

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ÇEVRESEL BİYOTEKNOLOJİDE UYGULAMA POTANSİYELİNE
SAHİP METİLOTROFİK MAYA TÜRLERİNİN İZOLASYON VE
İDENTİFİKASYONLARI**

Zübeyde HANOL

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.04

Sunuş tarihi: 13/02/2009

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Füsün UÇAR

Bornova

Zübeyde HANOL tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “**Çevresel Biyoteknolojide Uygulama Potansiyeline Sahip Metilotrofik Maya Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonları**” başlıklı bu çalışma, E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13/02/2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Füsun B. UÇAR

Raportör Üye : Doç. Dr. Mustafa ATEŞ

Üye : Prof. Dr. Abdurrahman Ü. TAMER

ÖZET**ÇEVRESEL BİYOTEKNOLOJİDE UYGULAMA POTANSİYELİNE
SAHİP METİLOTROFİK MAYA TÜRLERİNİN İZOLASYON VE
İDENTİFİKASYONLARI****HANOL, Zübeyde****Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü****Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Füsün UÇAR**

Bu tezde, özellikle çürümekte olan bitkiler ve organik materyal açısından zengin olan topraklardan, çiğ süttten, çürümüş meyve ve turşu suyundan izole edilmiş metilotrofik mayaların tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla 42 maya izole edilmiştir. Bu 42 izolat fakültatif oldukları düşünülerek öncelikle MYGP ortamında büyütülmüştür. MYGP besiyerinde 19 numaralı izolat üremediğinden metanol açısından obligat olduğu düşünülerek metanollü N-Base agarda büyütülmeye çalışılmıştır. Fakat burada da üremediğinden daha sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır. Daha sonra bu strainler Yeast Ekstrakt Broth ortamı kullanılarak bu besiyerine değişen konsantrasyonlarda (% 1(v/v), %2(v/v), %3(v/v), %4(v/v), %5(v/v), %6(v/v), %7(v/v) metanol koyarak izolatların bu konsantrasyonlarda üreyip ümediği test edilmiştir. Sonuçta 42 izolattan 26 tanesinin %1- %6 arasındaki konsantrasyonlarda üreme yoğunlukları arasında farklılık olmasına rağmen hepsinin ürettiği görülmüştür. Daha sonra bu türler metanol toleransı, formaldehid'i kullanma kapasitesi ve metilamini kullanma kapasiteleri açısından test edilmiştir.

Bu izolatların tanımlanmaları fenotipik testler ile yapılmıştır. Fenotipik testler sonucunda 42 izolattan 26 tanesi (2, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 25, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ve 42 numaralı izolatlar) metilotrofik maya olarak tanımlanmıştır.

Karbon monoksit, karbon dioksit, metan ve metanol gibi tek karbonlu bileşikler, bazı mikroorganizmalar tarafından kullanılmakta veya sentezlenmektedir. Bu bileşikler arasında mikrobiyal endüstride en çok tercih edileni, oldukça saf halde ve bol miktarda bulunabilen metanoldür.

Bu çalışmada, çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve metanolü tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen 26 maya izolatu, bu mayaların morfolojik ve fizyolojik özelliklerinden yararlanılarak, çeşitli karbon ve azot kaynaklarının asimilasyonu, karbon kaynaklarının fermentasyonu, farklı sıcaklıklarda büyüme, üre hidrolizi, vitamin ihtiyacı gibi testler ile genus ve tür düzeyinde tanılanmıştır. Bu izolatlardan 10 tanesi *Pichia angusta*, 2 tanesi *Candida boidinii*, 2 tanesi *P.kodamae*, 2 tanesi *P. pini*, 2 tanesi *P. methanolica*, 1 tanesi *C.methanosorbosa*, 1 tanesi *C.nomedendra*, 5 tanesi ise *P. ciferrii* ve 1 tanesi *C.ovalis* olarak tanılanmıştır. Farklı metanol konsantrasyonları ile ilgili yapılan testte (konsantrasyon oranları %1(v/v), %2(v/v), %3(v/v), %4(v/v), %5(v/v), %6(v/v), %7(v/v)) bu konsantrasyonlara en toleranslı türün *P.angusta* olduğu görülmüştür. %7 ml'lik metanol konsantrasyonunda ise hiç üreme görülmemiştir. Metilamin ve formaldehit denemelerinde ise türler metilamin ve formaldehiti kullanabilmişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Metilotrofik mayalar, metanol, identifikasyon

ABSTRACT**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF METHYLOTROPHIC
YEAST SPECIES THAT HAVE POTENTIAL APPLICATION IN THE
ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY****HANOL, Zübeyde****MSc in Biology Department****Supervisor: Prof. Dr. Füsun B. UÇAR**

In this thesis, identification of the yeasts that were isolated from the soil rich in decaying plants and organic materials, raw milk, decaying fruit juice and decaying pickle has been intended. In this reason, 42 yeast isolate were isolated. These 42 isolates which have been thought fakultativ they first of all have been grown at MYGP medium. 19 numbered isolate didn't reproduce at MYGP with respect to methanol, it has been tried to be grown as it has been thought as obligationas it didn't reproduce here as well it hasn't been used in other studies. After then these strains have been tested whether they been produced or not by putting methanol with changing concentrations (1%(v/v), 2%(v/v), 3%(v/v), 4%(v/v), 5%(v/v), 6%(v/v), 7%(v/v)) a yeast extract broth medium.

It has been realised that all of 26 of 42 isolate can grow between 1%-6% methanol rate although, they have different reproduction density. Afterwards these isolate have been tested for tolerance to methanol, capacity to use formaldehyde and capacity to use methylamine.

These isolates identified with phenotypic tests. Result of the phenotypic tests, 26 of the 42 isolates (2, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

VIII

20, 21, 24, 25, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 and 42 numbered strains) identified as methylotrophic yeast.

Compound having one carbon such as carbon monoxide, carbon dioxide, methane and methanol are utilized or synthesized by some microorganisms. Of these compounds, methanol is considered to be preferable for the microbial industry because of its high purity and abundance.

In this study, twenty six yeast isolates which can utilize methanol as sole carbon and energy source, were identified at genus and species level by using different tests such as assimilation of carbon and nitrogen source, fermentation of carbon sources, urea hydrolysis, growth at different temperatures and vitamin requirements. In conclusion, ten of twenty six isolates were classified as *Pichia angusta*, two of twenty six isolates were classified as *Candida boidinii*, two of twenty six isolates were classified as *P.kodamae*, two of twenty six isolates were classified as *P.pini*, two of twenty six isolates were classified as *P.methanolica*, one of twenty six isolates was classified as *C.methanosorbosa*, one of twenty six isolates was classified as *C.nomedendra*, five of twenty six isolates were classified as *P.ciferrii* and one of twenty six isolate was classified as *C.ovalis*. Afterwards, these species were tested for tolerance to methanol, capacity to use of formaldehyde and capacity to use of methylamine. The test, which we made about different methanol concentration (the rate of concentration: 1%(v/v), 2%(v/v), 3%(v/v), 4%(v/v), 5%(v/v), 6%(v/v), 7%(v/v), was determined that the most tolerant species was *P.angusta*. Any species were no proliferation at 7% concentration of methanol. The experiments of methylamine and formaldehyde, the species can use the compound of methylamin an formaldehyde.

