeden de görüldüğü gibi maya türlerinden sadece *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. thermotolerans*'ta çok az miktarda trehaloz belirlendi. Trehaloz değerlerine ait grafik Şekil. 4.15'de verildi.

Çizelge 4.10 *Kluyveromyces* türlerinde ozmotik şok uygulaması trehaloz ölçümleri

Maya Türü	Trehaloz Miktarları ^a	
	YPD	YPD + 0,8M NaCl
<i>K. lactis</i>	0	0
<i>K. lactis</i> var. <i>drosphilarum</i>	0	0,40 ± 0,28
<i>K. thermotolerans</i>	0,09 ± 0,12	0
<i>K. marxianus</i>	0	0
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	0	0

^a Ölçülen trehaloz miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.

Ozmotik Şok Trehaloz Miktarları



Şekil 4.15 Ozmotik stresin *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz birikimine etkileri. Ölçülen trehaloz miktarları μg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 9. *Kluyveromyces* Türlerinde Pseudohifsel Farklılaşmanın Uyarıldığı Koşullarda Glikojen ve Trehaloz Miktarları

4. 9. 1. *Kluyveromyces* Türlerinde Pseudohifsel Farklılaşmanın Uyarıldığı Koşullarda Glikojen Miktarının Belirlenmesi

Kluyveromyces türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarılabilmesi için SLAD besin ortamı kullanıldı. SLAD ortamına ilave edilen butanol ve isopropanol'ünde pseudohifsel farklılaşma sırasında glikojen birikimini etkileyip etkilemeyeceği araştırıldı. SLAD, SLAD + %1 bütanol ve SLAD + %1 isopropanol ortamlarında *Kluyveromyces* türlerinden elde edilen glikojen miktarları belirlendi. Maya türlerinin her bir besin ortamına ait glikojen miktarları Çizelge 4.11'de verildi. Elde edilen bulgulara göre SLAD ortamında en yüksek glikojen birikimi *K. marxianus*'ta gözlemlendi ve $24,84 \pm 0,30$ µg glukoz/mg ölçüldü. En düşük glikojen ise *K. thermotolerans*'ta ölçüldü ve glikojen miktarı $4,96 \pm 0,42$ µg glukoz/mg olarak belirlendi.

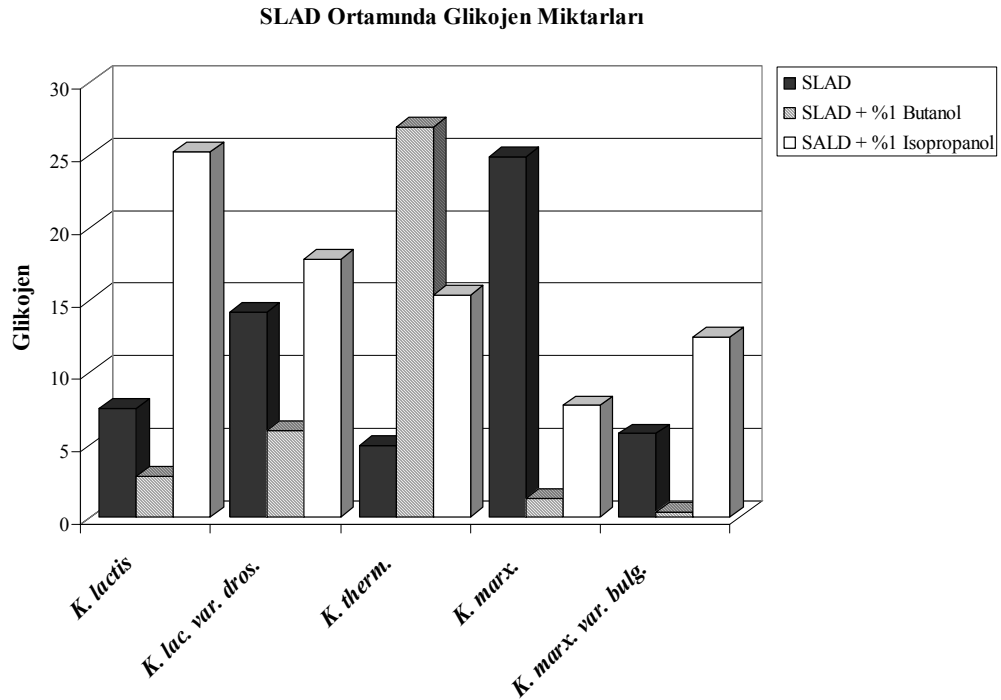
Fakat SLAD ortamına ek olarak aynı üreme ortamına %1 bütanol veya %1 isopropanol eklenmesinin *Kluyveromyces* türlerindeki glikojen birikiminde çok önemli farklılıklara neden olduğu gözlemlendi. SLAD + bütanol ortamında üretilen *K. thermotolerans*'ta çok fazla miktarda ($26,90 \pm 0,66$ µg glukoz/mg) glikojen birikimine neden olduğu gözlemlenirken, bu ortamda üremenin diğer *Kluyveromyces* türlerinde ise glikojen miktarlarında çok fazla miktarda azalmalara neden olduğu bulundu.

SLAD + %1 isopropanol içeren ortamda üretilen *Kluyveromyces* türlerinde türlerinde yüksek miktarlarda glikojen belirlendi. *K. lactis*'te $25,21 \pm 0,25$ µg glukoz/mg, *K. lactis* var. *drosophilarum*'da $17,83 \pm 1,46$ µg glukoz/mg glikojen ölçüldü. En düşük glikojen seviyesi *K. marxianus*'da $7,72 \pm 0,12$ µg glukoz/mg olarak belirlendi. Bütün bu üreme ortamlarından elde edilen verilerin karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.19'da verildi.

Çizelge 4.11 *Kluyveromyces* türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarıldığı SLAD, SLAD+ %1 bütanol ve SLAD + %1 isopropanol ortamlarında belirlenen glikojen miktarları

Maya Türü	Glikojen Miktarları ^a		
	SLAD	SLAD + %1 Bütanol	SLAD + %1 İsoopropanol
<i>K. lactis</i>	7,48 ± 0,25	2,80 ± 0,76	25,21 ± 0,25
<i>K. lactis</i> var. <i>drosphilarum</i>	14,17 ± 0,21	6,01 ± 0,30	17,83 ± 1,46
<i>K. thermotolerans</i>	4,96 ± 0,42	26,90 ± 0,66	15,36 ± 0,61
<i>K. marxianus</i>	24,84 ± 0,30	1,28 ± 0,16	7,72 ± 0,12
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	5,76 ± 0,30	0,38 ± 0,06	12,48 ± 0,11

^a Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.16 Farklı SLAD ortamlarında üretilen *Kluyveromyces* türlerindeki glikojen birikimlerinin karşılaştırılması. Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 9. 2. *Kluyveromyces* Türlerinde Pseudohifsel Farklılaşmanın Uyarıldığı Koşullarda Trehaloz Miktarının Belirlenmesi

Pseudohifsel üremenin *Kluyveromyces* türlerindeki trehaloz metabolizmasına etkileri de araştırıldı. Bunun için SLAD, SLAD + %1 bütanol ve SLAD + %1 isopropanol ortamlarında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz miktarları belirlendi. Pseudohifsel üremenin uyarıldığı SLAD besin ortamında ve alkol ilave edilen SLAD ortamlarında üretilen *Kluyveromyces* türlerine ait trehaloz miktarları Çizelge 4.12’de verildi. SLAD ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde belirlenen trehaloz miktarları karşılaştırıldığında en fazla trehaloz birikiminin *K. lactis* ve *K. thermotolerans*’ta olduğu görüldü (Çizelge 4.12). SLAD ortamlarında üretilen *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*’ta ise düşük miktarda trehaloz olduğu bulundu.

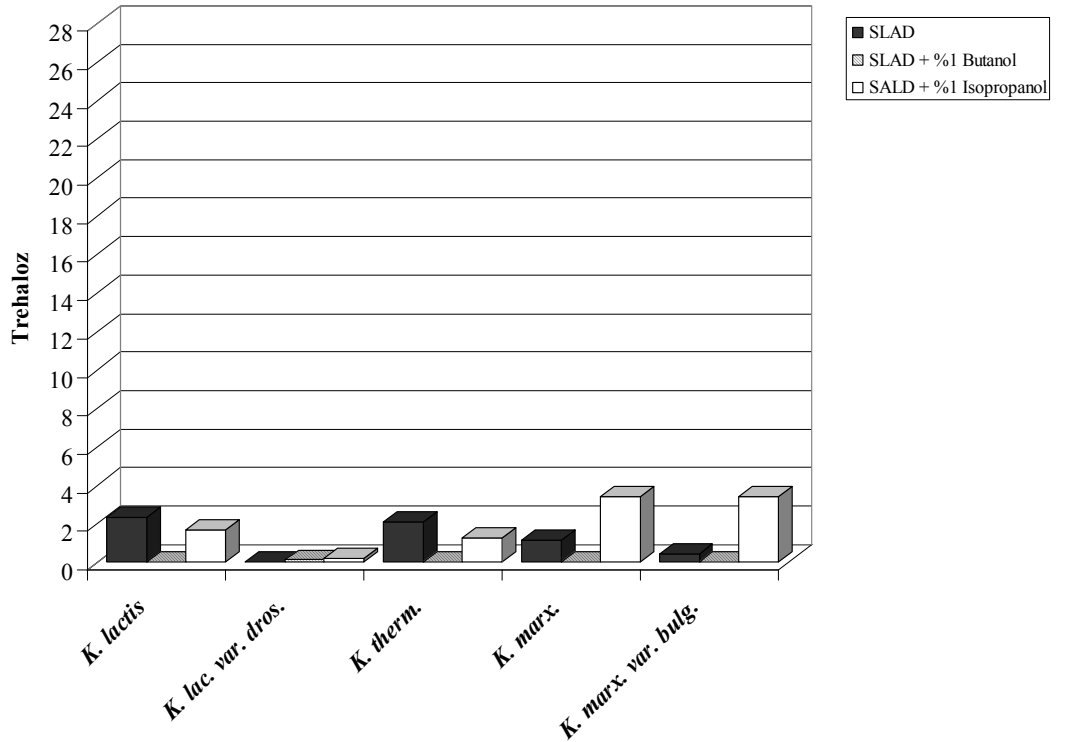
SLAD + %1 bütanol ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz birikimi belirlenmedi. SLAD + %1 isopropanol ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinden *K. marxianus*’ta $3,43 \pm 0,05$ µg glukoz/mg ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*’da ise $3,38 \pm 0$ µg glukoz/mg trehaloz ölçüldü. En düşük trehaloz miktarı *K. lactis* var. *drosphilarum*’da $0,19 \pm 0,15$ µg glukoz/mg olarak belirlendi. Pseudohifsel farklılaşmanın uyarıldığı bu ortamların tamamındaki trehaloz verilerinin karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.20’de verildi.

