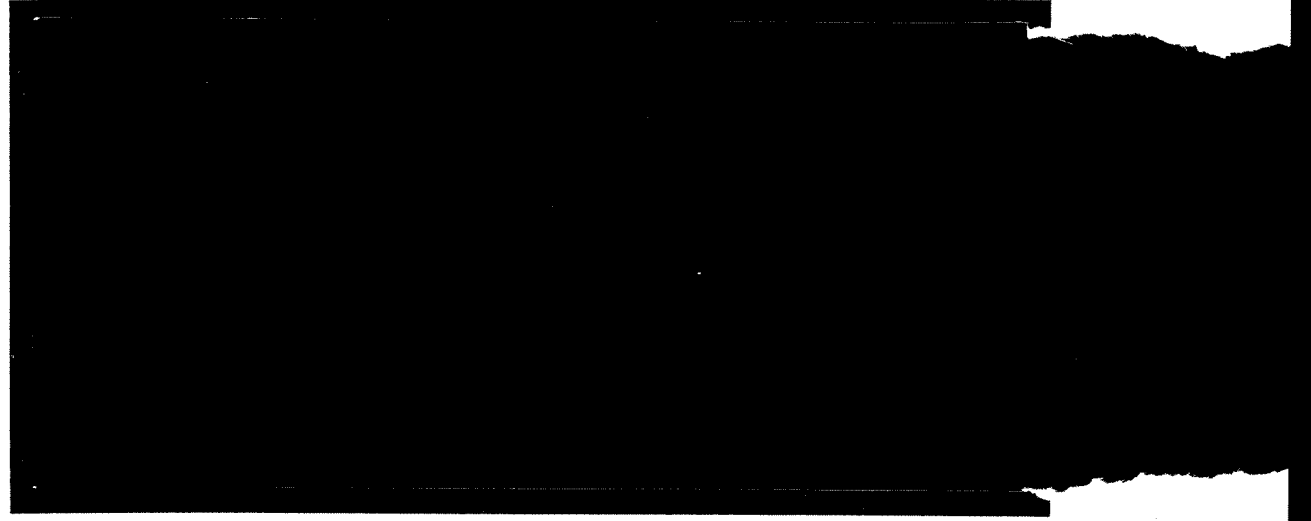




TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Dur  
1997-231



Makina, Kimyasal Teknolojiler, Malzeme ve İmalat Sistemleri  
Araştırma Grubu

Mechanical Engineering, Chemical Technologies, Material  
Sciences and Manufacturing Systems Research Grant  
Committee

EKMEK MAYASI KÜLTÜRLERİNİN ÜRETİM  
SIRASINDA, DEPO VE KORUYUCU MADDE  
BİRİKTİRMELERİNİN METABOLİK  
TEMELLERİNİN İNCELENMESİ

PROJE NO: KTÇAG-114

Prof. Dr. Haluk HAMAMCI  
Doç. Dr. Alev BAYINDIRLI  
Doç. Dr. Talat ÇİFTÇİ  
Doç. Dr. Mustafa TÜRKER  
Doç. Dr. Levent Dağışan  
Dr. Nüzhet Ertugay

KASIM 1995  
ANKARA

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ŞEKİL LİSTESİ.....   | vi   |
| ÖZ .....   | viii |
| ABSTRACT.....  | ix   |
| <b>BÖLÜM I.</b>  |      |
| GİRİŞ.....   | 1    |
| 1.Karbonhidrat Metabolizması.....                              | 3    |
| 1.1.Trehaloz Metabolizması.....                                | 3    |
| 1.1.1. Fonksiyon.....  | 3    |
| 1.1.2.Trehaloz Metabolizmasının Düzenlenmesi.....              | 4    |
| 1.1.2.1. Trehalozun Birikimi.....                              | 4    |
| 1.1.2.1.1. Trehaloz Birikiminde Yer Alan Enzimler.....         | 4    |
| 1.1.2.1.1.1. Trehalozu Sentezleyen Enzimlerin Özellikleri..... | 4    |
| 1.1.2.1.2. Trehaloz Sentezinin Düzenlenmesi.....               | 5    |
| 1.1.2.2. Trehalozun Bozunumu.....                              | 6    |
| 1.1.2.2.1. Trehaloz Bozunumunda Yer Alan Enzimler.....         | 6    |
| 1.1.2.2.1.1. Trehalazın Özellikleri.....                       | 6    |
| 1.1.2.2.1.1.1. Düzeleyici-Olmayan Trehalazın Özellikleri.....  | 6    |
| 1.1.2.2.1.1.2. Düzenleyici Trehalazın Özellikleri.....         | 7    |
| 1.1.2.2.1.2. Trehaloz Bozunumunun Düzenlenmesi.....            | 7    |
| 1.1.2.1.3. Düzenleyici-Olmayan Trehalaz (V-Trehalaz).....      | 8    |
| 1.2. Glikojen Metabolizması.....                               | 9    |
| 1.2.1. Hücre İçi Konumu.....                                   | 9    |
| 1.2.2. Glikojenin Fonksiyonu.....                              | 10   |
| 1.2.3. Glikojenin Birikimi.....                                | 10   |
| 1.2.3.1. Glikojen Birikimine Neden Olan Enzimler.....          | 10   |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.2.3.2. Glikojen Sentezinin Düzenlenmesi.....   | 11        |
| 1.2.4. Glikojen Bozunumu.....  | 12        |
| 1.2.4.1. Glikojen Bozunumunda Yer Alan Enzimler.....   | 12        |
| 1.2.4.1.1. Glikojen Bozunumunda Yer Alan Enzimlerin<br>Özellikleri.....  | 13        |
| 1.2.4.2. Glikojen Bozunumunun Düzenlenmesi.....  | 13        |
| 2. Mayalarda Besin-Uyarılmış İşaret İletimi (Nutrient-Induced<br>Signal Transduction).....   | 14        |
| 2.1. Glikoz-Uyarılmış İşaret İletimi (Glucose-Induced Signal<br>Transduction).....   | 14        |
| 2.1.1. Ana Glikoz Baskılanma İzyolu, GBİ (Main Glucose<br>Repression Pathway, GRP).....  | 14        |
| 2.1.2. RAS-Adenilat-Siklaz-İzyolunun Glikoz Uyarılmış<br>Etkinleşmesi (Glucose Induced Activation of RAS-Adenylate-<br>Cyclase Pathway)..... | 15        |
| 2.2. Fermentatif-Büyüme-Ortamı-Uyarılmış-İzyol, FBOUİ<br>(Fermentable-Growth-Medium-Induced-Pathway, FGMİP).....                             | 15        |
| 3. Maya Fizyolojisini Etkileyen Faktörler.....   | 16        |
| 3.1. Büyüme Hızının Etkisi.....  | 16        |
| 3.1.1. Büyüme Hızının Glikoz Metabolizması Üzerindeki Etkisi-<br>Solunum Darboğazı Kuramı.....   | 16        |
| 3.1.2. Büyüme Hızının Makromoleküler Bileşim Üzerine Etkisi.....   | 19        |
| 3.2. Besin Sınırlılığı ya da Kıtlığının Etkileri.....  | 22        |
| 3.3. Isı Şokunun Etkisi.....   | 23        |
| <b>BÖLÜM II.</b>   |           |
| <b>DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....</b>  | <b>26</b> |
| 1. Mikroorganizma.....   | 26        |
| 2. Besi Ortamı Bileşimi.....   | 26        |
| 2.1. Kesiksiz Fermentör Besi Ortamı.....   | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2. Kesikli-Beslemeli Fermentör Besi Ortamı.....                   | 26        |
| 3. Analitik Yöntemler.....  | 26        |
| 3.1. Büyüme Ortamı Analizi.....                                     | 26        |
| 3.1.1. Biyokütle Miktarının Belirlenmesi.....                       | 26        |
| 3.1.2. Glikoz Miktarının Belirlenmesi.....                          | 26        |
| 3.1.3. Fosfat Miktarının Belirlenmesi.....                          | 27        |
| 3.1.4. Amonyak Miktarının Belirlenmesi.....                         | 27        |
| 3.2. Hücre Bileşim Analizi.....                                     | 27        |
| 3.2.1. Trehaloz Miktarının Belirlenmesi.....                        | 27        |
| 3.2.2. Glikojen Miktarının Belirlenmesi.....                        | 27        |
| 3.2.2.1. Mannan ve Bazda Çözünen Glikojen Miktarının Belirlenmesi.. | 28        |
| 3.2.2.2. Mannan Miktarının Belirlenmesi.....                        | 28        |
| 3.2.2.3. Asitte Çözünen Glikojen Miktarının Belirlenmesi.....       | 28        |
| 3.2.4. Protein Miktarının Belirlenmesi.....                         | 28        |
| 3.2.5. RNA Miktarının Belirlenmesi.....                             | 29        |
| 4. Fermentasyon.....  | 29        |
| 4.1. Fermentörün Tanımlanması.....                                  | 29        |
| 4.2. Kesiksiz Fermentasyon.....                                     | 29        |
| 4.3. Kesikli-Beslemeli Fermentasyon.....                            | 29        |
| <b>BÖLÜM III.</b>   |           |
| <b>BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>                                    | <b>30</b> |
| 1. Kesiksiz Fermentör Deneyleri.....                                | 30        |
| 1.1. Seyrelme Hızının Etkisi.....                                   | 30        |
| 1.1.1. Çıkış Fermentasyon Ortamı Üzerine Etkisi.....                | 30        |
| 1.1.2. Makromoleküler Bileşim.....                                  | 31        |
| 1.1.2.1. Birikim Karbonhidratları.....                              | 31        |
| 1.1.2.2. RNA ve Protein.....  | 32        |
| 1.2. Sabit Seyrelme Hızı Deneyleri.....                             | 32        |

|  |    |
|--|----|
| 1.2.1. Isı Şokunun Etkisi.....                           | 32 |
| 1.2.1.1. Kültür Üzerine Etkisi.....                      | 33 |
| 1.2.1.2. Trehaloz Üzerine Etkisi.....                    | 33 |
| 2. Kesikli-Beslemeli Fermentör Deneyleri.....            | 35 |
| 2.2. Besin Kıtlığının Etkisi.....                        | 35 |
| 2.2.1. Nitrojen Kıtlığının Etkisi.....                   | 35 |
| 2.2.1.1. Kültür Ortamı Üzerindeki Etkisi.....            | 35 |
| 2.2.1.2. Makromoleküler Bileşime Etkisi.....             | 36 |
| 2.2.1.2.1. Birikim Karbonhidratları.....                 | 36 |
| 2.2.1.2.2. Protein ve RNA.....                           | 37 |
| 2.2.2. Fosfat Kıtlığının Etkisi.....                     | 37 |
| 2.2.2.1. Kültür Ortamı Üzerine Etkisi.....               | 37 |
| 2.2.2.2. Makromoleküler Bileşime Etkisi.....             | 38 |
| 2.2.2.2.1. Birikim Karbonhidratları.....                 | 38 |
| 2.2.2.2.2. Protein ve RNA.....                           | 39 |
| 2.2.3. Nitrojen ve Fosfor Kıtlığının Bileşik Etkisi..... | 39 |
| 2.2.3.1. Kültür Ortamı Üzerine Etkisi.....               | 39 |
| 2.2.3.2. Makromoleküler Bileşime Etkisi.....             | 40 |
| 2.2.3.2.1. Birikim Karbonhidratları.....                 | 40 |
| 2.2.3.2.2. Protein ve RNA.....                           | 40 |
| 2.3. Besin Kıtlığı ve Isı Şokunun Bileşik Etkisi.....    | 40 |
| 2.3.1. Isı Şokunun Etkisi.....                           | 41 |
| 2.3.1.1. Kültür Ortamı Üzerine Etkisi.....               | 41 |
| 2.3.1.2. Makromoleküler Bileşime Etkisi.....             | 41 |
| 2.3.1.2.1. Birikim Karbonhidratları.....                 | 41 |
| 2.3.1.2.2. Protein ve RNA.....                           | 41 |
| 2.3.2. Nitrojen Kıtlığı ve Isı Şokunun İkili Etkisi..... | 42 |
| 2.3.2.1. Kültür Ortamı Üzerine Etkisi.....               | 42 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.2.2. Makromoleküler Bileşime Etkisi.....                          | 42        |
| 2.3.2.2.1. Birikim Karbonhidratları.....                              | 42        |
| 2.3.2.2.2. Protein ve RNA.....  | 43        |
| 2.3.3. Fosfor Kıtlığı ve Isı Şokunun İkili Etkisi.....                | 43        |
| 2.3.3.1. Kültür Ortamı Üzerine Etkisi.....                            | 43        |
| 2.3.3.2. Makromoleküler Bileşime Etkisi.....                          | 43        |
| 2.3.3.2.1. Birikim Karbonhidratları.....                              | 43        |
| 2.3.3.2.2. Protein ve RNA.....  | 44        |
| 2.3.4. Nitrojen ve Fosfor Kıtlıkları ile Isı Şokunun Üçlü Etkisi..... | 44        |
| 2.3.4.1. Kültür Ortamı Üzerine Etkisi.....                            | 44        |
| 2.3.4.2. Makromoleküler Bileşime Etkisi.....                          | 44        |
| 2.3.4.2.1. Birikim Karbonhidratları.....                              | 44        |
| 2.3.4.2.2. Protein ve RNA.....  | 45        |
| <b>BÖLÜM IV.</b>  |           |
| <b>SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>                                      | <b>67</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>   | <b>70</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Kesiksiz ekme mayası kültüründe seyrelme hızına göre, biyokütle, verim ve çıkış glikoz derişimi.....46
- Şekil 2. Kesiksiz ekme mayası kültüründe seyrelme hızına göre, biyokütle, çıkış  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , çıkış  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  derişimin değişimi.....47
- Şekil 3. Seyrelme hızının ekme mayasının hücre içi, protein, toplam glikojen, RNA ve trehaloz derişimi üzerindeki etkisi.....48
- Şekil 4. Seyrelme hızının ekme mayasının hücre içi, bazda çözünen ve çözünemeyen glikojen, ve toplam glikojen derişimi üzerinde etkisi.....49
- Şekil 5. Kesiksiz ekme mayası kültüründe  $36^\circ\text{C}$  ısı şokunun, biyokütle, çıkış glikoz ve çıkış  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ ).....50
- Şekil 6. Kesiksiz ekme mayası kültüründe  $38^\circ\text{C}$  ısı şokunun, biyokütle, çıkış glikoz ve çıkış  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ ).....51
- Şekil 7. Kesiksiz ekme mayası kültüründe  $40^\circ\text{C}$  ısı şokunun, biyokütle, çıkış glikoz ve çıkış  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ ).....52
- Şekil 8. Kesiksiz ekme mayası kültüründe  $40^\circ\text{C}$  ısı şokunun, trehaloz derişimine etkisi ( $D=0.05 \text{ sa}^{-1}$ ).....53
- Şekil 9. Kesiksiz ekme mayası kültüründe  $40^\circ\text{C}$  ısı şokunun, trehaloz ve protein derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ ).....54
- Şekil 10. Kesiksiz ekme mayası kültüründe  $36^\circ\text{C}$  ısı şokunun, trehaloz ve protein derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ ).....55
- Şekil 11. Kesiksiz ekme mayası kültüründe  $38^\circ\text{C}$  ısı şokunun, trehaloz ve protein derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ ).....56
- Şekil 12. Kesiksiz ekme mayası kültüründe sıcaklığın başlangıç trehaloz birikim hızına etkisi.....57
- Şekil 13. Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kıtlığının biyokütle miktarı üzerine etkisi.....58
- Şekil 14. Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin



|                  |  |    |
|------------------|--|----|
|                  | kıtlığının biyokütle miktarı üzerindeki ortak etkisi.....  | 58 |
| <b>Şekil 15.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kıtlığının çıkış glikoz miktarı üzerine etkisi.....  | 59 |
| <b>Şekil 16.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının çıkış glikoz miktarı üzerindeki ortak etkisi.....                       | 59 |
| <b>Şekil 17.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kıtlığının çıkış $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı üzerine etkisi.....                      | 60 |
| <b>Şekil 18.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının çıkış $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı üzerindeki ortak etkisi..... | 60 |
| <b>Şekil 19.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kıtlığının çıkış $\text{KH}_2\text{PO}_4$ miktarı üzerine etkisi.....                          | 61 |
| <b>Şekil 20.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının çıkış $\text{KH}_2\text{PO}_4$ miktarı üzerindeki ortak etkisi.....     | 61 |
| <b>Şekil 21.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kıtlığının hücredeki trehaloz miktarı üzerine etkisi.....                                      | 62 |
| <b>Şekil 22.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının hücredeki trehaloz miktarı üzerindeki ortak etkisi.....                 | 63 |
| <b>Şekil 23.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kıtlığının hücredeki toplam glikojen miktarı üzerine etkisi.....                               | 64 |
| <b>Şekil 24.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının hücredeki toplam glikojen miktarı üzerindeki ortak etkisi....           | 64 |
| <b>Şekil 25.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kıtlığının hücredeki protein miktarı üzerine etkisi.....                                       | 65 |
| <b>Şekil 26.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının hücredeki protein miktarı üzerindeki ortak etkisi.....                  | 65 |
| <b>Şekil 27.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kıtlığının hücredeki RNA miktarı üzerine etkisi.....   | 66 |
| <b>Şekil 28.</b> | Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının hücredeki RNA miktarı üzerindeki ortak etkisi.....                      | 66 |

## ÖZ

Bu çalışmada, ülkemizde en önemli besin maddesi olan ekmeğin yapımında kullanılan “ekmek mayasının” fizyolojisi incelenmiştir.

Bu çalışmanın temeli değişik büyüme koşullarında mayanın makromoleküler bileşimini belirlemek ve stres uygulamalarına tepkisini ölçmektir.

Bu çalışmayı ikiye ayırabiliriz; kesiksiz-fermentasyon ve kesikli-beslemeli fermentasyon deneyleri.

Kesiksiz-fermentörde, değişik seyrelme hızlarında hücrenin makromoleküler bileşimi belirlenmiş ve ayrıca sabit seyrelme hızında mayanın ısı şokuna tepkisi trehaloz ve protein bazında incelenmiştir. Artan seyrelme hızı ile beraber birikim karbonhidratlarının -trehaloz ve glikojen- azaldığı, RNA ve protein miktarlarının ise arttığı gözlenmiştir.

İkinci grup deneyler ise, kesikli-fermentör stres deneylerinden oluşmuştur. Bu amaçla,  $0.1 \text{ sa}^{-1}$  seyrelme hızında, kesiksiz fermentörde, durağan-duruma ulaşan maya hücreleri stres uygulaması ile eş zamanlı kesikli-beslemeli fermentasyona geçirilmişlerdir. Bu deneylerde besin kıtlığı ve ısı şoku streslerinin hücre üzerine tek tek ve beraber etkisi incelenmiştir. Sadece besin kıtlığı uygulamalarında elde edilen sonuçlar, nitrojen ve fosfat kıtlığının ikili etkisinin en yüksek trehaloz birikimine neden olduğunu göstermiştir. Hem besin kıtlığı hem de ısı şokunun beraber uygulandığı durumlarda ise, trehaloz birikiminin daha fazla olduğu ve en yüksek birikime nitrojen-kıtlığı ve ısı-şoku ile nitrojen-fosfat kıtlıkları ve ısı şokunda ulaşıldığı gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ekmek Mayası, Besin-kıtlığı, Isı Şoku, Makromoleküler Bileşim, Trehaloz

## ABSTRACT

In this research, the physiology of the bakers' yeast which is an important ingredient of the Turkish staple food, bread, was studied.

This study was based on the determination of the macromolecular composition of bakers' yeast under different growth conditions and of its response to different stress applications.

This study can be divided into two major groups; continuous and fed-batch fermentation experiments.

In continuous fermentation studies, the cell's macromolecular composition was determined for different dilution rates. Also, the cellular response to heat shock in terms of trehalose and protein was determined at constant dilution rate. It was observed that, the amount of storage carbohydrates -trehalose and glycogen- decreased whereas the amount of RNA and protein increased with increasing dilution rates.

The second group of experiments comprised of fed-batch experiments. For this purpose, the steady-state cells grown continuously at a dilution rate of  $0.1 \text{ h}^{-1}$  were stressed and at the same time switched to fed-batch fermentation. In this set of experiments, the effects of nutrient starvation and heat shock were studied separately and also in a combined manner. The results obtained from nutrient starvation experiments, showed that the highest trehalose accumulation was achieved when the cells were starved for both nitrogen and phosphate. In the cases where nutrient starvation and heat shock were applied together, trehalose accumulation was higher. The highest amount of trehalose accumulation was achieved when nitrogen-starvation together with heat shock and also nitrogen-phosphate starvation together with heat shock was applied.

**Key Words:** Bakers' Yeast, Nutrient Starvation, Heat Shock, Macromolecular Composition, Trehalose

## BÖLÜM I.

### GİRİŞ

Bilinen uygarlığın ilk zamanlarından miras kalan buğday ekmeği, bütün batı ve orta doğu ülkelerinde bir gıda maddesi olarak önemini sürdürmektedir. Durum Türkiye’de biraz farklıdır. Ekmek ülkemizde yeri doldurulamaz bir besin maddesidir, öyle ki Türk halkı protein ihtiyacının bile %50’si kadarını sadece buğday ekmeğinden sağlamaktadır.

Bu durum göz önüne alındığında Türkiye’de çeşitli firmalara ait yedi fabrikadan oluşan, gelişmiş bir maya endüstrisi olmasına ve özel sektörde kurulmuş bulunan en ciddi AR-GE birimlerinden birinin ihtisasının maya olmasına şaşmamak gerekir.

Ekmek mayasının, bir sanayi girdisi olarak düşünüldüğünde, en önemli niteliği hamura karıştırıldığı zaman karbon dioksit gazı üretme faaliyetidir. Bu ise canlı ve sağlıklı mayanın normal hayati işlevlerini göstermesinin -büyümesinin ve bölünmesinin- bir sonucudur. Ekmek mayası “malının” ikinci önemli niteliği raf ömrünün uzun olmasıdır. Maya fermentör çıkışında canlıdır ve bu canlılığı korunarak temizlenir, paketlenir ve satışa sunulur. Hamur içine girince tekrar faal hale gelmesi arzulanan mayanın, fabrika çıkışı ve kullanılışı arasında geçecek sürede -ki bu haftalarla ifade edilebilir- bir çeşit uykuda olması istenir.

Ekmek mayası üreticileri bu faaliyetleri, mayanın genel bileşimine etki ederek kontrol etmeye çalışırlar. Mayanın kaba bileşimi ile -protein, RNA, DNA, trehaloz, glikojen- büyüme koşulları kontrol edilerek, belli ölçüler içinde oynanabilir.

Maya üreticileri -yine belli ölçüler içinde- hamura girdiğinde yüksek faaliyet gösterecek mayanın protein içeriğinin çok olması gerektiğini bilirler. Öte yandan bu yüksek faaliyet potansiyeli, rafta bekleme süresini kısaltabilir ve mayanın önceden bozulmasına neden olabilir. Bu yüzden yüksek protein içeriğinin, mayanın faaliyetini dizginleyebilecek, yüksek trehaloz miktarı ile dengelenmesine çalışılır. Trehaloz hücre içi su aktivitesini düşürdüğü için rafta bekleme sırasında maya faaliyetini azaltıcı yönde etki yapar ve maya hamura atılınca hızla bozunup hem kullanılabilecek karbonhidrat görevi görür hem de su aktivitesini arttırıp maya faaliyetinin hızlanmasını sağlar.

Bu çalışmada büyüme ortamı bileşimi ve koşulları ile oynayarak, ekme mayasının genel bileşiminde oluşabilecek değişimler belirlenmeye çalışılmıştır.

Ekme mayası sanayii kesikli-beslemeli sistemle çalışmaktadır; bu ise her yeni dolunda yapılan aşının ve büyümenin tam kontrollü olmaması ve değişkenlikler göstermesine yol açmaktadır. Bu çalışmada, daha iyi tanımlanmış fizyolojik özellikleri olan maya ile çalışılabilmesi için kesiksiz-durağan ve kesikli-beslemeli kültürler ile çalışılmıştır.

Bu çalışmayı iki ana grupta toplayabiliriz.

Birinci grup, kesiksiz-fermentör deneylerinden oluşmuştur. Bu deneyler, seyrelme hızının ve sabit seyrelme hızında ısı şokunun, ekme mayasının makromoleküler bileşimini nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda, seçilen seyrelme hızlarında mayanın durağan-durum makromoleküler bileşimi -RNA, protein, trehaloz ve glikojen cinsinden- belirlenmiştir. Ayrıca, her seyrelme hızında çıkış fermentasyon ortamının bileşimi de - çıkış glikoz, fosfat ve amonyak cinsinden- belirlenmiştir.

İkinci grup ise, kesikli-fermentör deneylerinden oluşmuştur. Bu deneylerde, maya hücreleri kesiksiz fermentörde  $0.1 \text{ sa}^{-1}$  seyrelme hızında üretilmiş ve durağan-duruma gelmeleri beklenmiştir. Daha sonra, bu hücreler stres uygulamasıyla eş zamanlı, kesiksiz-fermentasyondan kesikli-beslemeli fermentasyona geçirilmiştir. Bu deneylerde, uygulanan streslerin mayanın makromoleküler bileşimini -RNA, protein, trehaloz ve glikojen cinsinden- nasıl etkilediği belirlenmiştir. Yine, bunun dışında, çıkış fermentasyon ortamının bileşimi -çıkış glikoz, fosfat ve amonyak cinsinden- belirlenmiştir.

## 1. Karbonhidrat Metabolizması

### 1.1. Trehaloz Metabolizması

#### 1.1.1. Fonksiyon

Literatürde trehaloz genellikle glikojen ile birlikte ana birikim karbonhidratı olarak tanımlanmaktadır. Öte yandan, trehaloz birikim maddesinden çok stres koruyucu bir nitelik göstermektedir. Diğer birikim maddelerinin aksine trehaloz sitozolik bir maddedir. Maya hücrelerinin olumsuz koşullara tepki olarak büyük miktarlarda trehaloz biriktirmesi sitozolü su etkinliği yönünden etkilemektedir. Bu etki doğal olarak metabolizmayı yavaşlatacak ve böylece hücrelerin durgun faza geçmeleri kolaylaşacaktır (Wiemken, 1990). Sonuç olarak, büyük olasılıkla trehaloz metabolik etkinlikleri engelleyerek, stres koşullarında hücre yapısını koruyucu olarak iş görmektedir.

Besin kıtlığı, ısı şoku ve değişik stres türleri (kurutma, soğukta saklama, toksik kimyasallar, vb.) yüksek miktarlarda trehaloz sentezine neden olmaktadır. Bu nedenle trehaloz tipik bir stres metaboliti olarak belirmektedir. Bundan başka, hücrelerdeki trehaloz miktarı ile bu hücrelerin ısıya dayanıklılığı arasındaki ilişki trehalozun aynı zamanda ısı koruyucu olarak da davrandığını ortaya koymaktadır.

Enerjetik görüş açısından hareketle, trehaloz glikojenden daha az etkili bir birikim maddesidir. Çünkü, trehaloz sentezi glikoz başına daha fazla enerji gerektirmekte ve bozunması sırasında da çok daha az enerji açığa çıkmaktadır (hidrolitik bozunmaya karşı fosforolitik bozunma).

Son olarak, birikim karbonhidratı görevi tam olarak glikojen tarafından yerine getirilmektedir. Trehalozun birincil görevinin ise sitozol içerisindeki maddeleri olumsuz koşullara karşı (kuruma, ısı, besin kıtlığı gibi), koruma olduğunu gösteren, ama kesin olmayan, bulgular vardır.

## 1.1.2. Trehaloz Metabolizmasının Düzenlenmesi

### 1.1.2.1. Trehalozun Brikimi

Trehaloz birikimi genel olarak düşük büyüme hız dönemleri ile ilgilidir.

#### 1.1.2.1.1. Trehaloz Birikiminde Yer Alan Enzimler

Trehaloz-6-fosfat sentaz (Tre 6P sentaz) ile trehaloz-6-fosfat fosfataz (Tre 6P Paz) trehalozu sentezleyen enzimlerdir.

##### 1.1.2.1.1.1. Trehalozu Sentezleyen Enzimlerin Özellikleri

Tre 6P sentaz enzimi UDP-glikoz için 0.5 mM  $K_m$  değeri göstermektedir. Bu değer UDP-glikozun maya hücrelerinde bulunan sitozolik derişimine çok yakındır. Buna karşılık glikoz-6-fosfat için  $K_m$  değeri (3.5 mM) hücrede bulunan fizyolojik miktarından çok daha fazladır (Van der Cammen vd., 1989). Bu durum, glikoz-6-fosfat maddesinin varlığının trehaloz sentezinde belirleyici faktör olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Van der Cammen vd (1989) anorganik fosfatın Tre 6P sentaz etkinliğini engellediğini rapor etmişlerdir. Benzer sonuçlar, Londesborough ve Vuorio (1991) tarafından da elde edilmiştir. Anorganik fosfatın glikojen sentaz etkinliğini engellediği ve glikolizin anahtar enzimlerinin etkinliklerini desteklediği de bilinmektedir.

Tre 6P Paz enzimi trehaloz-6-fosfat için 0.5 mM  $K_m$  değeri göstermektedir. Ayrıca, bu enzimin etkinliği için Mg iyonuna gereksinimi vardır. Anorganik fosfatın ise her hangi bir etkisi yoktur (Van der Cammen vd., 1989).

Van der Cammen vd (1989) ayrıca Tre 6P sentaz ve Tre 6P Paz enzimlerinin tek bir bifonksiyonel proteinin parçaları olduklarını öne sürmüşlerdir. 1991'de Londesborough ve Vuorio, ekmek mayasından proteolitik olarak etkinleştirilmiş Tre 6P sentaz/Tre 6P Paz bileşiği saflaştırmışlardır. Bu bileşik hem Tre 6P sentaz hem de Tre 6P Paz etkinliği göstermekte ve bir kısa (57 kDa) ile bir de uzun (86/93 kDa) polipeptit içermektedir. Bu araştırmacılar ayrıca, Tre 6P sentaz etkinleştiricisi saflaştırmışlardır. Bu proteolitik olarak etkinleştirdikleri protein bileşimini "kesik trehaloz sentaz (truncated trehalose synthase)" olarak adlandırmışlardır. Bu kesik trehaloz sentaz ana bileşenleri olarak 56 ve 123 kDa'luk polipeptitler içermektedir. Londesborough ve Vuorio (1993) daha sonra, 123 kDa'luk

polipeptidi ayırmış ve bunun Tre 6P Paz olduğunu göstermişlerdir. Bu Tre 6P Paz anorganik fosfattan etkilenmemektedir. Ayrıca Tre 6P sentaz etkinleştiricisinin fosfoglikoizomeraz (PGI) enzimi olduğunu kanıtlamışlardır. Fruktoz-6-fosfatın ise 30°C'de trehaloz sentaz enziminde Tre 6P sentaz etkinliğini arttırdığını, ancak kesik enzimde bu etkinin görülmediğini gözlemişlerdir. Fruktoz-6-fosfata bağımlılık, özellikle fizyolojik anorganik fosfat derişimlerinde ortaya çıkmaktadır.

Londesborough ve Vuorio (1993) trehaloz sentaz enziminin sıcaklığa bağımlılığını da incelemişlerdir. Sıcaklık arttıkça enzimin anorganik fosfat tarafından engellenmesinin azaldığını ve 50°C'de ise tamamen ortadan kalktığını göstermişlerdir. Böylece, anorganik fosfata duyarlı olan Tre 6P Sentaz (123 kDa'luk polipeptit) enziminin etkinliğinin, fizyolojik derişimlerde, yüksek sıcaklık (trehalozun ısı-uyarılmış birikiminin olduğu sıcaklık aralığında) katsayısının olduğu ortaya çıkmıştır.

#### 1.1.2.1.2. Trehaloz Sentezinin Düzenlenmesi

Cabib ve Leloir (1958) bira mayası özütüyle yaptıkları çalışma sonucunda trehaloz sentezi için bir mekanizma önermişlerdir. Buna göre, UDP-glikoz ve glikoz-6-fosfatın yoğunlaşmasından bir ara bileşik, trehaloz-6-fosfat, oluşmakta ve bu ara bileşik daha sonra hidrolize olarak trehaloz ve anorganik fosfat oluşturmaktadır.

Panek (1962 ve 1963) ekmek mayasıyla *in vitro* ve *in vivo* gerçekleştirdiği araştırmalar sonucunda Cabib ve Leloir'in sonuçlarını onaylamıştır. Ancak, trehaloz-6-fosfatı gözleyememiştir.

1987'de, Panek ve arkadaşları Tre 6P sentaz ve Tre 6P Paz enzimlerinin etkinliklerinin fosforlanma yolu ile iki formun dönüşümü ile düzenlendiğini öne sürmüşlerdir. Ancak, bu sonuçlar, başka araştırmacılar tarafından, deneysel yöntemlerinin güvensizliği nedeniyle kabul edilmemişlerdir (Van der Cammen vd., 1989). Bu araştırmacılar, cAMP-bağımlı protein kinazın (cAPK), değişik Mg-ATP ve cAMP derişimlerinin Tre 6P Paz enziminin etkinliği üzerinde etkilerinin olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca, Tre 6P sentaz enziminin etkinliği düşük ya da yüksek adenilat siklaz ve dolayısıyla cAMP tarafından pek etkilenmemiştir. 1990'da Panek ve arkadaşları değişik *Saccharomyces* suş ve mutantları üzerindeki araştırmalarını, van der Cammen vd. (1989) tarafından öne sürülen sonuçlarla ilgili olarak, tekrar gözden geçirmişlerdir. Yine daha önceki bulgularını onaylayan sonuçlar elde etmişlerdir. Yakın bir çalışmada, Londesborough ve Vuorio (1991) güvenilir enzim ölçüm yöntemlerinin



kullanılması durumunda, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda herhangi bir fosforlanma durumunun gözlenmediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, Vicente-Soler vd (1991) *C. utilis* ile yaptıkları çalışmada Tre 6P sentaz enziminin proteolitik etkinleşme ile, Tre 6P Paz enziminin ise geri dönüşümlü fosforlanma ile kontrol edildiğini rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak, büyük olasılıkla, Tre 6P sentaz ve Tre 6P Paz enzimlerinin etkinliğinin ilk kaybı proteolitik bozunma sonucu olmakta ve cAMP ile ilgisi bulunmamaktadır. Daha sonra bu enzimlerin etkinliği baskılanma mekanizması ile düşük düzeyde tutulmaktadır. Bunun da, bir öncekinin aksine, cAMP'nin kontrolü altında olduğu gözükmektedir (François vd, 1991; Argüelles vd, 1993). Biyosentetik enzim bileşimini bu mekanizmanın, ya da henüz bilinmeyen bir mekanizmanın, *in vivo* kontrol ettiğinin ise henüz kanıtlanması gerekmektedir.