Key Words: Methylotrophic yeast, methanol, identification

TEŞEKKÜR

Öncelikle, güncel nitelik taşıyan bu çalışma konusunu öneren ve çalışmam süresince değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım, Sayın Prof. Dr. Füsün UÇAR'a, tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen ve sürekli desteğini gördüğüm, Sayın Araş. Gör. Dr. H. Tansel ÖZTÜRK YALÇIN'a ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bölümü eğitim elemanlarına ve araştırma görevlilerine, çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, çalışmalarım sırasında değerli yardımlarını gördüğüm Sayın Biyolog Tekin GEZER'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince beni maddi-manevi destekleyen ve bulunduğu yere gelmemde büyük emekleri olan kıymetli aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER**Sayfa No**

ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XX
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	6
2.1. Metilotrofik Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	6
2.2. İzolatların Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik Testler.....	10
2.2.1. Pseudomisel oluşturmayan vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi.....	10
2.2.2. Pseudomiselli büyümenin mikroskopik olarak incelenmesi.....	10
2.2.3. Ballistosporların mikroskopik olarak incelenmesi.....	11
2.2.4. Ascosporların mikroskopik olarak incelenmesi.....	11
2.3. Tanımlamada kullanılan fizyolojik testler.....	12
2.3.1. Aerobik büyüme için karbon kaynağı olarak organik bileşikleri kullanma kapasitesi.....	12
2.3.2. Aerobik büyüme için azot kaynaklarını kullanma kapasitesinin belirlenmesi.....	14
2.3.3. Şekerleri anaerobik olarak kullanma kapasitesinin belirlenmesi	14
2.3.4. Vitamin ihtiyacının belirlenmesi.....	15
2.3.5. Hücre dışı nişasta benzeri bileşiklerin üretiminin belirlenmesi..	15

2.3.6. Cycloheximide varlığında büyümenin belirlenmesi.....	16
2.3.7. Üreaz testi.....	16
2.3.8. Diazonium Blue B (DBB) Testi.....	17
2.3.9. 37° C 'ta ve diğer sıcaklıklarda büyüme.....	18
2.4. Metilotrofik Mayalarda Metanol Metabolizması ve Enzimler.....	18
2.5. Metanol Metabolizmasının Regülasyonu.....	25
2.5.1. Genel özellikler.....	25
2.5.2. Karbon akışının düzenlenmesi ve formaldehitin disimilator ve asimilator yollarında paylaşımı.....	27
2.5.3. Metilotrofik Metabolizmada Temel Bir Bileşik Olan Formaldehit.....	29
2.5.4. Formaldehit Detoksifikasyonunda Bulunan Kofaktörler.....	32
2.5.5. Metilotrofik Mayalarda Formaldehit Detoksifikasyonu.....	34
2.6. Metilotrofik Mayaların Kullanım Alanları.....	36
2.6.1. Tek hücre proteini (THP) üretimi.....	36
2.6.1.1. Tek hücre proteini ve kullanım alanları.....	38
2.6.1.2. THP üretiminde mikroorganizmaların seçimi ve metanolün avantajları.....	39
2.6.1.3. Endüstriyel ölçekte THP üretimi.....	42
2.6.2. Metilotrofik Mayaların Kimyasal Maddelerin Üretiminde Kullanılması.....	44
2.6.2.1. Amino asitlerin üretimi.....	44

XIII

2.6.2.2. Nükletid koenzim üretimi.....	45
2.6.2.3. Metil keton üretimi.....	46
2.6.2.4. Sitrik asit üretimi.....	47
2.6.2.5. Gliserol üretimi.....	47
2.6.2.6. Poliollerin üretimi.....	48
2.6.2.7. Metilotrofik mayalar ve enzimlerinin biyokatalizör olarak kullanılması.....	49
2.7. Metilotrofik Mayalarla İlgili Genetik Çalışmalar.....	50
2.7.1. Metanolle regüle edilen genler.....	51
2.8. Metilotrofik Mayaların Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılması.....	52
2.8.1. Metilotrofik mayaların biyoteknolojik uygulamalardaki hücresel fonksiyonları.....	53
2.8.2. Metilotrofik mayalarda güçlü ve regüle edilebilir genler.....	54
2.8.3. Metilotrofik mayaların heterolog gen ifadeleri için taşıyıcı olarak kullanılması.....	56
2.8.4. <i>Pichia pastoris</i> 'in heterolog proteinlerin üretiminde taşıyıcı sistem olarak kullanılması.....	57
2.8.5. <i>Pichia pastoris</i> 'ten heterolog proteinlerin salgılanması.....	59
2.9. Metilotrofik Mayalarla İlgili Olarak Ülkemizde Yapılan Çalışmalar.....	60
3. MATERYAL VE METOTLAR.....	61

3.1. Materyal.....	61
3.1.1. Kullanılan örnekler.....	61
3.1.2. Mayaların İzolasyonu ve Tanılanmasında Kullanılan Besiyerleri.....	63
3.1.2.1. Zenginleştirme besiyeri.....	63
3.1.2.2. İzolasyon besiyeri.....	63
3.1.2.3. Tanılama besiyerleri.....	64
3.1.3. Boya ve Çözeltiler.....	69
3.2. Metot.....	71
3.2.1. Mayaların İzolasyonu.....	71
3.2.2. Mayaların İdentifikasyonu.....	71
3.2.2.1. Metilotrofik Olduğu Düşünülen Mayaların Farklı Metanol Konsantrasyonlarına Olan Toleranslarının Saptanması.....	72
3.2.2.2. Farklı Sıcaklıklarda Büyüme	72
3.2.2.3. Metilotrofik Olduğu Düşünülen Mayaların Formaldehiti Kullanma Kapasitesinin Saptanması.....	72
3.2.2.4. Metilotrofik Olduğu Düşünülen Mayaların Metilamini Kullanma Kapasitesinin Saptanması.....	72
4. BULGULAR.....	74
4.1. İzolatların Elde Edilmesi.....	74
4.1.1. K arbon kaynağı olarak metanol kullanan mayaların değişen metanol konsantrasyonlarına olan toleransı.....	75

4.1.2 Karbon kaynağı olarak metanol kullanan mayaların formaldehiti kullanma kapasitesi.....	79
4.1.3. Karbon kaynağı olarak metanol kullanan mayaların metilamini kullanma kapasitesi.....	80
4.1.4. Farklı Sıcaklıklarda Büyüme.....	81
4.2. İzolatların Tanımlanması.....	84
4.3. Tanımlanan İzolatların Dahil Olduğu Genusların Özellikleri.....	94
4.3.1. <i>Pichia</i> Genusun Özellikleri.....	94
4.3.2. <i>Candida</i> genusunun özellikleri.....	94
4.4. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Fotoğrafları.....	111
5.TARTIŞMA.....	124
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	135
ÖZGEÇMİŞ.....	148

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

Şekil 2.1. Metilotrofik mayalarda metanol metabolizması (Kunze et al., 2005).....	18
Şekil 2.2. <i>Candida boidinii</i> de metanol metabolizması (Yurimoto et al.,2005).....	19
Şekil 2.3. Metilotrofik mayalarda metanol ve formaldehit oksidasyonu. Enzim kısaltmaları.....	25
Şekil 2.4. Metilotrof, ototrof ve metanojenlerin karbon döngüsündeki rolleri (Yurimoto et al.,2005).....	30
Şekil 2.5. Tek karbonlu bileşiklerin metilotrofik metabolizmadaki ana hatları(Yurimoto et al.,2005).....	31
Şekil 2.6. Formaldehit dönüşümünde bulunan kofaktörlerin yapısı (Yurimoto et al.,2005).....	33
Şekil 2.7. Kofaktör bağlı formaldehit dönüşümü (Yurimoto et al.,2005).....	33
Şekil 2.8. Biyokimya, Mikrobiyoloji ve Genetikte süper enzim oluşumu ve yeni protein sentezi için fermentatif ve enzimatik metotlar (Kato et al., 1999).....	54
Şekil 2.9. <i>Candida boidinii</i> 'de moleküler transformasyon.....	56
Şekil 4.1.12 numaralı izolatın MYGP agardaki kolonilerin 27°C'de 2 günlük görünümü.....	74
Şekil 4.2. % 1 Metanol İçeren Yeast Extract Broth'da Bazı İzolatların 2 Günlük Görünümü (işaretli izolatlar metilotrof olarak tanılanmıştır).....	76