Çizelge 4.12 *Kluyveromyces* türlerinin pseudohifsel farklılaşmanın uyarıldığı SLAD, SLAD+ %1 Bütanol ve SLAD + %1 isopropanol ortamlarında belirlenen trehaloz miktarları

Maya Türü	Trehaloz Miktarları ^a		
	SLAD	SLAD + %1 Bütanol	SLAD + %1 İsoopropanol
<i>K. lactis</i>	2,34 ± 0	0	1,69 ± 0,03
<i>K. lactis</i> var. <i>drosophilarum</i>	0,03 ± 0,04	0,11 ± 0,15	0,19 ± 0,15
<i>K. thermotolerans</i>	2,10 ± 0,33	0	1,29 ± 0,41
<i>K. marxianus</i>	1,12 ± 0,07	0	3,43 ± 0,05
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	0,43 ± 0	0	3,38 ± 0

^a Ölçülen trehaloz miktarları µg glukoz/ mg yaş ağırlık ± standart sapma olarak verildi.

SLAD Ortamında Trehaloz Miktarları

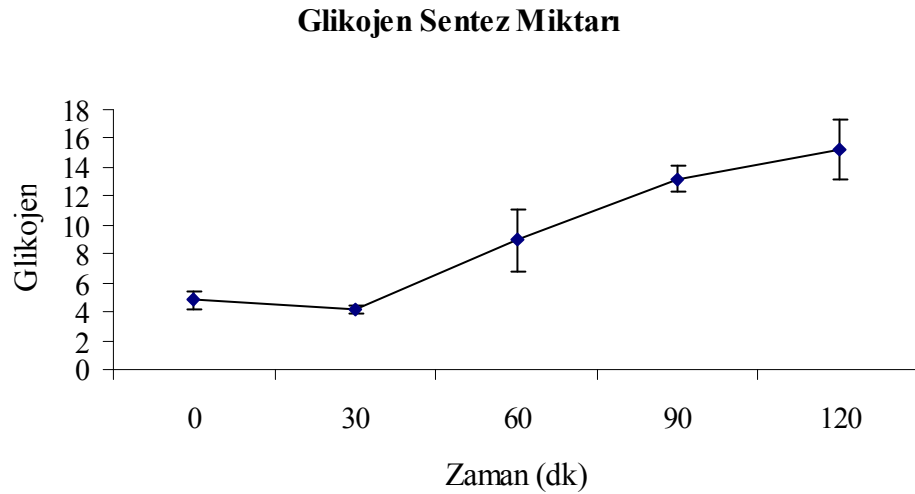


Şekil 4.17 Farklı SLAD ortamlarında üretilen *Kluyveromyces* türlerindeki trehaloz birikiminin karşılaştırılması. Ölçülen trehaloz miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi.

4. 10. YPD'de Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Glikojen Sentez Miktarı ve Yıkım Şeklinin Belirlenmesi

4. 10. 1. YPD'de Üretilen *K. lactis* var. *drosphilarum*'da Glikojen Sentez Miktarının Belirlenmesi

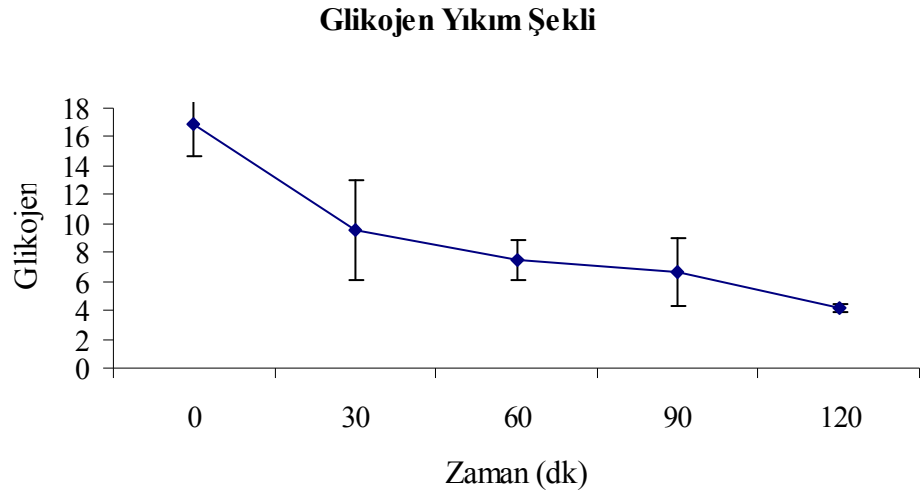
K. lactis var. *drosphilarum*'da glikojen sentez miktarının belirlenmesi için bölüm 3.4'te açıklandığı şekilde azot içermeyen minimal ortamlarda üretildi. Belirli zaman aralıkları ile üreme ortamından maya örnekleri alınarak glikojen içeriği belirlendi. Elde edilen değerler ile hazırlanan sentez ve birikim miktarına ait grafik Şekil 4. 18'de verildi. Buradaki değerlere göre *K. lactis* var. *drosphilarum*'da 30. dakikadan itibaren glikojen birikiminin başladığı ve zaman ile doğru orantılı olarak glikojen sentezi ve birikiminde artış olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.18 *K. lactis* var. *drosphilarum* 'da glikojen sentez miktarının belirlenmesi. Ölçülen glikojen miktarları μg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi. Eğrilerdeki barlar standart hatayı göstermektedir.

4. 10. 2. YPD'de Üretilen *K. lactis* var. *drosphilarum*'da Glikojen Yıkım Şeklinin Belirlenmesi

K. lactis var. *drosphilarum* glikojen yıkım şeklinin belirlenmesi için ilk önce zengin ortamda üretildiler. Daha sonra azot içermeyen minimal ortama aktarılıp glikojen sentezlemeleri sağlanan maya hücreleri tekrar zengin ortamda üretilerek glikojen yıkımı sağlandı. Belli zaman aralıkları ile örnek alınarak maya hücrelerinin glikojen içerikleri belirlendi. Elde edilen değerler ile hazırlanan yıkım şklne ait grafik Şekil 4.19'da verildi. Buradaki değerlere göre *K. lactis* var. *drosphilarum*'da 0. dakikadan itibaren glikojenin yıkılmaya başladığı, 30. dakikada glikojen miktarının 15,79 µg glc/ mg olan başlangıç değerinin yarısına düştüğü gözlemlendi.

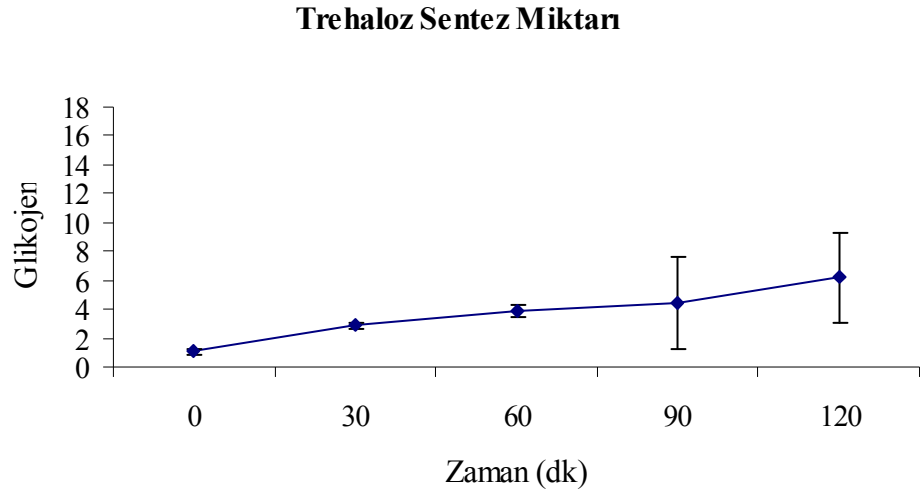


Şekil 4.19 *K. lactis* var. *drosphilarum*'da glikojen yıkım şeklinin belirlenmesi. Ölçülen glikojen miktarları µg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi. Eğrilerdeki barlar standart hatayı göstermektedir.

4. 11. YPD’de Üretilen *Kluyveromyces* Türlerinde Trehaloz Sentez Miktarının ve Yıkım Şeklinin Belirlenmesi

4. 11. 1. YPD’de Üretilen *K. thermotolerans*’ta Trehaloz Sentez Miktarının Belirlenmesi

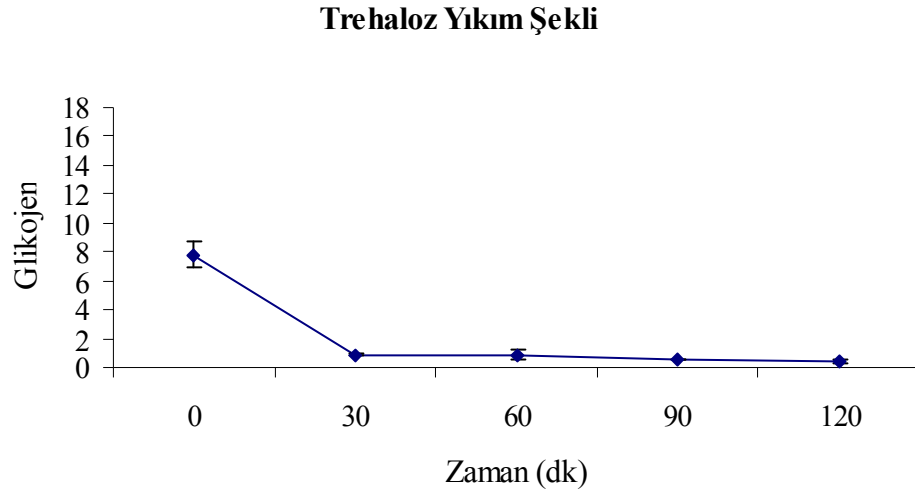
K. thermotolerans’ta trehaloz sentez Miktarının belirlenmesi için hücreler ilk önce zengin ortamda daha sonra azot içermeyen minimal ortamlarda üretildiler. 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda alınan maya örneklerinde trehaloz miktarları belirlendi. Elde edilen değerler ile hazırlanan sentez Miktarlarına ait grafik Şekil 4.20’de verildi. Belirlenen trehaloz miktarlarına göre *K. thermotolerans*’ta 0. dakikadan itibaren trehaloz birikiminin başladığı görüldü. 120. dakikaya kadar trehaloz birikiminde belirgin bir artış olduğu bulundu.



Şekil 4.20 *K. thermotolerans*’ta trehaloz sentez miktarının belirlenmesi. Ölçülen trehaloz miktarları μg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi. Eğrilerdeki barlar standart hatayı göstermektedir.