#### **1.1.2.2. Trehalozun Bozunumu**

Koşulların hızlı büyümeye uygun hale gelmesi, hızlı trehaloz bozunumuna neden olmaktadır. Bunun mekanizması aşağıda tartışılmıştır.

##### **1.1.2.2.1. Trehaloz Bozunumunda Yer Alan Enzimler**

Trehaloz bozunumuna neden olan, bilinen tek enzim trehalazdır.

##### **1.1.2.2.1.1. Trehalazın Özellikleri**

*Saccharomyces cerevisiae* mayası birbirinden farklı iki trehalaz etkinliği göstermektedir: Düzenleyici (regulatory) ve düzenleyici-olmayan (non-regulatory) trehalazlar.

##### **1.1.2.2.1.1.1. Düzenleyici-Olmayan Trehalazın Özellikleri**

Bu tür trehalazlar vakuollerde bulunmakta ve asidik optimum (pH 3.5-5.5) ve yüksek ısı dayanıklılığı göstermektedir. Bu trehalaz, trehaloz için 5.7 mM  $K_m$  değeri göstermektedir. V-trehalaz (vakuolar trehalaz) etkinleşme için herhangi bir bivalent metale gereksinim duymamaktadır. Bu tür, zigomisetler dışında tüm funguslarda bulunmaktadır (Thevelein, 1984; Londesborough ve Varimo, 1984). Hızlı trehaloz bozunma dönemlerinde V-trehalazda hızlı etkinlik değişimleri hiç gözlenmemiştir (Thevelein, 1984).

### 1.1.2.2.1.1.2. Düzenleyici Trehalazın Özellikleri

Nötral pH optimumu (6.0-7.5) ve ısıya dayanıksız olan bu tür trehalazlar sitozolde bulunmaktadır (S-trehalaz). Bu türün trehaloz için  $K_M$  değeri 1.4 mM'dır. Bir dimer olan S-trehalazın Ca ya da Mn iyonlarına gereksinimi vardır ve bu iyonlara eğilimi etkinleşmeyle birlikte artmaktadır (Londesborough ve Varimo, 1984). Bu enzimin Ca iyonuna eğilimi ise 40°C'de 20 kat azalmaktadır (Neves ve François, 1992).

Hızlı trehaloz bozunum dönemleri her zaman hızlı S-trehalaz etkinleşmesi ile ilişkilidir. Bu tür trehalaz zigomisetlerde ve yakından ilgili maya türlerinden *Saccharomyces* ve *Pichia*'da bulunmaktadır (Thevelein, 1984).

### 1.1.2.2.1.2. Trehaloz Bozunumunun Düzenlenmesi

Uzun süre, mayalarda trehalaz ile trehaloz arasında sadece bölmelenmenin var olduğuna inanılmıştır. Bu tezi desteklemek üzere yüksek miktarda trehaloz ve yine yüksek miktarda trehalaz etkinliğinin birlikte bulunmaları ve membran bütünlüğünü etkileyen işlemlerde hidrolizin başlaması gösterilmektedir. *S. cerevisiae* ve *Pichia pastoris* hücrelerinde trehalazın *in vivo* etkinleştirildiğinin bulunması daha önceki görüşleri çürütmüştür. Ancak, bu görüşler, sadece V-trehalaza sahip maya türleri için hala geçerli olabilir (Thevelein, 1984'de özetlenmiştir).

van der Plaat ve van Solingen (1974) cAMP-uyarılmış fosforlanma sonucu trehalazın etkinleştiğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, maya kültürlerine eklenen glikozun bir şekilde adenilat siklazı etkinleştirdiğini ve bunun da cAMP düzeyinin çok çabuk yükselmesine neden olduğu sonucuna varmışlardır. cAMP derişimindeki bu artış bir ya da daha fazla protein kinazı etkinleştirmekte ve bu da trehalazı fosforlayarak etkinleşmesine neden olmaktadır.

van der Plaat ve van Solingen'in (1974) sonuçları başka çalışmalar (Panek ve Mattoon, 1977; Uno vd., 1983; Ortiz vd., 1983; Thevelein ve Beullens, 1985 ve Coutinho vd., 1992) tarafından da desteklenmiştir. Bu sonuçlara göre, cAMP-bağımlı fosforlanma mekanizması önerilmiştir. Trehalaz enziminin etkinliği cAPK-bağımlı fosforlanma tarafından düzenlenmektedir. Yüksek trehalaz etkinliği için yüksek cAMP düzeyine gereksinim vardır. cAMP düzeyinin geçici yükselişi glikoz-uyarılmış trehalaz etkinleşmesi için bir işaret oluşturmaktadır.

Nitrojen kıtlığı uygulanmış hücrelere sadece glikoz eklenmesi trehalazı ancak geçici olarak etkinleştirmektedir (Thevelein ve Buellens, sülfür kıtlığı çeken hücrelere bu besinlerin eklenmesinin büyümeyi uyardığını ve böylece hızlı trehaloz bozunumuna neden olduğunu gözlemişlerdir. İlginç olan, bu besinlerin eklenmesinin cAMP düzeyinde herhangi bir değişiklik yaratmamasıdır. Buna ek olarak, her üç besin maddesi de doğal suşlardaki normal cAMP düzeyinin çok altındaki cAMP derişiminde bile önemli trehalaz etkinleşmesine neden olmaktadır. Bu sonuçlar, besin-uyarılmış sinyalleminin, cAMP düzeyinin yükselmesinden çok temel cAMP düzeyine bağlı olduğu varsayımını desteklemektedir. Nitrojen-işaretleme (nitrogen signalling) modelinde, nitrojen kaynağı ile uyarılmış izyol, cAMP-bağımlı protein kinazın serbest katalitik alt-ünitelerini etkin hale getirebilmektedir. Toplam serbest katalitik alt-ünitelerin miktarı, cAMP düzeyine bağlı olduğu için, nitrojen-işaretleme de dolaylı olarak cAMP düzeyine bağlıdır. Bu model fosfor ve sülfür işaretleme için de geçerlidir.

Bu modelin uygulanabilirliği, Durnez vd (1994) tarafından, üç *TPK* geninden (bu genler cAPK'nın katalitik alt-ünitelerini kodlamaktadırlar) sadece birine sahip olan maya suşları ile gerçekleştirilen çalışmada incelenmiştir. Bu araştırmacılar, nitrojen-uyarılmış etkinleşmenin fonksiyonel RAS proteinlerden bağımsız ve cAPK'nın düzenleyici alt-ünitelerinin yokluğunda gerçekleştiğini, ancak cAPK'nın katalitik alt-ünitelerinin etkinliğine bağımlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Son olarak, bu günkü bilgiler ışığında, nitrojen-uyarılmış trehalaz etkinleşmesi şöyle gerçekleşmektedir:

- i) Temel cAMP düzeyi, ancak sınırlı miktarda katalitik alt-ünitelerin serbest kalmasına hizmet etmektedir,
- ii) Bu serbest katalitik alt-üniteler sonradan nitrojen-işaretleme izyolu tarafından etkinleştirilmektedir,
- iii) Bu etkinleşme ise trehalazın etkinleşmesinden ve hücre döngüsünde "başlama" noktasının aşılmasından sorumludur.

#### **1.1.2.1.3. Düzenleyici-Omayan Trehalaz (V-Trehalaz)**

Düzenleyici-olmayan trehalazlar vakuollerde bulunmaktadır. Bu nedenle, vakuolar-trehalaz olarak da adlandırılmaktadırlar.

Wiemken ve Schellenberg (1982), V-trehalaz etkinliğinin, S-trehalazın fosforlandıktan sonra proteolitik bozunum için vakuol içerisine taşınması ile oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Ancak daha sonra, Londesborough ve Varimo

(1984), vakuolar etkinlikten bir glikoproteininin sorumlu olduğunu ve bunun sitoplazmik etkinlik için geçerli olmadığını bulmuşlardır. Vakuolar enzimler başlangıçta etkin olmayan ön-enzim olarak yapılan glikoproteinler oldukları için (bu enzimleri etkinleştirmek için vakuolar proteaz A, bu ön-sırayı ayırmaktadır. Proteaz A, *PEP4* geni tarafından şifrelenmektedir), Harris ve Cotter (1987) deneylerinde *pep4* mutanını kullanmışlardır. Bu araştırmacılar, V-trehalaz etkinliğinin proteaz A'ya bağımlı olduğunu, öte yandan S-trehalazının bu enzimden bağımsız olduğunu gözlemişlerdir. Bu da V-trehalazın diğer çözülmüş vakuolar enzimlerle aynı izyol boyunca oluştuğunu göstermektedir. Bundan sonraki nokta ise, V-trehalazın vakuole nasıl taşındığıdır. Harris ve Cotter (1988) salgılayıcı izyolun (secretory pathway) değişik evrelerinde tıkanmış mutanlar kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar, V-trehalazın vakuole geçişi sırasında erken salgılayıcı izyolunu kullandığını göstermiştir. Bu da, V-trehalazın hücre yüzeyine salgılanacak diğer proteinlerle birlikte salgılayıcı izyol boyunca hareket ettiğini belirlemektedir. Bundan sonra, V-trehalaz golgi cisimciği içerisinde diğer çözülmüş vakuolar proteinlerden ayıklanarak vakuole taşınmaktadır. S-trehalaz ise salgılayıcı izyolunu kullanmamaktadır.

## 1.2. Glikojen Metabolizması

Glikojen, glikoz birimlerinden oluşan dallanmış çok büyük bir polimerdir. Bu glikoz birimleri  $\alpha$ -1,4-glikosidik bağlarıyla birbirlerine bağlanmışlardır. Dallar ise  $\alpha$ -1,6 bağlarından oluşmuştur.

### 1.2.1. Hücre İçi Konumu

Glikojen, maya hücrelerinde büyük tanecikler oluşturan zarsız keseler içerisinde bulunmaktadır. Yine aynı tür keseler hücre yüzeyi üzerinde de bulunmaktadır (Ghosh vd, 1973). Glikojen keseleri glikojen sentezini ve yıkımını sağlayan enzimlerle, bu işlemi düzenleyen enzimleri barındırmaktadır.

Gunja-Smith ve Smith (1974) ve Gunja-Smith vd. (1977)'nin çalışmaları *Saccharomyces* hücrelerinde iki tür glikojen havuzu bulunduğunu ortaya koymuştur. Suda-çözünen azınlık kısım ve suda-çözünmeyen çoğunluk kısım. Suda-çözünmeyen parça alkali bozunmaya dayanıklı bir bağla hücre duvarına bağlanmıştır. Bu parça asidik ya da mekanik bozunmaya duyarlıdır. Gunja-Smith vd (1977) çözünmeyen glikojen parçasının sitoplazmik membranın dışındaki yüzey boşluğunda bulunduğu ve  $\beta$ -konfigurasyonu

hücre duvarına bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca, her iki glikojen havuzunun da birbirinden bağımsız düzenlendiğine işaret etmişlerdir.

### 1.2.2. Glikojenin Fonksiyonu

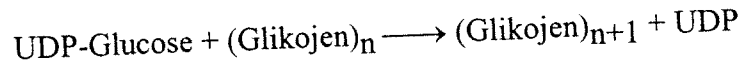
Mayalarda glikojen ana birikim karbonhidratıdır. Glikojenin glikoz birimlerinin % 90'ını fosforilitik olarak, kalan % 10'unu (dallanmış artıklar) ise hidrolitik olarak ayrılmaktadırlar. Böylece, mayalarda glikojen yıkımı yüksek enerji veren bir işlem olarak belirmektedir. Glikojenin fosforilitik ayrımı enerjetik açıdan avantajlıdır, çünkü bu yolla elde edilen glikoz zaten fosforlanmış durumdadır. Buna karşın, hidrolitik ayırım sadece glikoz açığa çıkaracağı için, bu glikozun fosforlanması bir ATP tüketimine neden olacaktır. Bir başka avantaj ise, oluşan glikoz-1-fosfatın hücreden dışarıya çıkamamasıdır.

### 1.2.3. Glikojenin Birikimi

Genel olarak, mayalarda glikojen büyümenin engellendiği koşullarda birikmektedir. Bu tür koşullar, glikoz (ya da ilgili fermente edilebilen şekerler) varlığında logaritmik fazdan durgun faza geçişte ve ayrıca glikoz dışındaki gerekli besinlerin (nitrojen, fosfat, sülfür, vb.) kıtlığında ortaya çıkmaktadır (Lillie ve Pringle, 1980).

#### 1.2.3.1. Glikojen Birikimine Neden Olan Enzimler

Glikojen sentaz, glikojen birikimine neden olan enzimdir. Bu enzim glikojenin ucundaki indergemeyen glikoz artıklarına yeni glikosil üniteleri eklemektedir. Ayrıca, bir dallanma enzimi de glikojenin dallanmış bir polimer olmasına neden olmaktadır.



Rothman-Denes ve Cabib (1971) ile Huang ve Cabib (1974)'in çalışmaları mayalardaki glikojen sentazın memeli hücrelerdeki ile ortak özellikler içerdiğini göstermiştir. Bunlar, glikoz-6P tarafından allosterik etkinleştirilme ve geri dönüşümlü kovalent fosforlanma gibi özelliklerdir.

Daha sonra, François ve Hers (1988) hücre içermeyen maya özütü ile kapsamlı bir kinetik çalışma yapmışlardır. Bu araştırmacılar, pH 5.9'da glikoz-

6-fosfatın glikojen sentazı uyardığını, ATP, ADP ve diğer nükleotitlerin ise engellediğini rapor etmişlerdir. Ancak, fizyolojik koşullarda ATP'nin engelleyici etkisinin önemsizleştiğini gözlemişlerdir. Bu enzimin etkinliği de fosforlanma yoluyla kontrol edilmektedir. Bu mekanizma etkin (a) form ile etkin olmayan (b) formlar arasında dönüşümü sağlamaktadır. Fosforlanma enzimin etkinliğini yitirmesine neden olmaktadır. Glikojen sentaz fosfataz, glikojen sentazın fosforunu ayırmakta ve bu yolla etkin hale getirmektedir (Geniş açıklama için bkz. Peng vd., 1991).

Glikojen sentaz (a) ve (b) UDP-glikoz için benzer  $K_m$  (0.25-0.55 mM) değeri göstermektedir. Ancak, (a) formunun  $V_{max}$  değeri diğerininkine oranla 10 kat daha fazladır. Fizyolojik anorganik fosfor derişimlerinde sentaz (b)'nin spesifik etkinliği sentaz (a)'ninkinin % 5'ni geçmemekte ve glikoz-6-fosfat derişiminden ancak eser miktarda etkilenmektedir (François ve Hers, 1988).

Farkas vd (1990) glikojen sentazı saflaştırmışlardır. Bu saflaştırılmış enzim moleküler ağırlıkları 85 ve 77 kDa olan iki polipeptit içermektedir. Bu sonuç Peng vd. (1990) bulgularına uyum göstermekte, ancak Carabaza vd'nin (1990) sonuçlarından ayrılmaktadır. Carabaza vd (1990) ve Peng vd (1990) 80 kDa'luk bir polipeptit ayırabilmişlerdir. Klonlama çalışmaları, 85 kDa'luk peptidin *GSY1* geni tarafından (Roach vd. 1991) ve 77 kDa'luk peptidin ise *GSY2* geni tarafından (Farkas vd., 1990) şifrelendiğini ortaya koymuştur.

### 1.2.3.2. Glikojen Sentezinin Düzenlenmesi

Diğer polimerlerde olduğu gibi, glikojen sentezi, belli başlama ve uzama evrelerinden geçmeyi ve ayrıca  $\alpha$ -1.6 glikosidik bağları oluşturmak için bir mekanizmayı gerektirmektedir.

"Glikojenin (glycogenin)", glikojen sentaz için uygun bir substrat oluşturacak uzunlukta bir oligosakkarit zinciri meydana getirebilme özelliğine sahip olan bir proteindir. Memeli hücrelerde "glikojenin" varlığı görülmüşse de bunun tüm doğada önemli bir madde olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Ayrıca, maya hücrelerinin de glikojen sentezini başlatmak için "glikojenine" benzer bir protein kullanıp kullanmadıkları henüz bilinmemektedir. (Roach vd.).

cAMP izyolu olmayan mutantlarla yapılan çalışmalar, glikojen metabolizmasının düzenlenmesinde ve glikojen sentaz etkinliğinde cAMP'nin rol oynadığını göstermiştir. Sınırsız cAPK etkinliği gösteren mutantlarda (*bey<sup>-1</sup>*, gibi) glikojen birikimi görülmemektedir (Cannon ve Tatchell, 1987 ve

Cameron vd., 1988). cAMP üretimi noksan olan mutantlarda (*ras2<sup>-</sup>* gibi) ise yüksek miktarda glikojen birikmektedir (Broek vd., 1985).

François vd (1988) mayalarda glikojen metabolizmasının kontrolü üzerine araştırma yapmışlardır. Glikoz eklenmesinin glikojen sentazı uyardığını, ancak bunun cAMP derişimindeki değişimden kaynaklanmadığını gözlemişlerdir. Dönüşümün birincil etkeninin glikozun kendisinin olmadığı sonucuna varmışlardır. Glikoz eklenmesinden hemen sonra maya içinde büyük miktarda artan glikoz-6-fosfat derişiminin bir sentaz engelleyici enzimi (büyük olasılıkla sentaz fosfataz) uyarmaktadır. Bu araştırmacılar, ayrıca, glikoz varlığında ortama nitrojen eklendiğinde glikojen sentezinin yavaşladığını ve glikojen sentaz etkinliğinin engellendiğini rapor etmişlerdir. cAMP-bağımlı bir protein kinazın rol oynadığı bir mekanizma, bu araştırmacılar tarafından, öne sürülmüştür. Bu öne sürülen mekanizmaya göre, glikojen metabolizmasında glikojen-6-fosfatın, hem fosforilaz hem de glikojen sentaz kinaz enzimlerini engelleme ve protein fosfatazı etkinleştirme yoluyla, olası bir rolü vardır.

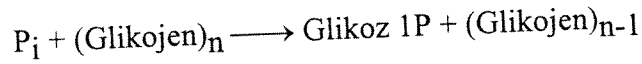
Ancak, RAS-cAMP izyolu glikojen metabolizmasını kontrol eden tek yol değildir. Fermentatif-Büyüme-Ortamı-Uyarılmış-İzyol (FBOU) (Fermentable-Growth-Medium-Induced-Pathway, FGMIP) da glikojen metabolizmasını kontrol etmektedir. Bu izyol sadece temel cAMP düzeyine bağımlıdır (Thevelein, 1994, geniş bilgi için bir sonraki bölüme bakınız).

#### 1.2.4. Glikojen Bozunumu

Glikojen bozunumu her zaman büyümenin uyarılmasıyla beraber gerçekleşmektedir.

##### 1.2.4.1. Glikojen Bozunumunda Yer Alan Enzimler

Glikojen fosforilaz, glikojen molekülünün sonundaki glikosil unitelerinin sıralı ayırımlarını katalize eden enzimdir.



Glikojen, fosforilaz tarafından sınırlı bir miktara kadar bozunmaktadır, çünkü bu enzim sadece molekülün dallanmamış parçasını ayırabilmektedir. Bu nedenle, glikojen fosforilaza ek olarak, bir transferaz ve bir de dalları ayırıcı (debranching) enzim gerekmektedir.

#### 1.2.4.1.1. Glikojen Bozunumunda Yer Alan Enzimlerin Özellikleri

Glikojen sentaz gibi, glikojen fosforilaz da etkin (a) formu ile etkin olmayan (b) arasında dönüşümlü fosforlanma/fosfor ayırımı yoluyla çalışmaktadır. Ancak bu durumda fosforlanma, glikojen fosforilazın etkinleşmesine neden olmaktadır (Tanabe vd., 1987 ve 1988 ve François ve Hers, 1988).

Tanabe vd (1987), maya glikojen fosforilazında oligomerik formların olduğunu göstermişlerdir: 100 kDa'luk bir monomer, 203 kDa'luk bir dimer ve 410 kDa'luk bir tetramer. (b) formundan (a) formuna etkinleşme, tetramerden dimere geçiş ile birlikte olmaktadır (Grunenberg ve Schwartz, 1990). Bu araştırmacılar, glikojen fosforilazın en çok fosforilaz kinaz tarafından etkinleştirildiğini ve cAPK'nın da (b) formunun etkinleşmesini sağladığını rapor etmişlerdir.

Her iki form da glikoz-1-fosfat için benzer  $K_m$  değerleri (yaklaşık 1 mM) göstermişlerdir. Ancak,  $V_{max}$  değerleri oldukça farklıdır. (a) formu için bu değer 70 mU/mg protein, (b) formu için ise 86 mU/mg protein'dir (François ve Hers, 1988).

Saflaştırılmış glikojen fosforilaz en çok pH 5.8 ve 30°C'de etkin durumdadır. Bu enzim pH 5-8 aralığında kararlıdır. Bu enzimin etkinliğini yitirmesi 25°C'nin üzerinde başlamakta ve 40 ile 50°C'ler arasında artmaktadır. Bu enzimin etkinliği UDP-Glikoz ve Glikoz-6-fosfat tarafından engellenmektedir (Tanabe vd., 1987 ve François ve Hers, 1988).

Glikoz yokluğunda glikojen fosforilaz, fosforlanmış (a) formunda, en yüksek etkinliktedir. Ayrıca, Mg-ATP'nin ve  $Ca^{+2}$ 'nin varlığı glikojen fosforilazın 50-100 kat etkinleşmesine neden olmaktadır. Bu enzimin (b) formunun etkinliği ise AMP'ye duyarlı değildir (François ve Hers, 1988).

#### 1.2.4.2. Glikojen Bozunumunun Düzenlenmesi

Glikojen fosforilaz etkinliğinin kontrolü üzerine François vd. (1988) tarafından ayrıntılı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Glikozun (ya da ilgili fermente edilebilen şekerlerin) eklenmesinden hemen sonra glikojen fosforilazın etkinliğini yitirdiğini gözlemişlerdir. Glikoz uzaklaştırıldığı zaman ise etkinlik geri kazanılmıştır. Glikozdan sonra pepton eklendiğinde ise, glikojen sentezi yavaşlamıştır. Peptonların glikojen metabolizması üzerindeki etkisi glikojen sentazın etkinliğinin yitişi ve glikojen fosforilazın etkinleşmesi ile eş zamanlıdır. Ancak, tek başına peptonların etkisi bu kadar olmamaktadır.



Ayrıca, glikojen fosforilazın glikoz-uyarılmış etkinlik kaybı cAMP derişimindeki bir değişiklikten kaynaklanmamakta, daha çok temel cAMP düzeyine bağımlı olmaktadır. Bu araştırmacılar, glikoz-6-fosfatın, glikojen fosforilazın etkinlik kaybına neden olabilecek, bir fosforilaz fosfatazı uyardığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca, cAMP'nin yanında ikinci bir uyarıcının, Ca<sup>+2</sup>'nin, da glikojen fosforilaz etkinliğinde rol oynadığı görüşünü ortaya atmışlardır. Temel bir cAMP düzeyine bağımlılık, FBOU'unun glikojen fosforilaz etkinliğini kontrol ettiğini göstermektedir (Thevelein, 1994).

## **2. Mayalarda Besin-Uyarılmış İşaret İletimi (Nutrient-Induced Signal Transduction)**

### **2.1. Glikoz-Uyarılmış İşaret İletimi (Glucose-Induced Signal Transduction)**

Fermente olmayan karbon kaynaklarıyla büyüyen ya da durgun fazda bulunan maya hücrelerine glikoz (ya da ilgili fermente edilebilen şekerler) eklenmesi değişik bir çok olayın başlamasına neden olmaktadır. Değişik enzim ve taşınım proteinleri translasyon-sonrası düzeyde hızla etkinleşmekte ya da etkinliklerini yitirmekte, transkripsiyonel düzeyde ise bir çok gen baskılanmakta ya da uyarılmaktadır.

Glikoz uyarılmış bir çok düzenleyici etkinin ana rolü, metabolizmayı glikoneojenik/solunum modundan fermentatif moduna verimli olarak değiştirmek olarak görünmektedir.

Glikoz uyarılmış olayların başlamasında değişik işaretleme izyolları rol almaktadır.

#### **2.1.1. Ana Glikoz Baskılanma İzyolu, GBİ (Main Glucose Repression Pathway, GRP)**

Bu izyolun ana etkisi yüksek düzeyde glikoz (ya da ilgili şekerler) varlığında büyüme sırasında solunumu kapatmaktır (switch off). Bu, Krebs döngüsü ve elektron aktarım zinciri ile ilgili genlerin baskılanmasıyla olmaktadır. Mitokondrial solunumun bağlı olmayan (non-obligate) karakteri maya hücrelerinde bilinen bir durumdur.

GBİ ve diğer izyollar arasındaki bağlantı, uyarılma mekanizması için gerekli bir maddenin baskılanması olarak görünmektedir.

### 2.1.2. RAS-Adenilat-Siklaz-İzyolunun Glikoz Uyarılmış Etkinleşmesi (Glucose Induced Activation of RAS-Adenylate-Cyclase Pathway)

Baskılanmamış maya hücrelerine glikoz eklenmesi, cAMP düzeyinde hızlı bir geçici yükselmeye neden olmaktadır (cAMP işareti).

Mayalarda bu izyol sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir.

Fazla-etkin bir izyol şunlara neden olmaktadır:

1. Isı şokuna ve besin kıtlığına aşırı duyarlılık
2. Düşük trehaloz ve glikojen düzeyleri
3. Besin sınırlılığı sonucu G1 fazında tutunamama
4. Fermente olmayan karbon kaynaklarında büyüyememe
5. Diploid hücrelere sporlanmama

İzyol etkinliğinin azalması ise şunlara neden olmaktadır:

1. Artan stress dayanıklılığı
2. Artan trehaloz ve glikojen düzeyi
3. Sadece durgun fazdaki hücrelerde üretilen ısı şoku proteinlerin ve başka genlerin etkin hale gelmesi
4. Zengin besin ortamında sporlanma

İzyolunun çok düşük etkinlik göstermesi ise hücreler için ölümcüldür. Çünkü, o zaman, hücrelerin "başlama" noktasını aşarak G1 fazına geçmeleri engellenmekte ve hücreler G0 fazını aşamamaktadırlar.

RAS-Adenilat-Siklaz izyolunun ana görevinin,yeterli miktarda fermente olabilen şekerin ( $K_m = 15-20$  mM glikoz) ortama eklendiğini hücreler işliğe işaretlemek olduğu görünmektedir.

Bu izyoldan ulaşan işaret sonucu, hücreler metabolizmalarını, büyüme hızlarını ve fenotipik özelliklerini, fermente edilebilir şekerlerde büyüyen hücrelerdekine ayarlarlar. Bu ayarlama yapıldıktan ve hücreler G1'nin çalışması sonucu glikoz-baskılanmış duruma geldiklerinde, RAS-cAMP izyolunun glikoz algılayıcı sistemi kapatılır ve yeni bir izyol, Fermentatif-Büyüme-Ortamı-Uyarılmış-İzyol (FBOUİ) devreye girer.

Sonuç olarak, mayada RAS-cAMP izyolu, sadece hücrelerin yeni duruma uyum göstermelerine hizmet eden bir işaretleme izyolu olarak çalışır.

### 2.2. Fermentatif-Büyüme-Ortamı-Uyarılmış-İzyol, FBOUİ (Fermentable-Growth-Medium-Induced-Pathway, FGMIP)

FBOUİ, sadece temel cAMP düzeyine bağlıdır. Bu düzey ise RAS-cAMP izyolunun glikoza bağımlı temel etkinliğinden gelmektedir. Bu izyolun

etkinlik gösterebilmesi için gerekli besin maddelerinin ortamda var olması gerekmektedir.

Bu izyol, hücre çoğalması ("başlama" noktasını aşabilmek için), trehalaz, glikojen sentaz, glikojen fosforilaz gibi bir çok enzimin etkinleşmesi için gereklidir.

### 3. Maya Fizyolojisini Etkileyen Faktörler

#### 3.1. Büyüme Hızının Etkisi

##### 3.1.1. Büyüme Hızının Glikoz Metabolizması Üzerindeki Etkisi- Solunum Darboğazı Kuramı

Oksijen ve şekerin düzenleyici etkileri bağlamında, şeker (glikoz ve fermente olabilen şekerler) metabolizması üzerine çalışmalar, Pasteur'ün araştırmalarına kadar uzanır. Yüz yıl önce, Pasteur, bira mayalarında, oksijen varlığında fermentasyonun azaldığını gözlemiştir. Bu nedenle, solunumun fermentasyonu engellemesine "Pasteur etkisi" denilmiştir. Ancak, büyüyen hücrelerde bu etkinin görülmesi olası değildir. Dinlenme fazındaki hücrelerde ise bu etki görülebilir (Lagunas v.d., 1982).

Daha sonra, 1929'da Crabtree, tümör hücrelerinde glikolitik etkinliğinin hücre solunumunu kontrol ettiğini gözlemiştir. Fermentasyonun solunumu engellemesi "Crabtree etkisi" olarak adlandırılmıştır.

Kesikli kültür deneylerinde, büyüyen maya hücrelerinin Crabtree etkisi gösterdikleri gözlenmiştir. Bu deneyler, oksijenli ortamda büyüyen maya hücrelerinin glikozu tamamıyla fermentasyon yoluyla kullandıklarını göstermiştir. Ortamda yeterli miktarda glikoz bulunduğu sürece, fermentatif özümseme aerobik özümsemeye baskın olmaktadır (Alexander ve Jeffries, 1990).

Sürekli kültür teknikleri kullanılıncaya kadar, şeker metabolizması veya Crabtree etkisi üzerine doyurucu sonuçlar elde edilememiştir.

*Saccharomyces cerevisiae* hücreleri, sürekli kültürde glikoz ortamında büyütüldükleri zaman iki farklı metabolik faz görülür. Düşük seyrelme hızlarında, hücre tamamıyla, alkol oluşumu gözlenmeyen, 0.5 (g kullanılan glikoz/g oluşan biyokütle)'e yakın yüksek hücre verimiyle tanımlanan solunum metabolizması gösterir. Solunum metabolizması süresince, artık glikoz derişimi çok düşüktür (0.5 g/L'den daha az). Seyrelme hızı, suşa özel belli bir

dönüm değerinin,  $D_R$ , üzerine çıkarıldığı zaman hücre solunumlu-fermentatif (respiro-fermentative) metabolizma gösterir.

Beck ve Meyenberg (1968), spesifik oksijen kullanım oranının seyrelme hızıyla doğru orantılı arttığını ve  $D_R$  noktasında en yüksek değerine ulaştığını gözlemişlerdir. Bu değer, daha sonra  $D_R$ 'in üzerinde artan seyrelme hızıyla düşüş göstermiş ve alkol üretimi artmıştır. Beck ve Meyenberg (1968), bu gözlemlerini, solunum baskılanmasına kanıt olarak ele almışlardır.

Fakat, daha sonra Barford ve Hall (1979)'ın çalışmaları, kesiksiz kültürde tam olarak uyum sağlamış büyüme sırasında solunumun baskılanmadığını göstermiştir. Bu çalışma sonucunda, enerji substratının niteliğinden bağımsız olarak, suşa özel seyrelme hızında solunum hızının en yüksek değere ulaştığı rapor edilmiştir. Ayrıca, (solunum alanının kısıtlı olmasından kaynaklanan baskılanmanın da olabileceği) kesikli kültürde, tam olarak solunum uyumunun başarılmasının çok zor olduğunu da göstermişlerdir.

Bradford ve Hall (1981), "uzun-dönem uyumu" olarak adlandırdıkları uygun bir uyum döneminden sonra *Saccharomyces cerevisiae*'nin solunum kapasitesinin en yüksek spesifik oksijen alım hızı gösterdiği ve doyuma ulaştığını gösteren deneysel araştırmaları temel alarak, bir model öne sürmüşlerdir. Bu model, diğer substratların alım oranlarının engellemesi ve baskısı olmadan, solunum ve fermentasyon kontrolünün sadece solunum doyumunu sonucu olduğunu ileri sürmektedir. Bu modele göre, fermentasyon ve solunumun başka herhangi bir düzenleyicisi olmadığı varsayılmaktadır.

Barford ve grubu dışında, aynı konu, bağımsız olarak Kaeppli ve grubu tarafından da çalışılmıştır.