XVIII

Şekil 4.3. %5 Metanol İçeren Yeast Extract Broth'da İzolatların 2	
Günlük Görünümü.....	76
Şekil 4.4. %7 Metanol İçeren Yeast Extract Broth'da İzolatların 2	
Günlük Görünümü (işaretli izolatlar metilotrof olarak tanılanmıştır).....	77
Şekil 4.5.33 numaralı izolatın %1 metanollü N Base agarda 27°C'de 2	
günlük genel koloni görünümü.....	77
Şekil 4.6.36 numaralı izolatın %1 metanollü N Base agarda 27°C'de 2 günlük	
genel koloni görünümü.....	78
Şekil 4.7.34 numaralı izolatın %1 metanollü N Base agarda 27°'de 2 günlük	
genel koloni görünümü.....	78
Şekil 4.8.10 numaralı izolatın %1 metanollü N Base agarda 27°C'de 2 günlük	
genel koloni görünümü.....	79
Şekil 4.9. % 1 Formaldehit İçeren Yeast Extract Broth'da İzolatların 2	
Günlük Görünümü (işaretli izolatlar metilotrofik olarak tanılanmıştır).....	80
Şekil 4.10. % 1 Metilamin İçeren Yeast Extract Broth'da İzolatların 2 Günlük	
Görünümü (işaretli izolatlar metilotrofik olarak tanılanmıştır).....	81
Şekil 4.11. Malt Ekstrakt agarda 40 °C'de kolonilerin 2 günlük görünümü..	82
Şekil 4.12. Malt Ekstrakt Agarda 45°C'de kolonilerin 2 günlük görünümü..	83
Şekil 4.13. Malt ekstrakt agarda kolonilerin 48°C'de 2 günlük görünümü...	83
Şekil 4.14. Malt ekstrakt agarda kolonilerin 50 ⁰ C'de 2 günlük görünümü...	84
Şekil 4.15. 18 numaralı izolat olan <i>Pichia methanolica</i> 'nın MYGP broth'daki	
vegetatif hücrelerinin 2 günlük görünümü.....	111
Şekil 4.16.18 numaralı izolat olan <i>P.methanolica</i> 'nın MYGP agarda 2 günlük	
genel koloni görünüşü.....	112
Şekil 4.17.36 numaralı izolat olan <i>P.angusta</i> 'nın MYGP broth'daki vegetatif	
hücrelerinin 27°C'deki 2 günlük görünümü.....	112

Şekil 4.18.34 numaralı izolat olan <i>P.ciferrii</i> 'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerinin 27°C'daki 2 günlük görünümü.....	113
Şekil 4.19. 10 numaralı izolat olan <i>P.pini</i> 'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerin 27°C'da 2 günlük görünümü.....	113
Şekil 4.20.12 numaralı izolat olan <i>P.kodamae</i> 'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerin 27°C'da 2 günlük görünümü.....	114
Şekil 4.21.12 numaralı izolat olan <i>P.kodamae</i> 'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerin 27°C'da 2 günlük görünümü.....	114
Şekil 4.22.33 numaralı izolat olan <i>C.boidinii</i> 'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerin 27°C'da 2 günlük görünümü.....	115
Şekil 4.23. Üre Agar'da 27 ⁰ C'da 2 Günlük Kolonilerin Üre Hidrolizi Testi.....	115
Şekil 4.24. MYGP agarda 27°C'da 10 günlük kolonilerin 55°C'da 1- 2 saat tutulmasıyla oluşan DBB testi.....	116
Şekil 4.25. D-Glukoz İçeren Yeast Extract Broth'da 27 ⁰ C'de 7 Günlük Fermentasyon Testi.....	116
Şekil 4.26. Fenotipik Tanılama Testlerinde İzolatların Ekilmesinde İzlenilen Sıra; 1- 42 Arası İzolat Numaraları.....	117
Şekil 4.27. N- Base Agarda 27 ⁰ C'de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü (NegatifKontrol).....	117
Şekil 4.28. %1 Metanol İçeren N- Base Agarda 27°C'de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	118
Şekil 4.29. %10 NaCl içeren % 0.1 Metanollü N- Base Agarda 27°C'de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	118
Şekil 4.30. Trehaloz İçeren N- Base Agarda 27°C'de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	119
Şekil 4.31. Melibiose İçeren N- Base Agarda 27°C'de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	119

Şekil 4.32. Galaktoz İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	120
Şekil 4.33. Nitrat (NO ₃) İçeren C- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	120
Şekil 4.34. Sukroz İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	121
Şekil 4.35. Glukoz İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	121
Şekil 4.36. %0.01 Oranında Siklohekzimid İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	122
Şekil 4.37. Maltoz İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	122
Şekil 4.38. Eritritol İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü.....	123

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Metilotrofik Mayaların İzolasyonu İçin Optimum Koşullar (Rose and Harrison, 1989).....	8
Çizelge 2.2. Metilotrofik Mayaların Doğadaki Dağılımı (Ogata et al ., 1975).....	9
Çizelge 2.3. <i>Candida boidinii</i> ’ den saflaştırılmış Formaldehit Dehidrogenaz ve Formaldehit Dehidrogenaz enzimlerinin bazı özellikleri (Harder and Brooke, 1990).....	22
Çizelge 2.4. Xylulose Monofosfat Çevriminin Anahtar Enzimlerinin Bazı Özellikleri (<i>Candida boidinii</i> K1’ den saflaştırılmış enzimler) (Harder and Brooke, 1990).....	24
Çizelge 2.5. Genleri bozulmuş ırkların formaldehit oksidasyonu yolizindeki hücre miktarları (Yurimoto et al.,2005).....	36
Çizelge 2.6. Alkanlar ve Metanolden Endüstriyel Ölçekte THP Üretimi (Senez, 1986).....	40
Çizelge 2.7. Provesteen Tek Hücre Proteininin Tipik Kompozisyonu (Harder and Brooke, 1990).....	43
Çizelge 3.1. Mayaların İzole Edildiği Örnek Sayısı ve İzole Edildiği Kaynaklar.....	61
Çizelge 4.1. Metanol Kullanan Mayaların Tayin Anahtarı (Barnett et al., 2000).....	86

Çizelge 4.2. Glukozu Fermente Eden Mayaların Tayin Anahtarı (Barnett, 2000).....	88
Çizelge 4.3. Mayaların İzole Edildiği Kaynaklara Göre Genus ve Türlerin Dağılımı.....	91
Çizelge 4.4. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri (Alexopoulos et al., 1996).....	93
Çizelge 4.5 Tanımlanan İzolatların Literatürde Verilen Özellikleri ile Morfolojik ve Fizyolojik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması (Barnett et al., 2000).....	95

1. GİRİŞ

Tek karbon ve enerji kaynağı olarak metanol içeren sentetik ortamlarda büyüeyebilen mikroorganizmalar metilotrof olarak tanımlanmaktadır (Large, 1983., Tani, 1991., Yurimoto et al., 2005).

Karbon monoksit, karbon dioksit, metan, metanol gibi tek karbonlu bileşiklerin (Tani., 1991 and Yurimoto et al., 2005) mikroorganizmalar tarafından kullanıldığı , 1800'lerin sonundan beri bilinmekteydi (Harder and Brooke., 1990). Ancak bu konu ilk olarak 1906 yılında von Söhngen tarafından rapor edilmiştir (Cooney et al., 1975).

Metanolün tek karbon ve enerji kaynağı olarak bulunduğu ortamlarda büyüeyebilen mayaların keşfedilmesi ise yakın tarihlere rastlamaktadır (Harder and Brooke., 1990). Böylece metanol ve formaldehit gibi tek karbonlu bileşikleri kullanabilen ökaryotik mikroorganizmalara metilotrofik maya denmiştir (Koloczek et al., 2001).