4. 11. 2. YPD'de Üretilen *K. thermotolerans*'ta Trehaloz Yıkım Şeklinin Belirlenmesi

K. thermotolerans'ta trehaloz yıkım şeklinin belirlenmesi için önce bu maya hücresinde trehaloz birikimi için maya hücreleri ilk olarak azot içermeyen minimal ortamda üretildi. Daha sonra maya hücreleri zengin ortama aktarıldılar. 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda üreme ortamında maya örnekleri alınıp trehaloz miktarları belirlendi. Elde edilen değerler ile hazırlanan trehaloz yıkım şekline ait grafik Şekil 4.21'de verildi. Buradaki değerlere göre *K. thermotolerans*'ta 0. dakikadan itibaren trehalozun hızla yıkılmaya başladığı ve 30. dakikada trehalozun tamamına yakın miktarının yıkıldığı belirlendi.



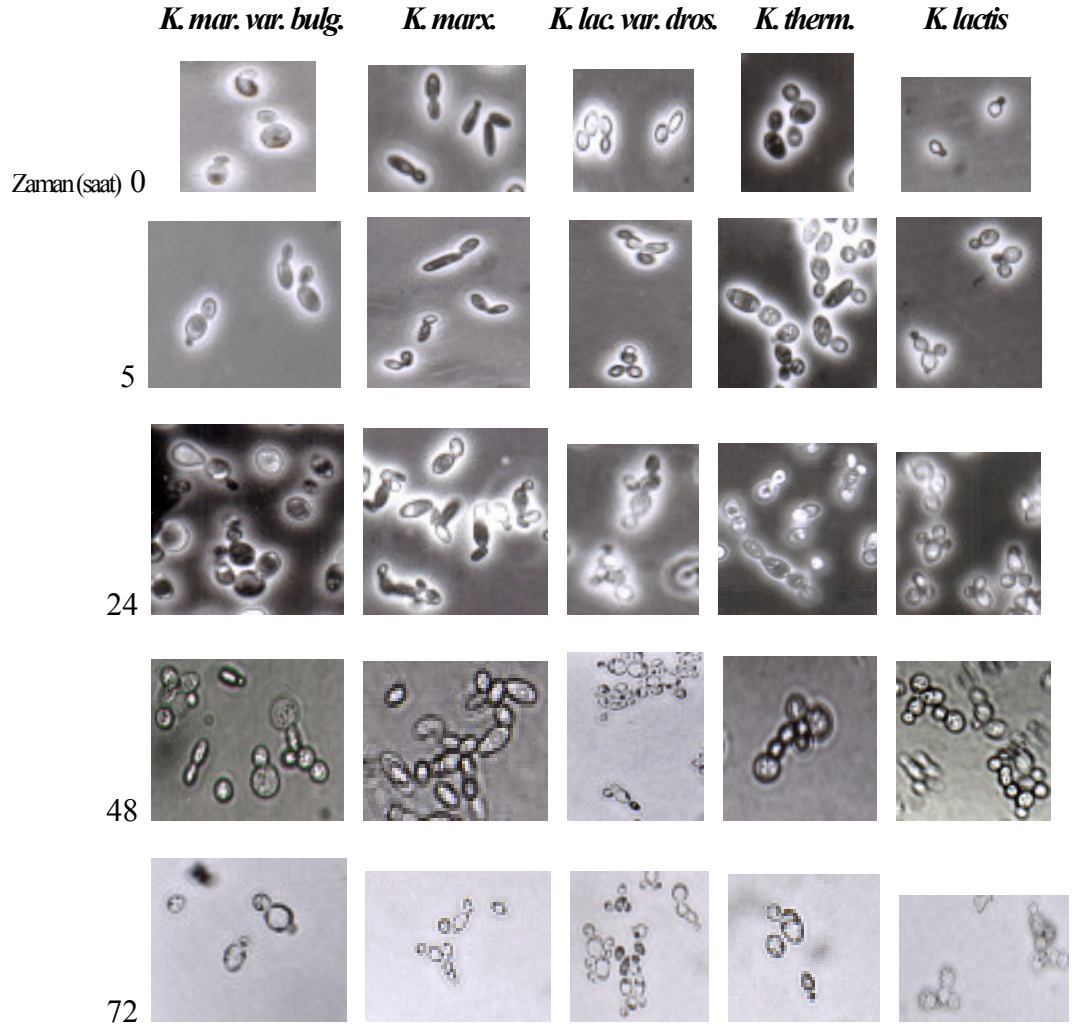
Şekil 4.21 *K. thermotolerans*'ta trehaloz yıkım şeklinin belirlenmesi. Ölçülen trehaloz miktarları μg glukoz/mg yaş ağırlık olarak verildi. Eğrilerdeki barlar standart hatayı göstermektedir.

4. 12. *Kluyveromyces* Türlerinde Pseudohifsel Farklılaşmanın Uyarılması

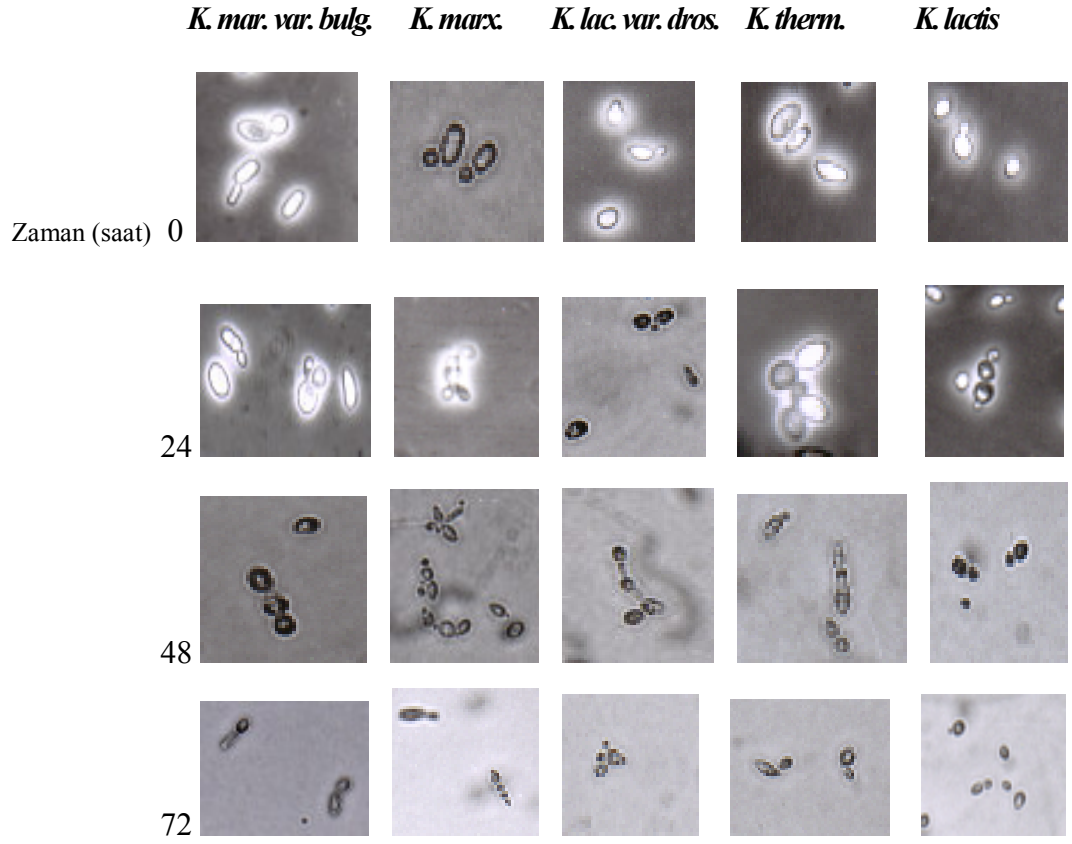
Çalışmada kullanılan *Kluyveromyces* türleri pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması amacıyla katı SLAD, SLAD + %1 bütanol ve SLAD + %1 isopropanol ortamlarında üretildiler. Önce 72 saat süresince üremeleri sağlanan mayalarda pseudohifsel farklılaşma olup olmadığı araştırıldı. SLAD ortamında üretilen mayaların 5, 24, 48 ve 72. saatlere ait fotoğrafları Şekil 4.22’de verildi. SLAD + %1 bütanol ortamında üretilen mayaların 24, 48 ve 72. saatlerdeki fotoğrafları Şekil 4.23’te, SLAD + %1 isopropanol’de üretilen mayaların 24, 48 ve 72. saatlere ait fotoğrafları Şekil 4.24’te verildi. SLAD ortamında üretilen mayaların tamamında 5. saatte pseudohifsel farklılaşma gözlemlendi. 5. saatte en fazla filamentli üreme *K. lactis*, *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. thermotolerans* türlerinde gözlemlendi. 24. ve 48. saatlerde *Kluyveromyces* türlerinin tamamında filamentli üremenin arttığı, dallanmış yapıların oluştuğu gözlemlendi. 72. saatte ise *K. marxianus*, *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. lactis*’te dallanmanın arttığı belirlendi.

SLAD + %1 bütanol besin ortamında üremeleri sağlanan *Kluyveromyces* türlerinde ilk 5 saatte filamentli üreme gözlenmedi. 24. saatte türlerin tamamında filamentli üreme görülürken, en fazla dallanma oluşturan türlerin *K. marxianus*, *K. thermotolerans* ve *K. lactis* olduğu belirlendi. *K. marxianus*’un 48. saatte en fazla filamentli üreme gösteren tür olduğu, diğer türlerde dallanmanın fazla olmadığı gözlemlendi. 72. saatte çalışmada kullanılan *Kluyveromyces* türlerine ait kültürlerde filamentli üreme gösteren hücrelerin ve bu hücrelerdeki dallanmanın azaldığı belirlendi.