Petric v.d. (1983), *Saccharomyces uvarum*'da, Rieger v.d. (1983) *Saccharomyces cerevisiae*'de, glikoz etkisinin metabolizmanın uzun ve kısa dönem uyumu üzerinde araştırma yapmışlardır. Bu araştırmalar sonucunda, *Saccharomyces* cinsinde, glikoz metabolizmasının düzenlenmesinin hücrenin sınırlı solunum kapasitesine bağlı olduğunu göstermiştir. Glikolitik akış oksidatif kapasiteden daha yüksek olduğu zaman, oksidatif izyolunun kısıtlı kapasitesi, etanolün son ürün olduğu, piruvatın alternatif dekarboksilasyonuna neden olur. Belli bir seyrelme hızına kadar,  $D_R$ , oksijen alımının, *S. cerevisiae* ve *S. uvarum*'un büyüme hızıyla doğru orantılı olduğunu ve glikozun solunumla yıkıldığını (solunumsal glikoz metabolizması) rapor etmişlerdir. Suşa özel seyrelme hızında,  $D_R$ , oksijen alımını aynı düzeyde kalır ve ikincil glikoz metabolizması ile etanol oluşumu görülür (solunumsal-fermentatif glikoz metabolizması).

Kaeppli vd (1985a), *S. uvarum*'un oksidatif metabolizmadan oksido-indirgeyici metabolizmaya geçişinin, ani etanol oluşumu ve bu hücrelerin yeni bir fizyolojik duruma kademeli uyumu ile tanımlandığını göstermişlerdir. Bu oksido-indirgeyici glikoz metabolizmasının görülebilmesi için sınırlı solunum kapasitesinin ön koşul olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bir başka çalışmalarında, Kaeppli vd (1985b), sürekli kültürde solunumsal glikoz metabolizması gösteren *S. cerevisiae*'nin etanolü ortak substrat olarak kullanabildiğini rapor etmişlerdir. Bu tür hücrelerde, etanol alım oranı hücre solunumunun artık kapasitesi ile sınırlıdır. Solunum kapasitesi, solunumsal substrat kullanımı için bir darboğaz sergiler. Solunum kapasitesi glikoz tarafından ne kadar kullanılırsa etanol alımı da o kadar azalır.

Sonnleitner ve Kaeppli (1986), *Saccharomyces* türü mayaların kısıtlı solunum kapasitesi için bir model öne sürmüşlerdir. Bu model, aerobik etanol fermentasyonu koşullarında, glikoz yıkımının iki izyol aracılığıyla gerçekleştiği sonucuna dayanmaktadır. Glikoz, kısmen oksidatif, kısmen de indirgeyici metabolizma ile yıkılmaktadır. İndirgeyici metabolizmanın son ürünü ise etanoldür. Bu metabolik durum ise oksido-indirgeyici olarak tanımlanır. Bunun ötesinde, etanol sadece oksidatif olarak kullanılabilir. Glikoz ve etanolün en yüksek oksidatif yıkım hızları hücrelerin solunum kapasitelerine bağlıdır.

van Urk vd. (1989) mayaları Crabtree olumlu (*Saccharomyces* ve *Schizosaccharomyces pombe*) ve Crabtree olumsuz (*Rhodotorula*, *Hansenula* ve *Candida*) olarak ikiye ayırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Crabtree olumsuz mayalar yüksek glikoz ortamına geçtikten sonra alkolik fermentasyon göstermeyen hücreler olarak tanımlamışlardır. Crabtree olumlu mayalarda dış glikoz derişiminin artışının kolaylaştırılmış yayılım (facilitated diffusion) yoluyla sınırsız alımına ve dolayısıyla solunumlu-fermentasyona neden olduğu sonucuna varmışlardır. Bunun aksine, Crabtree olumsuz mayalar düzenlenmiş proton-simport sistemleriyle glikoz girişini kısıtlayabilir ve böylece taşkın metabolizma oluşumunu önleyebilirler.

Sonnleitner ve Hahnemann (1994), *S. cerevisiae*'nin solunum darboğazı dinamiği üzerine çalışmışlardır. Çalışmalarında, yavaş büyüyen hücrelerde, solunum mekanizmasının yavaşça artan substrat miktarıyla hemen başatmaya izin verecek ölçekte var olduğunu, fakat her zaman en yüksek solunuma yetecek kadar fazla olmadığını rapor etmişlerdir. İsteğe göre solunum mekanizmasının bir parçası de-novo sentezlenmektedir. Bu, *Saccharomyces* türü mayaların solunum kapasitesinin durağan ve sabit bir değer olmadığı, aksine, organizmanın o anlık özel gereksinimlerine dinamik olarak uyum

gösterdiği anlamına gelmektedir. Ani bir substrat artışından dolayı solunuma duyulan gereksinim var olan kapasitenin üzerine çıkarsa (ve bu gereksinim hala üst sınırın altındaysa) hücreler daha fazla solunum bileşiklerini (respiratory compounds) *de novo* sentezlerler. Bu etkinin tipik zaman sabiti bir saattir (çünkü transkripsiyon ve translasyon için zamana gereksinim vardır). Öte yandan, substrat miktarı azaltılırsa, solunum gereksinimi var olan yüksek kapasiteden çok substrat kullanımı tarafından kısıtlanmaktadır. O zaman, hücreler büyüme sırasında solunum enzimlerinin hücre içi seyrelmesiyle sonuçlanan gereksiz sentezi durdurmaktadır. Bu zaman sabiti de hücrenin asıl büyüme hızıyla belirlenmektedir. Bunun ötesinde, etanolün, ortamda bulunduğu zaman, solunumu olumsuz yönde etkilediğini rapor etmişlerdir. Etanol, solunumun olası üst-sınırını ve var olan kapasitesini baskılamaktadır. Buna karşın, hücreler etanole uyum sağlamak için mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu uyum için bir kaç gün gibi uzun bir zaman sabiti gerekmektedir.

Sonuç olarak, kültür makroskopik durağan-durumda olduğu halde, fizyolojik olarak da durağan-durumda olabilmesi için, biyolojik sistemin doğasına ait ve vazgeçilmez dinamik unsurların olmaması gerekmektedir. Bunu sağlamak ise çok zordur.

### 3.1.2. Büyüme Hızının Makromoleküler Bileşim Üzerine Etkisi

Büyüme hızı değiştiği zaman mayanın makromoleküler bileşimi de değişmektedir.

Büyüme hızındaki değişim hücrenin karbonhidrat içeriğini büyük ölçüde etkilemektedir. Genel olarak, trehaloz ve glikojen birikimi yavaş büyüme hızı ile yakından ilgilidir. Öte yandan, hücre duvarı karbonhidratları olan glukan ve mannan büyüme hızının değişmesinden belirli bir şekilde etkilenmemektedirler.

Kesikli kültürde, trehaloz birikimi glikozun tamamen tükenmesinden hemen önce büyümenin yavaşladığı durgun faza doğru başlamaktadır (Panek ve Mattoon, 1977; Lillie ve Pringle, 1980). Aynı şekilde, sürekli kültürlerde trehaloz düşük seyrelme hızlarında birikmektedir (Küenzi ve Fiechter, 1972).

Glikojen birikimi de düşük büyüme hızı sırasında olmaktadır (Becker, 1982; Lillie ve Pringle, 1980 ve Costa-Carvalho vd., 1986). Glikojen birikimi ortam bileşiminden bağımsız olarak hem kesikli (Lillie ve Pringle, 1980) hem de sürekli (Küenzi ve Fiechter, 1972) kültürlerde büyüme hızı yavaşladığı zaman olmaktadır. Glikojen miktarı durgun faza geçiş sırasında en yüksek

düzeyine erişmektedir. Bu geçiş sırasında ortamdaki glikozun tükenmesiyle hücre büyümesi hızla yavaşlamaktadır. Glikozda erken logaritmik büyüme fazı süresince glikojen miktarı çok düşüktür. Daha sonra glikojen miktarı glikozun tükenmesinden çok önce artmaya başlamaktadır. Glikozun tükenmesine yakın glikojenim net sentezinden net bozunmasına doğru bir dönüşüm olmaktadır (Lillie ve Pringle, 1980). Öte yandan, trehaloz birikimi ancak ortamdaki glikoz miktarı 0.5 mg/ml'ye düştüğü zaman başlayabilmekte ve durgun faz boyunca glikojenin bozunmasıyla eş zamanlı artmaktadır (François vd., 1987 ve 1991). Hücre çoğalmasının olmadığı uzayan durgun faz boyunca birikmiş olan glikojen temel değerine kadar bozunmaktadır (Lillie ve Pringle, 1980). Ayrıca, Costa-Carvalho vd (1986) yavaş büyüme ortamında glikojen birikim oranının hücre çoğalması olmayan koşullardakinden çok daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bundan başka, Rocha-Leao vd. (1984), katabolik baskılanmanın olduğu koşullarda glikojen birikiminin ancak büyüme fazının sonuna doğru, yani durgun fazda, gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Daha sonra, Rocha-Lao vd. (1987) glikojen zengin hücreler elde etmek için, katabolik baskılanmanın yokluğunun yüksek glikojen birikimi için yeterli koşul olmadığını ve bu durumun aynı zamanda yavaş büyüme ile de ilişkili olması gerektiğini bildirmişlerdir.

Küenzi ve Fiechter (1972) karbonhidrat bileşiminin seyrelme hızına bağımlılığını incelemişlerdir. Glikoz-sınırlı kültürlerde birikim karbonhidratları giriş substratının artan sınırlılığı, örneğin büyüme hızının düşmesi, ile doğru orantılı olarak sentezlenmektedirler. Ayrıca, solunumlu-fermentatif büyüyen hücrelerin sadece glikojen içerdiğini, öte yandan daha yavaş büyüyen sadece solunumlu metabolizma gösteren hücrelerin hem trehaloz hem de yüksek miktarda glikojen içerdiklerini gözlemişlerdir. Dönüşüm seyrelme hızı,  $D_R$ , olan 0.24 sa<sup>-1</sup>'e kadar artık glikoz miktarı 40 mg/l'nin altında ölçülmüş, glikojen miktarı % 25'den 20'ye, trehaloz ise % 7'den 3'e düşmüştür.  $D_R$ 'ın üzerindeki artan seyrelme hızıyla artık glikoz miktarı yükselmeye ve biyokütle miktarı da azalmaya başlamıştır. Bu yüksek seyrelme hızlarında hücrelerde trehaloz ancak eser miktarda bulunmaktadır. Glikojen miktarı da % 15'den 7'ye düşmüştür. Hücre duvarı karbonhidratları olan mannan ve glukan ise seyrelme hızından etkilenmemişlerdir. Hücrenin mannan miktarı % 8, glukan miktarı ise % 6 olarak ölçülmüştür. Bundan başka, Küenzi ve Fiechter (1972), nitrojen-sınırlı kültürlerle de çalışmışlardır. Bu çalışmalarından, substratın cinsinden çok büyümeyi sınırlayan substratın akışının daha önemli olduğu sonucuna varmışlardır. Pejin ve Razmovski (1993) glikoz-sınırlı kültürle yaptıkları çalışmalarında daha yüksek glikojen ve trehaloz değerleri bulmakla beraber

azalan seyrelme hızıyla trehaloz ve glikojen birikimlerinin de arttığını gözlemişlerdir.

Hücrelerin RNA ve protein miktarları artan büyüme hızıyla beraber artmakta, öte yandan DNA miktarı hemen hemen sabit kalmaktadır.

Bu konuyla ilgili geçmiş çalışmalardan biri, Wehr ve Parks (1969) tarafından kesikli kültürde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada protein, RNA ve DNA derişimleri büyüme hızlandıran veya yavaşlatan ortama aktarım koşullarında incelenmiştir.  $0.2 \text{ sa}^{-1}$  spesifik büyüme hızıyla büyüyen hücreler  $0.63 \text{ sa}^{-1}$  büyüme hızını destekleyen ortama geçirildiklerinde protein miktarı % 24.5'den 32.8'e, RNA miktarı % 14.9'dan 35.8'e ve DNA miktarı da % 0.4'ten 0.75'e yükselmiştir.

Waldron ve Lacroute (1975) kesikli kültürde hücrelerin RNA miktarının azalan seyrelme hızıyla birlikte azaldığını gözlemişlerdir. Büyüme hızı  $0.08 \text{ sa}^{-1}$  den  $0.6$ 'ya arttırıldığında RNA miktarı % 2.6'dan 11.2'ye yükselmiştir. Ancak bu sonuçlar Wehr ve Parks (1969) sonuçlarından çok daha düşüktür.

Kesikli kültürle ilgili başka bir çalışma da Carter ve Lorincz (1978) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ortam değişimi sonucunda protein sentezi ve hücre bölünmesinin yeni hızına ulaşmadan önce bir süre eski hızını koruduğu gözlenmiştir.

Sürekli kültürlerle ise daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmiştir.

Parada ve Acevedo (1983) nitrojen-sınırlı sürekli kültürle çalışmışlardır. Seyrelme hızı arttığı zaman,  $0.1-0.34 \text{ sa}^{-1}$ , RNA miktarının % 10'dan 12'ye, protein miktarının ise % 30'dan 50'ye yükseldiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, % 6 RNA miktarının hücrenin yaşamını devam ettirmesi için gerektiği sonucuna varmışlardır.

Furukawa vd. (1983) glikoz-sınırlı kültürün seyrelme hızı  $0.2 \text{ sa}^{-1}$ 'den  $0.3$ 'e arttırıldığında RNA miktarının % 6.5'den 8.5'e, protein miktarının % 40'dan 48'e yükseldiğini, DNA miktarının ise % 4 dolayında sabit kaldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, hücredeki yağ miktarının da artan seyrelme hızıyla % 8.5'den 4'e düşmüştür. Bu araştırmacılar, yüksek çözünmüş oksijen derişiminde ve çok yavaş seyrelme hızında kültürün asla durağan-duruma erişemediğini, ancak sabit derişim değişimleriyle sürekli salındığını rapor etmişlerdir.

Verduyn vd. (1990 a ve b) glikoz-sınırlı anaerobik sürekli kültürlerle çalışmışlardır. Aerobik kültürlerin aksine artan seyrelme hızıyla biyokütle miktarının sürekli azaldığını ve en yüksek verim değerinin  $0.1 \text{ (g substrat/g hücre)}$  olduğunu rapor etmişlerdir. Seyrelme hızı  $0.1 \text{ sa}^{-1}$ 'den  $0.28$ 'e (anaerobik kültürde durağan-durum elde edilebilecek en yüksek değer) arttırıldığında



protein miktarı % 47'den 57 yükselmiştir. Bu değer ise aerobik kültürdekinden daha yüksektir.

### 3.2. Besin Sınırlılığı ya da Kıtılığının Etkileri

Hücrelerin büyümeleri ve fizyolojileri sadece büyüme hızından değil, besin kıtlığı ya da sınırlılığında da etkilenmektedir.

Besin sınırlılığının cinsi, kültürün karbon-, nitrojen-, ya da fosfat-sınırlı, maya hücrelerinin metabolizmasını etkilemektedir.

Ogawa vd. (1980) glikoz-fosfat-sınırlı (çifte-sınırlı) kültürde  $D_R$  değeri, sadece glikoz-sınırlı kültürünün ötesine uzanmaktadır. Bunun büyük olasılıkla çifte-sınırlı kültürde artık glikoz miktarının daha da azalmasından ileri geldiğini öne sürmüşlerdir. Böylece, spesifik bir fosfat derişimi aerobik fermentasyonu en aza indirgeyebilir.

Franko vd. (1984)  $D_R$  değerinin nitrojen ve fosfor düzeylerinden etkilendiğini ortaya koymuşlardır. Glikoz-sınırlı kültürlerde  $0.2 \text{ sa}^{-1}$  olarak ölçülen suşa özel  $D_R$  değeri, düşük nitrojenli kültürde  $0.14 \text{ sa}^{-1}$ 'e ve düşük fosforlu kültürde de  $0.12 \text{ sa}^{-1}$ 'e inmiştir.

Larsson vd. (1993) karbon-, nitrojen- ve çifte-sınırlı kültürlerle çalışmışlardır. Karbon/Nitrojen oranının biyokütle bileşimini etkilediğini rapor etmişlerdir. Yüksek nitrojen derişimlerinde kültür sadece glikoz-sınırlıdır. Hücre verimi  $D_R$  değerinin,  $0.2 \text{ sa}^{-1}$ , altında sabit, bu değer üzerinde ortamda artan etanol ile birlikte azalmaya başlamaktadır. Orta nitrojen derişimlerinde,  $0.05-0.08 \text{ sa}^{-1}$  seyrelme hızları arasında yüksek büyüme verimi elde edilmektedir. Bu seyrelme hızlarında artık glikoz miktarı çok düşük, artık nitrojen miktarı da yüksektir. Bu da ortamın sadece glikoz-sınırlı olduğunu göstermektedir.  $0.11-0.26 \text{ sa}^{-1}$  seyrelme hızları arasında büyüme verimi düşmekte ve ortam hem glikoz- hem de nitrojen-sınırlı hale gelmektedir.  $0.29 \text{ sa}^{-1}$  seyrelme hızının üzerindeki hızlarda büyüme verimi daha da azalmakta, artık glikojen miktarı ise artmakta ve ortam sadece nitrojen-sınırlı hale gelmektedir. Orta nitrojen derişiminde  $D_R$  değeri  $0.14 \text{ sa}^{-1}$ 'e düşmektedir. Düşük nitrojen derişimlerinde artan seyrelme hızıyla birlikte büyüme verimi de sürekli düşmektedir.  $0.16 \text{ sa}^{-1}$  seyrelme hızına kadar kültür çifte-sınırlıdır, daha sonra artan artık glikoz miktarıyla sadece nitrojen-sınırlı hale gelmektedir. Bu durumda  $D_R$  değeri daha da düşerek  $0.1 \text{ sa}^{-1}$  değerine ulaşmaktadır. Ayrıca, ortamdaki nitrojen derişiminin azalmasıyla solunumun doygunluk noktasının düştüğünü rapor etmişlerdir.

Hücrelerin birikim karbonhidrat içeriği besin sınırlılığı ve kıtlığından etkilenmektedir. Glikoz, nitrojen, fosfat ve sülfür kıtlıkları trehaloz ve glikojen birikimine neden olmaktadır (Lillie ve Pringle, 1980). Bu kıtlığı çekilen besinlerin ortama tekrar eklenmesi ise, büyümeyi hızlandırdığı için, hem trehaloz hem de glikojen bozunumuna neden olmaktadır (Becker, 1982; Thevelein ve Beullens, 1985; Hirimburegama vd., 1992).

Küenzi ve Fiechter (1972) glikoz-sınırlı ve nitrojen-sınırlı kültürlerde, aynı seyrelme hızında olmak koşuluyla, trehaloz ve glikojen miktarlarının farklı olduğunu gözlemişlerdir.

Liden (1995) nitrojen kıtlığı sonucu, artık nitrojen miktarı azaldıkça glikojen ve trehaloz birikiminin attığını, glikoz tüketim hızının azaldığını ve yeni protein sentezlenmediğini, sonuç olarak da büyümenin yavaşladığını gözlemişlerdir. Nitrojenin eklenmesiyle, hücreler ortamdaki glikozdan önce glikojenden gelen ve zaten fosforlanmış olan glikozu kullanmaktadırlar. Trehaloz ise hemen bozunmakta ve büyüme hızlanmaktadır.

### 3.3. Isı Şokunun Etkisi

Hücreler normal büyüme sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklara aktarıldıklarında trehaloz birikimi olmaktadır. Özellikle, 35-45°C sıcaklıklar arasında trehaloz çok miktarda birikmektedir.

Çeşitli çalışmalar, yüksek sıcaklıklara aktarıldıkları zaman trehaloz biriktirmenin, *S. cerevisiae* hücrelerinin genel tepkisi olduğunu göstermiştir (Hottiger vd., 1987 a ve b; Attfield, 1987; Panek vd., 1990; de Virgilio vd., 1990 ve Winkler vd., 1991).

Hücrelerin tekrar normal büyüme sıcaklığına aktarıldıklarında trehaloz miktarının hemen azalması, yüksek sıcaklıklarda trehaloz birikiminin geçici bir durum olduğunu göstermektedir. Hottiger vd. (1987a) ısı şokundan kurtulan hücrelerde trehaloz bozunumunun, en az ısı şoku sırasında trehaloz birikimi kadar hızlı olduğunu rapor etmişlerdir. Normal büyüme sıcaklığında durgun fazdaki hücrelerin, glikoz verildiği zaman büyük miktardaki trehaloz birikimlerini hemen yıktıkları bilinen bir durumdur. Öte yandan, buna karşıt olarak, aynı hücrelere ısı şoku uygulandığı zaman, glikoz verilmesi bu hücrelerde zaten var olan yüksek miktarda trehalozun daha da artmasına neden olmaktadır. Bu ısı şoku uygulanmış hücreler, dış glikoz olmadığı zaman daha fazla trehaloz biriktirememektedirler (Hottiger vd., 1987b). Bu araştırmacılar, elde ettikleri sonuçlardan, hücre içinde sabit bir glikoz derişimine ulaşmak için trehalozun çok çabuk biriktiği ve bozunduğu kanısına varmışlardır. Isı şoku sırasında,

hücre içi glikoz miktarı 50 kat kadar artmaktadır. Bu kadar yüksek glikoz derişimi hücre proteinleri ile enzimatik olmayan tepkimelere girebilir ve belki de hücreyi bozabilir. Öte yandan, çok fazla glikoz önemli izyollarını da olumsuz etkileyebilir.

Attfield (1987) ısı şoku sırasında *de novo* RNA sentezine gereksinim olduğunu rapor etmiştir. Böylece, ısı-uyarılmış trehaloz birikiminin mayalarda transkripsiyonel düzeyde kontrol edildiği sonucuna varmıştır. Ancak daha sonraki araştırmalar bu sonucun doğru olmadığını ortaya koymuştur.

Hottiger vd (1987a) ısı uygulamasının Trehaloz-6-fosfat sentaz etkinliğini 6 kat arttırdığını rapor etmişlerdir. Sıcaklık normal büyüme sıcaklığına geri döndürüldüğünde bu enzimin etkinliği çok çabuk azalarak, çok kısa bir zamanda normal düzeyine inmiştir. Öte yandan, trehalozun birikmesine karşın trehalaz etkinliğinde de bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara karşıt olarak, Winkler vd (1991), ısı stresi koşullarında ne trehaloz-6-fosfat sentaz etkinliğinde ne de trehalaz etkinliğinde herhangi bir değişme gözlememişlerdir. Daha çok, ısı şoku uygulanan logaritmik faz hücrelerinde trehaloz-6-sentaz enziminin substratları olan UDP-glikoz ve glikoz-6-fosfat derişimlerinde ani bir artış gözlemişlerdir.

Panek vd (1989 ve 1990), sıcaklık derişimi sırasında protein sentezi gerektiği ve etkinleşmenin rol almadığı sonucuna varmışlardır.

Daha sonra, Neves ve François (1992) ısı şokuna bağılı olarak trehaloz-6-fosfat ve trehaloz enzimlerinin kinetik özelliklerinde sıcaklığa bağılı derişme olduğunu öne sürmüşlerdir. Ancak trehalaz ve trehaloz-6-fosfat sentaz/fosfataz enzimlerinin kinetik özelliklerindeki derişimlerin ısı-uyarılmış hızlı trehaloz birikimini açıklayabileceği sonucuna varmışlardır. Isı şoku sonucu glikoz alımında ve fosforlama etkinliğinde her hangi bir derişim gözlememişlerdir. Bunun dışında,  $Ca^{+2}$ 'un bu işlemde önemli bir rol oynayabileceğini rapor etmişlerdir. Isı şoku sırasında trehalaz etkinliği için gereken  $Ca^{+2}$  iyonunu çekim önemli ölçüde azalmaktadır. Büyük olasılıkla bu nedenle trehalaz etkinliği yüksek sıcaklıklarda düşmektedir. Neves ve François'nun (1992) sonuçları kısmen Londesborough ve Vuorio'nun (1993) gözlemleri tarafından onaylanmıştır. Bu araştırmacılar, ısı şokuna bağılı trehaloz birikiminin olduğu sıcaklık aralığında trehaloz-6-fosfat etkinliğinin yüksek sıcaklık katsayısı olduğunu rapor etmişlerdir.

Riberio vd (1994), en son olarak, ısı şoku sonucu trehaloz birikiminin, glikoz alım hızındaki artış nedeniyle hücre içi substratlarının kullanıma hazır olmalarından kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak, ısı şoku nedeniyle biriken trehaloz düzeyi biyosentetik ve katabolik enzimler arasındaki dengeye bağımlıdır.

## BÖLÜM II.

### DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 1. Mikroorganizma

Ticari ekmeç mayası (Pak-Maya) kullanılmıştır.

#### 2. Besi Ortamı Bileşimi

##### 2.1. Kesiksiz Fermentör Besi Ortamı

Besi ortamı olarak yarı-yapay ortam kullanılmıştır. Bu ortam 3-5 g/L sukroz, 2 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.5 g/L  $KH_2PO_4$ , 2 g/L maya özütü (Difco), 0.25 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.25 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 'dan oluşmuştur.

##### 2.2. Beslemeli Fermentör Besi Ortamı

Beslemeli fermentör stres deneylerinden önce maya hücreleri kesiksiz fermentörde durağan-duruma gelinceye kadar üretilmişlerdir. Durağan-durum, biyokütlenin sabit derişime gelmesi olarak tanımlanmıştır.

Kesiksiz fermentör büyüme ortamı 5 g/L sukroz, 1.2 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.3 g/L  $KH_2PO_4$ , 1 g/L maya özütü, 0.25 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ve 0.25 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 'dan oluşmuştur.

Beslemeli fermentör stres deneylerinde ise yapay ortam kullanılmıştır. Bu ortam 190 g/L sukroz, 23 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 11.5 g/L  $KH_2PO_4$ , 11.5 g/L KCL, 5.75 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 5.4 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.2 g/L  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.1 g/L  $ZnSO_4 \cdot 2H_2O$  ve 40 ml vitamin çözeltilisinden oluşmuştur. Vitamin çözeltilisi ise % 0.05 B6, % 0.001 Biotin, % 0.2 B1 ve % 1 Ca-Pantotenat vitaminlerinden oluşmuştur. Vitamin çözeltilisi, 0.45  $\mu m$ 'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

#### 3. Analitik Yöntemler

##### 3.1. Büyüme Ortamı Analizi

###### 3.1.1. Biyokütle Miktarının Belirlenmesi

Fermentör ortamındaki biyokütle miktarı kurutma yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla, alınan hücre örnekleri önce yıkanmış, daha sonra da 100°C'de kurutularak ağırlıkları belirlenmiştir.

###### 3.1.2. Glikoz Miktarının Belirlenmesi

Ortamdaki glikoz miktarı fenol-sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiştir (Dubois vd., 1956 ve Rao ve Pattabiraman, 1989).

Bu amaçla, santrifüj edilerek hücrelerden arındırılan, fermentasyon ortamı 10-100 µl/ml glikoz içerecek ölçüde seyreltilmiştir.

Tepkime geniş tabanlı şişelerde gerçekleştirilmiştir. 1 ml örnek üzerine 1ml % 5'lik fenol çözeltisi ve çok hızlı bir şekilde 5 ml saf sülfürik asit eklenmiştir. Tepkime zamanı yarım saat olarak belirlenmiştir. Bu sürenin sonunda açığa çıkan renk koyuluğu 488 nm'de spektrofotometrede okunmuştur.

### **3.1.3. Fosfat Miktarının Belirlenmesi**

Ortamdaki fosfat miktarı asit-özütleme yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla hücre içermeyen fermentasyon ortamından 0.3 ml örnekler alınmıştır. Bu örneğin üzerine 0.3 ml 5N'lik sülfürik asit ve 0.3 ml % 6'lik amonyum-molibdat çözeltisi eklenerek karışım 5 ml'ye su ile tamamlanmıştır. Bunun üzerine yine 0.3 ml redoks çözeltisi (% 0.2 foto-reks, % 1 sodyum-sülfid ve % 30 sodyum-piro-sülfid) eklenerek toplam 10 ml olacak kadar saf su eklenmiştir. Bu ortam tepkimenin olabilmesi için bir saatlik süre gerekmektedir. Bu sürenin sonunda örnekler 700 nm'de spektrofotometrede okunmuştur.

### **3.1.4. Amonyak Miktarının Belirlenmesi**

Fermentasyon ortamındaki amonyak miktarı amonyak elektrodu ile belirlenmiştir.

## **3.2. Hücre Bileşim Analizi**

### **3.2.1. Trehaloz Miktarının Belirlenmesi**

Hücredeki trehaloz miktarı trikloro asetik asit özütleme yöntemiyle belirlenmiştir.

Maya örnekleri doğrudan buzlu suyun üzerine alınarak, soğukta santrifüjlenmiştir. Elde edilen yıkanmış maya topakçıklarına 3 ml 0.5 M'lık  $CCl_3COOH$  eklenmiştir. Bu özütleme ortamı 4°C, arasıra karıştırılarak, bir saat bekletilmiştir. Daha sonra karışımdan santrifüjlamayla elde edilen serum kısmında trehaloz miktarı antron yöntemiyle belirlenmiştir.

Bu amaçla 1 ml seyreltilmiş serum deney tüpleri içerisinde soğutulduktan sonra, üzerine yine soğutulmuş 5 ml antron çözeltisi (100 ml % 75'lik  $H_2SO_4$  içerisine 200 mg antron ve 5 ml etanol eklenmiştir) hızlı bir şekilde eklenmiştir. Daha sonra bu ortam su banyosunda 100°C'de 10 dakika tutularak tepkimenin oluşması sağlanmıştır. Su banyosundan çıkarılan tüpler hemen buzlu suya konmuştur. Daha sonra örnekler 625 nm'de spektrofotometrede okunmuştur (Steward, 1975 ve Lillie ve Pringle, 1980).

### **3.2.2. Glikojen Miktarının Belirlenmesi**

Hücredeki glikojen miktarı dönüşümlü baz ve asit özütleme yöntemiyle belirlenmiştir (Steward, 1975).

Bu amaçla alınan örnekler santrifüjlenerek serum kısmı atılmıştır.

### 3.2.2.1. Mannan ve Bazda Çözünen Glikojen Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen maya topakçığı, üzerine 3 ml 0.25 M'lık  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi eklenerek, kaynar su banyosunda 45 dakika tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan örnekler soğutularak, santrifüjle serum kısımları alınmıştır. Serumun bir kısmı mannan miktarını belirlemek üzere ayrılmıştır. Kalan serumda, trehalozda yapıldığı gibi, mannan ve glikojen miktarı antron yöntemiyle belirlenmiştir. Artık topakçık kısmı ise asitte çözünen glikojen miktarını belirlemek üzere saklanmıştır.

### 3.2.2.2. Mannan Miktarının Belirlenmesi

Mannan için ayrılan seruma 2:1 oranında fehling çözeltisi eklenerek, gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra, örnekler santrifüjlenerek kalan topakçıklara 0.5 ml 1 M'lık  $\text{H}_2\text{SO}_4$  çözeltisi eklenmiş ve topakcıkların çözünmesi sağlanmıştır. Örnekler 1 ml'ye tamamlandıktan sonra seyreltilmişler ve antron yöntemiyle miktarları belirlenmiştir. Tüm antron ölçümlerinde satandard olarak glikoz kullanılmıştır.

### 3.2.2.3. Asitte Çözünen Glikojen Miktarının Belirlenmesi

Saklanan maya topakcıklarına 2 ml 0.5 M'lık  $\text{HClO}_4$  eklenmiş ve bu karışım kaynar su banyosunda 30 dakika beletilmiştir. Daha sonra örnekler santrifülenmiş ve seyreltilen serum kısmında asitte çözünen glikojen miktarı yine antron yöntemiyle belirlenmiştir.

### 3.2.4. Protein Miktarının Belirlenmesi

Hücrelerde protein miktarı Lowry yöntemiyle belirlenmiştir (Hartree, 1972).

Fermentasyon ortamı örnekleri santrifüjlanmış ve elde edilen maya topakcıkları su ile yıkanmıştır. Daha sonra bu topakcıklara 1 N'lik  $\text{NaOH}$  çözeltisi eklenmiş ve örnekler su banyosunda  $90^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika tutulmuşlardır. Su banyosundan alınan örnekler seyreltilmiş ve 1 ml'lik örnekler hazırlanmıştır.

Bu örnekler, 0.9 ml A çözeltisi (% 0.2 potasyum-sodyum-karbonat, % 10 sodyum-karbonat) eklenerek  $50^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda 10 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra oda sıcaklığına soğutulan örnekler 0.1 ml B çözeltisi (% 2 potasyum-sodium-tartarat, % 1 bakır-sülfat, % 0.4  $\text{NaOH}$ ) eklenmiştir. Örnekler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. En son olarak 3 ml Folin-Ciocalteu (1:15 seyreltilmiş) eklenen örnekler  $50^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika tutulmuşlardır. Oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler 650 nm'de spektrofotometrede okunmuşlardır. Standard olarak bovin serum albumin kullanılmıştır.

### 3.2.5. RNA Miktarının Belirlenmesi

Hücrenin RNA miktarı orsinol yöntemiyle belirlenmiştir.

Ortamdan alınan hücre örnekleri santrifüjlenmiş ve elde edilen topakcıklar saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra bu topakcıklara 4ml 0.5 M'lık  $\text{HClO}_4$  eklenmiştir. Örnekler  $37^\circ\text{C}$ 'de, sürekli karıştırılarak iki saat bekletilmişlerdir. Örnekler santrifüjlendikten sonra elde edilen serum seyreltilmiştir. Bu serumdan 1 ml'lik örnek alınarak üzerine 3 ml orsinol çözeltisi (1 birim % 1 orsinol ve 4 birim % 0.09 HCl içerisinde çözünmüş  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) eklenmiştir. Kaynar su banyosunda 20 dakikalık tepkime süresinden sonra, örnekler 672 nm'de okunmuşlardır. Standart olarak Adenosin-mono-fosfat (AMP) kullanılmıştır (Steward, 1975).

## 4. Fermentasyon

### 4.1. Fermentörün Tanımlanması

Bu çalışmada Virtis marka, 1.2 L fermentasyon hacmi olan, masa üstü fermentör kullanılmıştır.

Bu fermentörde pH, giriş oksijen ve sıcaklık kontrolü yapılabilmektedir.