Mikrobiyal endüstride en çok kullanılan tek karbonlu bileşik metanoldür. Metanol, suyla karışabilen oldukça saf bir bileşiktir. Dolayısıyla metanollü sıvı atıkların işlenmesi de kolay olmaktadır. Metanol doğal gazların temel bileşeni ve organik bir atık olan metanın fotooksidasyonu ile oluşur. Doğal gazın yenilenebilir bir enerji kaynağı olması metanolün önemini daha da arttırmaktadır (Yurimoto et al., 2008).

Metanol ayrıca lignin, hemiselülozlar ve pektinin dekompozisyonu sonucu bitkisel materyallerde de bulunmaktadır (Large., 1983). Metanolde mikrobiyal büyüme 1960'ların ortalarına yani metanolün ticari fermentasyonda kullanılabilecek potansiyel bir hammadde olduğu anlaşılan kadar sadece laboratuvar çapında ilgi duyulan bir konu olarak kalmıştır (Cooney et al.,1975). Bu tarihler, metanolün çok düşük maliyetle

üretilmesine olanak sağlayacak olan çok miktarda doğal metan rezervinin keşfedildiği döneme rastlamaktadır.

Zamanla protein kaynakları konusunda sıkıntı çekileceği düşüncesiyle petrol bazlı üretim sistemlerinden elde edilen tek karbonlu bileşiklerin kullanılması için biyolojik metotların kullanılması gerekli görüldüğünden, bu kaynakları kullanabilen organizmalar yoğun bir araştırma konusu haline gelmiştir (Woodward, 1989). Aynı yıllarda, tek hücre proteini üretiminde büyük bir ilgi başlamış ve pek çok firma tek hücre proteini prosesleri geliştirmiştir (Harder and Brooke.,1990).

THP prosesi için kullanılacak substratın ucuz, bol miktarda, toksik kalıntılar içermeyen ve mikrobiyal büyümeyi destekleyecek özellikte olması gerekir. Büyük ölçekli proseslerde bu özelliklere uygun olarak daha çok metan, metanol ve parafinler tercih edilmektedir (Large., 1983 and Goma., 1986). Ayrıca metanol metandan daha fazla oksidasyon potansiyeline sahip olduğu için hücre metabolizması ve biyosentezinde enzimatik dönüşümler için metandan daha uygundur (Goma., 1986 and Yurimoto et al., 2005).

Petrolde THP üretiminde atık petrolün değerlendirilmesi üretim maliyetinin azaltılmasını sağlamaktadır. Ayrıca metilotrofik bakteri ve mayaların kullanıldığı proseslerde aseptik koşullar gerekmediğinden yatırım ve işletme maliyetleri oldukça düşmektedir. Metanın metanole biyolojik dönüşümü daha çok bakterilerle sağlanmaktadır. Bunun sebebi metan parçalayan bakteri sayısının çok fazla olmasıdır. Yıllarca metanı sadece obligat metilotrofik bakterilerin parçalayabildiği düşünülmüştür. Fakat son yıllarda metanı parçalayabilen metilotrofik mayalar da izole edilmiştir (Harder and Brooke., 1990; Yurimoto et al., 2005).

Mikroorganizmaların metanolü kullanmasıyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır, bu alanla ilgili çalışmaların çoğu bakterilerle ilgilidir (Cooney et

al., 1975). Fakat mayaların metanolü kullanmasıyla ilgili yapılan çalışmalar oldukça azdır. 1975 yılından itibaren metilotrofik mayalardaki enerji dönüşümünün biyokimyası belirlenmeye başlanmış. Daha sonra karbon asimilasyonu yol izi belirlenmeye başlanmış (Fonseca et al., 2003). Metanol metabolizmasındaki anahtar enzimler olan alkol oksidaz, katalaz ve dihidroksi aseton sentaz peroksizomlarda bulunmaktadır. Metanol metabolizması ile ilgili diğerk enzimler hücreseldir (Dorgai et al., 2005 and Gingeras et al., 1985).

Metanolün mikrobiyal metabolizmasının tam olarak anlaşılabilmesi yenilenebilir kaynaklardan kullanılışlı bileşiklerin üretilmesi için gereklidir (Yurimoto et al., 2005). Metan atmosferde anaerobik çevrelerde bulunur. Metanın mikrobial oksidasyonu toprakta ve aquatik çevrelerde gerçekleşir. Buralarda metanın atmosferdeki emisyonu feedback mekanizmasıyla ayarlanır. Bu yüzden metan kullanan mikroorganizmaların metan emisyonunda biyofiltre olarak önemli rolleri vardır (Rhem., 1986;Yurimoto et al., 2005).

Bununla birlikte formaldehit metan döngüsünde sitotoksik bir ara bileşik olduğundan bu bileşiğın kullanılması bazı çevrelerde önemli bir sorundur. Metanolün mikroorganizmalar tarafından etkili olarak kullanılabilmesi için metilotrofların bu toksik bileşiği nasıl detoksifike ettiklerinin moleküler mekanizmasını anlamak gerekmektedir. Son yıllarda mikroorganizmaların tek karbonlu bileşikler üzerinde büyüme sırasında formaldehitin toksik etkisini regüle eden birkaç biyokimyasal ve genetik yaklaşımda bulunulmuştur (Yurimoto et al., 2005).

Metilotrofik mayaların metabolizması hakkındaki bilgiler arttıkça, ilgi odağı THP üretiminden başka ürünler ve metabolitlerin üretimi konularına kaymıştır. Metilotrofik mayaların ve enzimlerinin biyokatalizör olarak

kullanımıyla aldehitler, gliserol, sorbitol, xylitol, amino asitler, nükleotid koenzim, metil keton, sitrik asit ve metanolün asimilasyon yoliziyle ilgili metabolitlerin üretimi ile metilotrofik mayaların heterolog gen ifadeleri için taşıyıcı olarak kullanılmaları (Klei et al., 2005, Fonseca et al., 2003), THP üretiminden sonra ilgi duyulmaya başlanan diğer konulardandır (Harder and Brooke., 1990).

Metilotrofik mayalarla ilgili yapılan son çalışmalar bu mayaların heterolog protein sentezi için mükemmel taşıyıcı olduklarını göstermektedir. *Saccharomyces cerevisiae*'nin genetiği ve moleküler biyolojisi hakkındaki detaylı bilgiler sayesinde istenilen genlerin ifadesini sağlayacak çok sayıda ifade vektörü geliştirilmesine rağmen bu türdeki yabancı genlerin stoplazmik ifadesi verimli olmayıp istenilen ürünün biyolojik aktivitesi düşük olmaktadır (Uzeh and A.Ojokoh., 2005., Trotsenko and Ashin., 2000).

Tek karbonlu bileşikler üzerinde büyümekte olan metilotrofik mayalar peroksizomlarda bulunan yüksek oranda alkol oksidaz üretmektedir (Dunn and Tuttle.,1995). Bu özellik yabancı genlerin ifade edilmeleri için taşıyıcı olarak metilotrofik mayaların kullanılmasını ve yabancı proteinlerin, proteolize karşı korunacakları bir yer olan peroksizomlarda paketlenmelerini mümkün kılmaktadır (Harder and Brooke., 1990).