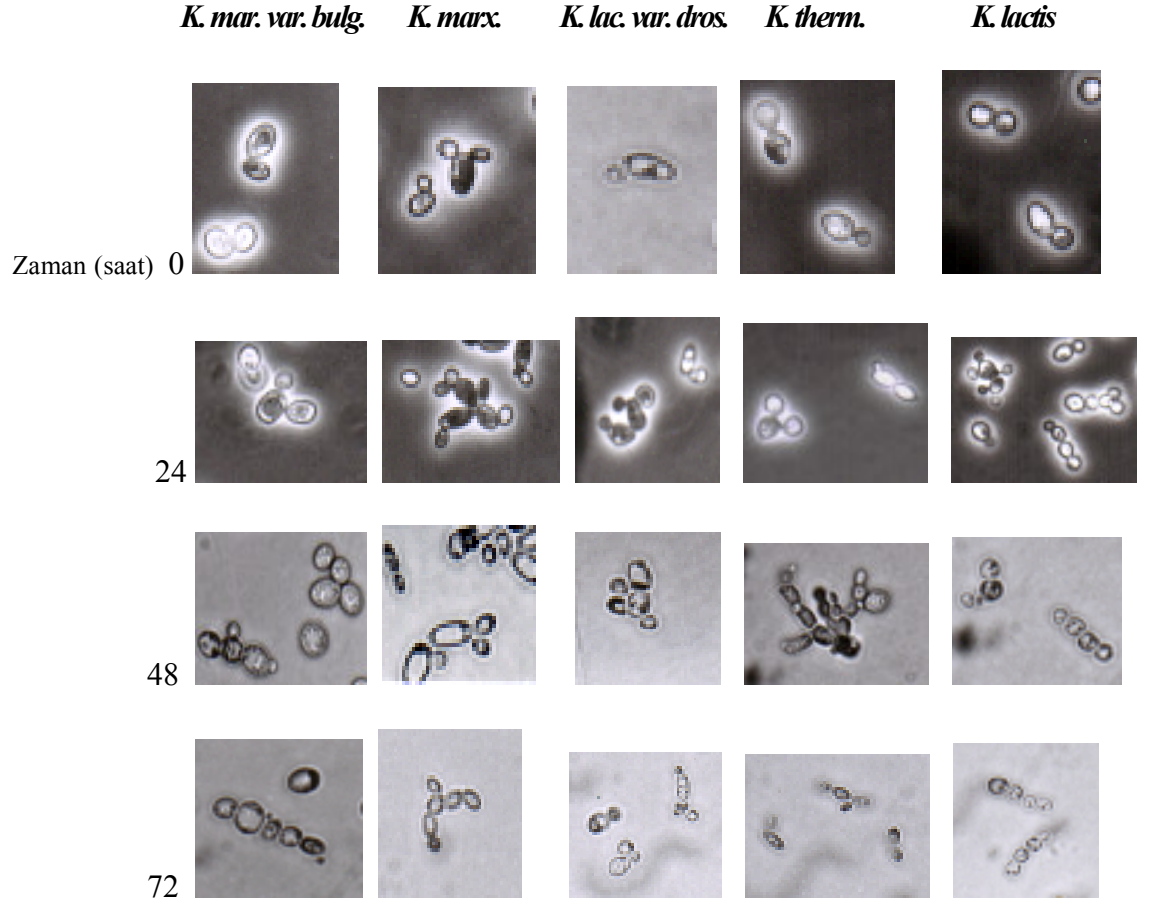
Filamentli büyümenin uyarılması için SLAD + %1 isopropanol ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde ilk beş saatte filamentli üreme gözlenmedi. 24. saatte ise türlerin tamamında çok sayıda dallanma içeren filamentli yapıların oluştuğu gözlemlendi. *K. marxianus*, *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. lactis*’te dallanmaların, SLAD ve SLAD + %1 bütanol ortamlarının 24. ve 48. saatlerine göre oldukça fazla olduğu belirlendi. Dallanmış yapıları oluşturan hücrelerin uzadıkları ve giderek küçüldükleri belirlendi.



Şekil 4.22 SLAD besin ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması.



Şekil 4.23 SLAD + %1 bütanol besin ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması.



Şekil 4.24 SLAD + %1 isopropanol ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde pseudohifsel farklılaşmanın uyarılması.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glikojen ve trehaloz maya hücrelerinde sentezlenip depolanabilen karbonhidratlardır. Bu karbonhidratlar çevre koşullarına ve hayat döngüsü aşamalarına bağlı olarak hücrelerde biriktirilirler (Parrou ve François 1997, Lillie ve Pringle 1980). Bu bileşiklerin çeşitli fizyolojik koşullarda ve stres şartlarında artışlarının belirlenmesi bu karbonhidratların biyolojik fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır (Parrou ve François 1997). Birçok araştırmada maya hücrelerinin azot açlığı, yüksek veya düşük ısı, yüksek veya düşük ozmotik ortam, yüksek etanol konsantrasyonu, ağır metal veya oksidatif bileşiklerin varlığı gibi çeşitli stres koşullarından etkilenebileceği belirtilmektedir (Parrou ve ark. 1997). Maya hücrelerinin bu streslere karşı geliştirdikleri yanıtlarda benzerlikler olduğu ve bir strese maruz kalmanın diğer bir strese karşı olan toleransı arttırdığı belirtilmektedir (Parrou ve ark. 1997).

Hücrelerin glikojen ve trehaloz içerikleri ve oldukça fazla miktarlarda depolanabilmeleri bu karbonhidratların maya hayat döngüsünde önemli roller oynadıklarını göstermektedir. Glikojen ve trehaloz birikimi özellikle azot, sülfür veya fosforun tükendiği hücrelerde olmakta ve mineral sınırlamasına genel bir yanıt olarak oluşmaktadır (Lillie ve Pringle 1980). Glikojen ve trehaloz seviyeleri ile hücrelerin fizyolojik ve gelişimsel aktivitelerinin bağlantısı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları glikojen ve trehalozun besin açlığı çeken hücrelerde, sporulasyondaki hücrelerde, germinasyondaki sporlarda, taze kültür ortamında durağan safhadan çıkmakta olan vejetatif hücrelerde, karbon ve enerjinin sınırlı olduğu koşullarda mitotik hücre döngüsüne geçen hücrelerde önemli bir karbon ve enerji kaynağı olarak görev yaptıklarını göstermektedir. (Lillie ve Pringle 1980).

Glikojen ve trehaloz metabolizması ile ilgili çalışmaların çoğu *S. cerevisiae* ile yapılmıştır. Çalışmamızda daha önce çeşitli stres koşullarındaki depo karbonhidrat metabolizması ile ilgili bilgi bulunmayan *Kluyveromyces* türü mayalar kullanıldı. *Kluyveromyces* cinsi mayalar günümüzde biyoendüstride oldukça yaygın olarak kullanılan mayalardır. Laktaz ve çeşitli rekombinant proteinlerin üretiminde kullanılmaktadırlar (Wesolowski-Louvel ve ark. 1996). Ayrıca laktoz ve fruktozdan oluşan bir sentetik ketoz disakkariti olan laktuloz *K. lactis*'te β -galaktosidaz aracılığıyla üretilmektedir (Lee ve ark. 2004).

Çevre koşullarının değiştiğini gösteren önemli bir belirteç glikojen ve trehaloz kullanımınıdır. *S. cerevisiae*'de azot ve glukoz eksikliğinde depo karbonhidratların net birikimi glikojen sentazın aktivasyonuna, nötral trehalazın inaktivasyonuna, glukoz-6-fosfatın artmasına, trehaloz-6-fosfat sentaz içeriğine ve glikojen sentazın da dahil olduğu birçok metabolizmaya bağlıdır (Parrou ve ark. 1999).

İyot boyama yöntemi bakteri ve mayalarda depo karbonhidratların araştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Mayaların hücre içi glikojen içeriklerindeki farklılıklar bu yöntemle kalitatif olarak kahverengi renk oluşumuyla belirlenebilir (Chester 1968, Enjalbert ve ark. 2000). Bu yöntem, glikojen metabolizması araştırmalarında ve glikojen metabolizması değişmiş maya mutantlarının araştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır (Enjalbert ve ark. 2000).

Bu tez araştırmasında önce bu yöntem kullanılarak glukoz, gliserol ve laktoz gibi farklı karbon kaynaklarında üretilen *Kluyveromyces* türlerinin glikojen içerikleri araştırıldı. Herbir karbon kaynağında üretilen maya türlerinin glikojen içeriklerinde farklılıklar olduğu belirlendi. Glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı üreme ortamında *Kluyveromyces* türlerinden yalnızca iki türde (*K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*) glikojen birikimi belirlendi. Bu sonuç *Kluyveromyces* türleri arasında glikojen metabolizması açısından önemli farklılıklar olabileceğini göstermektedir.

Üreme ortamında gliserol kullanıldığında ise yine *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*'ta glikojen belirlenip diğer türlerde glikojen belirlenmemesi türlerin glikoneojenik ortamlarda depo karbonhidrat metabolizması bakımından da farklı davranabileceğini düşündürdü. *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*'un glukoz ve gliserolde uzun süre üretildiklerinde glikojen biriktirmelerinden gliserolü karbon kaynağı olarak kullanıp glikojen sentezleyebilecekleri düşünüldü.

Üreme ortamında laktoz kullanıldığında ise yalnızca *K. lactis* var. *drosphilarum*'da glikojen bulunması da göz önüne alındığında bu türün karbon kaynağına bağlı olmaksızın uzun süreli üreme sırasında glikojen biriktirebileceği belirlendi. İyot boyama yöntemi ile elde edilen bu sonuçlar daha sonra yapılan enzimatik glikojen ölçümleri için bir ön bilgi oluşturdu.

Parrou ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, *S. cerevisiae*'de karbon ve azotun az olduğu koşullarda glikojen ve trehaloz metabolizmasındaki değişiklikleri incelemişlerdir. Glukozun eksik olduğu üreme ortamında glikojen ve trehaloz biyosentezi ve yıkımları ile ilgili genlerin ayrıca stress- responsive gen *CTT1*'in aktivitesinin glikojen miktarı ile paralel olarak arttığını belirlemişlerdir. Azotun eksik olduğu durumlarda ise glikojen ve trehaloz birikimi ve metabolizmalarına katılan genlerin transkripsiyonel aktivasyonu ortamda azotun tükenmesiyle aynı anda başladığı belirlenmiştir. Glikojen eksponansiyel safhadan çıkışta birikmeye başlamıştır ve üremenin durması ile glikojen birikiminin uyarılması arasında bir bağlantı olabileceği belirtilmiştir (Parrou ve ark. 1999).