### 4.2. Kesiksiz Fermentasyon

Kesiksiz fermentasyon amacıyla, giriş ortamının hızı ayarlanarak, sabit çalışma hacminde, istenilen seyrelme hızı elde edilmiştir.

### 4.3. Kesikli-Beslemeli Fermentasyon

Kesikli-beslemeli fermentasyon ise, giriş ortam hızının olası en az düzeye indirerek (30 ml/sa) ve çıkış hattı kesilerek elde edilmiştir.



## BÖLÜM III.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 1. Kesiksiz Fermentör Deneyleri

Çalışmanın bu bölümünde, kesiksiz fermentasyon ortamında seyrelme hızının ve sabit seyrelme hızında sıcaklığın ekmek mayası hücrelerinin makromoleküler bileşimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Maya hücrelerinin makromoleküler bileşimi RNA, toplam protein, trehaloz, toplam glikojen miktarları ölçülerek belirlenmiştir. Ayrıca, fermentasyon ortamının çıkış sukroz (glikoz eşdeğeri), fosfat ve amonyak miktarları da belirlenmiştir.

##### 1.1. Seyrelme Hızının Etkisi

Seyrelme hızının etkisi, 33 °C sabit sıcaklıkta mayanın makromoleküler yapısı üzerinde incelenmiştir. Seyrelme hızı 0.1 ile 0.4 sa<sup>-1</sup> arasında 0.05 aralıklarla değiştirilmiştir. Diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur.

##### 1.1.1. Çıkış Fermentasyon Ortamı Üzerine Etkisi

Çıkış fermentasyon ortamında kalan glikoz, fosfat ve amonyak miktarları incelendiğinde, ortamın sadece "glikoz sınırlı" olduğu belirlenmiştir. Çıkış glikoz miktarı düşük seyrelme hızlarında 0.2 g/L olup 0.3 sa<sup>-1</sup> seyrelme hızından sonra artmıştır (Şekil 1). Çıkış fosfat ve amonyak miktarlarında seyrelme hızıyla birlikte önemli değişim olmadığı gözlenmiştir (Şekil 2).

Her seyrelme hızında durağan(yatışkın)-durumda kuru hücre miktarı ölçülmüştür. 0.3 sa<sup>-1</sup> seyrelme hızına kadar ortalama 2.7 g/L de sabit kalan kuru biyokütle miktarı, bu seyrelme hızını aştıktan hemen sonra hızlı bir düşüş göstererek 0.8 g/L'ye inmiştir. Hesaplanan fermentasyon verimi (g oluşan hücre/g kullanılan glikoz) aynı doğrultuda sonuç vermiştir. 0.3 sa<sup>-1</sup> seyrelme hızına kadar ortalama 0.45 olan fermentasyon verimi, daha sonra 0.16'ya kadar düşmüştür (Şekil 1).

Düşük seyrelme hızlarındaki bu glikoz değeri hücrelerin tamamen solunum (respiratif) metabolizmasına sahip olduklarını göstermektedir. Metabolizmadaki değişim 0.3 sa<sup>-1</sup> seyrelme hızından sonra olmuştur. Bu dönüm noktasından sonra, çıkış glikoz miktarı artmaya ve azalan biyokütle

miktariyla birlikte fermentasyon verimi de düşmeye başlamış ve dolayısıyla solunum metabolizmasından solunumlu-fermentasyon metabolizmasına (respiro-fermentatif) geçiş olmuştur. Tüm bu sonuçlar literatür değerleri ile uyumludur (Barford ve Hall, 1979 ve 1981; Rieger vd, 1983; Petric vd, 1983; Kaeppli vd, 1985a ve b; Sonnleitner ve Kaeppli, 1986; van Urk vd, 1989).

### 1.1.2. Makromoleküler Bileşim

Hücresinin yapısını oluşturan makromoleküler bileşiklerin derişimleri beklendiği gibi seyrelme hızıyla birlikte değişmiştir.

#### 1.1.2.1. Birikim Karbonhidatları

Hücresinin birikim karbonhidratları olan glikojen ve trehaloz miktarları, beklenildiği gibi, artan seyrelme hızıyla düşüş göstermiştir.

Hücre içindeki trehaloz miktarı, seyrelme hızı 0.1 sa<sup>-1</sup>'den 0.4 sa<sup>-1</sup>'e değişirken, % 4 den 0.9'a düşmüştür (Şekil 3). Bilindiği gibi hücre içinde trehaloz büyüme hızı yavaşladığı zaman birikmektedir. Bu konuda, kesiksiz fermentörde yapılan en detaylı çalışma Küenzi ve Fiechter (1972) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, glikoz sınırlı ortamda artan seyrelme hızı ile trehaloz miktarı % 5 den 1'e düşmüştür. Pejin ve Razmovski (1993) de yaptıkları çalışmada glikoz-sınırlı kültürde daha yüksek trehaloz miktarları ölçtükleri halde, artan seyrelme hızıyla trehaloz miktarının düştüğünü bulmuşlardır. Sonuç olarak, düşük büyüme hızı her zaman yüksek trehaloz birikimine neden olmaktadır.

Hücresinin ana birikim maddesi olan toplam glikojenin miktarı da % 15 den 10'a düşmüştür (Şekil 3 ve 4). Bu sonuçlar Küenzi ve Fiechter'in (1972) karbon-sınırlı kültürle yaptığı çalışma ile uyum göstermektedir. Onların çalışmasında toplam glikojen miktarı % 18 den 8'e düşmüştür. Ayrıca glikojen miktarı bazık ortamda çözünebilir (sitozolda bulunan) ve çözünemeyen (hücre duvarına bağlanmış) glikojen olarak belirlenmiştir. Buna göre, bazda çözünebilir glikojen miktarında seyrelme hızıyla beraber önemli değişme olmamıştır (Şekil 4). Burada ilginç nokta toplam glikojen miktarının değişen metabolizmayla birlikte aniden düşüş göstermesidir. Sadece solunum metabolizması gösteren hücrelerde yüksek ve sabit miktarda olan toplam glikojen miktarı, metabolizmanın solunumsal-fermentatif olmasıyla birlikte hızlı bir düşüş göstermiştir. Bu dönüm noktasından sonra artan büyüme hızı zaten birikim karbonhidratlarının bozunumunu da beraberinde getirmektedir.

### 1.1.2.2. RNA ve Protein

Seyrelme hızı arttıkça (0.1'den 0.4 sa<sup>-1</sup>'e) hücre içindeki RNA miktarı % 9.3 den 12'ye yükselmiştir (Şekil 3). Parada ve Acevedo (1983) *S. cerevisiae* ile yaptıkları çalışmada nitrojen-sınırlı kültürlerde RNA miktarının % 8 den 14'e yükseldiğini gözlemişlerdir (seyrelme hızı 0.1-0.3 sa<sup>-1</sup> arasında tutulmuştur). Verduyn vd (1990) ise 0.1 sa<sup>-1</sup> seyrelme hızında RNA miktarını % 7 olarak belirlemişlerdir. Bunun dışında Furukawa ve arkadaşları (1983) seyrelme hızı 0.2 den 0.3 sa<sup>-1</sup>'e yükseltildiği zaman RNA miktarının % 6.5 den 8.5'e çıktığını bulgulamışlardır.

Hücre içindeki protein miktarı ise % 42 den 53'e yükselmiştir (Şekil 3). Verduyn ve arkadaşlarının (1990) karbon-sınırlı ortamlarında toplam protein % 47'den 57'ye, Parada ve Acevedo'nun (1983) nitrojen sınırlı ortamlarında da % 32'den 50'ye yükseldiği gözlenmiştir.

### 1.2. Sabit Seyrelme Hızı Deneyleri

Çalışmanın bu bölümünde ise seyrelme hızı 0.05 ve 0.1 sa<sup>-1</sup>'de sabit tutularak sıcaklığın maya hücresi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, maya hücresi içindeki trehaloz ve protein miktarları ile biyokütle, çıkış sukroz (glikoz eşdeğeri olarak) ve çıkış fosfor derişimleri ölçülmüştür.

Isı şoku, fermentasyon ortamının en fazla 3 dakika içerisinde 30 °C'den istenilen sıcaklığa ısıtılması ve deney süresince yüksek sıcaklığın korunmasıyla sağlanmıştır. Bu amaçla, 80 °C'lik su banyosundan fermentörün soğutma borularına sıcak su pompalanmıştır. Isı şoku 300 dakika boyunca uygulanmış ve belirli aralıklarla örnek alınmıştır

#### 1.2.1. Isı Şokunun Etkisi

Hem 0.05 hem de 0.1 sa<sup>-1</sup> seyrelme hızlarında durağan durumdaki maya hücrelerine ısı şoku uygulanmıştır.

Birinci set deneylerde, seyrelme hızı 0.05 sa<sup>-1</sup> olarak seçilmiş ve sukroz giriş miktarı 3 ve 5 g/L olan besi ortamları kullanılmıştır. Isı şok sıcaklığı olarak 40 °C seçilmiştir. Örnekler 2 dakika aralıklarla 60 dakika boyunca alınmıştır. Her iki sukroz derişiminde de çıkış glikoz değeri 0.2 g/L olarak ölçülmüştür. Tüm deney boyunca bu miktarın değişmediği gözlenmiştir (veriler gösterilmemiştir).

İkinci set deneylerde ise seyrelme hızı  $0.1 \text{ sa}^{-1}$ , giriş sukroz derişimi ise  $5 \text{ g/L}$  olarak seçilmiştir. Isı şoku ise ortam sıcaklığının  $36, 38$  ve  $40 \text{ C}^\circ$ 'ye yükseltilmesi ile uygulanmıştır. Bu deneylerde, başlangıçta  $4$  dakika aralıklarla alınan örnekler  $40$ . dakikadan sonra  $15$  dakika ve  $120$ . dakikadan sonra ise  $30$  dakika aralıklarla alınmıştır.

#### 1.2.1.1. Kültür Üzerine Etkisi

İkinci set deneylerde çıkış ortamında biyokütle, glikoz ve fosfat derişimleri ölçülmüştür. Tüm bu deneylerde biyokütle miktarıyla çıkış glikoz ve fosfat derişimlerinin değişmediği gözlenmiştir.

$36 \text{ }^\circ\text{C}$  ısı şokunda  $3.9 \text{ g/L}$  biyokütle,  $0.35 \text{ g/L}$  çıkış fosfat ve  $0.17 \text{ g/L}$  çıkış glikoz derişimi ölçülmüştür (Şekil 5).  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  ısı şokunda ise biyokütle miktarı  $4.3 \text{ g/L}$ , çıkış fosfat derişimi  $0.35 \text{ g/L}$  ve çıkış glikoz derişimi  $0.17 \text{ g/L}$  olarak ölçülmüştür (Şekil 6). Son olarak,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  ısı şoku incelendiğinde değişiklikler gözlenmiştir. Başlangıçta sabit kalan biyokütle miktarı daha sonra düşüş göstermiştir. Bu kadar yüksek sıcaklıkta ortamın biyokütle miktarını koruyamaması olağan bir durumdur. Çıkış fosfat ve glikoz derişimlerinde ise önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 7).

Her üç sıcaklıkta da çıkış glikoz miktarının çok düşük olması hücrelerin tamamen solunum (respiratif) metabolizmasına sahip olduklarını göstermektedir.

#### 1.2.1.2. Trehaloz Üzerine Etkisi

Birinci set deneylerde, sabit seyrelme hızında giriş sukroz derişimi  $3 \text{ g/L}$ ' den  $5$ 'e yükseltildiğinde trehaloz miktarında artış gözlenmiştir (Şekil 8). Sıcaklık artırıldığı zaman hücre içerisine şeker alımı da artmaktadır. Artan hücre içi glikozun, düşük büyüme hızında glikolitik izyolda kullanımı yavaşlayacağına göre, birikim karbonhidratlarının sentezinde kullanılması olağandır. Sabit seyrelme hızında artan şeker derişimiyle biriken trehaloz miktarının artması da bunu göstermektedir. Yine aynı şekilde, ölçülmemiş olmakla birlikte, glikojen miktarının da arttığı öne sürülebilir.

Seyrelme hızı  $0.05$  den  $0.1 \text{ sa}^{-1}$  e yükseltildiğinde -aynı giriş sukroz derişimi kullanılmak koşuluyla- hücre içerisinde biriken trehaloz miktarının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 8 ve 9). Bu da beklenen bir durumdur. Büyüme hızı yavaşladığı zaman trehaloz birikimi artar.

Her iki seyrelme hızı için 40 °C ısı şoku verileri karşılaştırıldığı zaman ilk 60 dakika boyunca düşük seyrelme hızında trehaloz değerinin % 9.6'ya değerinde ise % 7'ye ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 8 ve 9).

İkinci set deneylerde, ısı şoku uygulaması ile birlikte hücre içinde trehaloz miktarı da artmıştır. 36 °C ısı şokunda başlangıç trehaloz miktarı % 4.8 gibi yüksek bir değerde olmasına karşın birikim diğer sıcaklıklara oranla daha yavaş olmuş, ilk 60 dakika sonunda % 7.8 ve 120. dakikanın sonunda en yüksek değerine, % 9.5'e ulaşmış ve bu değerinde sabit kalmıştır. Protein değerinde dalgalanmalar olmakla birlikte ortalama % 35 düzeyinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 10). 38 °C de ısı şoku uygulandığı zaman ise hücrenin yüksek miktarda trehaloz bağladığı görülmüştür. Başlangıçta % 3.3 olan trehaloz miktarı ilk 60 dakika sonunda % 7.8, 300. dakikada ise % 10.5 değerine ulaşmıştır. Bu deney setinde en yüksek trehaloz miktarına ulaşamadığı gözlenmiştir. Hücrenin başlangıçta % 35 olan protein miktarı ise deney boyunca % 30'a kadar düşmüştür (Şekil 11). 40 °C ısı şoku sonuçları incelendiği zaman ise önemli değişiklikler gözlenmiştir. Başlangıçta hızla yükselen trehaloz miktarı daha sonra biyokütlenin azalmasıyla birlikte düşmüştür. Bu kadar yüksek sıcaklıkta ortamın biyokütle miktarını koruyamaması olağan bir durumdur. Bu deneyde trehaloz miktarı 240 dakika boyunca % 3.4 den 8.7'ye yükselmiş, daha sonra % 4'e kadar düşmüştür. Bu sıcaklıkta, ölçülmemiş olmakla birlikte, yaşayan hücre sayısında düşüş olduğu ve ölü hücrelerde bağlanmış olan trehalozun hücre duvarı kırılması sonucu ortama salgılandığı öne sürülebilir. Protein miktarı ise deney boyunca % 35'de sabit kalmakla beraber sonlara doğru % 42'ye yükselmiştir (Şekil 9).

Aynı seyrelme hızlarında sıcaklığın etkisi göreceli olarak incelendiğinde, sıcaklık arttıkça başlangıç trehaloz birikim hızının da arttığı gözlenmiştir (Şekil 12). Sıcaklıkla trehaloz birikim ilişkisi bir çok grup tarafından incelenmiş olmakla beraber en uygun açıklama Neves ve François (1992) tarafından getirilmiştir. Buna göre, trehaloz-6-fosfat sentaz en yüksek etkinliğe 40-45 °C'de, trehaloz-6-fosfat fosfataz ise 40 °C'de ulaşmaktadır. Daha sonra Londesborough ve Vuorio'nun (1993) yaptıkları çalışma trehaloz sentaz enziminin sıcaklığa bağlı olduğunu sonucunu getirmiştir. Bu sonuçlar sıcaklık arttıkça başlangıç trehaloz birikim hızının da artmasını açıklar nitelikte görünmektedir.

## 2. Kesikli-Beslemeli Fermentör Deneyleri

Bu çalışmada hücreler kesiksiz fermentörde  $0.1 \text{ sa}^{-1}$  seyrelme hızında üretilmiş ve durağan (yatışkın)-duruma gelmeleri beklenmiştir. Daha sonra uygulanacak stres ile birlikte aynı anda kesiksiz fermentasyondan kesikli-beslemeli fermentasyona geçirilmişlerdir.

### 2.2. Besin Kıtlığının Etkisi

Trehaloz birikimi, değişik türdeki besin kıtlıklarına genel bir tepkidir. Kıtlığı çekilen besin ortama eklendiği zaman ise var olan trehaloz çok çabuk bozunmaktadır.

Bu çalışmada, önceden kesiksiz fermentörde üretilmiş hücreler kesikli-beslemeli kültüre dönüşümle birlikte nitrogen, fosfor ve her ikisi birden olmak üzere çeşitli kıtlıklarla karşı karşıya getirilmişlerdir.

#### 2.2.1. Nitrojen Kıtlığının Etkisi

##### 2.2.1.1. Kültür Ortamı Üzerindeki Etkisi

Hücrelerin kesiksiz kültürden kesikli-beslemeli kültüre geçirildikleri noktada biyokütle miktarı  $3.5 \text{ g/L}$  olarak ölçülmüştür (Şekil 13). 240 dakikalık nitrojen kıtlığı uygulamasından sonra biyokütle miktarı  $5.4 \text{ g/L}$  ye ulaşmış ve bu düzeyde kalmıştır. Fermentatif-Büyüme-Ortamı-Uyarılmış-İzyolu (FBOUI) nitrojen ortamdan tamamen tükendikten sonra çalışamaz duruma gelmektedir. FBOUI, başlama noktasını aşmayı sağladığı için, hücre çoğalması açısından önemli bir izyoldur (Thevelein, 1994).

Ortamdaki nitrojen miktarı 60 dakikalık kıtlık sonunda tamamen tükenmiştir. Bu noktadan sonra, hücreler büyük bir olasılıkla kendi iç nitrojen birikimlerini, daha yavaş düzeyde olmakla birlikte, büyümeyi sağlamak amacıyla kullanmışlardır (Şekil 17).

Ortamın fosfat miktarı deney süresince  $0.2$ 'den  $1.2 \text{ g/L}$ 'ye sürekli olarak yükselmiştir (Şekil 19).

Ortamın glikoz miktarı da deney süresince artış göstermiştir. Glikoz birikiminin, nitrojenin ortamdan tamamen tükenmesinden sonra arttığı gözlenmiştir (Şekil 15). Literatürden bilindiği gibi nitrojen kıtlığına uğrayan hücrelerin glikoz alımı büyük ölçüde düşmektedir (Lagunas vd, 1982). Bu

belki de ortamın glikoz birikiminin artışına bir nedendir. Ayrıca, aynı zamanda büyüme hızı da düşmektedir.

Glikoz miktarının ortamda yükselmesiyle birlikte hücreler sadece solunumlu metabolizmadan solunumlu-fermentatif metabolizmaya geçmektedirler. Bu noktada, etanol üretimi başlamaktadır. Bu durumda, atık glikoz miktarı nitrojenin tükenmesinden hemen sonra hızla artmaktadır. Büyük olasılıkla, ölçülmemiş olmakla beraber, bu noktada hücrelerin solunumlu-fermentatif metabolizmaya geçişlerini belirleyen etanol üretimi de başlamıştır.

### 2.2.1.2. Makromoleküler Bileşime Etkisi

#### 2.2.1.2.1. Birikim Karbonhidratları

Maya hücreleri kesiksiz fermentasyonda üretildiklerinde her seyrelme hızında özgün makromoleküler bileşime sahiptirler. Trehaloz miktarı ele alındığında, seyrelme hızı azaldıkça bu disakkaritin birikimi artmakta olduğu gözlenmektedir.  $0.1 \text{ sa}^{-1}$  seyrelme hızında hücrelerde % 2 trehaloz miktarı bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 21). Bu kültür kesiksizden kesikli-beslemeli fermentasyona dönüştürüldüğünde, hücre içindeki trehaloz, uygulanan stres çeşidinden bağımsız olarak, hemen bozunarak % 0.2 düzeyine düşmüştür. Bu hızlı değişim karbon-sınırlı durumdan karbon-sınırsız duruma dönüşüm nedeniyle büyüme hızının artmasından kaynaklanmıştır. Bu trehalazın besin-uyarılmış etkinleşmesi sonucu olmuştur. Aynı zamanda glikolitik izyol da tam etkin hale gelmiştir. Bu durumda trehalaz enziminin tam etkinleşmesine neden olan FBOUİ kullanılmaktadır. Bu FBOUİ hücre büyümesi ve ayrıca trehalazın etkinleşmesi için sadece temel, cAMP düzeyine bağımlıdır (Thevelein, 1994). Aynı zamanda, trehaloz birikimine neden olan enzimlerin etkinlikleri cAMP kontrolünde en düşük düzeyde tutulmaktadır (François vd, 1991).

Nitrojen-kıt kesikli-beslemeli kültürde trehaloz birikimi ancak ortamdaki tüm artık nitrojen tükendikten sonra başlamaktadır. Şekil 21'den görüldüğü gibi, 60 dakikalık kıtlıktan sonra ortamdaki artık nitrojen tamamen tükenmiş ve bu noktada trehaloz birikimi başlamıştır. Bu noktadan sonra FBOUİ artık etkinliğini yitirmeye başlamaktadır. Biyokütle verilerinden de görüldüğü gibi, 240 dakikalık nitrojen-kıtlığından sonra hücre büyümesi durmuştur. Hücrelerin bu zamana kadar kendi iç nitrojen birikimlerini büyüme için kullandıkları düşünülebilir. Hücre büyümesi yavaşladığı zaman glikolitik

etkinlik de yavaşlamakta ve böylece fazla glikoz-6-fosfat birikim karbonhidratı için kullanıma hazır hale gelmektedir. Hücre büyümesi durduğunda trehaloz miktarı da en yüksek değerine, % 7, ulaşmış ve bu değerinde sabit kalmıştır.

Trehaloz birikiminde de gözleendiği gibi hücre içi glikojen miktarı da ortamdaki artık nitrojenin tamamen tükenmesinden sonra artmaya başlamıştır. Glikojen miktarı önce % 18'den 14'e düşmüş, 180 dakikalık kıtlıktan sonra da en yüksek değeri olan %23'e çıkarak bu değerinde sabit kalmıştır. Bu sonuç yükselen artık glikoz miktarıyla eş zamanlıdır. Ayrıca bu noktada trehaloz birikimi de yavaşlamaya başlamıştır. Glikojeni sentezleyen ve bozan enzimler de FBOUİ aracılığıyla etkinleştirilmektedirler. Ortamda artık glikoz bulunduğu halde, nitrojen yokluğunda FBOUİ kullanılamamaktadır. Glikojen miktarının sabit kaldığı 180. dakikadan sonra glikojeni sentezleyen ve bozan enzimler arasında bir denge oluştuğu söylenebilir (Şekil 23).

#### **2.2.1.2.2. Protein ve RNA**

Hücelere nitrojen kıtlığı uygulandığı zaman başlangıçta % 31 olan toplam protein miktarı deney boyunca dalgalanmalar göstermiştir (Şekil 25). Besin kıtlığının stres olarak uygulandığı tüm deney sonuçları incelendiğinde başlangıç protein miktarında önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Bilindiği gibi aynı koşullar altında bile olsa kesiksiz kültürlerde makromoleküler bileşim açısından durağan-duruma (steady-state) gelmek olası değildir.

Aynı deney koşullarında RNA miktarı ise ilk 60 dakikada % 10'dan 12'ye yükselmiş, daha sonra deney boyunca düşüş göstererek ilk değerine tekrar ulaşmıştır (Şekil 27).

#### **2.2.2. Fosfat Kıtlığının Etkisi**

##### **2.2.2.1. Kültür Ortamı Üzerine Etkisi**

Fosfat-kıtlığı deneyinin başlangıcında biyokütle miktarı 3.25 g/L olarak ölçülmüştür (Şekil 13). Başlangıç uyum döneminden sonra biyokütle miktarı 360 dakikalık deney boyunca 7 g/L'ye kadar yükselmiştir. Literatürde de çokça belgelendiği gibi, maya hücreleri fosfat-sınırlı olmayan koşullarda üretildikleri zaman çok miktarda fosfat biriktirmektedirler. Hücrelerin fosfat-kıt ortamda normal olarak büyümelerini sağlayan etkenin mayaların bu özelliği olmalıdır.



Ortamın artık fosfat miktarı 120 dakikalık kıtlık sonunda tükenmiştir (Şekil 19). Bu noktadan sonra hücreler kendi fosfor birikimlerini kullanmaya başlamışlardır.

Artık glikoz miktarı hücrelerin uyum dönemiyle eş zamanlı yükselmeye başlamış daha sonra da ilk değeri olan 0.2 g/L'ye düşmüştür (Şekil 15). Bu fosfor-kıtlığına uğramış hücrelerin tamamen solunum (respiratif) metabolizmasına sahip oldukları söylenebilir.

Ortamın artık nitrojen miktarı deney boyunca az çok sabit kalmıştır (Şekil 17).

## 2.2.2.2. Makromoleküler Bileşim Üzerine Etkisi

### 2.2.2.2.1. Birikim Karbonhidratlarına Etkisi

Fosfor-kıtlığına uğramış hücreler kesiksiz ortamdan kesikli-beslemeli ortama geçtikleri zaman, hücre içindeki tüm trehaloz bozunmaktadır. 60 dakikalık kıtlık döneminin sonunda hücre içindeki trehaloz miktarı % 3'den 0.2'ye düşmüştür. Bu düşük trehaloz düzeyi deney boyunca korunmuş ve en fazla % 1 olarak ölçülmüştür (Şekil 21). Bu deneyde, biyokütle miktarından da anlaşıldığı gibi (Şekil 13), hücre çoğalması devam etmiştir. Bilindiği gibi, trehaloz birikimi için büyüme hızının yavaşlaması gerekmektedir. Bu yavaşlama da FBOU'nun kullanılamamasının bir sonucudur. Bu deneyde ise, hücrenin büyük fosfor birikimi nedeniyle FBOU'nin tam olarak etkin olduğu öne sürülebilir. Etkin FBOU'u trehalozun etkin hale gelmesine neden olur. Böylece, hücre içinde trehaloz miktarı, stres uygulanmasına karşın, en düşük düzeyinde kalmıştır.

Fosfor-kıtlığının trehaloz üzerindeki etkisini inceleyebilmek için fosfor-sınırlı bir ortamda hücrelerin üretilmiş olması gerekmektedir. Bu tür bir kültürde içsel fosfor birikimi en düşük düzeyde olacaktır. Bu tür kültürler fosfor-kıtlığına uğradıkları zaman, trehaloz üzerine etki daha fazla olacaktır.

Glikojen birikim sonuçları da, stressiz ortam sonuçlarına benzemektedir. Başlangıç glikojen miktarı %17'den 8'e düşmüş, deney sonunda da % 10'a yükselmiştir (Şekil 23). Bu sonuç, fosfor-kıtlığının glikojen birikimi üzerinde hiç bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Yine, trehalozda olduğu gibi, glikojen birikiminin önkoşulu büyümenin yavaşlamasıdır. Hücre büyümesinin yavaşlamadığı biyokütle sonuçlarından da anlaşılmaktadır (Şekil 13). Büyük bir olasılıkla hücreler kendi iç fosfor birikimlerini kullanmışlardır.

Bu da FBOU'nin etkin halde çalışmasına ve dolayısıyla glikojen fosforilaz (a formunda) etkinliğine neden olmaktadır.

#### 2.2.2.2.2. Protein ve RNA

Kültüre fosfor kıtlığı uygulandığı zaman başlangıçta % 32 olan toplam protein miktarı ilk 60 dakikada % 29'a kadar düşerek bu düzeyi deney boyunca korumuştur (Şekil 25).

Aynı deneyde başlangıçta % 10 olan RNA miktarı 120 dakika boyunca artarak % 14'e ulaşmış, daha sonra ise deney boyunca azalarak ilk değerine dönmüştür (Şekil 27).

#### 2.2.3. Nitrojen ve Fosfor Kıtlığının Bileşik Etkisi

Nitrojen ve fosfor kıtlığının bileşik etkisi de çalışılmıştır. Bu amaçla kesikli-beslemeli fermentasyona dönüşüm sırasında giriş ortamı hem nitrojen hem de fosfor içermeyen bir ortamla değiştirilmiştir.

##### 2.2.3.1. Kültür Ortamı Üzerine Etkisi

Deney başlangıcında biyokütle miktarı 3.5 g/L olarak ölçülmüştür. Deney boyunca biyokütle miktarı 6 g/L' ye kadar yükselmiş ve bu düzeyde sabit kalmıştır. Biyokütle miktarındaki artış sadece nitrojen-kıtlığı olduğu zamankinden daha fazla olmuştur (Şekil 13).

Artık nitrojen ancak 120 dakikalık kıtlık uygulamasından sonra tamamen tükenmiştir (Şekil 17). Diğer yandan, artık fosfor ise 180 dakikalık kıtlıktan sonra tükenmiştir. Artık glikoz miktarı ise 90 dakika boyunca yükselmiş, daha sonraki 60 dakika boyunca düşmüş ve en son deney sonuna kadar artmaya devam etmiştir. Başlangıç glikoz yükselmesi artık nitrojenin azalmasıyla eşzamanlı olmuştur. İkinci glikoz yükselme dönemi ise fosfor tükenmesi ile eşzamanlıdır (Şekil 15). Artık glikoz miktarı hemen yükseldiği için kültürün solunumlu-fermentatif (respiro-fermentatif) metabolizma gösterdiği öne sürülebilir.

## 2.2.3.2. Makromoleküler Bileşim Üzerine Etkisi

### 2.2.3.2.1. Birikim Karbonhidratları

Trehaloz miktarı diğer deneylerde olduğu gibi başlangıçta, daha yavaş bir hızla olmakla beraber, düşüş göstermiştir. 90 dakikalık bir kıtlık döneminden sonra ise trehaloz miktarı artmaya başlamış ve en yüksek değerine, % 9, ulaştıktan sonra sabit kalmıştır (Şekil 21). Londesborough ve Vuorio'nun (1993) belirttikleri gibi inorganik fosfat trehaloz-6-fosfat sentaz enzimini olumsuz yönden etkilemektedir. Dolayısıyla, fosfatın ikili kıtlıkta artı etkisi büyük olasılıkla bundan kaynaklanmaktadır.

Hücreler hem nitrojen hem de fosfor kıtlığına uğradıkları zaman glikojen birikimi en yüksek miktarda olmuştur. Glikojen miktarı başlangıçta % 25'ten 16'ya düşmüş, daha sonra da % 38'e kadar yükselmiştir (Şekil 23). Başlangıç glikojen miktarındaki düşüş artık glikoz miktarındaki yükselme ile eş zamanlı olmuştur. Daha sonra glikojen miktarının artmaya başladığı noktada artık glikoz miktarı da düşmeye başlamıştır. Glikojen birikim hızı düştüğü zaman ise artık glikoz miktarında yükselme görülmüştür.

### 2.2.3.2.2. Protein ve RNA

Nitrojen ve fosfor kıtlığı birlikte uygulandığı zaman toplam protein miktarı başlangıçta % 34 olarak ölçülmüştür. Daha sonra bu miktar, sadece nitrojen kıtlığı uygulanan deneyde olduğu gibi, yükselmeye başlamış fosfor kıtlığının da etkisiyle tekrar azalmaya başlamıştır. Deney sonunda ise sadece fosfor kıtlığı uygulanan deneyde ulaşılan protein değerine ulaşmıştır (Şekil 25).

Bu ikili kıtlık deneyinde başlangıç RNA miktarı % 9.5 olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar fosfat kıtlığı deneyindeki sonuçlarla paralellik göstermektedir (Şekil 27).

## 2.3. Besin Kıtlığı ve Isı Şokunun Bileşik Etkisi

Bu set deneylerde, daha önceden kesiksiz üretilmiş hücrelere ısı şoku ile birlikte besin kıtlığı uygulanmıştır.

Isı şoku ortam sıcaklığının bir kaç dakikada 30'dan 38 °C'ye yükseltilmesi ile uygulanmıştır. Aynı zamanda kesikli-beslemeli kültüre geçişle birlikte besin kıtlığı da uygulanmıştır.

### 2.3.1. Isı Şokunun Etkisi

Bu deneyde sadece ısı şoku uygulanmıştır.

#### 2.3.1.1. Kültür Üzerine Etkisi

Başlangıçta biyokütle miktarı 4 g/L olarak ölçülmüştür. İlk başlangıç uyum döneminden sonra deney boyunca biyokütle miktarı sürekli artmıştır (Şekil 14). Bu artış hiç stres uygulanmadığı zamanki artıştan daha fazla olmuştur.

Artık nitrojen miktarı sürekli yükselmiştir. Stres uygulanmadığı zaman ise bu yükselme gözlenmemiştir (Şekil 18). Bu durumda sıcaklığın nitrojen alım mekanizmasını etkilediği öne sürülebilir. Artık fosfor miktarı da yükselmiştir (Şekil 20). Öte yandan, artık glikoz miktarı deney boyunca dönüm değerinden daha düşük kalmıştır (Şekil 16).

#### 2.3.1.2. Makromoleküler Bileşim Üzerine Etkisi

##### 2.3.1.2.1. Birikim Karbonhidratları

Isı şoku uygulanmış kesikli-beslemeli kültürde, stresin uygulanmaya başlamasıyla, hücrenin içindeki trehaloz tamamen bozunmuştur. Daha sonra, deney boyunca trehaloz miktarı % 2.5 gibi düşük bir düzeyde korunmuştur (Şekil 22). Deney boyunca biyokütle sürekli artış gösterdiğinden trehalozun düşük düzeyde olması beklenen bir durumdur.

Aynı zamanda glikojen miktarı da deney boyunca % 23'den 12'ye düşmüştür (Şekil 24). Ortam bileşim sonuçlarıyla birlikte hücrelerin kendi iç birikim karbonhidratlarını büyüme için kullandıkları öne sürülebilir.