Genetikte ve klonlama tekniklerindeki gelişmeler, metanol yolizinin heterolog proteinlerin üretimi için ticari sistemlerde başarıyla kullanılmasını sağlamıştır. Bu konudaki en iyi örnek, hepatit B yüzey antijeninin üretilmesidir. Bu organizmaların ekolojileri tam olarak anlaşılmamakla beraber yukarıda saydığımız ortamlarda ağaçlardaki lignin ve meyvelerdeki pektinde bulunan metoksi gruplarının metanole dönüştürülebileceği düşünülmektedir. Metanol bu pektin bileşiğinin metil esterlerinin hidroliziyle oluştuğundan metilotrofik mayaların doğada parçalanmakta olan bitki

materyallerinden açığa çıkan metanolün metabolizinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla çürüten bitki materyalleri ve organik maddeler açısından zengin olan toprak örneklerinin metilotrofik mayaların izolasyonunda iyi örnekler olduğunu göstermektedir (Harder and Brooke., 1990).

Organik atıklarca zengin olan topraklarda metan gazı oluşmaktadır. Bu konuda uygulanmakta olan genel yöntem, bu alanlarda belli mesafelerde bacalar açılarak, oluşan metan gazının atmosfere bırakılması şeklindedir. Metan gazının birikmesi engellenemezse, bu gazın doğal özelliği sonucu patlamalar gerçekleşmektedir. Bu gibi alanların doğal mikroflorası metanı parçalayabilecek özellikte bakteri ve mayaları bulundurduğu takdirde, oluşan metan gazı birikmeden bu mikroorganizmalar tarafından parçalanmış olacağından, patlama tehlikesi de ortadan kalkacaktır (Yurimoto et al., 2005).

Günümüze kadar incelenmiş metilotrofik mayaların hepsi obligat metilotroflardı. Metan, metilamin, formaldehit ve format gibi diğer tek karbonlu bileşikleri parçalayamamaktaydı. Fakat son yıllarda yapılan genetik çalışmaların sonucunda metilotrofik mayaların bu bileşikleri parçalayabildiği görülmüştür (Spencer et al., 2002).

Bu çalışmada özellikle organik atıklarca zengin topraklardan metilotrofik mayaların izolasyonu ile genus ve tür düzeyinde tanımlanması ve tanımlanan bu türlerin farklı metanol konsantrasyonlarına olan toleranslarının ölçülmesi ve formaldehit ile metilamin gibi bileşikleri kullanıp kullanamadıklarının saptanması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2. 1. Metilotrofik Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Mikroorganizmaların tek karbon kaynağı olarak metanolü kullanması ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Son yıllarda ise metanolü kullanabilen mayalarla ilgili çalışmalar üzerinde durulmuştur (Cooney et al.,1975). Bu çalışmalar üzerine yoğunlaşılmasının sebebi mayaların büyük hücre boyutlarından dolayı santrifügasyon ya da filtrasyon sırasında geri alımının kolay olması, tek hücre proteini gibi mayaların insanlar tarafından tüketilebilir olması, yapılan işlemler sırasında kontaminasyon riskinin az olması ve maliyetinin daha düşük olmasıdır. Bu kriterler tek hücre proteini üretilmesi konusundaki çalışmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır (Cooney et al., 1975). İzolasyon ortamı olarak organik atıklarca zengin topraklar, çürümüş meyve, turşu suyu ve çiğ süt kullanılmıştır (Ogata et al., 1975).

Japonya’da mikroorganizmaların indirgenmiş tek karbonlu bileşiklerden yararlanmaları konusundaki araştırmalar Ogata et al.’ın metanolde büyüeyebilen bir maya olan *Kloeckera* sp. No 2201 hakkındaki ilk raporuyla büyük bir hız kazanmış ve 1974 yılında Tokyo’da tek karbonlu bileşiklerde mikrobiyal büyüme konusunda ilk uluslararası sempozyum düzenlenmiştir (Tani and Yamada.,1980)

Elde edilen bu bilgilerden sonra metanol üzerinde daha yüksek büyüme hızına sahip yeni metilotrofik mayalar araştırılmıştır. Bunlar arasında metanolü tek karbon kaynağı olarak kullanan *Candida methanolica*, *Torulopsis methanolovescens*, *Pichia*, *Candida* (Koloczec et al., 2006 and Gingeras et al.,1985), *Candida* N16, *Candida* N17, *Saccharomyces* H1, *Torulopsis* M1, *Pichia methanolica*, *T. methanosorbosa*, *T. methanodomecquii*, *Hansenula ofunaensis*, *T. nagoyaensis*, *P.methanothermo* ve *C. methanophilum* bulunmaktadır (Tani and Yamada, 1980).

İzole edilen metilotrofik mayaların metanol üzerindeki büyüme kapasitelerine bakıldığında bu büyüme potansiyelinin metanol üzerinde büyüyen bakterilerden daha düşük olduğu görülmüştür. Çünkü yapılan denemelerde büyüme için gerekli olan tüm optimum koşullar sağlandığında bile metilotrofik bakterilerde % 90'lık bir potansiyel görülmesine rağmen metilotrofik mayalarda aynı kapasite görülememiştir (Harder and Brooke, 1990).

Doğal kaynaklardan izole edilen metilotrofik mayaların çok sınırlı sayıda genusa ait olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda elde edilen türlerin çoğunun *Hansenula*, *Candida*, *Pichia* ve *Torulopsis* genuslarına ait olduğu görülmüştür (Gingeras et al., 1985, Large, 1983). Günümüzde yapılan çalışmalarda ise yeni bir genus olan *Trichosporon* genusu üzerinde çalışılmaktadır (Kaszycki et al., 2006).

Şimdiye kadar metilotrofik mayaların izolasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Örneğin metilotrofik mayaların penisilin ya da sikloserin gibi antibakteriyel bileşikler içeren kesikli tip zenginleştirme kültürlerinden Ph 4.5'te ya da daha düşük Ph'de yürütülen sürekli proseslerden başarılı izolasyonlar yapılmıştır.

Bununla birlikte optimum koşullar kullanıldığında en sık izole edilen türlerin *Pichia pinus* ve *Candida boidinii* olduğu görülürken daha sonraki izolasyon metotlarında metanol içeriği sınırlandırılmış yüksek sıcaklıktaki sürekli kültürler kullanıldığında *Hansenula polymorpha* türünün izole edildiği görülmüştür (Trotsenko et al., 2000).

Etkili Olan Faktörler	Optimum Koşullar
Ortamin pH 'ı	4.5
Antibiyotikler	Gerekli
Vitaminler	Biotin veya thiamin
Metanol konsantrasyonu	%0.1- 0.5 (v/v) (Bazı türlerin büyümesi, %0.5'ten yüksek konsantrasyonlarda inhibe olmaktadır.)
İzolasyonun yapılacağı kaynak	Organik madde açısından zengin topraklar.

Çizelge 2. 1. Metilotrofik Mayaların İzolasyonu İçin Optimum Koşullar (Rose and Harrison., 1989)

Başka bir çalışmada Ogata et al., (1975), çeşitli doğal kaynaklardan toplam 594 maya suşu izole etmişlerdir. Amonyum klorür, potasyum hidrofosfat, potasyum dihidrofosfat, yedi sulu magnezyum sülfat ve vitamin çözeltisi içeren bazal ortama % 1- 3 metanol ekleyerek maya kültürlerini 130 rpm' deki shaker üzerinde 28° C'de inkübe edip, hangi suşların metilotrofik olduğunu belirleyen araştırmacılar daha sonra bunları tanımlamışlardır (Lee and Komagata., 1983).

Bir başka çalışmada mayalar %2 metanol ya da istenen konsantrasyonlardaki ksenobiotikleri içeren optimal ya da minimal ortamlarda, oda sıcaklığında 200 rpm deki shakerlarda inkübe edilerek seçici besiyerlerinden mayaların izole edilerek türlerin tanımlanmasıdır (Kaszycki et al., 2006). Ogata et al.,'ın yaptığı çalışmaya göre metilotrofik mayaların doğadaki dağılışı aşağıdaki gibidir (Çizelge 2.2).