Çalışmamızda azot açlığında üretilen *Kluyveromyces* türlerinin glikojen içerikleri iki ayrı yöntem ile araştırıldı. Kalitatif yöntem olan iyot boyama yönteminde *K. marxianus* var. *bulgaricus* ve *K. lactis*'te glikojen belirlendi. Daha sonra yapılan enzimatik ölçümlerde ise bu deneyin sonuçlarına benzer sonuçlar elde edildi. *K. marxianus* var. *bulgaricus* ve *K. marxianus*'ta bol miktarda glikojen belirlendi. İyot boyama sonucuyla uyumsuz bir sonuç *K. lactis*. var. *drosphilarum*'da gözlemlendi. Ölçümlerde bu türün bol miktarda glikojen biriktirdiği belirlendi. Mayalarda glikojen iki değişik formda bulunur. Bunlar çözünebilir stoplazmik glikojen ve hücre duvarı bileşenlerine kovalent olarak bağlı bulunan çözünemeyen glikojendir (Arvindekar ve Patil 2002). İyot boyama tekniği daha çok hücre duvarındaki glikojeni belirten kalitatif bir yöntemdir. Bu nedenle *K. lactis*. var. *drosphilarum*'da stoplazmik glikojen ile hücre duvarındaki glikojen miktarlarının farklı olması, iyot boyama yöntemi ile enzimatik yöntem arasında farklı sonuçlar elde edilmesine yol açabilir (Arvindekar ve Patil 2002). Azot içeren ortamda ise hem iyot boyama hem de enzimatik yöntemle *K. lactis*. var. *drosphilarum*'da glikojen birikimi belirlendi. Yapılan enzimatik glikojen ölçümleri ile çalışmamızda kullanılan *Kluyveromyces* türlerinin azot açlığında glikojen biriktirebildikleri belirlendi. Bu sonuçlar *Kluyveromyces* türlerinin *S. cerevisiae* ile benzer bir glikojen metabolizmasına sahip olabileceğini göstermektedir. Lillie ve Pringle (1980) yaptıkları bir çalışmada mineral sınırlamasına karşı *S. cerevisiae*'de depo karbonhidrat metabolizmasını araştırmışlardır. Bu çalışmada zengin ortamda üretilen maya hücrelerinin üremenin durağan safhasında glikojen ve trehaloz biriktirdikleri

belirlenmiştir. Ayrıca glikojen ve trehalozun azot, sülfür ve fosfor gibi mineral eksikliklerinde biriktiği belirlenmiştir.

Kluyveromyces türlerinin azot açlığında biriktirdikleri trehaloz araştırıldığında *K. thermotolerans* ve *K. marxianus*'ta çok miktarda trehaloz belirlendi. Aynı ortamdaki glikojen miktarları ölçüldüğünde *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz birikiminin oldukça az olduğu bulundu. Bu sonuçların *S. cerevisiae*'de azotsuz ortamda belirlenen glikojen ve trehaloz birikimi ile benzemediği belirlendi. Larsson ve ark. (1997) tarafından *S. cerevisiae*'nin azot açlığında depo karbonhidrat olarak trehalozu glikojeden daha fazla biriktirdiği belirtilmektedir. Bu çalışmada ise *Kluyveromyces* türlerinde azot açlığında tercih edilen depo karbonhidratın glikojen olduğu belirlendi.

Singer ve Lindquist'in (1998) bildirdiğine göre *S. cerevisiae*'de glikojen glukozun bol miktarda bulunduğu eksponansiyel üreme fazında sentezlenmektedir. Trehalozun ise ortamda glukoz olduğunda sentezlenmediği (örneğin eksponansiyel safhada), glukozun hemen hemen tükendiği durağan safha girişinde ve durağan safha boyunca sentezlendiği belirtilmektedir. Hücre dışında glukozun kalmadığı durağan safha sırasında trehaloz sentezi devam ederken glikojenin metabolize olduğu vurgulanmaktadır.

Çalışmamızda glukoz varlığında glikojen ve trehaloz birikimleri üreme aşamalarına göre incelendiğinde, *Kluyveromyces* türlerinin genel olarak logaritmik safhada durağan safhaya oranla daha fazla glikojen sentezleyip biriktirdikleri belirlendi. En fazla glikojen biriktiren tür *K. lactis*. var. *drosophilarum* olarak tespit edildi. Durağan safhada ise yalnızca *K. thermotolerans* türünde az miktarda glikojen belirlendi. Bu sonuçlar Singer ve Lindquist'in (1998) belirttiği *S. cerevisiae* glikojen sonuçları ile benzer bulundu. Aynı ortamda üretilen *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz birikiminin durağan safha sırasında olduğu belirlendi. *K. thermotolerans* başta olmak üzere türlerin tamamında durağan safha sırasında bol miktarda trehaloz belirlendi. *Kluyveromyces* türlerinde trehaloz birikiminin durağan safhada olması ile *S. cerevisiae*'ye benzer bir özellik göstermesinin yanında glukozda üreme sırasında tercih edilen depo karbonhidratın trehaloz olduğu belirlendi. Benzer sonuçlar *S. cerevisiae*'de azot açlığında belirlenmiştir. *S. cerevisiae* azot açlığında depo karbonhidrat olarak trehalozu tercih etmekte ve biriktirmektedir (Larsson ve ark. 1997).

Kluyveromyces türleri gliserolde üretildiklerinde ise *K. lactis*. var. *drosophilorum*'da durağan safhada glikojen birikiminin bol miktarda olduğu belirlendi. Diğer *Kluyveromyces* türlerinin de az miktarda da olsa durağan safhada glikojen biriktirdikleri belirlendi. Aynı ortamda trehaloz birikimleri karşılaştırıldığında türlere göre farklılıklar olduğu belirlendi. *K. lactis*. var. *drosophilorum* ve *K. thermotolerans*'ta logaritmik safhada trehaloz birikirken, *K. lactis*. *K. marxianus* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*'ta durağan safhada trehaloz biriktiği belirlendi. Bu sonuçlardan çalışmamızda kullanılan *Kluyveromyces* türlerinde gliserol kullanımı sırasında türlere göre depo karbonhidrat metabolizmasında farklılıklar olduğu söylenebilir.

Mayalar ortam şartları değiştiğinde örneğin ısı şoku, etanol şoku ve ozmotik şok gibi stresler altında trehaloz biriktirirler (Swan ve Watson 1998, Riberio ve ark. 1999). Mayalarda ısıya karşı oluşan toleransın artırılması, strese yanıtın temel beklentisini oluşturmaktadır. Maya stres yanıtının iki yönü vardır. ısı şoku proteinlerinin aktifleştirilmesi ve trehaloz birikimi. Bu biyomoleküllerin her ikisi de ısı şoku ile artırılabilir ve hücrelerde ısı toleransının kazanılmasında rol alırlar (Swan ve Watson 1998).

Attfield'in 1987'de yaptığı bir çalışmada *S. cerevisiae* ısı şoku ve çeşitli ajanlara maruz kalma sırasındaki trehaloz birikimleri araştırılmıştır. Çalışmada 30 °C'den 45 °C'ye çıkartılan ısı değişikliklerinde trehaloz biriktiği belirlenmiştir. Isı şokuna verilen yanıtın 90 dakikada maksimuma ulaştığı ve hücreler 30 °C'ye aktarıldığında trehaloz seviyesinin hızla düştüğü belirlenmiştir.

Riberio ve ark.'nın (1999) yaptıkları çalışmada tropikal koşullarda yaşayan mayalarda trehaloz birikimi ve çeşitli stres şartlarında canlı kalabilme ile trehaloz seviyeleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmada *S. cerevisiae* ile *Candida*, *Clavispora*, *Kluyveromyces* ve *Torulaspota*'ya ait türler kullanılmıştır. Fizyolojik stres olarak ısı şoku, etanol stresi ve ozmotik şok uygulanmıştır. Isı şoku için ilk olarak 50,5 °C'de 8 dk. tutulan hücreler, ikinci aşamada 40 °C'de 60 dk. tutulmuşlardır. Bu uygulamanın hemen ardından tekrar 50,5 °C'de 8 dk.'lık bir uygulama daha yapılmıştır. *K.marxianus* 40 °C'de canlı kalabilmiştir. Yaklaşık olarak 25 mg/gr kuru ağırlık trehaloz birikimi bulunmuştur. Çalışmada kullanılan diğer suşlardaki trehaloz miktarı ölçüldüğünde yüksek trehaloz birikimi ile canlılık arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir. 60 mg/gr kuru ağırlık trehaloz biriktiren suşlarda 50,5 °C'de 8 dk. da canlı

kalma oranı %75'in üzerinde bulunmuştur. Yine aynı çalışmada ozmotik şok uygulaması için durağan safhadaki hücreler %18'lik sorbitol içeren ortamda 28 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. *K.marxianus*'un ozmotik stresten sonra %60'ın üzerinde canlı kaldığı belirlenmiştir. Trehaloz içeriği ise ozmotik stresten önce ve sonra yaklaşık 35 mg/gr kuru ağırlık olarak bulunmuştur.

Swan ve Watson'un (1998) yaptıkları bir çalışmada *S. cerevisiae*'nin stres toleransı, trehalozla ilişkisi ve ısı şoku proteinleri araştırılmıştır. Hücrelerin gerçek ısı toleransını belirlemek için 25 °C'de üretilen hücreler ısı şoku uygulaması için 48 °C'de 60 dk. üretilmişlerdir. Çeşitli sürelerde örnekler alınmıştır. Isıya toleransın artırılması amacıyla da hücreler zengin ortamda 37 °C'de 30 dk. tutulmuştur. Sonuçta yaban tipte % 0.29 kuru ağırlık olan bazal trehaloz seviyesinin 10 kat arttığı belirlenmiştir. Mayalarda etanol ve ısının ısı şoku proteinlerinin sentezini ve trehaloz birikimini arttırdığı belirlenmiştir.

Lima Paulillo ve ark. (2003) *S. cerevisiae*'de glikojen ve trehalozun mobilizasyonunu araştırmışlardır. Çalışmada 38, 40, 42 ve 44 °C'de üretilen *S. cerevisiae* hücrelerinde glikojen ve trehaloz içerikleri ile bu karbonhidratların yıkım ısıları belirlenmeye çalışılmıştır. Önce hücrelerin ısı şoku etkisi ile glikojen ve trehaloz biriktirmeleri sağlanmıştır. Daha sonra glikojen ve trehaloz yıkımında ısının etkisini belirlemek için ısı belirli zaman aralıkları ile yükseltilmiş ve glikojen ile trehalozun yıkılması sağlanmıştır. Isı 38 °C'de iken yıkım hızında küçük bir artış olduğu, ısı 40 °C'den 42 °C'ye çıkartıldığında glikojen ve trehalozun yıkım hızında anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Glikojen yıkımı 42 °C'de 8-12 saat daha devam etmiş ve ısı 44 °C'ye çıktığında artmaya devam etmiştir. Ancak trehaloz yıkımının 42 veya 44 °C'de değişmediği dolayısıyla trehaloz yıkımının ısıya bağımlı olmadığı belirlenmiştir.