##### 2.3.1.2.2. Protein ve RNA

Kültüre sadece ısı şoku uygulandığı zaman elde edilen protein değerleri diğer tüm deneylerden daha düşük olmuştur. Başlangıçta % 26.5 olan protein miktarı, deney boyunca dalgalanmalar göstermekle birlikte, bu düzeyini korumuştur (Şekil 26).

Yine, RNA miktarlarının da diğer deneylerdekinden oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Başlangıçta % 5.5 olan RNA miktarı 120 dakika boyunca

artarak % 7'ye yükselmiş, daha sonra azalarak ilk değerine ulaşmıştır (Şekil 28).

### **2.3.2. Nitrojen kıtlığı ve Isı Şokunun İkili Etkisi**

#### **2.3.2.1. Kültür Üzerine Etkisi**

Biyokütle miktarı deneyin başında 4 g/L olarak ölçülmüştür. Daha sonra biyokütle miktarı artmaya başlamış ve 300. dakikada en yüksek miktarına, 6 g/L, ulaşmıştır (Şekil 14).

Artık nitrojen miktarı deneyin 60. dakikasında tamamen tükenmiştir (Şekil 18). Artık fosfor miktarı ise deney boyunca yükselmiştir (Şekil 20). Artık glikoz miktarı da 180 dakika boyunca düşük değerini korumuş, daha sonra ise artmaya başlamıştır (Şekil 16). Bu artış büyüme hızının azalmasıyla eş zamanlıdır. Bu noktadan sonra artık glikoz miktarı dönüm değerini hemen aşarak solunumlu metabolizmadan solunumlu-fermentatif metabolizmaya geçişe neden olmuştur.

#### **2.3.2.2. Makromoleküler Bileşim Üzerine Etkisi**

##### **2.3.2.2.1. Birikim Karbonhidratları**

Isı şoku ile beraber nitrojen kıtlığı da uygulandığı zaman en yüksek trehaloz değerine ulaşılmıştır. Hücredeki başlangıç trehaloz miktarı deneyin hemen başında bozunmuş ancak 60 dakika sonra trehaloz tekrar birikmeye başlamış ve en yüksek değeri olan % 12'ye ulaşmıştır. Bundan sonra da bu değerde sabit kalmıştır (Şekil 22). Sadece nitrojen kıtlığı deneyine ait sonuçlarla karşılaştırıldığında, bu deneyde trehaloz birikimi çok daha fazla olmuştur. İnorganik fosfatın olumsuz etkisi 35 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda önemsizleşmektedir. Bundan başka, trehalaz sintaz enzimi yüksek sıcaklık bağımlılığına sahiptir (Londesborough ve Vuorio, 1993). Tüm bu nedenler çok daha fazla trehaloz birikimine neden olmuş olabilir.

### 2.3.2.2.2. Protein ve RNA

Hücelere ısı şoku ile beraber nitrojen kıtlığı da uygulandığı zaman sadece ısı şoku deneylerinininkine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu deneyde protein miktarında daha fazla dalgalanma gözlenmiştir (Şekil 26).

Öte yandan bu ikili stres deneyinde başlangıç RNA miktarı, % 9, diğer deneylerdeki ölçümlerle aynı çıkmıştır. RNA miktarı 120 dakika boyunca artış göstererek, % 12 değerine ulaşmış, daha sonra da deney boyunca azalarak ilk değerine düşmüştür (Şekil 28).

### 2.3.3. Fosfor Kıtlığı ve Isı Şokunun İkili Etkisi

#### 2.3.3.1. Kültür Üzerine Etkisi

Deneyin başlangıcında biyokütle miktarı 3.7 g/L olarak ölçülmüş ve bu değer deney boyunca 8.5 g/L'ye kadar artmıştır (Şekil 14). Bu sonuç, fosfor kıtlığı uygulandığı halde hücrelerin yüksek miktardaki iç fosfor birikimlerini kullandıklarını göstermektedir.

Ortamdaki artık fosfor 120 dakika içerisinde tamamen tükenmiştir (Şekil 20). Artık nitrojen miktarının değişimi ise sadece fosfor kıtlığı uygulanmış ortam sonuçlarına benzemektedir (Şekil 18). Isı şokunun bu durumda nitrojen alımını etkilemediği halde sadece ısı şokunun uygulandığı durumda nitrojen alımının etkilenmesi oldukça ilginç bir bulgudur. Artık glikoz miktarı deney boyunca dönüm değerinin altında kalmıştır (Şekil 16). Bu da hücrelerin sadece solunum metabolizmasına sahip oluklarını göstermektedir.

#### 2.3.3.2. Makromoleküler Bileşim Üzerine Etkisi

##### 2.3.3.2.1. Birikim Karbonhidratları

360 dakikalık deney boyunca hücreler büyük miktarda trehaloz, % 7, biriktirmişlerdir. Hücelere sadece fosfat kıtlığı uygulandığı zaman trehaloz birikimi olmamıştır. Ancak, trehaloz sentaz enziminin sıcaklığa bağımlılığı çok yüksektir. Bu da her iki deneyde ulaşılan farklı trehaloz değerini açıklar niteliktedir.

### 2.3.3.2.2. Protein ve RNA

Kültüre ısı şokuyla beraber fosfor kıtlığı da uygulandığı zaman başlangıçta çok yüksek olan protein miktarı, % 38, 160 dakikaya kadar sabit kalmış, daha sonra hızlı bir düşüşle deney sonuna kadar % 35 değerini korumuştur (Şekil 26).

Aynı deneyde, başlangıçta % 10 olan RNA miktarı artarak 120. dakikada % 13'e ulaşmış, daha sonra ilk değerine düşmüştür (Şekil 28). İlgili çekiçi olan nokta, ısı şoku ile besin kıtlığı uygulandığı zaman elde edilen RNA eğrilerinin benzer olmalarıdır.

### 2.3.4. Nitrojen ve Fosfor Kıtıkları ile Isı Şokunun Üçlü Etkisi

#### 2.3.4.1. Kültür Üzerine Etkisi

Bu deneyde başlangıç biyokütle miktarı 3.3 g/L olarak ölçülmüştür. Stres uygulamasıyla beraber biyokütle miktarı 180 dakika boyunca 6 g/L'ye kadar artmış ve bu düzeyde sabit kalmıştır (Şekil 14). Hangi stres uygulanırsa uygulansın, ilk 120 dakika boyunca biyokütle miktarındaki artış her durumda aynı olmuştur. Ancak bu noktadan sonra uygulanan stres türüne göre biyokütle artış hızında farklılaşma olmuştur.

Ortamdaki artık nitrojen 120 dakika içerisinde (Şekil 18), artık fosfat ise 180 dakika içerisinde (Şekil 20) tamamen tükenmiştir. Ortamdaki artık glikoz miktarı ise deney sonuna doğru çok az artmıştır (Şekil 16). Bu sonuçlar hücrelere ısı şoku ile beraber nitrojen kıtlığı uygulandığı zaman elde edilen artık glikoz sonuçları ile çelişmektedir. İkinci durumda biyokütle artışının durmasıyla beraber artık glikoz miktarında yükselme gözlenmiştir. Öte yandan, birinci durumda biyokütle artışı yavaşladığı halde glikoz alımı en yüksek düzeyde devam etmiştir.

#### 2.3.4.2. Makromoleküler Bileşim

##### 2.3.4.2.1. Birikim Karbonhidratları

Bu deneyde elde edilen trehaloz birikim sonuçları hücrelere ısı şoku ile birlikte nitrojen kıtlığı uygulandığı zaman elde edilen birikim sonuçlarıyla aynı çıkmıştır (Şekil 22). Bu sonuç, inorganik fosfatın yüksek sıcaklıklarda olumsuz etkisini yitirdiğini doğrular niteliktedir. Böylece, fosfor kıtlığının

yüksek sıcaklıklarda artı etkisinin olmadığı öne sürülebilir. Bu sonuç, sadece besin-kıtlığı sonuçlarıyla da desteklenebilir. Bu durumda, fosfor kıtlığının artı etkisi görülmüştür.

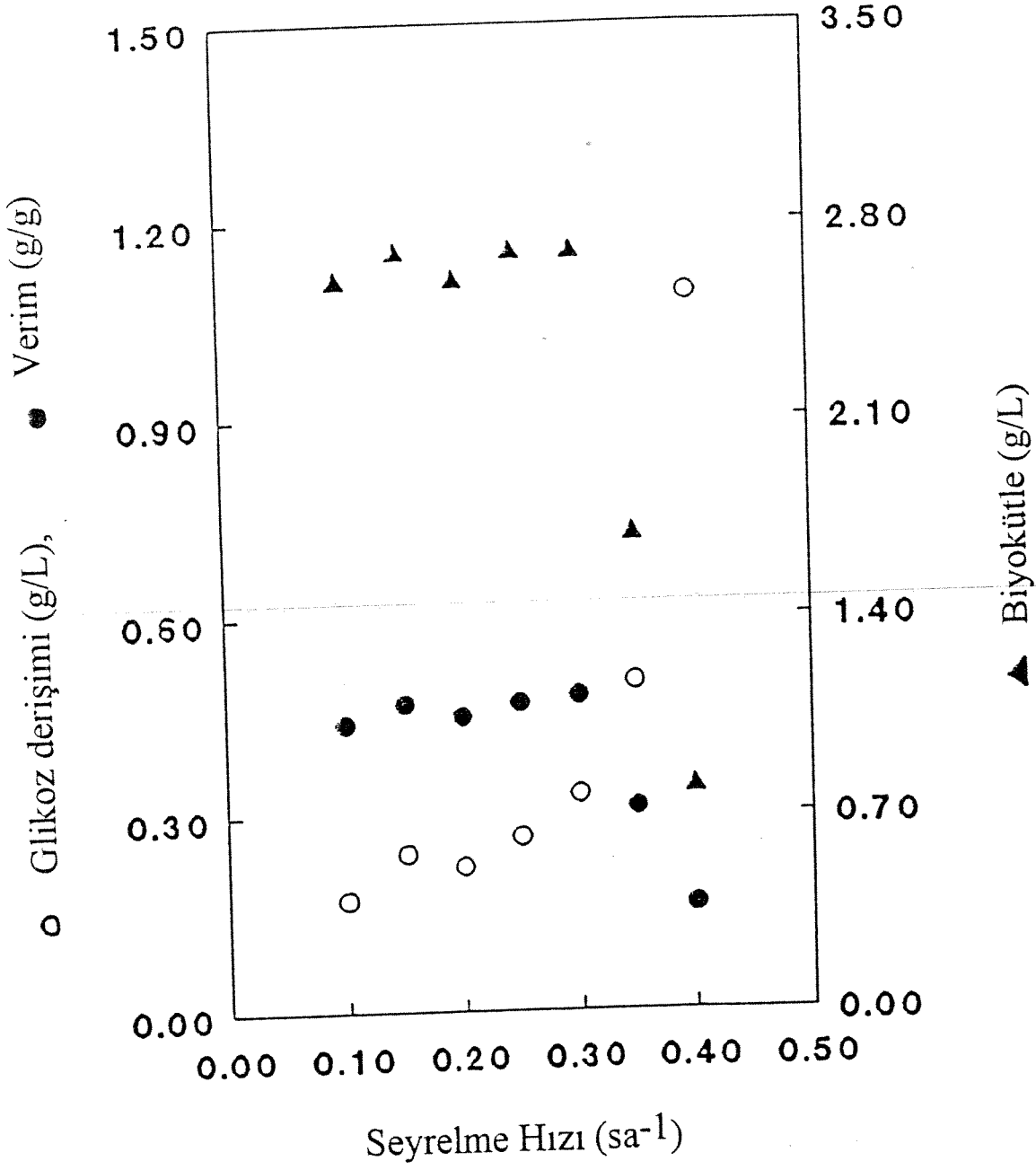
Bu deneyde, glikojen miktarı başlangıçta % 23'den 18'e düşmüş daha sonra 180. dakikada en yüksek değeri olan % 32'ye yükselmiş ve bu değerde sabit kalmıştır. Aynı zamanda çok düşük olan artık glikoz miktarında da yükselme gözlenmiştir (Şekil 24). Bu sonuçlar sadece besin kıtlığı uygulandığı zaman elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, yüksek sıcaklığın glikojen birikimini olumsuz yönde etkilediği görülmektedir.

#### 2.3.4.2.2. Protein ve RNA

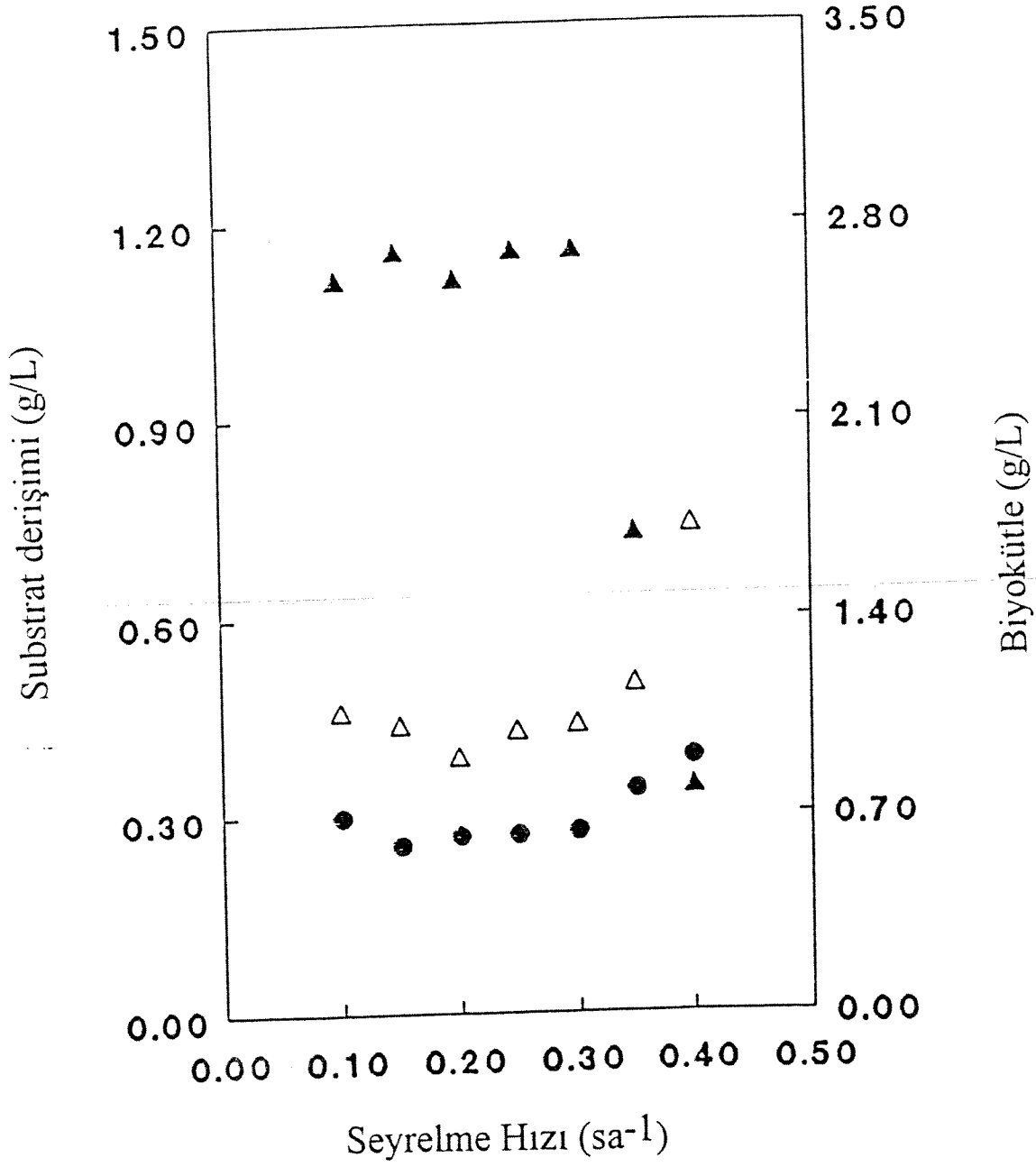
Isı şokuyla beraber ikili besin kıtlığı uygulandığı zaman protein miktarında sürekli bir düşüş gözlenmiştir. Başlangıçta % 40 gibi çok yüksek olan toplam protein miktarı deney boyunca % 29'a kadar düşmüştür (Şekil 26).

Aynı deneyde, diğer deneylerde olduğu gibi, başlangıçta % 8.5 olan RNA miktarı artarak 60. dakikada %12'ye ulaşmış, daha sonra azalarak deney sonunda ilk değerine düşmüştür (Şekil 28).

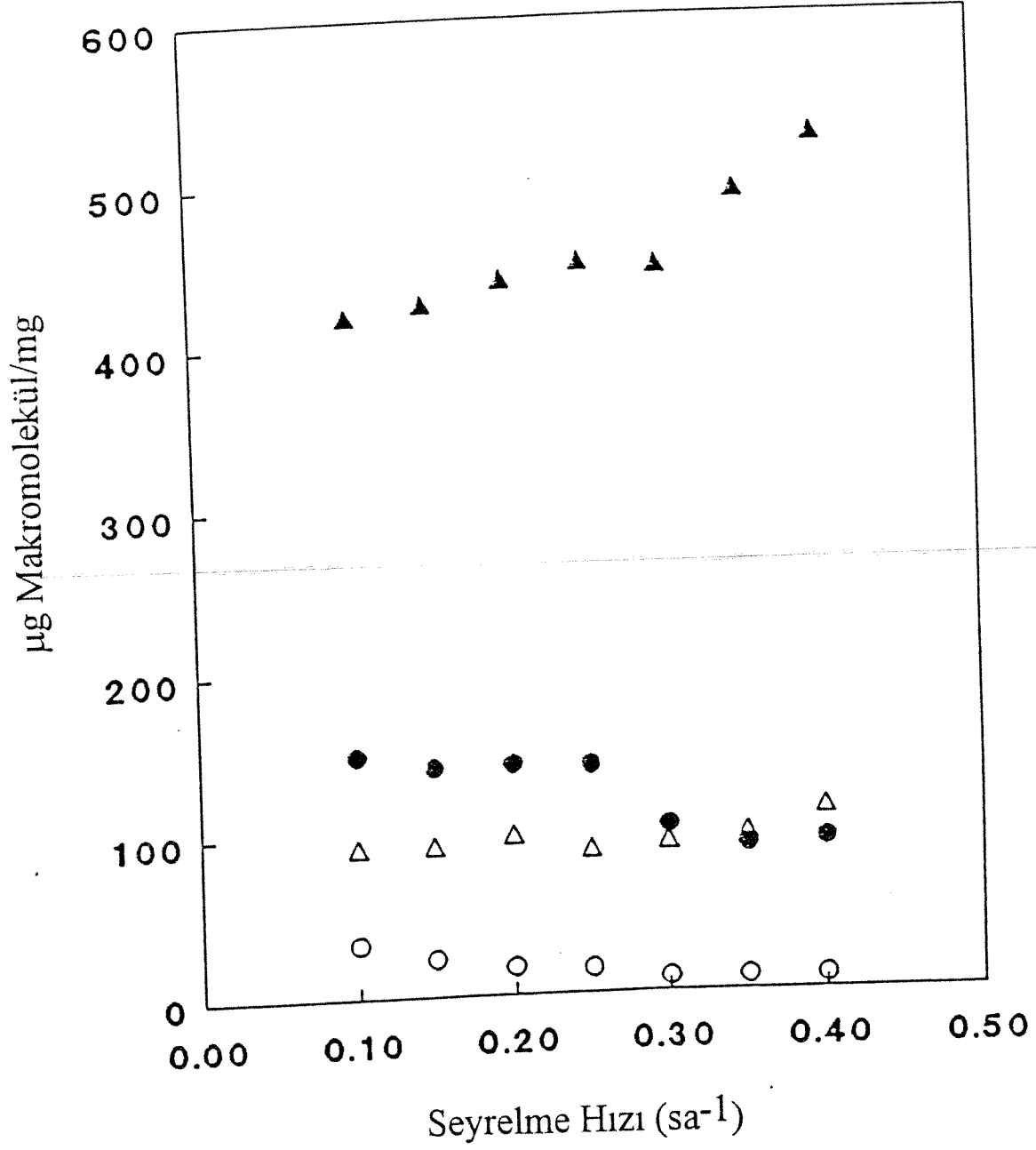




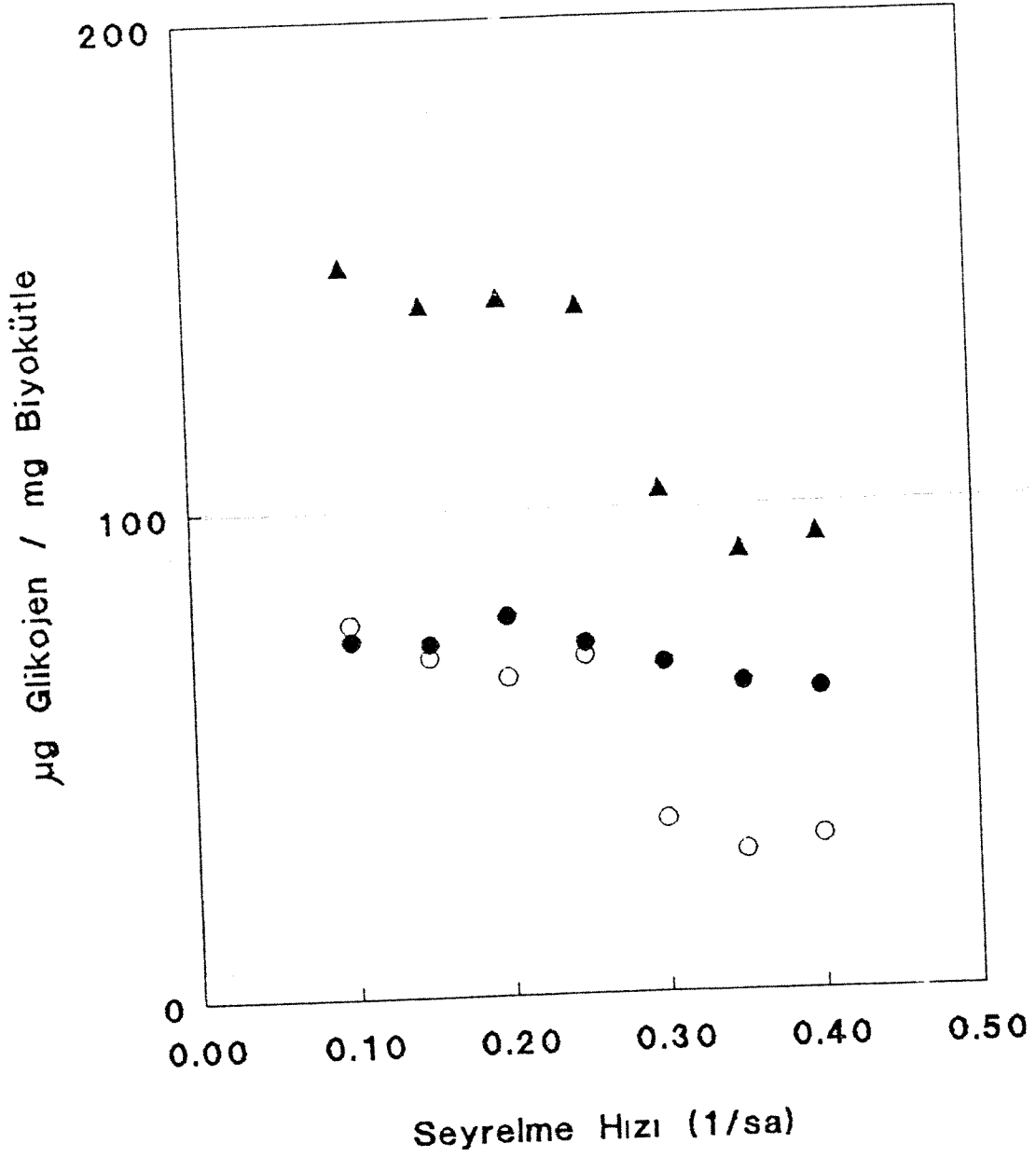
şekil 1. Kesiksiz ekmek mayası kültüründe seyrelme hızına göre (▲) biyokütle, (●) verim ve (○) çıkş glikoz derişimi



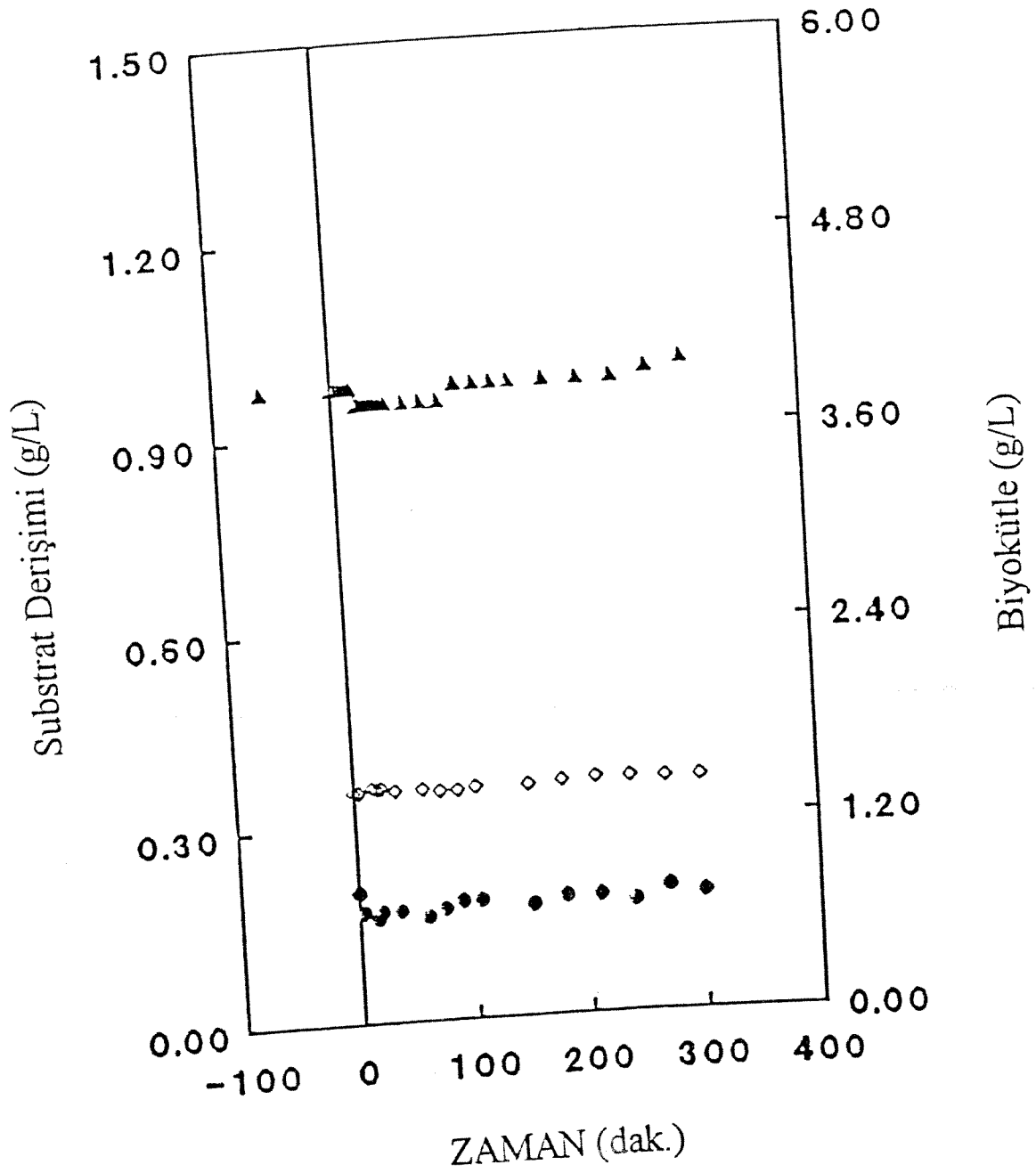
Şekil 2. Kesiksiz ekmek mayası kültüründe seyrelme hızına göre (▲) biyokütle, (Δ) çıkış (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (●) çıkış KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> derişimin değişimi



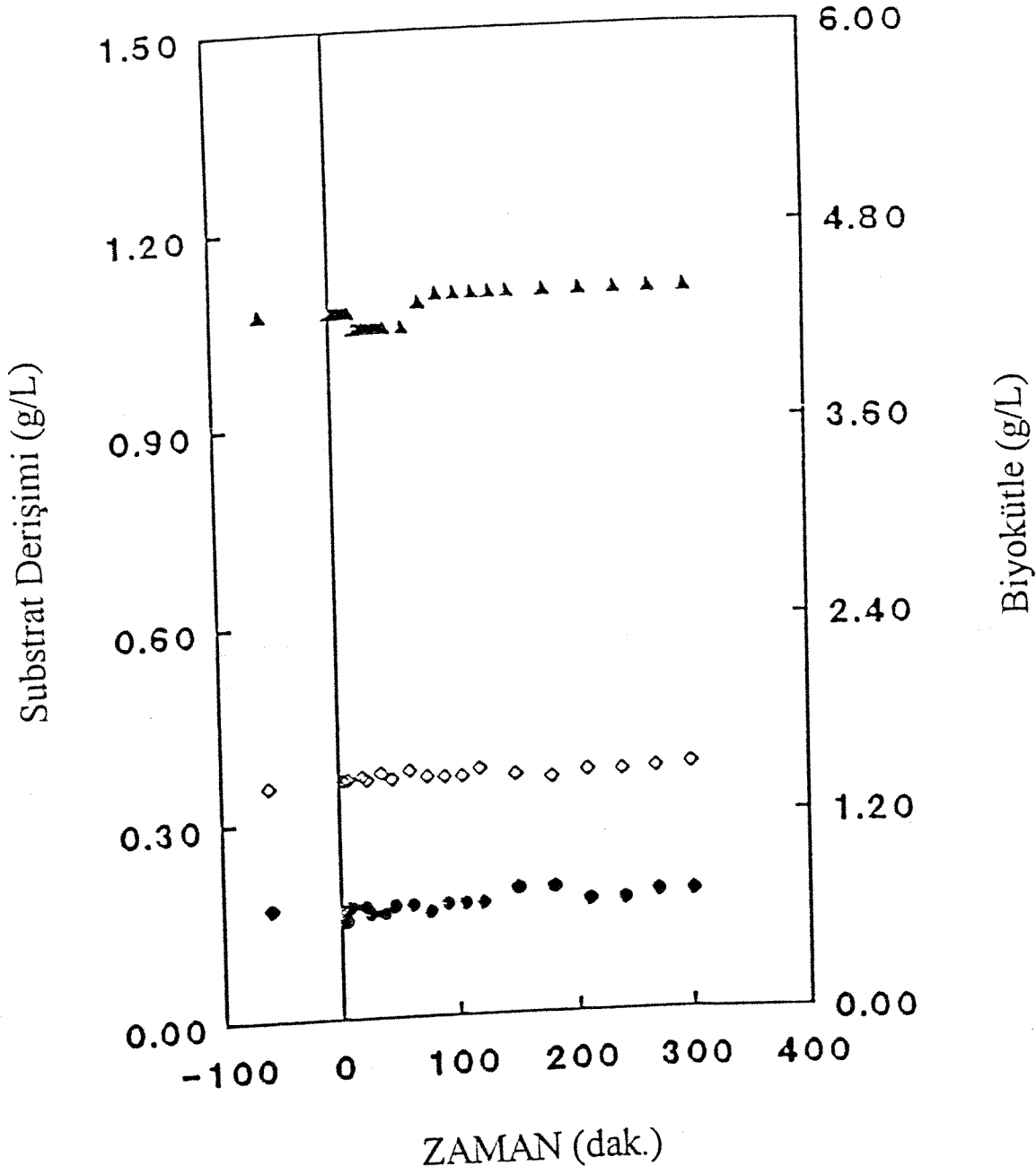
Şekil 3. Seyrelme hızının ekmek mayasının hücre içi (▲) protein, (●) toplam glikojen, (△) RNA ve (○) trehaloz derişimi üzerindeki etkisi