Örnek	Örnek Sayısı	Metilotropik Maya Sayısı	37°C'de Büyüyen Kültür Sayısı
Toprak	411	26	2
Çiçek	92	18	3
Ağaç	61	8	2
Meyve	20	2	0
Su	10	1	0
TOPLAM	594	55	7

Çizelge 2.2. Metilotropik Mayaların Doğadaki Dağılımı (Ogata et al ., 1975)

El Nawawy and Gnan kompost, çiğ süt, toprak, turşu ve çürük meyve örneklerinden % 0. 1- 0. 5 metanollü besiyerleri kullanarak metilotropik maya izolasyonu yapmışlar ve % 0. 1 oranında metanollü ortamda büyüeyebilen 24 maya izolatından bir *Rhodotorula* ve *Hansenula* suşu seçerek bunları başka özellikler açısından da incelemişlerdir. Günümüzde bu konuyla ilgili olarak özellikle başta formaldehit olmak üzere bu gibi ksenobiotiklerin doğada parçalanması incelenmektedir (Koloczek et al., 2001).

Mayaların %0. 4- 4 oranındaki metanol konsantrasyonlarında büyüme özellikleri yakın bir zamanda denenmiş, *Hansenula polymorpha*, *H. capsulata*, *H.glucozyma*, *H. nonfermentans*, *H.philodendra* ve *H. wickerhamii* türlerinin bu metanol konsantrasyonlarında büyüeyebildiği gözlenmiştir (Kratochilova., 1990). Bu konsantrasyonlarda büyüeyebilen metilotropik mayaların biyoteknolojide kullanılması son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Spencer et al., 2002).

Çalışmamızda organik atıklarca zengin topraklar, çürümüş meyve, çiğ süt ve turşu suyundan izolasyon yapılmıştır.

2. 2. İzolatların Tanımlanmasında Kullanılan Morfolojik Testler

2. 2. 1. Pseudomisel oluşturmeyen vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi

Vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesinin amacı, mayanın tomurcuklanmayla mı, fizyonla mı yoksa her iki yöntemle mi çoğaldığı, tomurcuk oluşturuyorsa bunun ana hücredeki yeri, şekli ve vejetatif hücrelerin şekli ve boyutunun belirlenmesidir. Bu incelemenin yapılabilmesi için, 100 ml'lik erlende bulunan 30 ml sıvı besiyerine (genellikle malt extract veya MYGP broth) bir günlük genç kültürden inokulasyon yapılarak, kültür 25- 28°C' de 3 gün inkübasyona bırakılmakta ve bu sürenin sonunda mikroskopik olarak incelenmektedir (Van der Walt, 1970 ve Barnet et al., 1983).

2. 2. 2. Pseudomiselli büyümenin mikroskopik olarak incelenmesi

Eğer bir maya tomurcuklanma ile çoğalıyorsa, olgunlaşmış tomurcuk ya hemen ana hücreden kendini ayırır ya da ana hücreye bağlı kalarak hücre zincirleri oluşmasını sağlar. Bazı mayaların hücre zincirleri oluşturma eğilimleri, pseudohyphae ya da pseudomycelium oluşmasına neden olmaktadır. Bu testin amacı, pseudomiselli büyümenin olup olmadığı, eğer varsa pseudomiselin tipi ve pseudomiselden büyüyen hücrelerin tipinin incelenmesidir. Bu inceleme için genellikle potato glucose agar veya rice agar kullanılmaktadır. Genellikle uygulanmakta olan iki yöntem bulunmaktadır. Bunlardan biri olan 'slide-culture' tekniğinde, içinde U şeklinde cam çubuk ve lam bulunan petriler sterilize edildikten sonra, eritilmiş besiyerinden lam üzerine bir damla damlatılıp üzerine steril lamel kapatılmakta ve lamelin dört kenarından, maya kültürü iğne öze ile inoküle

edilmektedir. Kuruma olmaması için bir miktar steril su eklenen petriler 25°C’de inkübe edilmekte ve preparat iki hafta boyunca iki günde bir mikroskop altında incelenmektedir (Van der Walt., 1970 ve Barnett et al., 1983).

Diğer yöntem ise ‘Dalmau plates’ yöntemidir. Bu yöntemde, agarlı besiyeri yeni dökülmüş petriler, yüzeylerinin kuruması için 1- 2 gün bekletilip, besiyerinin bir bölümüne tek çizgi ile, diğer bölümünde iki nokta inokulasyonu yapıldıktan sonra, çizginin orta kısmına ve noktalardan birinin üstüne steril lamel kapatılmakta ve preparat 25°C’de 7- 10 gün inkübasyondan sonra mikroskopta incelenmektedir (Wickerham., 1951 ve Van der Walt., 1970).

2. 2. 3. Ballistosporların mikroskopik olarak incelenmesi

Ballistoporların oluşumu, *Sporobolomycetaceae* familyasına üye olan bazı genusların karakteristiği olan özel bir reproduksiyon yoludur. Ballistosporlar, vejetatif hücrelerden çıkıntı yapan özel bir yapı içinde üretilmekte ve bir fırlatma mekanizmasıyla havaya bırakılmaktadır. Bu testin amacı, *Bullera*, *Sporobolomyces* veya *Sporodiobolus* genuslarının tanımlanmasıdır. Do Carmo- Sousa and Phaff, (1962) tarafından açıklanan yöntemde göre, malt extract agar hazırlanıp petrilere dökülerek petri yüzeyleri kurutulduktan sonra besiyeri, test edilecek maya ile (+) şeklinde inokule edilmekte, petriler aynı agarı içeren ve yüzeyine steril lam konulmuş ikinci petrilere, mayalar ballistospor oluşturuyorsa, alt petrideki agar üzerinde koloniler oluşacaktır (Wan der Walt., 1970, Barnett et al., 1983; Phaff et al., 1966).

2. 2. 4. Askosporların mikroskopik olarak incelenmesi

Bu testin amaçları: mayanın ascospor oluşturup oluşturmadığını saptamak, eğer oluşturuyorsa konjugasyon olmadan mı, konjugasyondan sonra mı ya da ana hücre ile tomurcuğun konjugasyonundan sonra mı oluşturuyor sorularının cevabını almak, ascospor ve ascusların şekil ve boyutlarını saptamaktır. Eğer ascosporlar

kolaylıkla oluşuyorsa identifikasyon da çok kolaylaşmaktadır. Ancak ascosporlar aşağıdaki nedenlerle görülmeyebilirler:

- Ortam uygun değildir.
- Suş heterothallic ve haploiddir.
- Ascusu ayırt etmek güçtür ve gözlemci uygunsuz deneme yapmıştır.
- Maya asporogeniktir yani ascospor oluşturmuyordur.

Bu test için bir gecelik maya kültüründen özel agara (Gorodkova agar, asetate agar gibi) inokulasyon yapılmakta ve kültür 25°C’de 3 gün inkübe edildikten sonra mikroskop altında incelenmektedir. Ascospor oluşumu gözlenmediyse kültürler 20° C’de 6 hafta boyunca ascospor oluşumu için gözlenmektedir (Phaff et al., 1966; Van der Walt., 1970 ve Barnett et al., 1983).

Schaeffer and Fulton’a göre (1933), ascosporların boyama prosedürü ise şu şekildedir: Isıyla fikse edilmiş preparatlar, 30- 60 saniye boyunca %5’lik malachite yeşilinden geçirilerek buharlaşma olana kadar 3- 4 defa ısıtılmakta ve fazla boya 30 saniye kadar, akan suyun altında durulandıktan sonra preparat 30 saniye boyunca %0. 5’lik safraninle boyanmaktadır. Olgun ascosporlar mikroskopta mavi- yeşil, vejetatif hücreler ise kırmızı renkte gözlenmektedir (Van der Walt., 1970).