S. cerevisiae ile yapılan bu çalışmalar ışığında, *Kluyveromyces* türlerinin ısı şokuna depo karbonhidrat birikimi yönünden verdikleri yanıtlar da çalışmamızda araştırıldı. 25 °C'de ve 37 °C'de ısı şokunda üretilen *Kluyveromyces* türlerinden bazılarının ısı şoku sırasında glikojen ve trehaloz biriktirdikleri belirlendi. Isı şokunda en fazla glikojen birikiminin *K. lactis* var. *drosphilarum* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus* türlerinde olduğu belirlendi. *Kluyveromyces* türlerinin ısı şoku sırasındaki trehaloz birikimleri incelendiğinde *K. thermotolerans* ve *K. marxianus* var.

bulgaricus'un en fazla trehaloz biriktiren türler olduğu belirlendi. Isı şokunda en fazla glikojen miktarının belirlendiği tür *K. lactis* var. *drosophilorum*'da 25 °C'de trehaloz birikiminin de en yüksek değerde belirlenmesi dikkat çekici bulundu. Bu türün 37 °C'de ısı şokunda depo karbonhidrat olarak glikojeni tercih ettiği trehaloz ölçüm deneylerinde en az miktarda trehaloz içeren tür olduğunun belirlenmesiyle tespit edildi. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde *Kluyveromyces* türlerinde 25 °C'de glikojen birikiminin trehaloz birikiminden daha fazla olduğu bulundu. Ancak 37 °C'de üreme sırasındaki trehaloz artışının 37 °C'deki glikojen artışından fazla olduğu yapılan deneylerle bulundu. *S. cerevisiae*'de ısı şoku sırasında en fazla depolanan ve ısıya dayanıklılığı arttıran trehalozun *Kluyveromyces* türlerinde de ısı şoku sırasında bol miktarda biriktirildiği ve *Kluyveromyces* türlerinin ısı şokuna *S. cerevisiae* ile benzer tepki gösterdiği çalışmamızda belirlenmiş oldu. *S. cerevisiae*'de trehaloz sentezi trehaloz sentaz ve trehaloz fosfataz ile yapılırken glikojen sentezi glikojen sentaz ve dallanma (branching) enzimi ile yapılır. Trehaloz yıkımı trehalaz enzimi ile glikojen yıkımı ise glikojen fosforilaz ve debranching enzimi ile yapılır. Bu enzimler aracılığıyla gerçekleşen sentez ve yıkım olaylarının ısının artması ile uyarılabildiği söylenebilir (Parrou ve ark. 1997, Lima Paulillo ve ark. 2003). Bu çalışmada da ısı şoku ile trehaloz sentezinin artması yüksek ısı ile trehaloz sentazın aktive edilmesiyle veya trehalazın baskılanmasıyla açıklanabilir.

Bu çalışmada *Kluyveromyces* türlerinde ozmotik şokun glikojen ve trehaloz metabolizmasına etkileri araştırıldığında 0.8 M NaCl içeren ozmotik ortamda üretilen *Kluyveromyces* türlerinde belirgin bir glikojen ve trehaloz birikimi gözlenmedi. Glikojen veya trehalozun birikmemesi *Kluyveromyces* türlerinin farklı bir yol izleyerek gliserol oluşturabileceğini düşündürdü. Bu ölçümlerde YPD ortamında üreme sırasında az miktarda glikojen birikiminin belirlenmesi yapılan diğer enzimatik ölçümlerle uyumlu bulunmuştur. Çünkü maya türlerinin YPD'de üretilip, logaritmik ve durağan safhalardaki glikojen miktarlarının karşılaştırıldığı ölçümlerde logaritmik safhada az miktarda glikojen biriktirdikleri belirlenmiştir. Araştırmanın bu bölümünde YPD ortamında trehaloz birikiminin belirlenememesine neden olarak trehalozun durağan safhada birikmesi gösterilebilir.

Araştırmanın bir bölümünde glikojen ve trehalozun maya türlerinde sentez ve yıkım hızları da araştırıldı. YPD ve YNB ortamlarında en fazla glikojen biriktiren tür

olan *K. lactis* var. *drosphilarum*'un glikojen sentezlemeye 30. dakikada başladığı ve sentezin artarak devam ettiği belirlendi. Bu sonuca göre *K. lactis* var. *drosphilarum*'da glikojen sentezinin azot açlığında oldukça hızlı gerçekleştiği düşünülebilir. Glikojen yıkımının ise 0. dakikadan itibaren başlaması ortama glukoz verildiğinde maya hücrelerinin glikojeni hızla yıkmaya başladığını göstermektedir.

Trehaloz sentez ve yıkım hızı, trehalozu azot açlığında en fazla biriktiren tür olan *K. thermotolerans*'ta incelendiğinde, *K. thermotolerans*'ın trehaloz sentezine 0. dakikadan itibaren başladığı ve 120 dakika boyunca devam ettiği belirlendi. Trehaloz yıkım hızı incelendiğinde ise trehalozun ilk 30 dakikada yıkılmasının ortama ilave edilen glukozun kullanımıyla bağlantılı olduğu düşünüldü.

Yapılan araştırmalar, stresle artan sinyal olaylarının filamentli büyümede çok önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Azot ve karbon açlığı haploid ve diploidlerde dimorfik değişimi etkileyebilir. Bunlara ilaveten çeşitli alkollerde hücrelerde morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Etanol diploid suşlarda filament oluşumunu arttırırken, 1-bütanol, isoamil alkol ve n-amil alkolünde içinde bulunduğu diğer alkoller, glukoz içeren sıvı ortamda üreyen haploidlerdeki filamentli büyümeyi arttırmaktadır (Palecek ve ark. 2002).

Lorenz ve ark.'nın (2000-b) yaptığı bir çalışmada *S. cerevisiae*'de alkol ile arttırılmış filamentli üremenin özellikleri araştırılmıştır. Özel SLAD ortamında, SLAD ortamına etanol, metanol, 1-propanol, isobütanol, bütanol, isopropanol, isoamil alkol gibi alkollerin ilave edildiği ortamlarda üretilen haploid ve diploid suşlarda filamentli üreme incelenmiştir. Bu ortamlarda 30 saat süre ile üretilen hücrelerde filamentli üremenin uyarıldığı ve dallanmış hücrelerden oluşan filamentlerin arttığı belirlenmiştir.

Çevre şartlarındaki değişimlerin *K. marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415 suşunda morfolojik etkilerinin neler olabileceği O'Shea ve Walsh (2000) tarafından araştırılmıştır. *K. marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415 suşu kesikli ve sürekli kültürlerde üretilmiş ve hücrelerin morfolojileri spesifik üreme oranı ile kontrol edilmiştir. Hücreler kesikli kültürlerde olduklarında spesifik üreme oranı maksimum spesifik üreme oranına ulaşmaktadır ve kültürlerin morfolojileri maya benzeri yapıdadır. Organizmalar kemostast ortamda kültüre alındıklarında morfolojilerinin pseudohifsel forma dönüştüğü belirlenmiştir (O'Shea ve Walsh 2000).

Çalışmamızda en çok filament oluşumunun *K. marxianus*, *K. lactis* ve *K. lactis* var. *drosophilarum*'da olduğu saptandı (Şekil 4.16). SLAD + %1 butanol ortamında üretilen *Kluyveromyces* türlerinde filament oluşumunun 24. saatten itibaren başladığı belirlendi. 48. saatte ise filament oluşumunun en fazla *K. marxianus*'ta olduğu, diğer türlerdeki filamentli yapıda artış olmadığı belirlendi. 72. saat sonunda ise hem hücrelerdeki dallanmanın azlığı hem de hücre sayısındaki azalma (Şekil 4.17) dikkat çekici bulundu. Bu sonuçlara dayanarak SLAD + %1 bütanol'de üretilen *Kluyveromyces* türlerinde filament oluşumunun çok fazla olmadığı ve 48. saatten sonra hücrelerin ölmeye başladığı söylenebilir. *Kluyveromyces* türleri SLAD + %1 isopropanol ortamında üretildiklerinde ise 24. saatte filament oluşumu gözlenmeye başlandı. 48. saatte tipik dallanmış, uzun ve dallanmış hücreler *Kluyveromyces* türlerinin tamamında oldukça iyi gözlendi (Şekil 4.18). *Kluyveromyces* türlerinin SLAD, SLAD + %1 bütanol ve SLAD + %1 isopropanol ortamlarında üretilmesiyle filament oluşumu gözlendiğinden, çalışmada kullanılan *K. lactis*, *K. lactis* var. *drosophilarum*, *K. thermotolerans*, *K. marxianus* ve *K. marxianus* var. *bulgaricus*'ta pseudohifsel farklılaşmadan sözedilebilir. Elde edilen bu sonuçlar daha önce detayları verilen Lorenz ve ark. (2000-b)'nin *S. cerevisiae* haploid ve diploid suşları ile yaptıkları çalışmanın sonuçları ile benzer bulundu. O'Shea ve Walsh (2000)'ın *K. marxianus* var. *marxianus*'un bir suşunda yaptıkları çalışma ise kesikli ve sürekli kültür ortamında olduğu için bu çalışmada bulunanlardan farklı sonuçlar alınmıştır. Ancak her iki araştırmada da *K. marxianus* var. *marxianus*'ta pseudohifsel farklılaşma gözlenmiştir.

Bu araştırmada *Kluyveromyces* türlerinin normal veya azotsuz ortamlarda olduğu gibi çeşitli organik alkollerde üremeleri sırasında da glikojen ve trehaloz biriktirebildiği belirlendi. Sonuçlara göre *Kluyveromyces* türlerinin, glikojen ve trehaloz birikimi açısından her bir ortama verdikleri tepkinin, dolayısıyla biriktirilen glikojen ve trehaloz miktarının türe göre değiştiği söylenebilir.

Çalışmamızda kullanılan bu özel üreme ortamlarının tümü dikkate alındığında azot içeriklerinin oldukça az olduğu bilinmektedir. *S. cerevisiae*'nin azotun sınırlı olduğu durumlarda bizim bulduğumuz sonuçlarla tamamen zıt olarak çalışan bir pseudohifsel farklılaşma ve depo karbonhidrat metabolizması olduğu bilinmektedir (Versele ve ark. 2001, Gagiano ve ark. 2002).