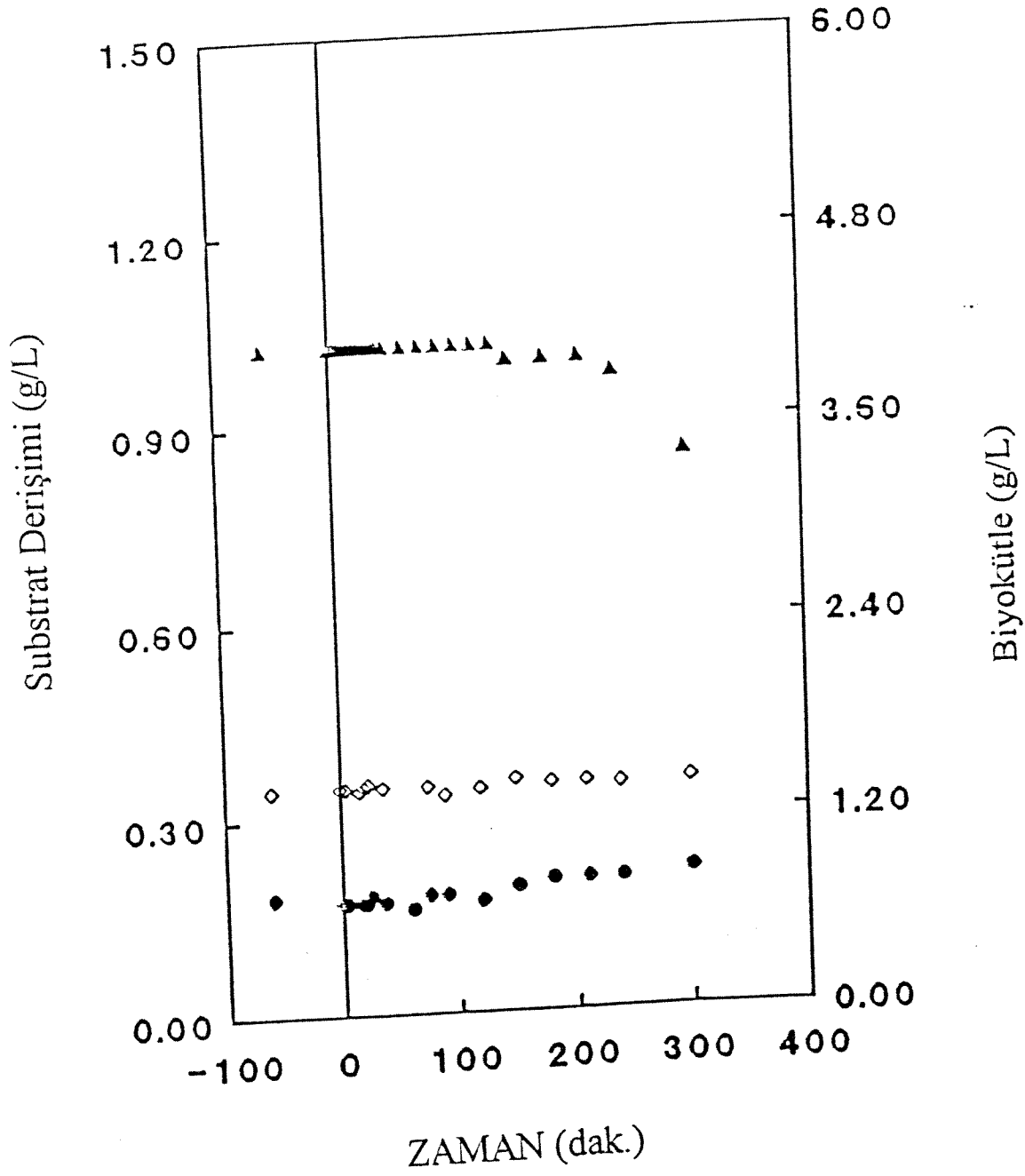
Şekil 4. Seyrelme hızının ekmek mayasının hücre içi, bazda (●) çözünen ve (○) çözünemeyen glikojen ve (▲) toplam glikojen derişimi üzerinde etkisi



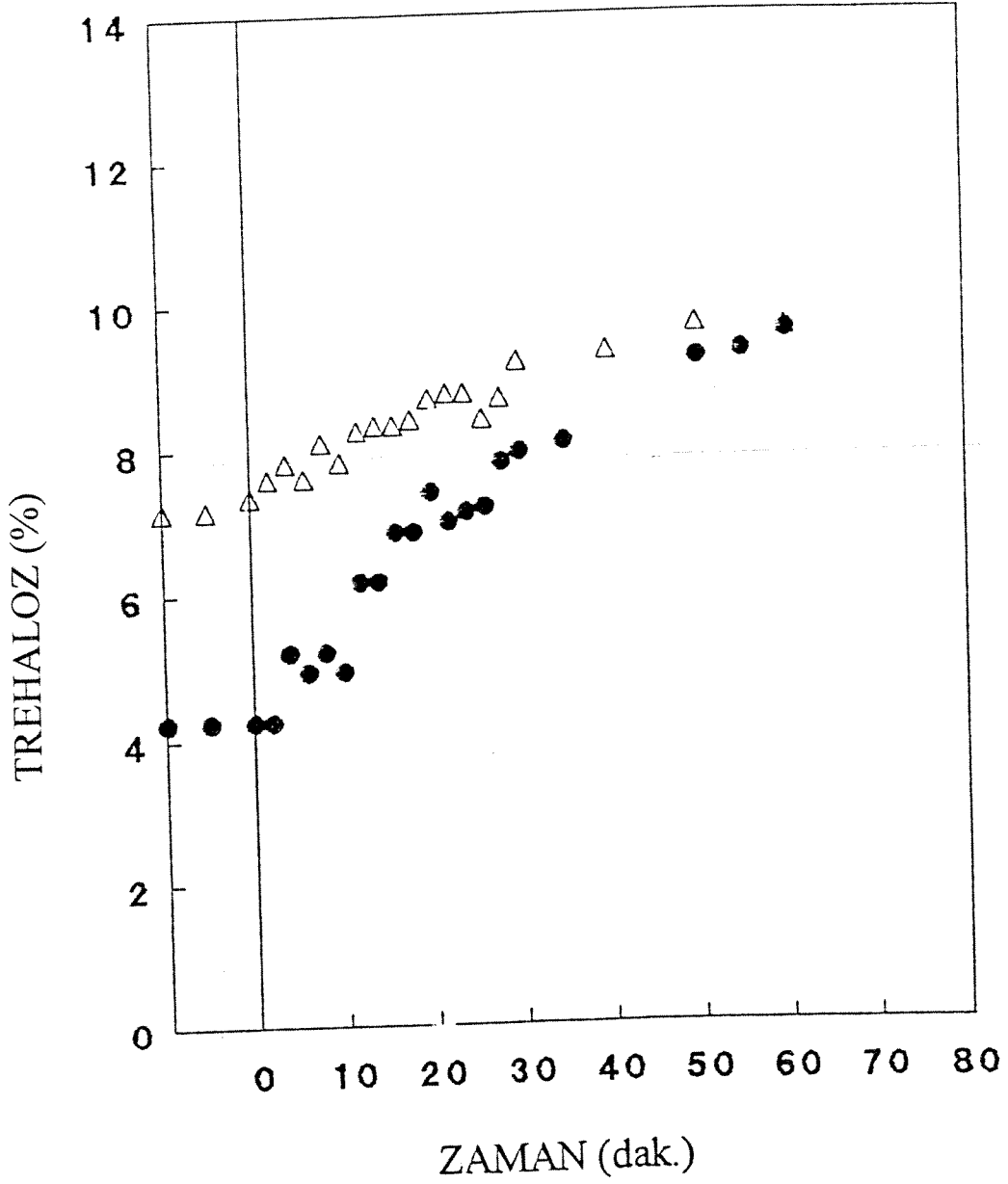
Şekil 5. Kesiksiz ekmek mayası kültüründe 36°C ısı şokunun (▲) biyokütle, (●) çıkış glikoz ve (○) çıkış  $KH_2PO_4$  derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ )



Şekil 6. Kesiksiz ekme mayası kültüründe 38°C ısı şokunun (▲) biyokütle, (●) çıkış glikoz ve (○) çıkış KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ )

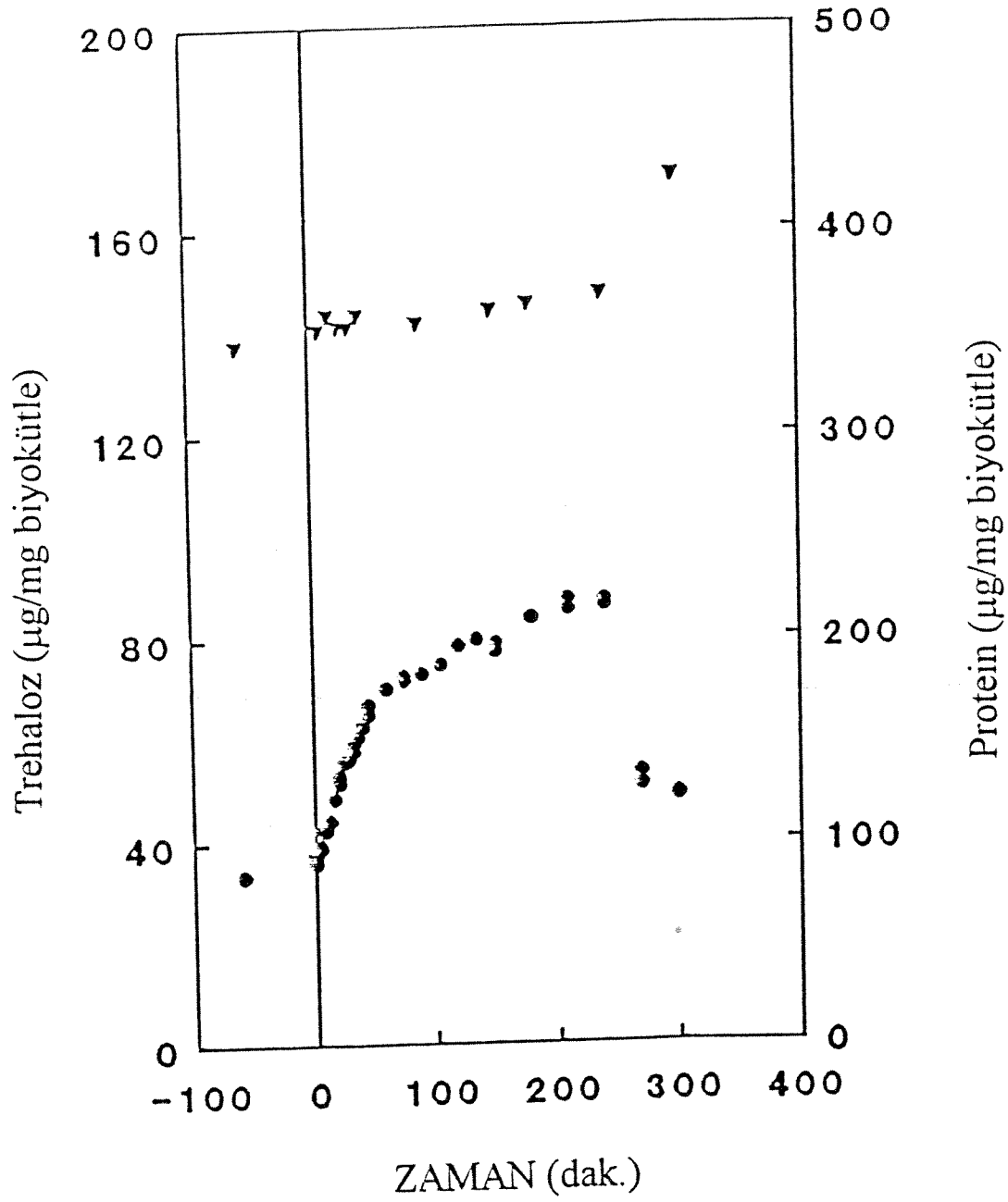


Şekil 7. Kesiksiz ekmek mayası kültüründe 40°C ısı şokunun (▲) biyokütle, (●) çıkış glikoz ve (o) çıkış KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> derişimine etkisi (D=0.1 sa<sup>-1</sup>)

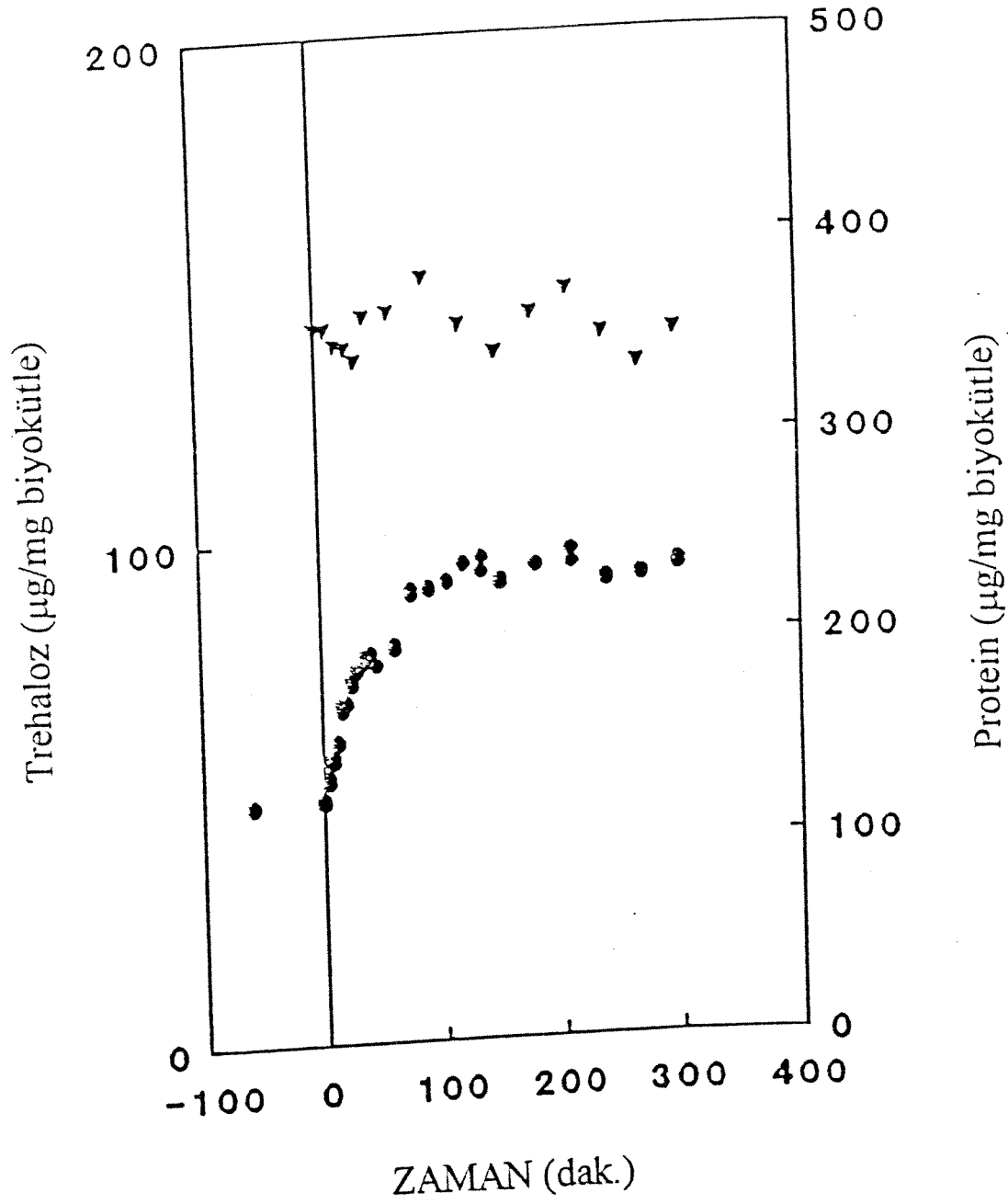


Şekil 8. Kesiksiz ekmek mayası kültüründe 40°C ısı şokunun trehaloz derişimine etkisi ( $D=0.05 \text{ sa}^{-1}$ )  
 Sukroz girişı: (●) 3 g/L, (Δ) 5 g/L

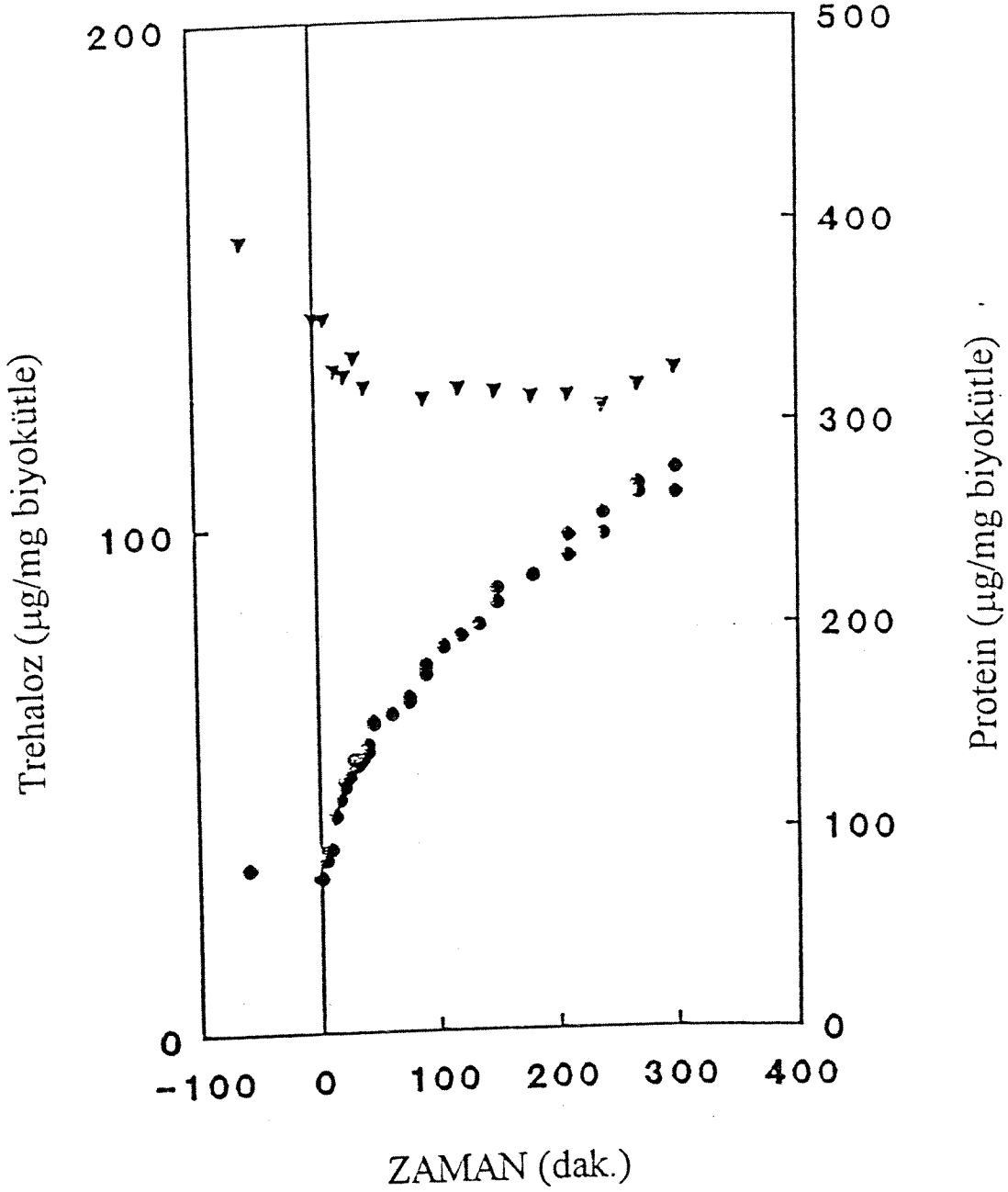




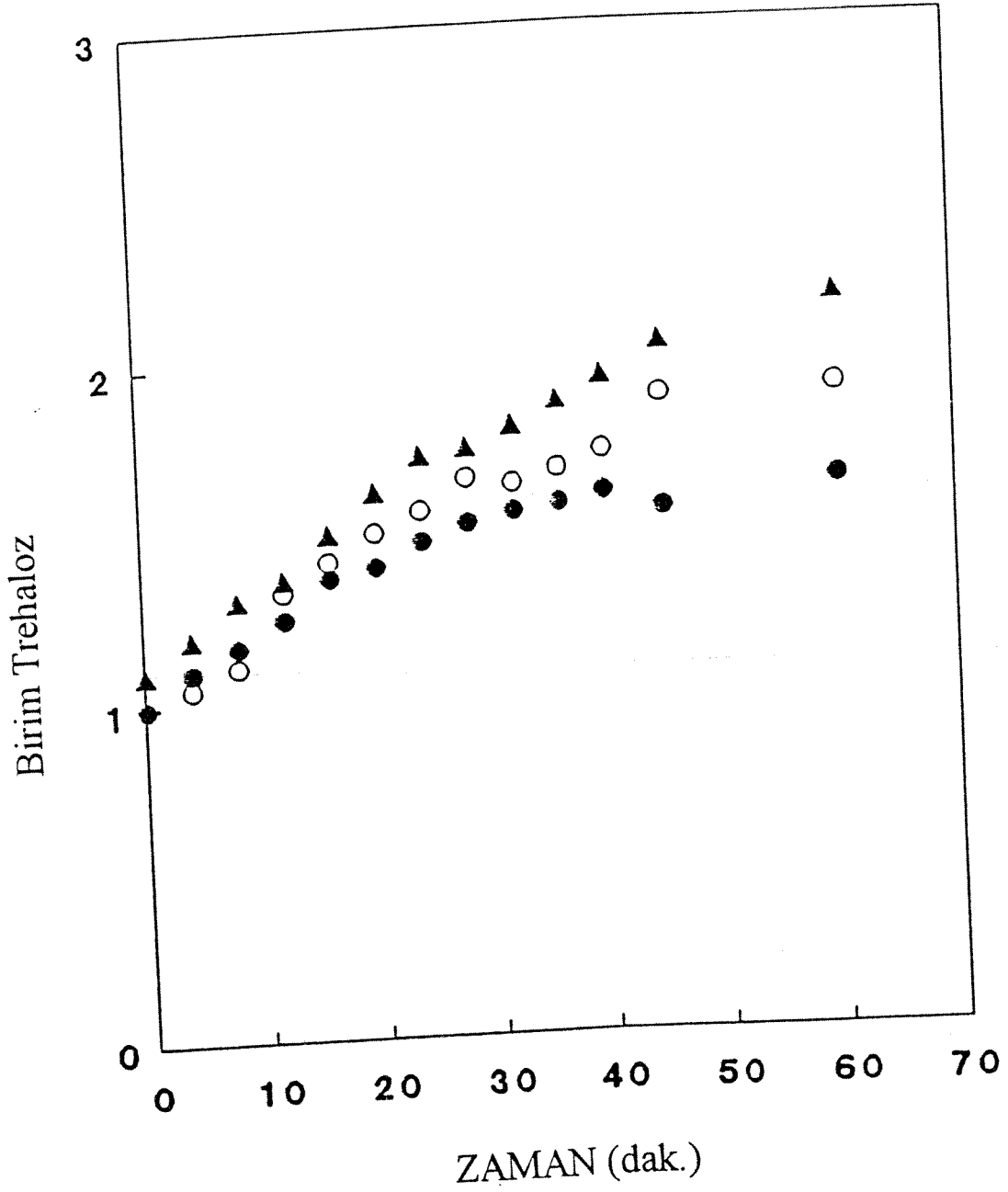
Şekil 9. Kesiksiz ekmek mayası kültüründe 40°C ısı şokunun (●) trehaloz ve (▲) protein derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ )



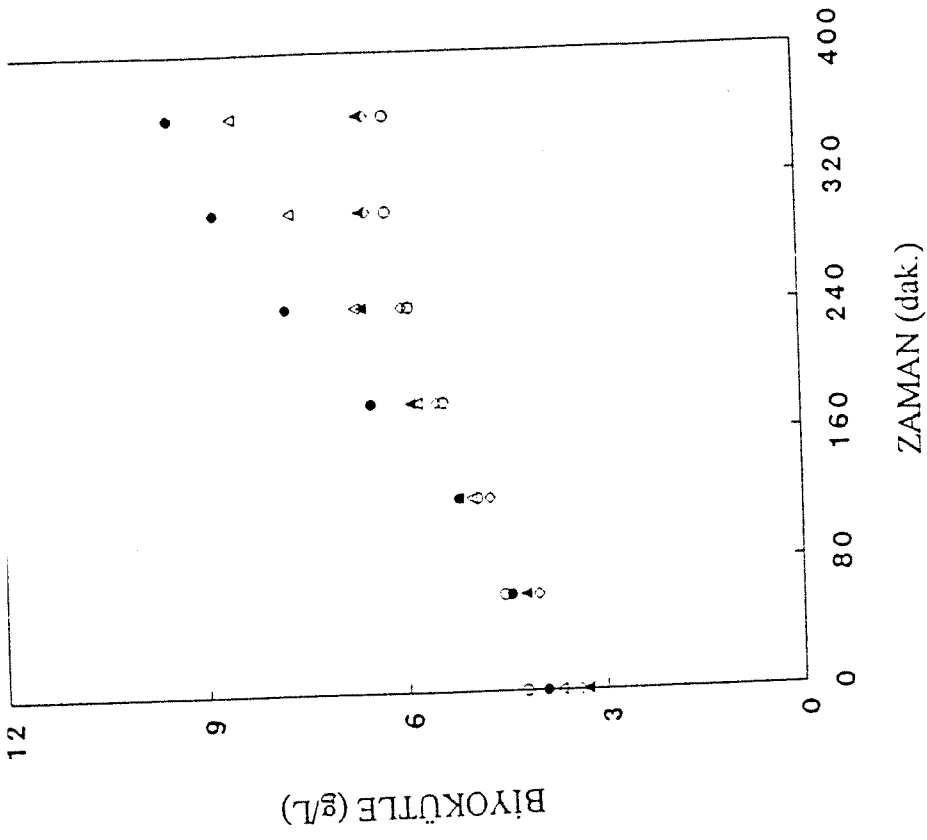
Şekil 10 Kesiksiz ekmek mayası kültüründe 36°C ısı şokunun (●) trehaloz ve (▲) protein derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ )



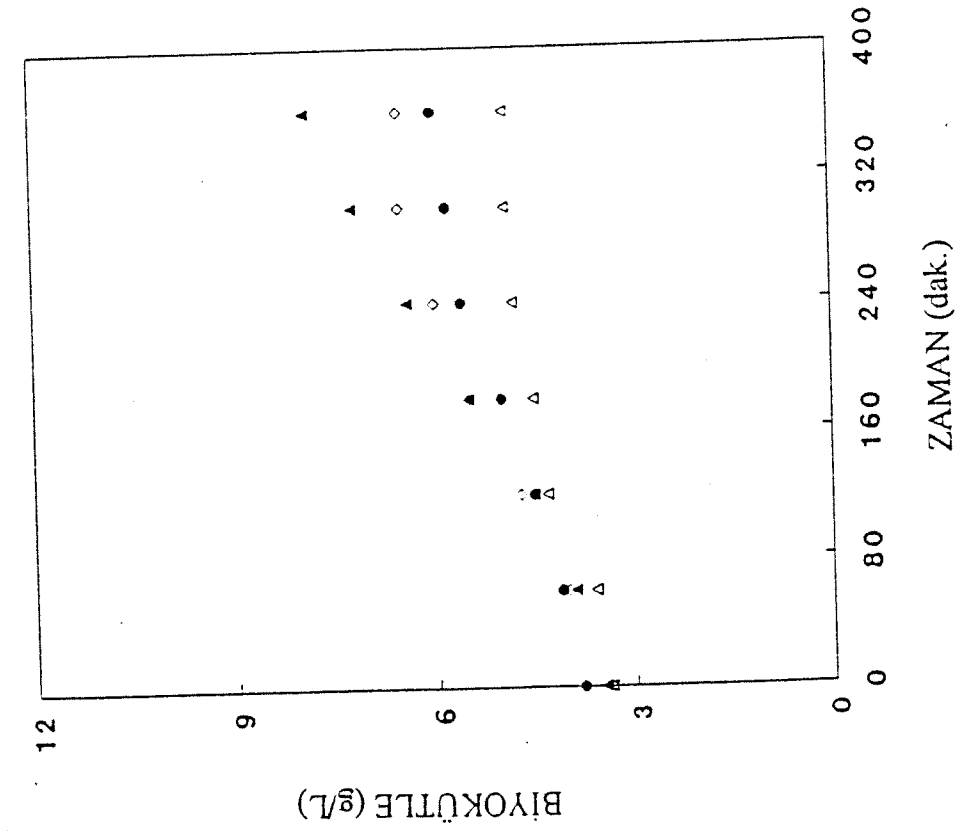
Şekil 11 Kesiksiz ekmek mayası kültüründe 38°C ısı şokunun (●) trehaloz ve (▲) protein derişimine etkisi ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ )



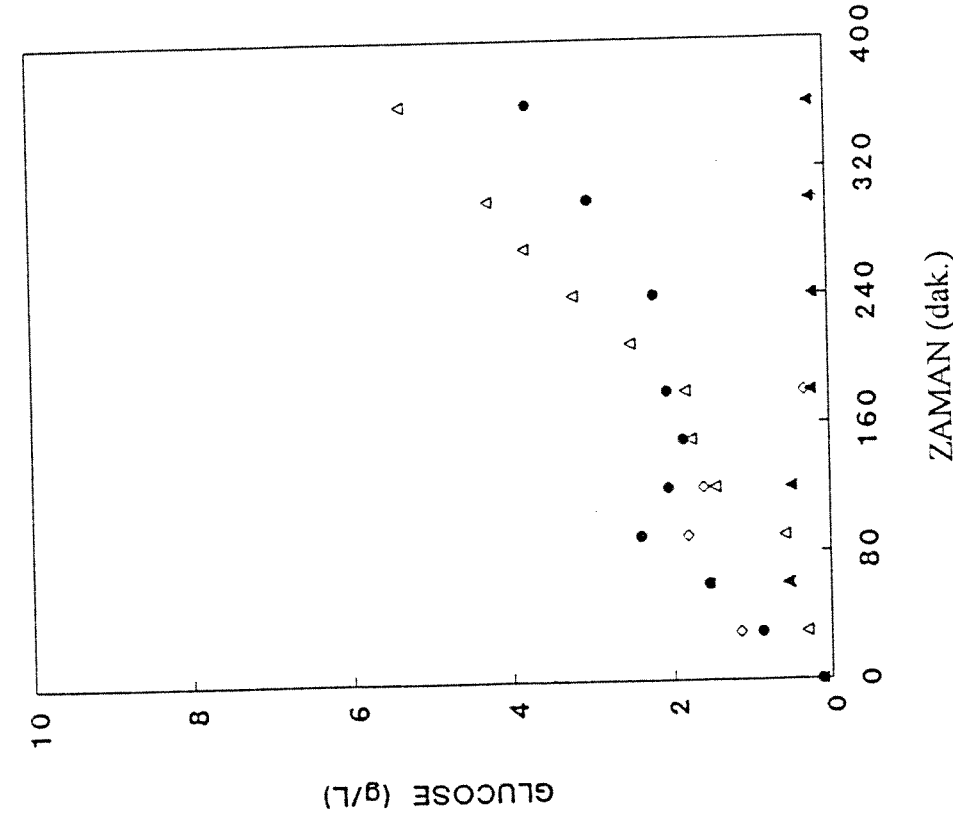
Şekil 12. Kesiksiz ekmek mayası kültüründe sıcaklığın başlangıç trehaloz birikim hızına etkisi  
 (●) 36°C, (○) 38°C ve (▲) 40°C ( $D=0.1 \text{ sa}^{-1}$ )



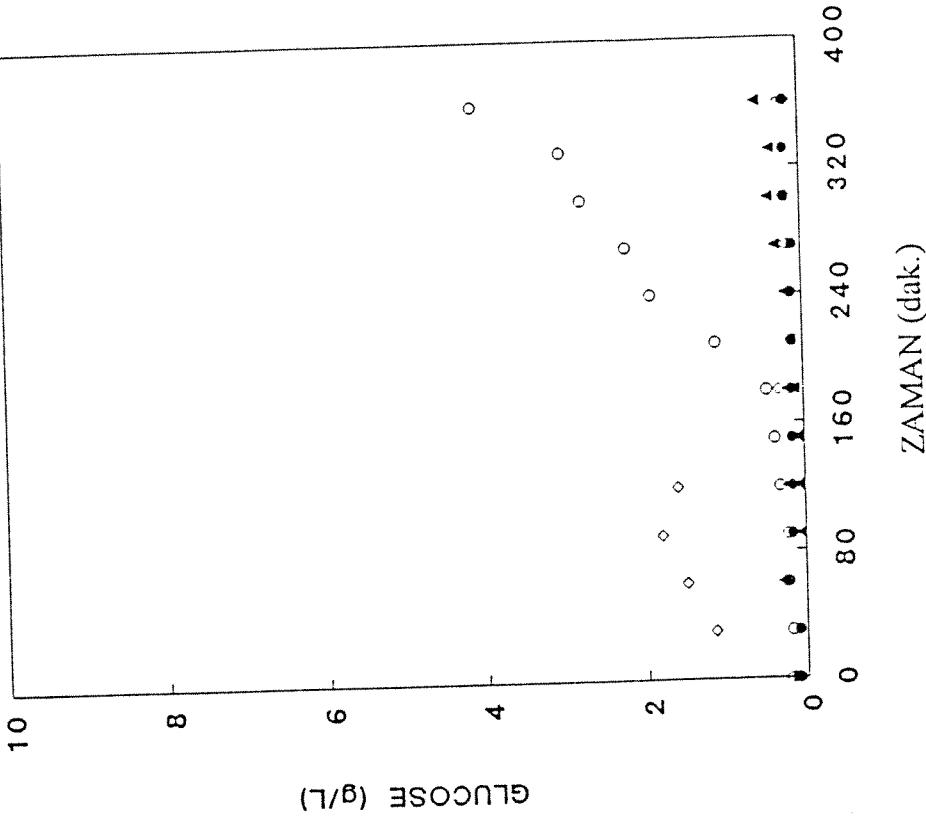
Şekil 13. Beslemeli ekmek mayası kültüründe, besin miktarının biyokütle miktarı üzerine etkisi  
 (◊) Stres uygulanmamış ortam, (Δ) Nitrojen miktarı, (▲) Fosfat miktarı, (●) Nitrojen ve Fosfat miktarı