2. 3. Tanımlamada kullanılan fizyolojik testler

Fizyolojik özellikler, esas olarak izolatları ayırt etmek ve tanımlamaya yaramaktadır. Rutin tanımlama için en yararlı olan karakteristikler, karbon ve azot kaynaklarının kullanımı, yüksek sıcaklıkta ve yüksek şeker konsantrasyonlarında büyüme, vitamin ihtiyacı gibi özelliklerdir (Van der Walt., 1970).

2. 3. 1. Aerobik büyüme için karbon kaynağı olarak organik bileşikler kullanma kapasitesi

Maya türlerini, organik bileşikler tek karbon kaynağı olarak kullanma yeteneklerine göre ayırt etmek mümkündür. Bu organik bileşikler, alditoller ve organik asitlerden oluşmaktadır. Bu testler “asimilasyon testleri” olarak

adlandırılmakta ve mayaların aerobik büyüme için bu bileşikleri kullanma kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu testlerde en yaygın olarak kullanılan yöntemler, tüplerde sıvı besiyeri kullanımı, agarlı besiyerinde oksonogram ve replica plate yöntemidir (Barnett et al., 1983).

Sıvı ortamda yapılan testte, tüplerdeki ortam yeast ekstrakt broth olup, negatif kontroller dışında tek bir test substratını yaklaşık 50mM oranında içermektedir. İnokulasyon için, test edilecek maya MYGP agarda büyütülmekte ve bunun bir gecelik kültüründen ekim yapılmaktadır. Büyüme ise bulanıklık yönünden incelenmektedir (Barnett et al., 1983).

Oksonogram yönteminde, sıvı besiyerinde büyütülmüş bir gecelik kültürden nitrogen- base agar içeren petrilere ekim yapıldıktan sonra, donmuş agar üzerinde, test edilecek karbon kaynağı bir spatül yardımıyla küçük bir yığın oluşturacak şekilde konulmakta ve petrilere inkübasyona bırakılmaktadır. Her petride en fazla üç karbon kaynağının test edilmesi uygun görülmektedir. Oksonogram metodunun bazı avantajları bulunmaktadır. Sıvı besiyerinin tersine, substratların sterilize edilmesine gerek yoktur, eğer varsa mikrobiyal kontaminantların belirlenmesi kolaydır, değişik substrat konsantrasyonlarına ve çözünürlüğü düşük olan test substratlarına tepkileri gözlemek mümkündür (Barnett et al., 1983).

Replica plating yönteminde, bir esas petrideki MYGP agarın yüzeyi, iğne öze ile yaklaşık 25 maya suşuyla belli bir plana göre inokule edildikten sonra, ayrı küçük kolonilerin oluşması için petri inkübasyona bırakılır. Petri üzerine işaret konularak belli bir yön oluşturulmalıdır. Baskının yapılacağı petrilere her biri 25mM karbon kaynağı ve nitrogen-base agar içermektedir. Baskı işleminin yapılacağı kadife bez ve bezin sarılı olduğu, petri kabına sığacak boyutta tahta blok, alüminyum folyoya sarılıp sterilize edilebilir. Esas petri, bu bloğa bastırılarak kolonilerin kadife üzerine çıkması sağlandıktan sonra, blokla sırasıyla diğer petrilere baskı ekim yapılarak petrilere inkübasyona bırakılmaktadır (Barnett et al., 1983).

2. 3. 2. Aerobik büyüme için azot kaynaklarını kullanma kapasitesinin belirlenmesi

Nitrati tek azot kaynağı olarak kullanma kapasitesinin belirlenmesi oldukça önemli bir testtir. Çünkü tüm maya türlerinin yaklaşık dörtte biri nitrati kullanabilmektedir. Nitrit, etilamin, L-lisin gibi diğer bazı azot kaynaklarının da test substratı olarak faydalı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Azot kaynaklarında aerobik büyüme testi, karbon kaynakları için kullanılan yöntemle aynı şekilde yapılmaktadır. Tek fark nitrogen-base yerine karbon-base ile hazırlanmış besiyerinin kullanılmasıdır. pH 6'dan düşük değerlerde nitroz asit oluştuğundan, nitrit mayalara toksik etki yapabilmektedir. Bu nedenle ortamın pH'sı 6. 5'e ayarlanmalıdır. Bu toksisite nedeniyle nitrit ve etilaminin test edilebilmesi için özellikle oksonogram yöntemi uygundur. Sıvı besiyeri kullanılacaksa azotlu test substratları 2- 5mM konsantrasyonda eklenmelidir (Barnett et al., 1983).

2. 3. 3. Şekerleri anaerobik olarak kullanma kapasitesinin belirlenmesi

Maya türlerinin yarısından fazlası en azından D-glukozu yarı anaerobik olarak fermente etmektedir. Bu testte 13 bileşiği (heksozlar veya heksozidler) kullanma kapasitesi, karbondioksit gazı oluşumu gözlenerek değerlendirilmektedir. Bu test için 150mm*12mm'lik büyük Durham tüpleri, içlerinde ters çevrilmiş 50mm*6mm'lik tüplerle kullanılmaktadır. Karbohidratların çözündürüldüğü bazal ortam, azot ve diğer besin maddelerini, iz elementleri ve vitaminleri içermelidir. Böylece karbohidratların sentezi ve taşınmasında görevli olan enzim sistemlerinin sentezi için optimum koşullar sağlanmış olur. Bazal ortamda, diğer fermente edilebilir şekerler bulunmamalıdır. Pratikte pepton- maya ekstraktı ile iyi sonuçlar elde edilmektedir. Tüplere 10- 15 ml besiyeri ve 50mM test şekeri eklenir. Negatif kontrol tüplerinde şeker bulunmamaktadır. Her tüp, aktif olarak büyümekte olan kültürden alınmış yaklaşık 107 hücre/ml besiyeri olacak şekilde 100µl maya süspansiyonu ile inokule edilmektedir.

Eğer maya, tüpteki şekeri aerobik olarak kullanıyorsa, besiyerinin üst kısmında büyüyerek o şekere adapte olur. Adapte olmuş (yani indüklenmiş veya derepresyona uğramış) hücreler, tüpün oksijen konsantrasyonunun düşük olduğu dip

kısmına inerler. Burada maya anaerobik bir mekanizmayla şekeri katabolize edebilir ve bunun sonucunda karbondioksit gazı açığa çıkarır. Çıkan gaz, ters çevrili tüpler içinde toplanır. Bu testte, inokule edilen tüpler 25°C’de yaklaşık 1 hafta inkübe edilerek, mayanın dibe çökmesini kolaylaştırmak için her gün çalkalanır ve tüplerde gaz oluşumu gözlenir (Barnett et al., 1983 ve Van der Walt., 1970).

2. 3. 4. Vitamin ihtiyacının belirlenmesi

Mayaların, belli vitaminleri dışarıdan sağlama ihtiyaçları farklıdır. Diagnostik bir özellik olarak, vitamin içermeyen bir ortamda büyüebilme yeteneğinin kullanılması, Wickerham (1951) tarafından geliştirilmiştir. Bu test, her vitaminin veya hepsinin yokluğunda mayaların büyüebilme yeteneğini belirlemekte ve vitaminler dışında, mayaların ihtiyaç duyabileceği her organik bileşiği içeren sıvı ortamda yapılmaktadır. Bir seri tüpte hiçbir vitamin bulunmazken, diğerlerinde her seferinde bir vitamin eksik tutulup diğerleri eklenerek testler gerçekleştirilmektedir. Aşağıdaki listede, 1litre besiyerine eklenmesi gereken vitamin miktarları verilmiştir (Barnett et al., 1983).

p-aminobenzoic acid	200 µg
Biotin	20 µg
Folic acid	2 µg
myo-inositol	10 µg
Nicotinic acid	400 µg
Pantothenate(Ca)	2 µg
Pyridoxine HCL	400 µg
Riboflavin	200 µg
Thiamin HCL	400 µg

2. 3. 5. Hücre dışı nişasta benzeri bileşiklerin üretiminin belirlenmesi

Bu testin amacı, karakteristik olarak, iyotla mavi renk veren nişasta benzeri polisakkaritler oluşturan, özellikle *Cryptococcus* genusuna ait belli türlerin tanımlanmasıdır. Şekerli bir sıvı ortamda pozitif büyüme elde edilmiş bir tüpe 1 damla Lugol iyot çözeltisi damlatılarak çalkalandıktan sonra renk değişimi olup

olmadığı gözlenmektedir. Mavi, mor veya yeşil renk sonucun pozitif olduğunu göstermektedir (Barnett et al., 1983).