S. cerevisiae'de azot açlığında glikojen ve trehaloz metabolizmaları çalışmakta dolayısıyla bu karbonhidratların birikimi olmaktadır. cAMP sentezinin azalması ve buna bağlı olarak PKA'nın inaktifleşmesi ile glikojen ve trehaloz sentezlenir. Bu nedenle pseudohifsel farklılaşma yolu çalışmaz ve filament oluşumu gözlenmez (Versele ve ark. 2001). Bizim elde ettiğimiz sonuçların da bu yönde olması beklenmekteydi, ancak filament oluşumu ve glikojen birikiminin aynı ortamda ve aynı zamanda olması bu metabolizmaların *Kluyveromyces* türlerinde *S. cerevisiae*'den farklı olarak işlediğini göstermektedir. *S. cerevisiae* ile benzer bir trehaloz metabolizması işleyişinden bahsedilebilir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre biyoteknolojide çeşitli kullanım alanları olan maya türlerini içeren *Kluyveromyces*'te azot eksikliği ve ısı şoku gibi fizyolojik streslerin etkisiyle glikojen ve trehaloz biyosentezinin arttığı belirlendi. Özellikle trehaloz seviyelerinin artması biyoendüstride süt ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan *Kluyveromyces* türlerine olumsuz çevresel değişimlere karşı bir koruyuculuk, tolerans sağlayacaktır. Çalışmamızda ayrıca *Kluyveromyces* türlerinde pseudohifsel üremenin azot eksikliği sinyalleri ile uyarıldığı, SLAD ve SLAD ortamına ilave edilen bütanol ve isopropanol alkollerini ile dallanmış hücrelerden oluşan pseudohiflerin oluştuğu ve bu ortamlarda glikojen depolayabildikleri belirlendi.

Bu çalışmada *Kluyveromyces* türlerinin çeşitli fizyolojik streslerde glikojen ve trehaloz metabolizmaları araştırıldı. Ancak *Kluyveromyces* türlerinde bu metabolizmada görev yapan gen veya genler tam olarak belirlenmediği, ayrıca azot eksikliği, ısı şoku ve ozmotik şok sırasında hangi genlerin aktif olduğu bilinmediği için bu çalışmanın devamı olarak *Kluyveromyces* türlerinde glikojen ve trehaloz metabolizması ile ilgili genlerin belirlenmesine yönelik araştırmalar planlanabilir. Bu çalışmada uygulanan stres şartlarına ek olarak *Kluyveromyces* türlerinin üreme ortamında diğer bazı minerallerin eksikliklerine olan toleransı veya etanol toleransı araştırılabilir. Ayrıca *Kluyveromyces* türlerinde pseudohifsel farklılaşmaya neden olan genler henüz bilinmediğinden bu mekanizmayla ilgili genlerin belirlenmesi amacıyla daha ileri çalışmalar planlanabilir.

6. KAYNAKLAR

ALBERS, E., B. M. BAKKER and L. GUSTAFSSON. 2002. Modelling response of glycolysis in *S. cerevisiae* cells harvested at diauxic shift. *Molecular Biology Reports* 29: 119- 123.

AMARAL, F. C., P. VAN DIJCK, J. R. NICOLI and J. M. THEVELEIN. 1997. Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases. *Arch Microbiol.* 167: 202- 208.

ARGUELLES, J. C. 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol.* 174: 217- 224.

ARVINDEKAR, A. U. and N. B. PATIL. 2002. Glycogen-a covalently linked component of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19: 131- 139.

ATTFIELD, P. V. 1987. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEB.* 225: (1,2) 259- 263.

BARDWELL, L., J. G. COOK, J. X. ZHU-SHIMANI, D. VOORA and J. THORNER. 1998. Differential regulation of transcription: repression by unactivated mitogen- activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 15400- 15405.

BARNETT, J. A. 1998. A history of research on yeast 1: Work by chemists and biologists. *Yeast* 14: 1439- 1451.

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

BARNETT, J. A. and C. F. ROBINOW. 2002. A history of research on yeast 4: cytology part II, 1950- 1990. *Yeast* 19: 745- 772.

BITZILEKIS, S. and J. A. BARNETT. 1997. Exponential growth rates of species of the yeast genus *Kluyveromyces*. *FEMS Microbiology Letters* 146: 189- 190.

BLAZQUEZ, M. A., R. LAGUNAS, C. GANCEDO and J. M. GANCEDO. 1993. Trehalose-6- phosphate: a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.* 329: 51- 54.

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.

BREUNING, K. D., M. BOLOTIN-FUKUHARA, M. M. BIANCHI, D. BOURGAREL, C. FALCONE, I. FERRERO, P. GOFFRINI, J. J. KRIJGER, C. MAZZONI, C. MILKOWSKI, H. Y. STEENSMA, M. WESOŁOWSKI-LOUVEL and A. M. ZEEMAN. 2000. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 771- 780.

CABIB, E and L. F. LELOIR. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* 231: 259- 275.

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

CULLEN, P. J. and G. F. SPRAUGE JR. 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Pnas* 97: 13619- 13624.

ÇOLAÇO, C., S. SEN, M. THANGEVALU, S. PINDER and B. ROSER. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology. *Biotechnology*, 10: 1007- 1011.

De SILVA-UDAWATTA, M. N. and J. F. CANNON. 2001. Roles of trehalose phosphate synthase in yeast glycogen metabolism and sporulation. *Mol. Mikrobial* 40: 1345- 1356.

DICKINSON, J. R. 1996. Fusel alcohols induce hyphal like extensions and pseudohyphal formation in yeast. *Microbiology*. 142: 1391- 1397.

ELBEIN, A. D. 1974. The metabolism of α,α - trehalose. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.*, 30: 227- 256.

ELBEIN, A. D., Y. T. PAN, I. PASTUSZAK and D. CARROLL. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17- 27.

ENJALBERT, B., J. L. PARROU, O. VINCENT and J. FRANCOIS. 2000. Mitochondrial respiratory mutants of *Saccharomyces cerevisiae* accumulate glycogen and readily mobilize it in a glucose-depleted medium. *Microbiology* 146: 2685- 2694.

ENTIAN K. D. and J. A. BARNETT. 1983. Some genetical and biochemical attempts to elucidate the energetics of sugar uptake and explain the Kluyver effect in the yeast *Kluyveromyces lactis*.

FLORES, C.-L., C. RODRIGUEZ, T. PETIT and C. GANCEDO. 2000. Carbohydrate and energy-yelding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 507- 529.

FRANÇOIS, J., P. ERASO and C. GANCEDO. 1987. Changes in the concentration of cAMP, fructose 2, 6-biphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *Eur. J. Biochem.* 164: 369- 373.

FRANÇOIS, J., M. A. BLAZQUEZ, J. ARINO and C. GANCEDO. 1997. Storage carbohydrates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast sugar metabolism*.

biochemistry, genetics, biotechnology and applications. Chapter 16: 285- 303. Technomic Publ. Co. Lancaster. Pennsylvania USA.

FRANÇOIS, J and J. L. PARROU. 2000. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews 25: 125- 145.

GAGIANO, M., F. F. FLORIAN and I. S. PRETORIUS. 2002. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research 2: 433- 470.

GANCEDO, C and R. SERRANO. 1989. Energy-yielding metabolism. Yeast 3: 205- 259.

GANCEDO, J. M. 2001. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev. 25: 107- 123.

GANCEDO, C and C. L. FLORES. 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. FEMS Yeast Research. 4: 351- 359.

GIMENO, C. J., P. O. LJUNGDAHL, C. A. STYLES and G. R. FINK. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. Cell.68: 1077- 1090.

GOFFRINI, P., A. A. ALGERI, C. DONNINI, M. WESOLOWSKI-LOUVEL, I. FERRERO. 1989. *RAG1* and *RAG2*: nuclear genes involved in the dependence-independence on mitochondrial respiratory function for growth on sugars. Yeast 5: 99- 106.

GOFFRINI, P., M. WESOLOWSKI- LOUVEL and I. FERRERO. 1991. A phosphoglucose isomerase gene is involved in the rag phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Mol. Gen. Genet. 228: 401- 409.

GOLDSTEIN, A. and J. O. LAMPEN. 1975. Beta-D-fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Methods Enzymol.* 42: 504- 511.

HOHMANN, S., M. J. de K. W. NEVES, R. ALIJO, J. RAMOS and J. M. THEVELEIN. 1993. The growth and signaling defects of the *ggs1 (fdp1/byp1)* deletion mutant on glucose are suppressed by a deletion of the gene encoding hexokinase PII. *Curr. Genet.* 23: 281- 289.

JORGENSEN, H., L. OLSSON, B. RONNOW and E. A. PALMQVIST. 2002. Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 310- 317.

KELLER, F., M. SCHELLENBERG and A. WIEMKEN. 1982. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalase in the cytosol of yeast. *Arch. Microbiol.* 131: 298- 301.

KURTZMAN, C. P. 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhynchus*. *FEMS Yeast Research* 4: 233- 245.

LACHANCE, M. A. and W. M. PANG. 1997. Predacious yeasts. *Yeast* 13: 225- 232.

LARSSON, C., A. NILSSON, A. BLOMBERG and L. GUSTAFSSON. 1997. Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon or nitrogen limiting conditions. *J. Bacteriol.* 179: 7243- 7250.

LEE, B. N. and E. A. ELION. 1999. The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling component. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 12679- 12684.

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

LILLIE, S. H. and J. R. PRINGLE. 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. Journal of Bacteriology 143: 1384- 1394.

LIMA PAULILLO, S. C., F. YOKOYA and L. C. BASSO. 2003. Mobilization of endogenous glycogen and trehalose of industrial yeasts. Brazillian J. Microbiology 34: 249- 254.

LIU, H., C. A. STYLES and G. R. FINK. 1993. Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. Science 262: 1741- 1744.

LIU, H., C. A. STYLES and G. R. FINK. 1996. *S. cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. Genetics. 144: 967- 978.

LLORENTE, B., A. MALPERTUY, G. BLANDIN, F. ARTIGUENAVE, P. WINCKER and B. DUJON. 2000. Genomic exploration of the Hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. FEBS Letters 487: 71- 75.

LONDESBOROUGH, J. and K. VARIMO. 1984. Characterization of two trehalases in baker's yeast. Biochem. J. 219: 511- 518.

LONDESBOROUGH, J. and O. E. VUORIO. 1993. Purification of trehalose synthase from baker's yeast. Its temperature-dependent activation by fructose 6-phosphate and inhibition by phosphate. *Eur. J. Biochem.* 216: 841- 848.

LORENZ, M. C. and J. HEITMAN. 1997. Yeast pseudohyphal growth is regulated by *GPA2*, A g-protein α - homolog. *EMBO J.* 16: 7008- 7018.

LORENZ, M. C. and J. HEITMAN. 1998a. The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 1236- 1247.

LORENZ, M. C. and J. HEITMAN. 1998b. Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* 150: 1443- 1457.

LORENZ, M. C., X. PAN, T. HARASHIMA, M. E. CARDENAS, Y. XUE, J. P. HIRSCH, and J. HEITMAN. 2000a. The G-protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 154: 609- 622.

LORENZ, M. C., N. S. CUTLER and J. HEITMAN. 2000b. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of Cell* 11: 183- 199.

LUYTEN, K., W. DE KONING, I. TESSEUR, M. C. RUIZ, J. RAMOS, P. COBBAERT, J. M. THEVELEIN and S. HOHMANN. 1993. Disruption of *Kluyveromyces lactis GGS1* gene causes inability to grow on glucose and fructose and is suppressed by mutations that reduced sugar uptake. *Eur. J. Biochem.* 217: 701- 713.