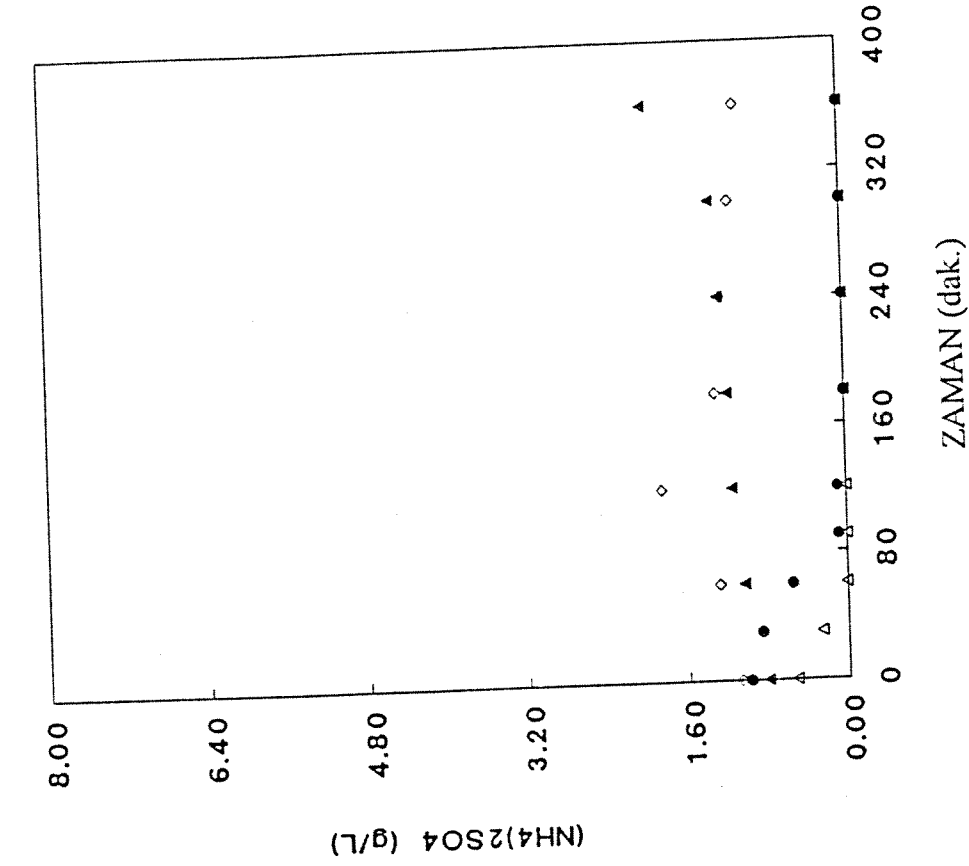
Şekil 14. Beslemeli ekmek mayası kültüründe, ısı şoku ve besin miktarının biyokütle miktarı üzerindeki ortak etkisi  
 (◊) Stres uygulanmamış ortam, (●) 38°C'de ısı şoku, (o) Isı şoku ve Nitrojen miktarı, (Δ) Isı şoku ve Fosfat miktarı, (▲) Isı şoku, Nitrojen ve Fosfat miktarı



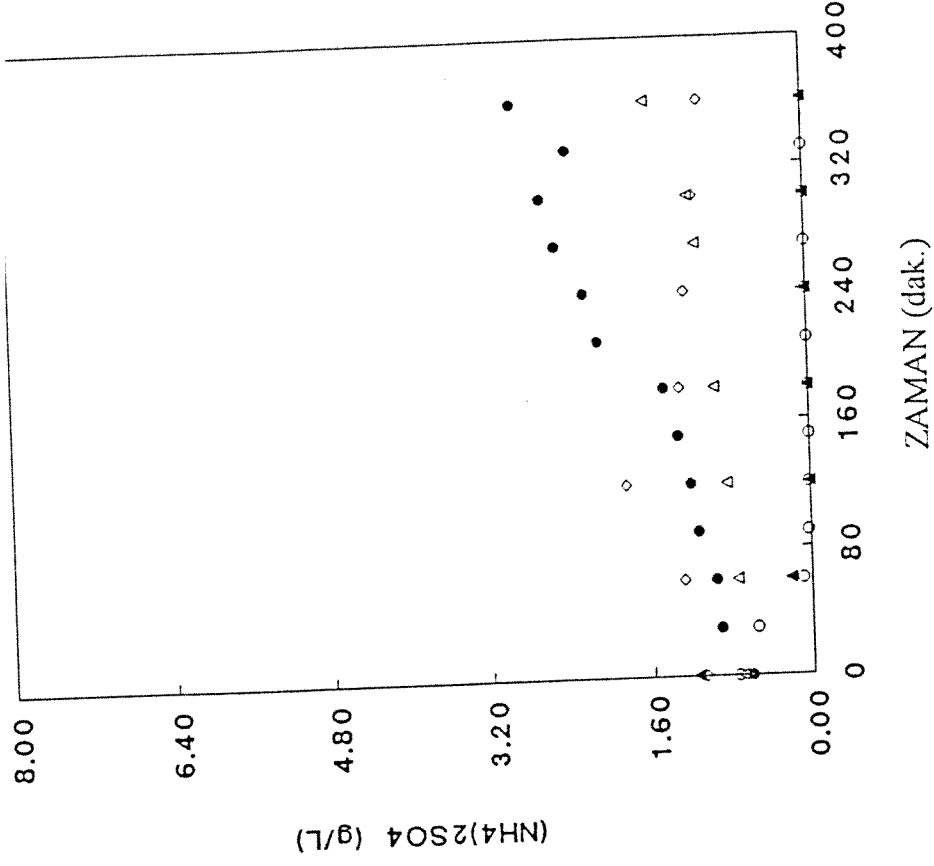
Şekil 15. Beslemeli ekmeke mayası kültüründe, besin kıtlığının çıkış glikoz miktarı üzerine etkisi  
 (◇) Stres uygulanmamış ortam, (Δ) Nitrojen kıtlığı,  
 (▲) Fosfat kıtlığı, (●) Nitrojen ve Fosfat kıtlığı



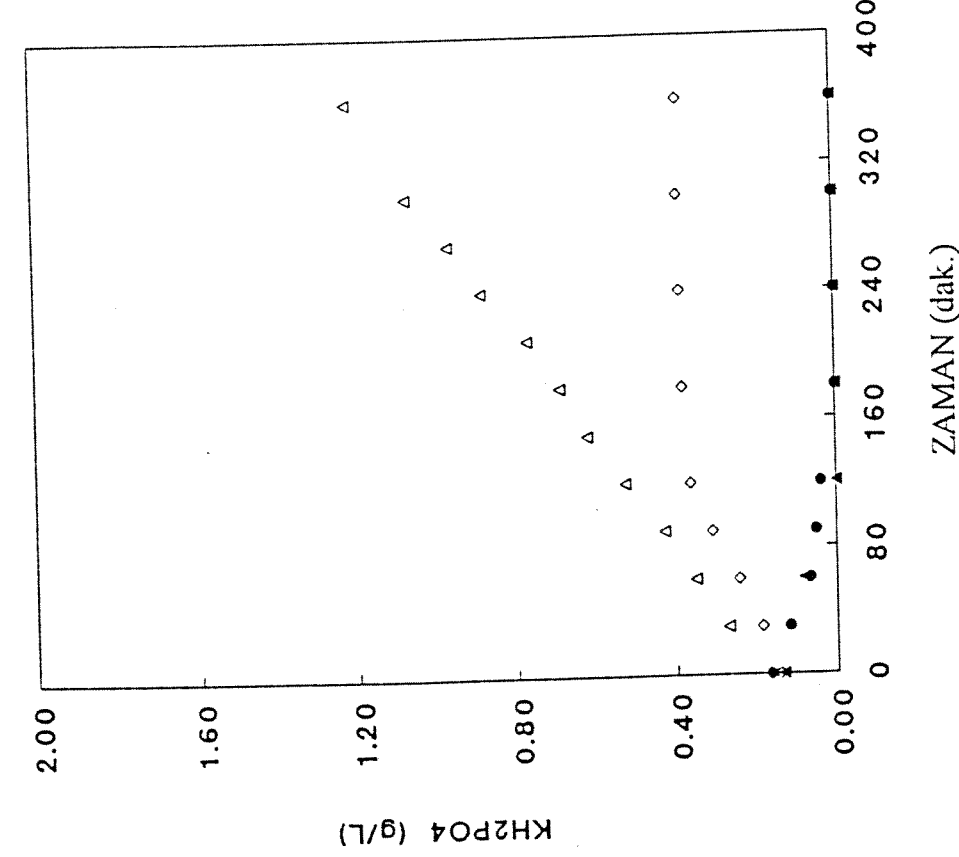
Şekil 16. Beslemeli ekmeke mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının çıkış glikoz miktarı üzerindeki ortak etkisi  
 (◇) Stres uygulanmamış ortam, (●) 38°C'de ısı şoku,  
 (○) Isı şoku ve Nitrojen kıtlığı, (Δ) Isı şoku ve Fosfat kıtlığı,  
 (▲) Isı şoku, Nitrojen ve Fosfat kıtlığı



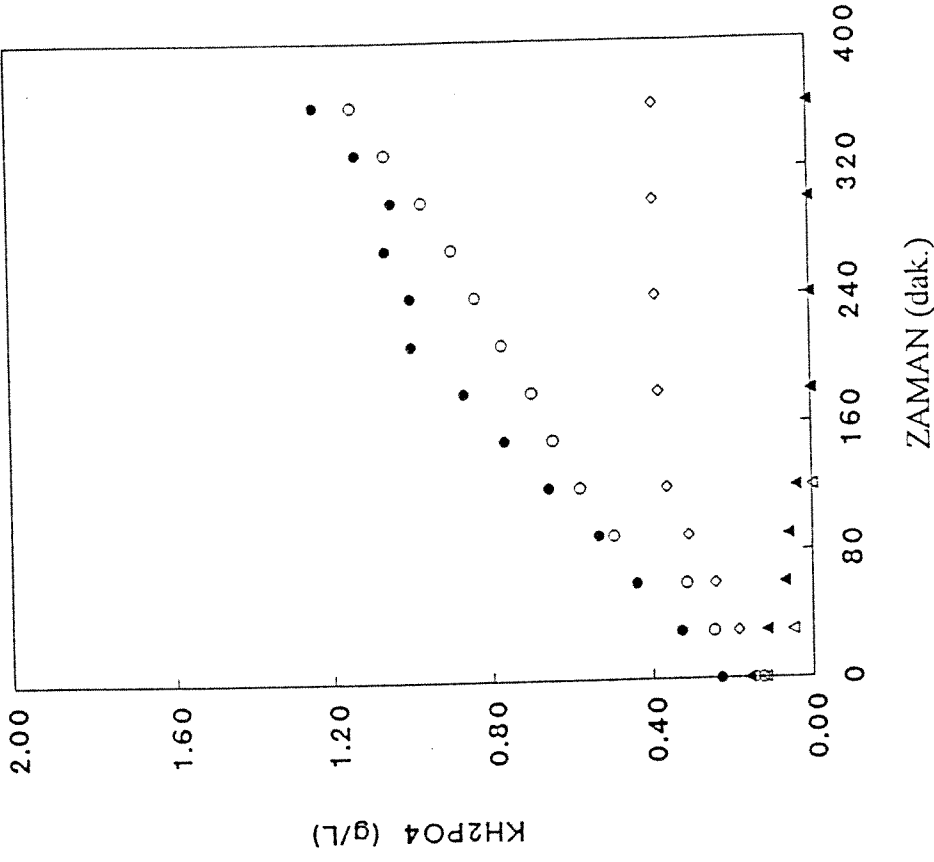
Şekil 17. Beslemeli ekmeek mayası kültüründe, besin kütüğünün çıkışı  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  miktarı üzerine etkisi  
 (◇) Stres uygulanmamış ortam, (▲) Nitrojen kütüğü,  
 (○) Fosfat kütüğü, (●) Nitrojen ve Fosfat kütüğü



Şekil 18. Beslemeli ekmeek mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kütüğünün çıkışı  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  miktarı üzerindeki ortak etkisi  
 (◇) Stres uygulanmamış ortam, (●)  $38^\circ\text{C}$ 'de ısı şoku,  
 (○) Isı şoku ve Nitrojen kütüğü, (△) Isı şoku ve Fosfat kütüğü,  
 (▲) Isı şoku, Nitrojen ve Fosfat kütüğü

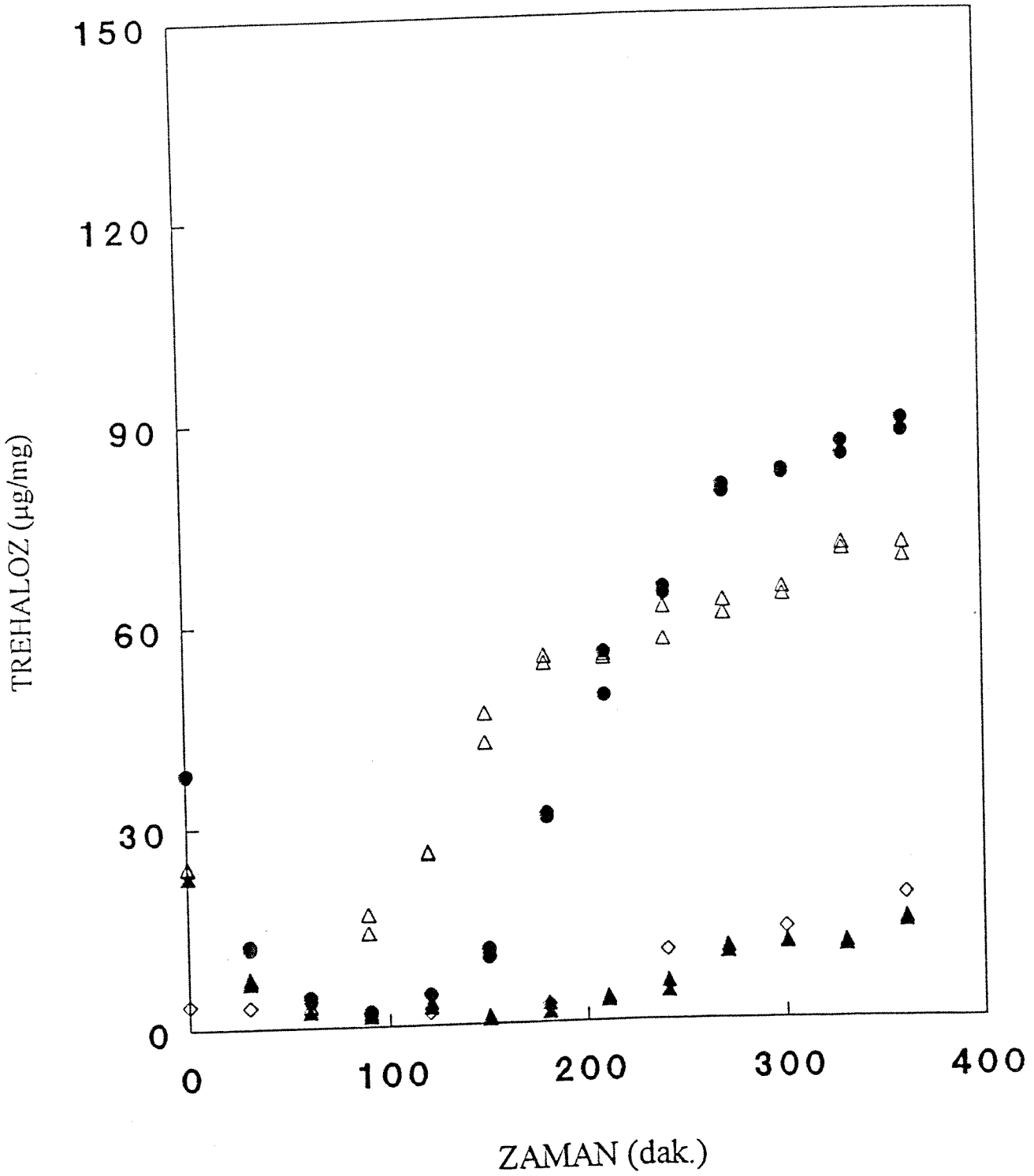


Şekil 19. Beslemeli ekme mayası kültüründe, besin kütliğinin çıkış  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  miktarı üzerine etkisi  
 ( $\Delta$ ) Stres uygulanmamış ortam, ( $\Delta$ ) Nitrojen kütliği,  
 ( $\blacktriangle$ ) Fosfat kütliği, ( $\bullet$ ) Nitrojen ve Fosfat kütliği

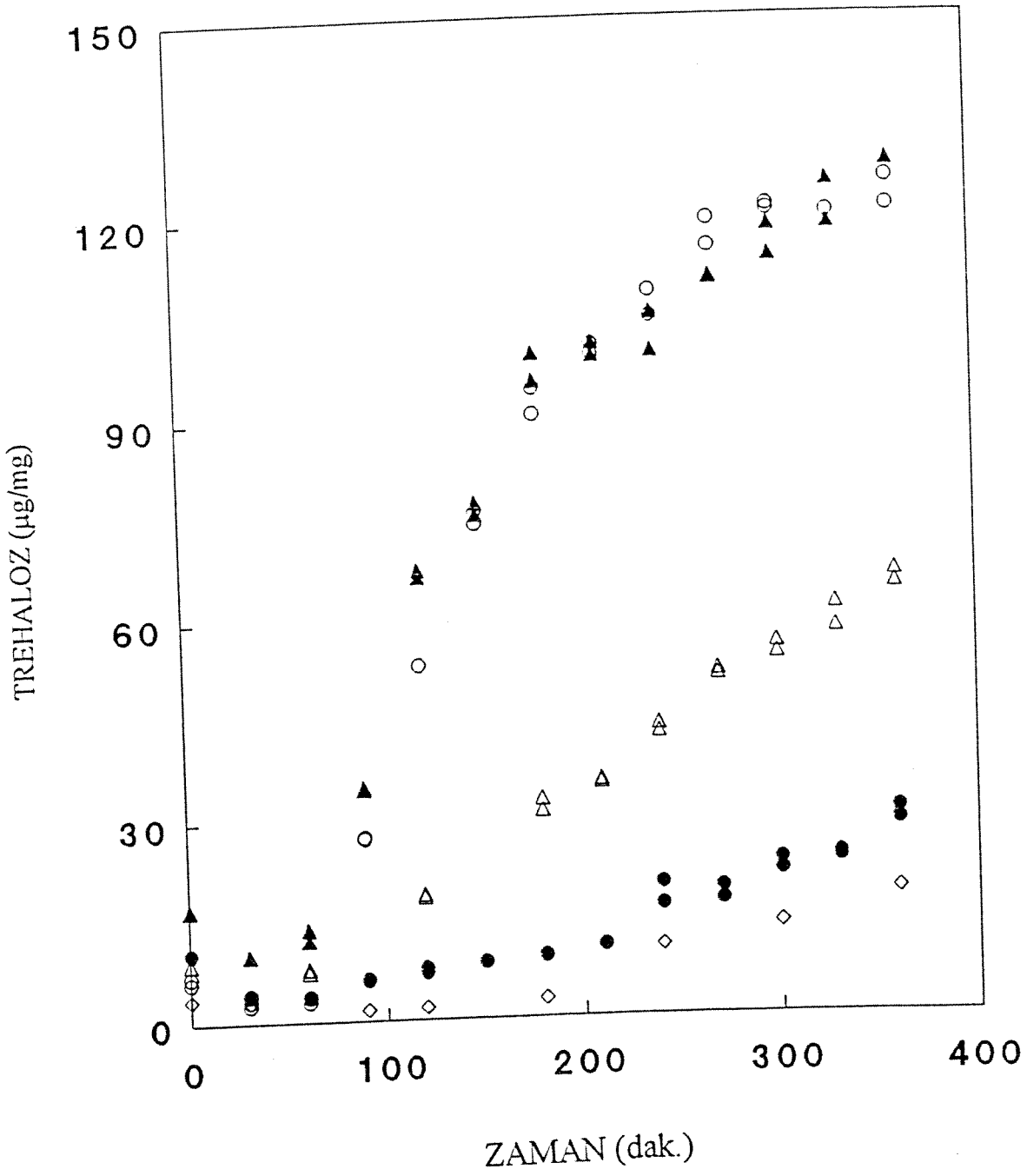


Şekil 20. Beslemeli ekme mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kütliğinin çıkış  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  miktarı üzerindeki ortak etkisi  
 ( $\diamond$ ) Stres uygulanmamış ortam, ( $\bullet$ ) 38°C'de ısı şoku,  
 ( $\Delta$ ) ısı şoku ve Nitrojen kütliği, ( $\Delta$ ) ısı şoku ve Fosfat kütliği,  
 ( $\blacktriangle$ ) ısı şoku, Nitrojen ve Fosfat kütliği

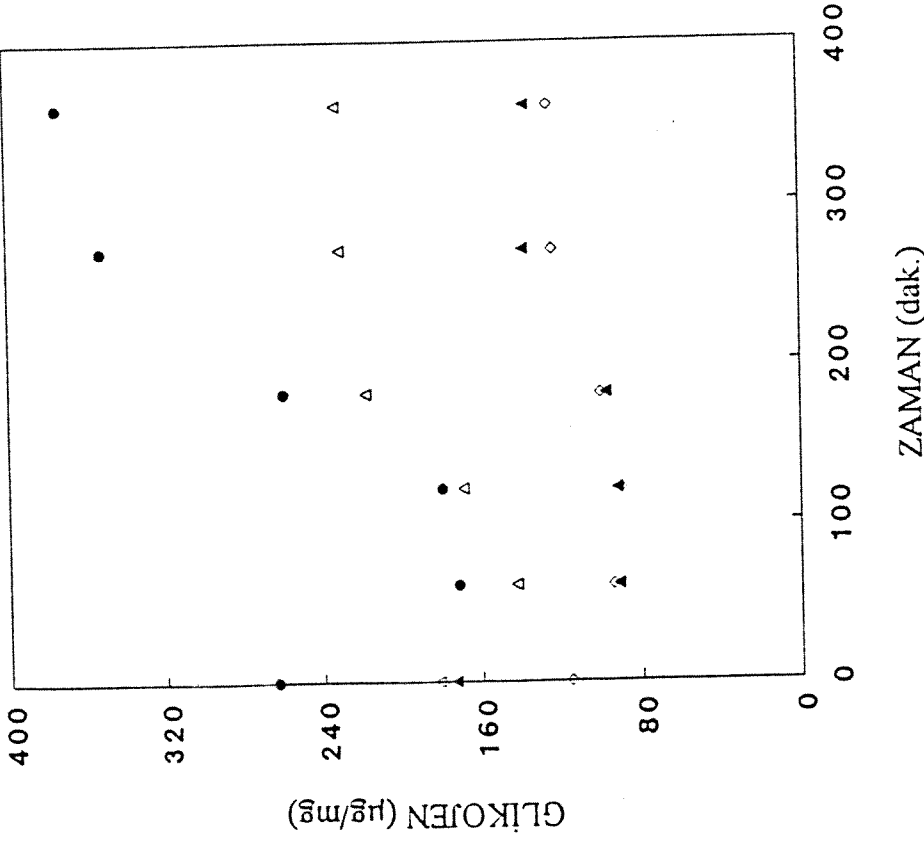




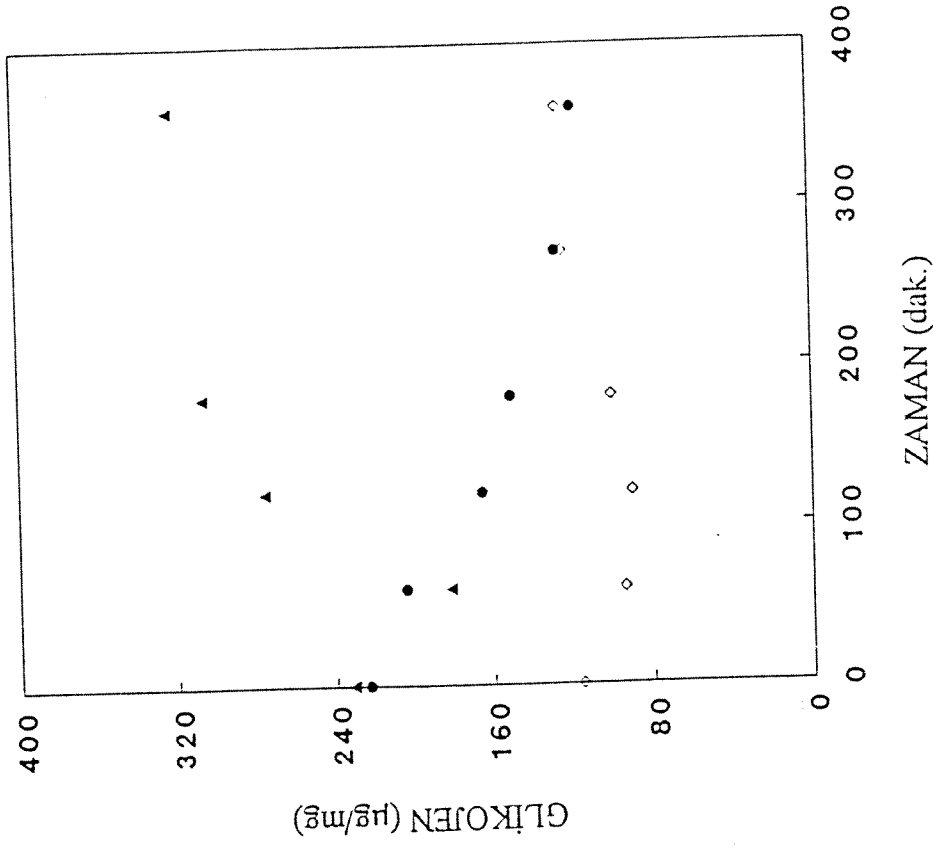
Şekil 21. Beslemeli ekmeek mayası kültüründe, besin kısıtlığının hücredeki trehaloz miktarı üzerine etkisi  
 (◇) Stres uygulanmamış ortam, (Δ) Nitrojen kısıtlığı  
 (▲) Fosfat kısıtlığı, (●) Nitrojen ve Fosfat kısıtlığı



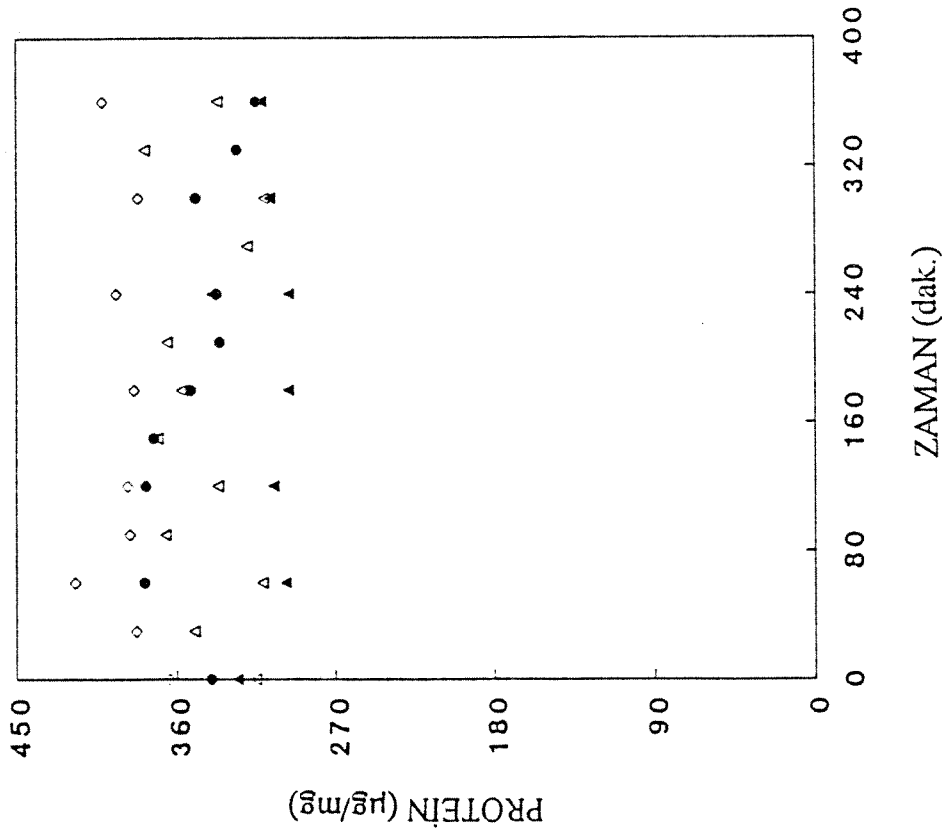
Şekil 22. Beslemeli ekmek mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının hücredeki trehaloz miktarı üzerindeki ortak etkisi  
 (◇) Stres uygulanmamış ortam, (●) 38°C'de ısı şoku,  
 (○) Isı şoku ve Nitrojen kıtlığı, (Δ) Isı şoku ve Fosfat kıtlığı  
 (▲) Isı şoku, Nitrojen ve Fosfat kıtlığı



Şekil 23. Beslemeli ekmeek mayası kültüründe, besin kütüğünün hücredeki toplam glikojen miktarı üzerine etkisi  
 (◊) Stres uygulanmamış ortam, (Δ) Nitrojen kütüğü  
 (▲) Fosfat kütüğü, (●) Nitrojen ve Fosfat kütüğü,



Şekil 24. Beslemeli ekmeek mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kütüğünün hücredeki toplam glikojen miktarı üzerindeki ortak etkisi  
 (◊) Stres uygulanmamış ortam, (●) 38°C'de ısı şoku,  
 (▲) Isı şoku, Nitrojen ve Fosfat kütüğü

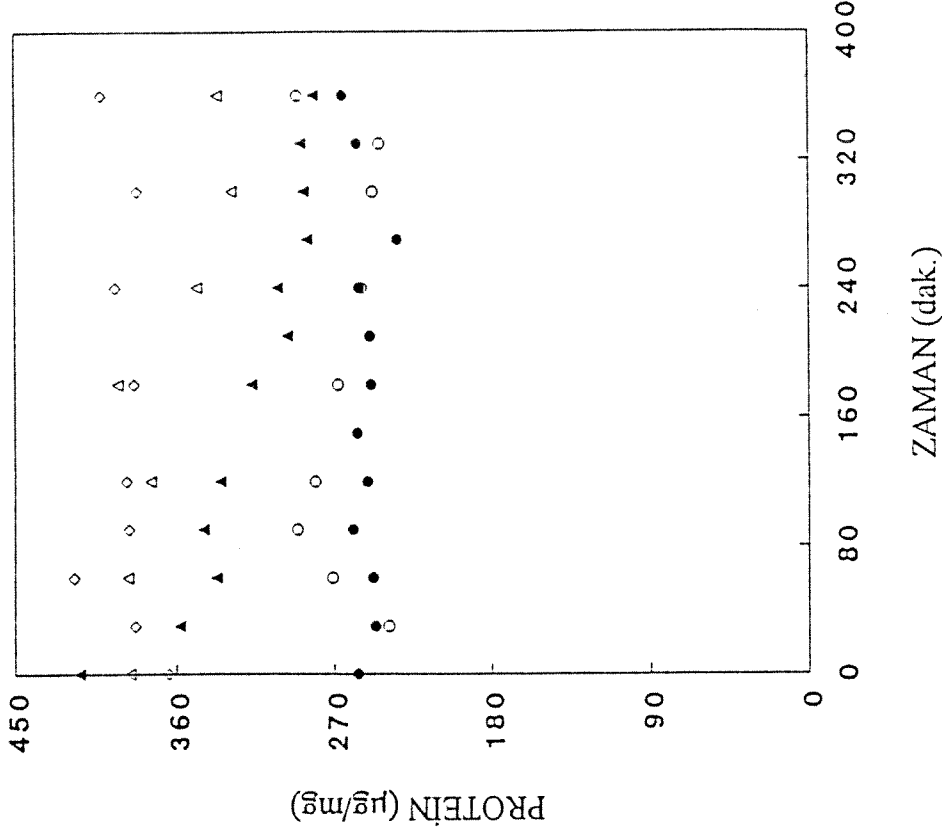


Şekil 25. Beslemeli ekmek mayası kültüründe, besin kılığının

hücredeki protein miktarı üzerine etkisi

(◇) Stres uygulanmamış ortam, (Δ) Nitrojen kıtlığı,

(▲) Fosfat kıtlığı, (●) Nitrojen ve Fosfat kıtlığı



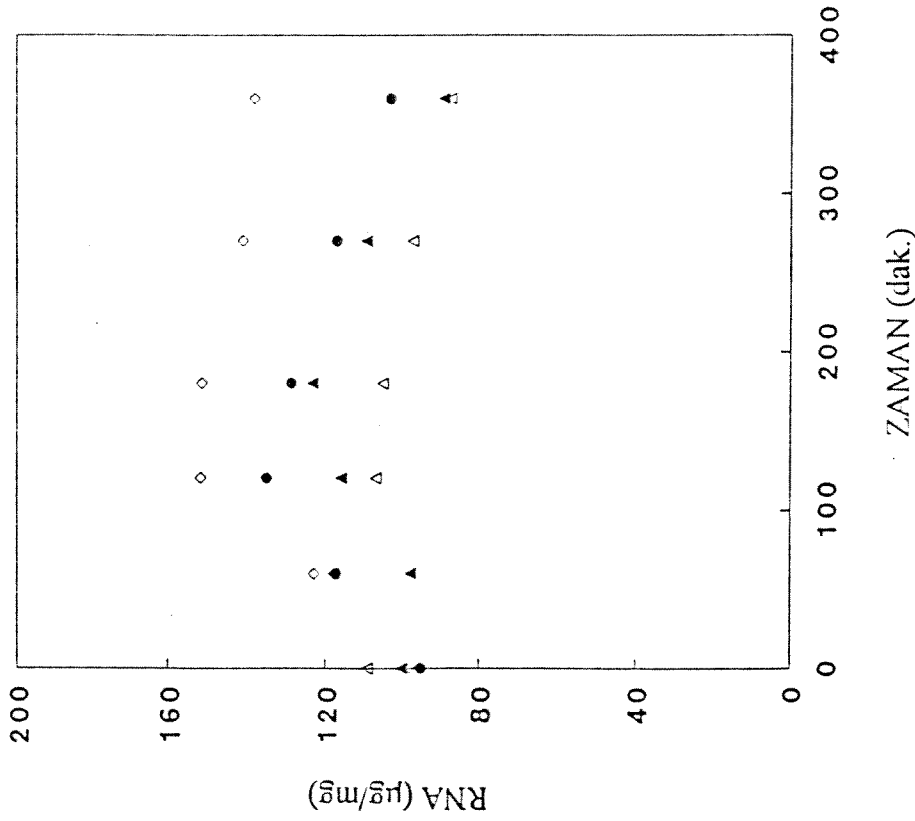
Şekil 26. Beslemeli ekmek mayası kültüründe, ısı şoku ve besin

kılığının hücredeki protein miktarı üzerindeki ortak etkisi

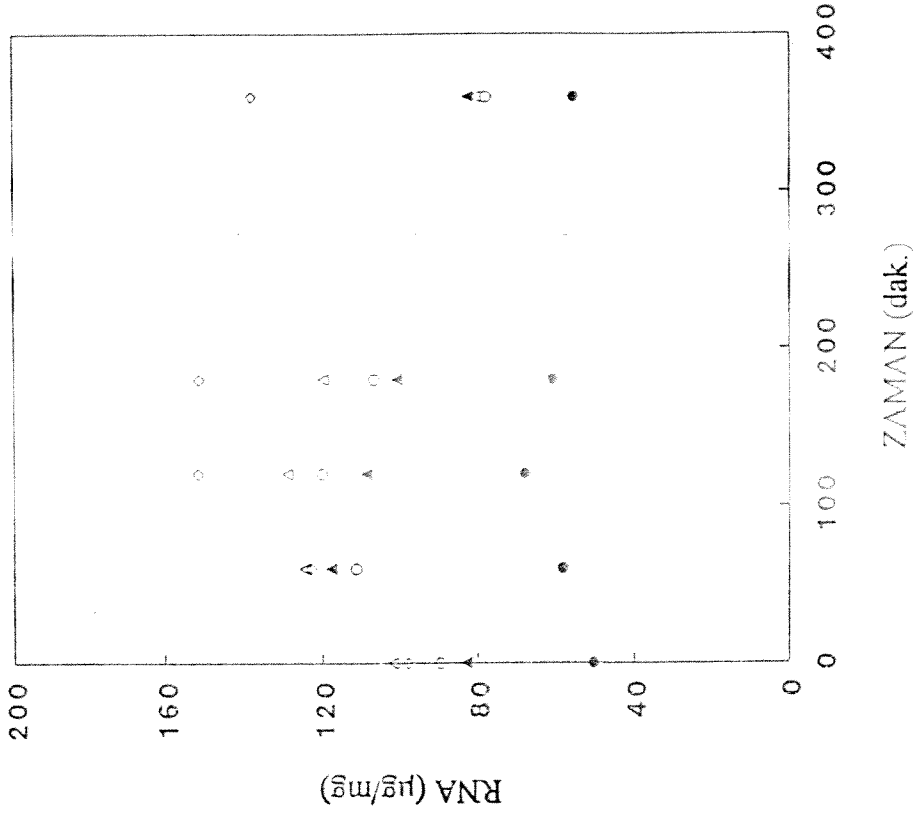
(◇) Stres uygulanmamış ortam, (●) 38°C'de ısı şoku

(○) Isı şoku ve Nitrojen kıtlığı, (Δ) Isı şoku ve Fosfat kıtlığı

(▲) Isı şoku, Nitrojen ve Fosfat kıtlığı



Şekil 27. Beslemeli ekmecek mayası kültüründe, besin miktarının hücredeki RNA miktarı üzerine etkisi  
 (◊) Stres uygulanmamış ortam, (Δ) Nitrojen kıtlığı,  
 (▲) Fosfat kıtlığı, (●) Nitrojen ve Fosfat kıtlığı



Şekil 28. Beslemeli ekmecek mayası kültüründe, ısı şoku ve besin kıtlığının hücredeki RNA miktarı üzerindeki ortak etkisi  
 (◊) Stres uygulanmamış ortam, (●) 38°C'de ısı şoku  
 (○) Isı şoku ve Nitrojen kıtlığı, (Δ) Isı şoku ve Fosfat kıtlığı  
 (▲) Isı şoku, Nitrojen ve Fosfat kıtlığı

## BÖLÜM IV.

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, değişik büyüme koşullarının ve stres uygulamalarının, endüstriyel bir ekmek mayası suşunun makromoleküler bileşimini nasıl etkilediği incelenmiştir.

Kesiksiz fermentör deneylerinde, seçilen seyrelme hızı değerlerinde hücrenin makromoleküler bileşimi belirlenmiştir. Ayrıca, yine kesiksiz fermentasyonda, sabit seyrelme hızında, ısı şokunun trehaloz ve protein miktarları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Seyrelme hızı 0.1 sa<sup>-1</sup>'den 0.4 sa<sup>-1</sup>'e yükseldiğinde hücre içindeki trehaloz miktarı % 4'den 0.9'a düşmüş, protein miktarı ise % 42'den 53'e yükselmiştir. Sabit seyrelme hızında ise en yüksek trehaloz değerine, % 10, 38 C ısı şoku sonucu ulaşılmıştır. Hücrenin başlangıçta % 35 olan protein miktarı ise deney boyunca % 30'a kadar düşmüştür.

Bilindiği gibi, maya endüstrisinde, piyasaya sürülen ürünün hamurda yüksek faaliyet gösterebilmesi için, bir yandan yüksek miktarda trehaloz biriktirmesi diğer yandan da protein içeriğinin çok olması gerekmektedir. Kesiksiz fermentasyonda yapılan ısı şoku deneyleri, sıcaklığın yükselmesi sonucu trehaloz miktarında artma olduğunu ve aynı zamanda protein miktarlarında ise önemli bir değişme olmadığını göstermiştir.

Kesikli-beslemeli fermentör deneylerinde ise besin kıtlığı ve ısı şoku stres uygulamalarının ayrı ayrı ve beraber etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, kesikli-beslemeli fermentasyon seçilmesinin nedeni ekmek mayası endüstrisinin bu sistemle çalışmasıdır. Ancak, bu deneylerde önemli bir değişiklik söz konusudur. Bu da hücrelerin, kesikli fermentasyona geçirilmeden önce, durağan-duruma gelinceye kadar kesiksiz fermentasyonla üretilmesidir. Bunun nedeni, stres uygulamalarından önce aynı başlama noktasını -benzer hücre bileşimini- sağlamaktır.

Kesikli-beslemeli fermentör deneyleri sonucu, besin kıtlığı ve ısı şoku beraber uygulandığı zaman en yüksek trehaloz değerine ulaşıldığı gözlenmiştir. Nitrojen kıtlığı ve ısı şokunun ikili etkisi sonucu en yüksek trehaloz değerine, % 12'ye ulaşılmıştır. Bu deney boyunca protein miktarında dalgalanmalar gözlenmekle beraber, başlangıç değerini koruduğu gözlenmiştir.

Bu çalışma boyunca stres uygulamalarına hücrenin tepkisi incelenmiştir. Özellikle, trehalozun hangi koşullar altında biriktiği, yapılan ısı şoku ve besin kıtlığı deneyleri ile ortaya çıkarılmıştır. Stres uygulaması ortadan kalktığı ya da aralıklı uygulandığı zaman maya hücrelerinin davranışlarının incelenmesi ise, şimdiye kadar yapılan çalışmayı tamamlayıcı nitelikte olacaktır.

Stres ortadan kalktığı zaman, daha hücre içerisinde biriken yüksek miktardaki trehaloz bozunmaktadır. Örneğin, kurutulmuş maya hücrelerinin tekrar su alımı sırasında, hücre içinde birikmiş olan trehalozun bir kısmı bozunmakta, diğer bir kısmı da hücre dışına atılmaktadır (Zikmanis, 1988). Yine bununla ilgili olarak, *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri trehalozu hücre içine doğrudan alabilmektedirler. Bu maya hücreleri trehaloz alımı için kullandıkları özel bir taşıyıcıya sahiplerdir. Hücre içine trehaloz taşınımı membran arası pH farkına bağlıdır. Diğer tüm disakkaritlerin alımında olduğu gibi, trehalozun hücre içerisine alımı etkin taşınım (active transport) ile gerçekleşmektedir (Crowe vd, 1991).

Stres uygulaması ortadan kalktığı zaman, trehalozun ne kadar bozunduğu, ne kadarının ise hücre dışına atıldığı bilinmemektedir. Yine bu arada, hücre dışına atılan trehalozun vakuolar-trehalaz tarafından glikoz monomerlerine parçalanıp parçalanmadığı da bilinmemektedir.

Stres uygulaması ortadan kalktığı ya da aralıklı stres uygulandığı zaman hücrenin tepkisi incelenirken, bazı soruların yanıtlanması gerekmektedir:

- i. Stres ortamı ortadan kalktığı zaman hücre içinde trehalozun bozunumu nedeniyle oluşan büyük miktardaki glikoz (ayrıca glikojen bozunumu sonucu oluşan fosforlanmış glikoz) hücre tarafından nasıl kullanılmaktadır?
- ii. Ortamdaki glikoz ve diğer besin maddelerinin hücre içine alımı bir önceki hızda devam etmekte midir? Diğer bir deyişle, fermentatif-büyüme-ortamı-izyolu etkinliğinde bir değişme olmaktadır?
- iii. Stres ortadan kalktığı zaman, biriken trehaloz dışarı atılmakta mıdır? Bu durumda vakuolar-trehalazın ne gibi bir etkisi vardır?

Bunun dışında, bu çalışmanın sonunda elde edilen ısı şoku verileri beraberinde yanıtlanması gereken bazı sorular getirmiştir. Kesikli-beslemeli kültürde, ısı şoku sonucu trehaloz birikimi olmamıştır. Kesiksiz kültüre ısı şoku uygulandığı zaman ise yüksek miktarda trehaloz birikimi olmuştur. Isı şokunun trehaloz birikimi üzerindeki etkisinin daha ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, gerçekleştirilmesi gereken deneylerden biri,  $Ca^{+2}$  iyonunun etkisinin incelenmesidir. Trehalaz enziminin  $Ca^{+2}$  iyonuna eğilimi sıcaklık arttıkça azalmaktadır (Neves ve François, 1992). Bu nedenle,  $Ca^{+2}$

derişimindeki değişikliklerin trehaloz birikimi üzerindeki etkisi önem taşımaktadır. Yine aynı şekilde, ısı şoku ile ortamdaki glikoz derişimi ve etanol varlığının trehaloz birikimine etkisinin incelenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmayla ilgili bir başka nokta da, deneylerin sadece glikoz sınırlı kültürlerle gerçekleştirilmiş olmasıdır. Glikoz-sınırlı kültürler dışında, makromoleküler bileşime- özellikle birikim karbonhidratlarına- ait yeri çok azdır. Oysa, kültürün nitrojen- ya da fosfor-sınırlı olması, hücrenin makromoleküler bileşimini, özellikle birikim karbonhidratları açısından, farklılaştırmaktadır. Bu tür, nitrojen- ya da fosfor-sınırlı kültürlerle ait ısı şoku ve/veya besin kıtlığı sonucu trehaloz ve glikojen birikim verileri ise hemen hiç yoktur. Bu nedenle, nitrojen- ve fosfor-sınırlı kültürlerle bu deneylerin tekrarlanması, yapılan çalışmayı tamamlayacaktır.

Sonuç olarak, öngörülen yeni çalışmalarla, mayanın değişik koşullara, özellikle trehaloz açısından, tepkisi daha iyi incelenmiş olacaktır.



## KAYNAKLAR

- Alexander, M.A. ve T.W. Jeffries, "Respiratory Efficiency and Metabolite Partitioning as Regulatory Phenomena in Yeasts". Enzyme and Microbial Technology, **12**:2-19 (1990).
- Argüelles, J.C., D. Carrillo, J. Vicente-Soler, F. Garcia-Carmona ve M. Gacto, "Lack of Correlation between Trehalase Activation and Trehalose-6-Phosphate Synthase Deactivation in cAMP-Altered Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*", Current Genetics, **23**:382-387 (1993).
- Attfield, P.V., "Trehalose Accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* During Exposure to Agents that Induce Heat Shock Response", FEBS Letters, **225**:259-263 (1987).
- Barford, J.P. ve R.J. Hall, "An Examination of the Crabtree Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the Role of Respiratory Adaptation", Journal of General Microbiology, **114**:267-275 (1979).
- Barford, J.P. ve R.J. Hall, "A Mathematical Model for the Aerobic Growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a Saturated Respiratory Capacity", Biotechnology and Bioengineering, **23**:1735-1762 (1981).
- Beck, C. ve H.K. von Meyenburg, "Enzyme Pattern and Aerobic Growth of *Saccharomyces cerevisiae* Under Various Degrees of Glucose Limitation", Journal of Bacteriology, **Aug.**:479-486 (1968)
- Becker, J.U., "Mechanism of Regulation of Glycogen Phosphorylase Activity in *Saccharomyces carlsbergensis*", Journal of General Microbiology, **128**:447-454 (1982).
- Broek, D., N. Samy, O. Fasano, A. Fujiyama, F. Tamana, J. Northup ve M. Wigler, "Differential Activation of Yeast Adenylate Cyclase by Wild-Type and Mutant RAS Proteins", Cell, **41**:763-769 (1985).
- Cabib, E. ve L.F. Leloir, "The Biosynthesis of Trehalose Phosphate", Journal of Biological Chemistry, **231**:259-275 (1958).
- Cameron, S., L. Levin ve M. Zoller, "cAMP-Independent Control of Sporulation, Glycogen Metabolism, and Heat Shock Resistance in *S. cerevisiae*", Cell, **53**: 555-566 (1988).
- Cannon, J.F. ve K. Tatchell, "Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Genes Encoding Subunits of Cyclic-AMP-Dependent Protein Kinase", Molecular and Cellular Biology, **7**:2653-2663 (1987)
- Carabaza, A., J. Arino, J.W. Fox, C.V. Villar-Palasi ve J.J. Guinovart, "Purification, Characterization and Partial Amino Acid Sequence of

- Glycogen Synthase from *Saccharomyces cerevisiae*", Biochemical Journal, **268**:401-407 (1990).
- Carter, B.L.A. ve A. Lorinez, "Protein Synthesis, Cell Division and the Cell Cycle in *Saccharomyces cerevisiae* Following a Shift to a Richer Medium", Journal of General Microbiology, **106**:222-225 (1978).
- Costa-Carvalho, V.L.A., D.F. Meirelles ve M.H.M. Rocha-Leao, "Production of Glucose-Grown Glycogen-Rich Cells of *Saccharomyces cerevisiae*", Biotechnology Letters, **8**:57-62 (1986).
- Coutinho, C.C., J.T. Silva ve A.D. Panek, "Trehalase Activity and its Regulation During Growth of *Saccharomyces cerevisiae*", Biochemistry International, **26**:521-530 (1992).
- Crowe, J.H., A.D. Panek, L.M. Crowe, A.C. Panek ve P.S. deAraujo, "Trehalose Transport in Yeast Cell", Biochemistry International, **24**:721-730 (1991).
- Dubois M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers ve F. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", Analytical Chemistry, **28**:350-356 (1956).
- Durnez, P., M.B. Pernambuco, E. Oris, J.C. Argüelles, H. Mergelsberg ve J.M. Thevelein, "Activation of Trehalase During Growth Induction by Nitrogen Sources in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Depends on the Free Catalytic Subunits of c-AMP-Dependent Protein Kinase, but not on Functional Ras Proteins", Yeast, **10**:1049-1064 (1994).
- Farkas, I., T.A. Hardy, A.A. de Paoli-Roach ve P.J. Roach, "Isolation of the *GSY1* Gene Encoding Yeast Glycogen Synthase and Evidence for the Existence of a Second Gene", Journal of Biological Chemistry, **265**:20879-20886 (1990).
- Franco, C.M.M., J.E. Smith ve D.R. Berry, "Effect of Nitrogen and Phosphate on the Levels of Intermediates in Bakers' Yeast Grown in Continuous Culture", Journal of General Microbiology, **2465**-2472 (1984)
- François, J. ve H.G. Hers, "The control of Glycogen Metabolism in Yeast 2. A Kinetic Study of the Two Forms of Glycogen Synthase and of Glycogen Phosphorylase and an Investigation of Their Interconversion in a Cell-Free Extract", European Journal of Biochemistry, **174**: 561-567 (1988).
- François, J., M.E. Villanueva ve H.G. Hers, "The control of Glycogen Metabolism in Yeast 1. Interconversion In Vivo of Glycogen Synthase and Glycogen Phosphorylase Induced by Glucose, a Nitrogen Source

- or Uncouplers", European Journal of Biochemistry, **174**:551-559 (1988).
- François, J., M.J. Neves ve H.G. Hers, "The Control of Trehalose Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for a Catabolite Inactivation and Repression of Trehalose-6-Phosphate Synthase and Trehalose-6-Phosphate Phosphatase", Yeast, **7**:575-587 (1991).
- François, J., P. Eraso ve C. Gancedo, "Changes in the Concentration of cAMP, Fructose 2,6-Biphosphate and Related Metabolites and Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* During Growth on Glucose", European Journal of Biochemistry, **164**:369-373 (1987).
- Furukawa, K., E. Heinzle ve I.J. Dunn, "Influence of Oxygen on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture", Biotechnology and Bioengineering, **25**:2293-2317 (1983).
- Ghosh, B.K., B. Montenecourt ve J.O. Lampen, "Abnormal Cell Envelope Ultrastructure of a *Saccharomyces* Mutant with Invertase Formation Resistant to Hexoses", Journal of Bacteriology, **Dec.**:1412-1420 (1973).
- Grunenberg, B.E. ve A.C. Schwartz, "Activation and Phosphorylation of Glycogen Phosphorylase from *Saccharomyces* by Different Protein Kinases", Joint Meeting, Konstanz, **371**: 788 (1990).
- Gunja-Smith, Z. ve E.E. Smith, "Evidence for the Periplasmic Location of Glycogen in *Saccharomyces*", Biochemical and Biophysical Research Communications, **56**:588-592 (1974).
- Gunja-Smith, Z., N.B. Patil ve E.E. Smith, "Two Pools of Glycogen in *Saccharomyces*", Journal of Bacteriology, **May**:818-825 (1977).
- Harris, S.D. ve D.A. Cotter, "Vacuolar (Lysosomal) Trehalase of *Saccharomyces cerevisiae*", Current Microbiology, **15**:247-249 (1987).
- Harris, S.D. ve D.A. Cotter, "Transport of Yeast Vacuolar Trehalase to the Vacuole", Canadian Journal of Microbiology, **34**:835-838 (1988).
- Hartree, E.F., "Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response", Analytical Biochemistry, **48**:422-427 (1972).
- Hirimburegama, K., P. Durnez, J. Keleman, E. Oris, R. Vergauwen, H. Mergelsberg ve J.M. Thevelein, "Nutrient-Induced Activation of Trehalase in Nutrient-Starved Cells of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: cAMP is not Involved as Second Messenger", Journal of General Microbiology, **138**:2035-2043 (1992).

- Hottiger, T., P. Schmutz ve A. Wiemken, "Heat-Induced Accumulation and Futile Cycling of Trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*", Journal of Bacteriology, Dec.:5518-5522 (1987 a).
- Hottiger, T., T. Boller ve A. Wiemken, "Rapid Changes of Heat and Desiccation Tolerance Correlated with Changes of Trehalose Content in *Saccharomyces cerevisiae* Cells Subjected to Temperature Shifts", FEBS Letters, **220**:113-115 (1987 b).
- Huang, K.P. ve E. Cabib, "Yeast Glycogen Synthetase in the Glucose-6-P-Dependent form. 7. Purification and Properties", Journal of Biological Chemistry, **249**:3851-3857 (1974).
- Kaeppli, O., M. Arreguin ve M. Rieger, "The Respirative Breakdown of Glucose by *Saccharomyces cerevisiae*: an Assessment of a Physiological State", Journal of General Microbiology, **131**:1411-1416 (1985 b).
- Kaeppli, O., M. Gschwend-Petrik ve A. Fiechter, "Transient Responses of *Saccharomyces uvarum* to a Change of the Growth-Limiting Nutrient in Continuous Culture", Journal of General Microbiology, **131**:47-52 (1985 a).
- Küenzi, M.T. ve A. Fiechter, "Regulation of Carbohydrate Composition of *Saccharomyces cerevisiae* Under Growth Limitation", Archives of Microbiology, **84**:254-265 (1972).
- Lagunas, R., C. Dominguez, A. Busturia ve M.J. Saez, "Mechanisms of Appearance of the Pasteur Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: Inactivation of Sugar Transport Systems", Journal of Bacteriology, Oct.:19-25 (1982).
- Larsson, C., U. von Stockar, I. Marison ve L. Gustafsson, "Growth and Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in Chemostat Cultures Under Carbon-, Nitrogen-, or Carbon- and Nitrogen-Limiting Conditions", Journal of Bacteriology, Aug.:4809-4816 (1993).
- Liden, G., U. Schulze, J. Nielsen ve J. Villadsen, "On the Optimization of Ethanol Production in Nitrogen Limited Yeast Fermentations", 7th European Congress on Biotechnology, Nice, Fransa, Abstract book, 43 (1995).
- Lillie, S.H. ve J.R. Pringle, "Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Response to Nutrient Limitation" Journal of Bacteriology, **143**: 1384-1394 (1980).
- Londesborough, J. ve K. Varimo, "Characterization of Two Trehalases in Bakers' Yeast", Biochemical Journal, **219**:511-518 (1984).

- Londesborough, J. ve O. Vuorio, "Trehalose-6-Phosphate Synthase/Phosphatase Complex from Bakers' Yeast: Purification of a Proteolytically Activated Form", Journal of General Microbiology, **137**:323-330 (1991).
- Londesborough, J. ve O.E. Vuorio, "Purification of Trehalose Synthase from Bakers' Yeast. Its Temperature-Dependent Activation by Fructose-6-Phosphate and Inhibition by Phosphate", European Journal of Biochemistry, **216**:841-848 (1993).
- Neves M.J. ve J. François, "On the Mechanism by which a Heat Shock Induces Trehalose Accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*", Biochemical Journal, **288**:859-864 (1992).
- Ogawa, T., T. Inoue, S. Sato, M. Shimoda ve S. Aiba, "Phosphate Mediation of the Aerobic Fermentation in Bakers' Yeast", Biotechnology Letters, **2**:147-152 (1980).
- Ortiz, C.H., J.C.C. Maia, M.N. Tenan, G.R. Braz-Padrao, J.R. Mattoon ve A.D. Panek, "Regulation of Yeast Trehalase by a Monocyclic, Cyclic AMP-Dependent Phosphorylation-Dephosphorylation Cascade System", Journal of Bacteriology, **Feb.**:644-651 (1983).
- Panek, A., "Synthesis of Trehalose by Bakers' Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)", Archives of Biochemistry and Biophysics, **98**:349-355 (1962).
- Panek, A., "Function of Trehalose in Bakers' Yeast", Archives of Biochemistry and Biophysics, **100**:422-425 (1963).
- Panek, A., R. Ferreira ve A.C. Panek, "Comperative Studies between the Glucose-Induced Phosphorylation Signal and the Heat Shock Response in Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*", Biochimie, **71**:313-318 (1989).
- Panek, A.C., J.J. Mansure-Vania, M.F. Paschoalin ve D. Panek, "Regulation of Trehalose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* Mutants During Temperature Shifts", Biochimie, **72**:77-79 (1990).
- Panek, A.C., P.S. Araujo, V.M. Neto ve A.D. Panek, "Regulation of the Trehalose-6-Phosphate Complex in *Saccharomyces*. I. Interconversion of Forms by Phosphorylation", Current Genetics, **11**:459-465 (1987).
- Panek, A.C., P.S. Araujo, S.C. Poppe ve A.D. Panek, "On the Determination of Trehalose-6-Phosphate Synthase in *Saccharomyces*", Biochemistry International, **21**:695-704 (1990).

- Panek, A.D. ve J.R. Mattoon, "Regulation of Energy Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*", Archives of Biochemistry and Biophysics, **183**:306-316 (1977).
- Parada, G. ve F. Acevedo, "On the Relation of Temperature and RNA Content to the Specific Growth Rate in *Saccharomyces cerevisiae*", Biotechnology and Bioengineering, **25**:2785-2788 (1983).
- Pejin, D. ve R. Razmovski, "Continuous Cultivation on the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* at Different Dilution Rates and Glucose Concentrations in Nutrient Media", Folia Microbiologica, **38**:141-146 (1993).
- Peng, Z.Y., R.J. Trumbly ve E.M. Reimann, "Purification and Characterization of Glycogen Synthase from a Glycogen Deficient Strain of *Saccharomyces cerevisiae*", Journal of Biological Chemistry, **265**:13871-13877 (1990).
- Peng, Z.Y., W. Wang, S.E. Wilson, K.K. Schlender, R.J. Trumbly ve E.M. Reimann, "Identification of a Glycogen Synthase Phosphatase from Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as Protein Phosphatase 2A", The Journal of Biological Chemistry, **266**: 10925-10932 (1991).
- Petric, M., O. Kaeppli ve A. Fiechter, "An Expanded Concept for the Glucose Effect in the Yeast *Saccharomyces uvarum*: Involvement of Short- and Long-Term Regulation", Journal of General Microbiology, **129**:43-49 (1983).
- Rao, P. ve T.N. Pattabiraman, "Reevaluation of the Phenol-Sulfuric Acid Reaction for the Estimation of Hexoses and Pentoses", Analytical Biochemistry, **181**:18-22 (1989).
- Ribeiro, M.J.S., J.T. Silva ve A.D. Panek, "Trehalose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* During Heat Shock", Biochimica et Biophysica Acta, **1200**:139-147 (1994).
- Rieger, M., O. Kaeppli ve A. Fiechter, "The Role of Limited Respiration in the Incomplete Oxidation of Glucose by *Saccharomyces cerevisiae*", Journal General Microbiology, **129**:43-49 (1983).
- Roach, P.J., Y. Cao, C.A. Corbett, A.A. DePaoli-Roach, I. Farkas, C.J. Fiol, H. Flotow, P.R. Graves, T.A. Hardy, T.W. Hrubey, E. Viskupic ve W. Zhang, "Glycogen Metabolism and Signal Transduction in Mammals and Yeast", Advances in Enzyme Regulation, **31**:101-120 (1991).
- Rocha-Leao, M.H.M., A.D. Panek ve V.L.A. Costa-Carvalho, "Glycogen Accumulation During Growth of *Saccharomyces cerevisiae*;

- Catabolite Repression Effects", IRCS Medical Science: Biochemistry, **12**:411-412 (1984).
- Rocha-Leao, M.H.M., D.F. Meireles ve V.L.A. Costa-Carvalho, "Stimulation of Glycogen Formation During Growth of Non-Repressed *Saccharomyces cerevisiae*", FEMS Microbiology Letters, **44**:423-425 (1987).
- Rothman-Denes, L.B. ve E. Cabib, "Glucose-6-P-Dependent and Independent Forms of Yeast Glycogen Synthetase. Their Properties and Interconversions", Biochemistry, **10**:1236-1242 (1971).
- Sonnleitner, B. ve O. Kaeppli, "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of Hypothesis", Biotechnology and Bioengineering, **28**:927-937 (1986).
- Sonnleitner, B. ve U. Hahnemann, "Dynamics of the Respiratory Bottleneck of *Saccharomyces cerevisiae*", Journal of Biotechnology, **38**:63-79 (1994).
- Stewart, P.R., "Analytical Methods for Yeasts", Methods in Cellular Biology, Editör: D.W. Prescott, Academic Press, New York, **12**:11-145 (1975).
- Tanabe, S., M. Kobayashi ve K. Matsuda, "Yeast Glycogen Phosphorylase: Characterization of the Dimeric Form and its Activation", Agriculture and Biological Chemistry, **51**: 2465-2471 (1987).
- Tanabe, S., M. Kobayashi ve K. Matsuda, "Yeast Glycogen Phosphorylase: Kinetic Properties Compared with Muscle and Potato Enzymes", Agriculture and Biological Chemistry, **52**: 757-764 (1988).
- Thevelein, J.M. ve M. Beullens, "Cyclic-AMP and the Stimulation of Trehalase Activity in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Carbon Sources, Nitrogen Sources and Inhibitors of Protein Synthesis", Journal of General Microbiology, **131**:3199-3209 (1985).
- Thevelein, J.M., "Regulation of Trehalose Mobilization in Fungi", Microbiological Reviews, **Mar.**:42-59 (1984).
- Thevelein, J.M., "Signal Transduction in Yeast", Yeast, **10**:1753-1790 (1994).
- Uno, I., K. Matsumoto, K. Adachi ve T. Ishikawa, "Genetic and Biochemical Evidence that Trehalase is a Substrate of c-AMP-Dependent Protein Kinase in Yeast", The Journal of Biological Chemistry, **258**:10867-10872 (1983).
- Van der Cammen, A., J. François ve H.G. Hers, "Characterization of Trehalose-6-Phosphate Synthase and Trehalose-6-Phosphate of

- Saccharomyces cerevisiae*", European Journal of Biochemistry, **182**:613-620 (1989).
- Van der Plaats ve P. van Solingen, "Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate Stimulates Trehalose Degradation in Bakers' Yeast", Biochemical and Biophysical Research Communications, **56**:580-587 (1974).
- Van Urk, H., E. Postma, W. A. Scheffers ve J.P. van Dijken, "Glucose Transport in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts", Journal of General Microbiology, **135**:2399-2406 (1989).
- Verduyn, C., E. Postma, W.A. Scheffers ve J.P. van Dijken, "Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Anaerobic Glucose-Limited Chemostat Cultures", Journal of General Microbiology, **136**:405-412 (1990 a).
- Verduyn, C., E. Postma, W.A. Scheffers ve J.P. van Dijken, "Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in Anaerobic Glucose-Limited Chemostat Cultures", Journal of General Microbiology, **136**:395-403 (1990 b).
- Vicente-Soler, J., J.C. Argüelles ve M. Gacto, "Proteolytic Activation of  $\alpha,\alpha$ -Trehalose-6-Phosphate Synthase in *Candida utilis*", FEMS Microbiology Letters, **82**:157-162 (1991).
- Virgilio, de C., U. Simmen, T. Hottiger, T. Boller ve A. Wiemken, "Heat Shock Induces Enzymes of Trehalose Metabolism, Trehalose Accumulation, and Thermotolerance in *Shizosaccharomyces pombe*, Even in the Presence of Cycloheximide", FEBS Letters, **273**:107-110 (1990).
- Waldron, C. ve F. Lacroute, "Effect of Growth Rate on the Amounts of Ribosomal and Transfer Ribonucleic Acids in Yeast", Journal of Bacteriology, **June**:855-865 (1975).
- Wehr, C.T. ve L.W. Parks, "Macromolecular Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in Different Growth Media", Journal of Bacteriology, **May**:458-466 (1969).
- Wiemken, A. ve M. Schellenberg, "Does a cyclic AMP-Dependent Phosphorylation Initiate the Transfer of Trehalase from the Cytosol into the Vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*?", FEBS Letters, **150**:329-331 (1982).
- Wiemken, A., "Trehalose in Yeast, Stress Protectant Rather than Reserve Carbohydrate", Antonie van Leeuwenhoek, **58**:209-217 (1990).
- Winkler, K., I. Kienle, M. Burgert, J.C. Wagner ve H. Holzer, "Metabolic Regulation of the Trehalose Content of Vegetative Yeast", FEBS Letters, **291**:269-272 (1991).



Zikmanis, P.B., R.V. Kruche, L.C. Auzinya, M.V. Margevizha ve M.B. Beker,  
“Distribution of Trehalose Between Dehydrated *Saccharomyces cerevisiae* Cells and the Rehydration Medium”, Microbiology,  
57:491-493 (1988).

## BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

|  |
|--|
| 1. Proje no: KTÇAG - 114   |
| 2. Rapor Tarihi: Kasım 1995  |
| 3. Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.2.1993 - 31.7.1995   |
| 4. Projenin Adı: Ekmek Mayası Kültürlerinin Üretim Sırasında, Depo ve Koruyucu Madde Biriktirmelerinin Metabolik Temellerinin İncelenmesi  |
| 5. Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:<br>Prof. Dr. Haluk HAMAMCI, Doç. Dr. Alev BAYINDIRLI, Doç. Dr. Talat ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Levent DAĞAŞAN, Doç. Dr. Mustafa TÜRKER, Dr. Nüzhet ERTUĞAY  |
| 6. Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:<br>Orta Doğu Teknik Üniversitesi<br>Gıda Mühendisliği Bölümü<br>Ankara 06531  |
| 7. Destekeyen Kuruluşların Adı ve Adresi:<br>- TÜBİTAK<br>Atatürk Bulvarı No: 221 Kavaklıdere, Ankara 06100<br>- Pak Gıda A.Ş., P.K. 119, Kocaeli 41001  |
| 8. Öz (Abstract):<br>Ekte verilmiştir.   |
| 9. Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler:<br>- N. Ertugay, H. Hamamcı ve A. Bayındırlı, "The Effect of Temperature and Dilution Rate on the Macromolecular Composition of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", 6. European Congress on Biotechnology, 1993, Floransa, İtalya.<br>- N. Ertugay, H. Hamamcı ve A. Bayındırlı, "Sıcaklığın ve Seyrelme Hızının Ekmek Mayasının Makromoleküler Bileşimine Etkisi", 1. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 1994, Ankara.<br>- N. Ertugay, H. Hamamcı ve A. Bayındırlı, "Effect of Dilution Rate, Heat Shock and Phosphate Starvation on the Macromolecular Composition of Bakers' Yeast", 7. European Congress on Biotechnology, 1995, Nice, Fransa.<br>- N. Ertugay, H. Hamamcı ve A. Bayındırlı, "Effect of Dilution Rate, Heat Shock and Phosphate Starvation on the Macromolecular Composition of Bakers' Yeast", European Research Conferences: Control of Metabolic Flux: Metabolic Pathway Engineering in Yeasts, 1995, Granada, İspanya.<br>- N. Ertugay, H. Hamamcı ve A. Bayındırlı, "Effect of Nutrient Starvation and Heat Shock on the Macromolecular Composition of Bakers' Yeast in Fed-Batch Culture", European Federation of Biotechnology: Symposium on Modelling for Improved Bioreactor Performance III, 1995, Poina Brasov, Romanya |
| 10. Bilim Dalı:<br>Doçentlik B. Dalı Kodu: SIC Kodu:<br>Uzmanlık alanı Kodu:   |
| 11. Dağıtım: Sınırsız  |
| 12. Raporun Gizlilik Durumu: Gizli Değil.  |