MADHANI, H. and G. R. FINK. 1998. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends in Cell Biology* 8: 348- 353.

MALPERTUY, A., B. LLORENTE, G. BLANDIN, F. ARTIGUENAVE, P. WINCKER and B. DUJON. 2000. Genomic exploration of the Hemiascomycetous yeast: 10. *Kluyveromyces thermotolerans*. FEBS Letters 487: 61- 65.

MÖSCH, H. U., R. L. ROBERTS, and G. R. FINK. 1996. Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5352- 5356.

MÖSCH, H. U and G. R. FINK. 1997. Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *S. cerevisiae*. Genetics. 145: 671- 674.

MÖSCH, H.- U., E. KUBLER, S. KRAPPMAN, G. R. FINK, and, G. H. BRAUS. 1999. Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10: 1325- 1335.

NAUMOV, G. I. and E. S. NAUMOVA. 2002. Five new combinations in the yeast genus *Zygoascus* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data. FEMS Yeast Research 2: 39- 46.

O'SHEA, D. G. and P. K. WALSH. 2000. The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 316- 322.

PAALMAN, J. W. G., R. VERWAAL, S. H. SLOFSTRA, A. J. VERKLEIJ, J. BOONSTRA and C. T. VERRIPS. 2003. Trehalose and glycogen accumulation is related to the duration of the G₁ phase of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS 3: 261- 268.

PALECEK, S. P., A. S. PARIKH and S. J. KRON, 2002, Sensing, signalling and integrating physical process during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. Microbiology. 148: 893- 907.

PAN, X. and J. HEITMAN. 1999. Cyclic AMP- dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4874- 4887.

PAN, X., T. HARASHIMA and J. HEITMAN. 2000. Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinon in Microbiology* 3: 567- 572.

PARROU, J. L and J. FRANÇOIS. 1997. A simplified procedur for an rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Analytical Biochemistry*. 248: 186- 188.

PARROU, J. L., M. A. TESTE and J. FRANÇOIS. 1997. Effects of various types of stres on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stres-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*. 143: 1891- 1900.

PARROU, J., B. ENJALERT., L. PLAURDE., A. BAUCHE., B. GONZALES and J. FRANÇOIS. 1999. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15: 191- 203.

PARROU, J. L., M. JULES, G. BELTRAN and J. FRANÇOIS. 2005. Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: Localization, regulation and physiological function. *FEMS Yeast Research* 5: 503- 511.

PRIOR, C., P. MAMESSIER, H. FUKUHARA, X. J. CHEN and M. WESOLOWSKI-LOUVEL. 1993. The hexokinase gene is required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Molecular Cellular Biology* 13: 3882- 3889.

RIBERIO, M. J. S., L. S. C. LEAO, P. B. MORAIS, C. A. ROSA and A. D. PANEK. 1999. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie van Jeeuwenhoek* 75: 245- 251.

ROBERTSON, L. S. and G. R. FINK. 1998. The three yeast A kinases have specific signalling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13783- 13787.

RODRIGUEZ-BELMONTE, E., I. GONZALEZ-SISO and 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.

ROSE, M. D., F. WINSTON and P. HIETER. 1990. *Methods in yeast genetics. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.

RUA, D., B. T. TOBE and S. J. KRON. 2001. Cell cycle of yeast filamentous growth. *Current Opinion in Microbiology* 4: 720- 727.

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

SILLJE, H. H. W., J. W. G. PAALMAN, E. G. SCHURE, S. Q. B. OLSTHOORN, A. J. VERKLEIJ, J. BOONSTRA and C. T. VERRIPS. 1999. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 181: 396- 400.

SINGER, M. A and S. LINDQUIST. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The yin and yang of trehalose. *Tibtech* 16: 460- 468.

SPARK, M., H. PASCHERTZ and J. KAMPHUES. 2005. Yeast (different sources and levels) as protein source in diet of reared piglets: effects on protein digestibility and N-metabolism. *J. Animal Physiology and Animal Nutrition* 89: 3- 6.

SWAN, T. M and K. WATSON. 1998. Stres tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. FEMS Mic. Lett. 169: 191- 197.

THEVELEIN, J. M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol. Rev. 46: 42- 59.

THEVELEIN, J. M. 1992. The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie van Leeuwenhoek 62: 109- 130.

THEVELEIN, J. M. and S. HOHMANN. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? TIBS 20: 3- 10.

VANDERCAMMEN, A., J. FRANCOIS and H. G. HERS. 1989. Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 182: 613- 620.

VERSELE, M., K. LEMAIRE and J. M. THEVELEIN. 2001. Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. EMBO Reports 21: 574- 579.

VUORIO, O. E., N. KALKKINEN and J. LONDESBOROUGH. 1993. Cloning of two related genes encoding the 56 kDa and 123 kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem, 216: 849- 861.

WESOŁOWSKI-LOUVEL, M., C. PRIOR, D. BORNECQUE and H. FUKUHARA. 1992. Rag⁻ mutations involved in glucose metabolism in yeast: isolation and genetic characterization. Yeast 8: 711- 719.

WESOŁOWSKI-LOUVEL, M., K. D. BREUNIG nad H. FUKUHARA. 1996. *Kluyveromyces lactis* In: K. Wolf Non-conventional yeast in biotechnology. Heidelberg: Springer- Verlag 139- 201.

WINDERICKX, J., J. H. WINDE, M. CRAUWELS, A. HINO, S. HOHMANN, P. VAN DIJCK and J. M. THEVELEIN. 1996. Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control. *Mol. Gen. Genet.* 252: 470- 482.

EK. 1. Araştırmada Kullanılan Üreme Ortamları ve Çeşitli Çözeltilerin Hazırlanması

1. YP (Yeast Extract, Pepton)

YP sıvı üreme ortamı için 10 gr maya özütü 20 gr pepton toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Otoklavda 121 °C'de 25 dakika steril edildi. YP petrileri için YP ortamına 20 gr/l olacak şekilde agar agar eklendi.

2. Stok Glukoz, Laktoz ve Gliserol Çözeltileri

Glukoz, laktoz ve gliserol %20 (w/v) olacak şekilde distile suda hazırlandı ve otoklavda steril edildi. Sterilizasyondan sonra YPD ortamı için stok glukoz çözeltisinden son konsantrasyon %2 olacak şekilde glukoz eklendi. YPL için stok laktoz çözeltisinden son konsantrasyon %2 olacak şekilde laktoz ilave edildi. YPG için ise stok gliserol çözeltisinden son konsantrasyon %2 olacak şekilde gliserol eklendi.

3. YNB (Yeast Nitrogen Base)

YNB sıvı ortamı için 1.7 gr YNB (azotsuz ve aminoasitsiz), 5 gr amonyum sülfat toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildi. YNB petrileri için 20 gr/l olacak şekilde agar agar eklendi. Sterilizasyondan sonra YNB ortamına karbon kaynağı olarak steril %20'lik glukoz çözeltisinden son konsantrasyonu %2 olacak şekilde glukoz eklendi.

4. SLAD (Synthetic Low Ammonium Dextrose)

SLAD sıvı ortamı için 1.7 gr YNB (azotsuz ve aminoasitsiz), 100 mM amonyum sülfat stoğundan 500 µl amonyum sülfat toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildi. Sterilizasyondan sonra SLAD ortamına karbon kaynağı olarak steril %20'lik glukoz çözeltisinden son konsantrasyon %2 olacak şekilde glukoz ilave edildi.

5. Lugol Çözeltisi

1.5 gr potasyum iyodür ve 0.5 gr iyot 100 ml distile suda çözüldü.

6. Azotsuz YN Ortamı

YN sıvı ortamı hazırlamak için 1.7 gr YNB (azotsuz ve aminoasitsiz) 1 litre distile suda çözüldü. Otolavda steril edildi. YN petrileri için 20 gr/l olacak şekilde agar agar ilave edildi. Sterilizasyondan sonra %20'lik steril stok glukoz çözeltisinden son konsantrasyon %2 olacak şekilde glukoz eklendi.

7. 0.25 M Na₂CO₃ Çözeltisi

0.25 M Na₂CO₃ çözeltisi hazırlamak için 2.65 gr Na₂CO₃ toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildi.

8. 1 M Asetik Asit Çözeltisi

1 M asetik asit çözeltisi hazırlamak için %80'lik asetik asit stok çözeltisinden (d= 60.05gr/ml) 7.16 ml asetik asit alınarak toplam hacim 100 ml olacak şekilde steril distile suda çözüldü.

9. 0.2 M Sodyum Asetat Çözeltisi

0.2 M sodyum asetat çözeltisi için 2.722 gr sodyum asetat toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildi.

10. α -Amiloglukosidaz (Sigma A-7420)

α -Amiloglukosidaz liyofilize enzim olarak satın alındı. Kullanılmadan önce taze olarak 0.0015 gr α -amiloglukosidaz steril 150 μ l 0.2 M sodyum asetat çözeltisinde çözümlenerek hazırlandı.

11. Trehalaz (Sigma T-8778)

Direkt olarak 3 mU/reaksiyon olacak şekilde stok enzim çözeltisinden kullanıldı. Deneyler süresince -20 °C'de saklandı.

12. Glukoz-Oksidaz-Peroksidaz

Thermo Trace (Australia) firmasında üretilen glukoz ölçüm kiti, üretici tarafından açıklandığı şekilde kullanıldı. Deneyler süresince +4 °C'de saklandı.

13. 5 M NaCl Çözeltisi

292.5 gr NaCl toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. 121 °C'de 25 dakika steril edildi. Üreme ortamına son konsantrasyon 0.8 M olacak şekilde ilave edildi.

14. Bütanol ve İso-propanol

Bütanol ve İso-propanol % 96'lık stoklar olarak satın alındı. İso-propanol ve bütanol son konsantrasyonları %1 olacak şekilde direkt olarak stok çözeltiden alınıp üreme ortamlarına eklendi.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve çalıőmalarımın her aőamasında değerli bilgileri ve yardımları ile daima destek olan danıőmanım Doç. Dr. Sezai TÜRKELE'e, çalıőmalarımda emeği geçen bütün arkadaşlarıma, maddi ve manevi yardımlarından dolayı aileme sonsuz teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem EGEL 1972 yılında Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 1991 yılında Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. Bu bölümden 1995 yılında Biyolog ünvanını alarak mezun oldu.

1995 yılında Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisansa başladı. 1998 yılında Yüksek lisansını tamamlayarak 2000 yılında Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitime başladı. 2000 yılında Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi kadrosunda göreve başladı. Halen Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.