2. 3. 6. Cycloheximide varlığında büyümenin belirlenmesi

Cycloheximide, 80S ribozomlarda protein sentezini inhibe ederek ökaryotların büyümesini durduran bir antibiyotiktir. Cycloheximide'e dirençli olan mayaların ribozomları modifiye edilmiş olabilmektedir. Mayaların bu antibiyotiğe değişik duyarlılık gösterdiğini ilk belirleyen Whiffen'e (1948) göre mayalar cycloheximide duyarlılıkları açısından üç kategoride toplanmaktadır:

1 µg /ml ile inhibe olanlar : çok duyarlı

25 µg/ml ile inhibe olanlar :orta derecede duyarlı

>1000 mg /ml ile inhibe olanlar : toleranslı

Maya suşlarının düşük cycloheximide konsantrasyonlarına adapte olabilme ihtimali olduğundan, bu bileşiğe direnç, D- glukoz içeren sıvı nitrogen-base ortamında 100 ve 1000 ppm konsantrasyonlarında test edildiğinde, türlerin karakterizasyonunda sınırlı uygulama alanı bulmaktadır (Van der Walt., 1970 ve Barnett et al., 1983).

2. 3. 7. Üreaz testi

Pratikte, yeterli vitamin sağlandığı zaman bütün mayalar tek azot kaynağı olarak düşük konsantrasyonlarda üreden yararlanabilmekle beraber, pepton gibi bir organik azot kaynağı içeren ortamda yüksek konsantrasyonlardaki üreyi amonyağa hidroliz etme yeteneği açısından farklılık göstermektedirler. Üreaz aktivitesi çoğunlukla nişasta oluşumuna bağlanmasına rağmen, bu kesin bir kural değildir çünkü üreaz(+)/nişasta (-) ve üreaz(-)/ nişasta (+) olan mayalarda bilinmektedir. Üreaz reaksiyonu, maya taksonomisinde yararlı bir kriter haline gelmiştir. Üreaz testi katı ve sıvı ortamlarda yapılabilir. Katı ortamdaki test için, maya kültürü Christensen'in üre agarına inokule edilerek 25°C'de inkübe edilmekte, koyu pembe renk oluşumu reaksiyonun pozitif olduğunu göstermektedir. Sıvı ortamdaki test için ise Difco Bacto Urea R-Broth tüplere konularak 1- 2 günlük kültürden besiyerine bir

öze dolusu hücre inokule edilmektedir. 37°C’de inkübe edilen tüpler yarım saatte bir renk dönüşümü için incelenir. Rengin kırmızıya dönüşmesi, mayanın üreaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Üreaz(+) olan mayaların bir kısmı yarım saat, büyük bir kısmı 2 saat ve hepsi 4 saat içinde renk dönüşümünü sağlamaktadır (Barnett et al., 1983).

2. 3. 8. Diazonium Blue B (DBB) Testi

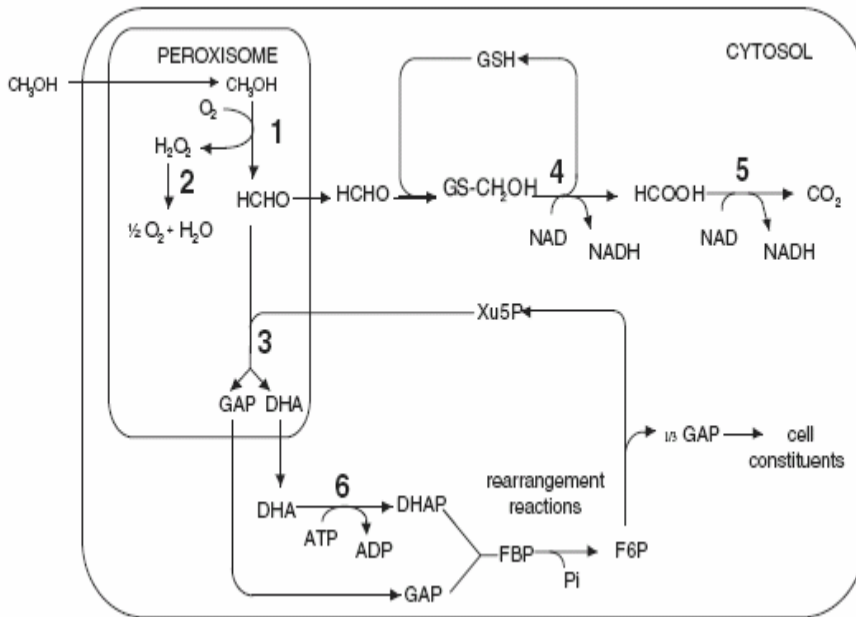
Van der Walt and Hopsu-Havu (1976), basidiomycetic mayaların bütün suşlarının, DBB’nin tamponlanmış çözeltisi ile koyu kırmızı renk verdiğini göstermiştir. Bu renk reaksiyonu, ascogenous mayaların hiçbirinde gözlenmemiştir. Hagler and Ahearn (1981), DBB testini maya, filamentli fungus ve alglerin 100 suşuna uygulamışlar ve elde edilen sonuçlara göre renk reaksiyonunun sadece basidiomycetic mayalara özgü olduğunu doğrulamışlardır. Bu renk değişiminin hücre duvarlarında gerçekleştiği bilinmekle birlikte, reaksiyonun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak bu reaksiyon, bazı imperfect maya türlerini ayırt etmek için kullanılmaktadır. Boyanın kalitesinin renk reaksiyonunu etkilediği görülmüştür (Van der Walt., 1970).

Bu test için önerilen besiyerlerinden birisi MYGP agardır. Bu besiyerindeki en az 10 günlük kültür birkaç saat 55° C’de tutularak daha sonra soğuk DBB çözeltisi eklenmekte ve oda sıcaklığında 2 dk içinde olacak renk değişimine göre değerlendirilmektedir. Bir başka yöntemde, incelenen maya suşları %0. 5 maya ekstraktı ile desteklenmiş Saboraud’un %4 glukozlu agarında, petrilere nokta kültürler olarak büyütülür. Petriler 25°C’de inkübe edilir. Kültürlerin aslında 3 hafta inkübe edilmeleri gerekmektedir ancak inkübasyon süresi 5- 7 güne indirilip kültürler daha sonra 16 saat 55- 60°C’de tutulabilmektedir. Reaktif, kullanılacağı zaman hazırlanmalı ve soğuk olarak tutulmalıdır. Hazırlanması için, diazonium blue B (DBB) tuzu soğuk 0. 1M tris HCL tampon çözeltisine (pH 7.0) 1mg/ml olacak şekilde eklenir. DBB reaktifi kolonilerin üstüne direkt olarak uygulanır. Koyu kırmızı veya viyole- kırmızı renk, oda sıcaklığında 1-2 daakikada oluşuyorsa reaksiyon pozitifdir (Van der Walt., 1970, Barnett et al., 1983).

2. 3. 9. 37° C’de ve diğer sıcaklıklarda büyüme

Birçok maya türü için, 20- 28° C arasındaki sıcaklık optimumudur. Bununla birlikte özellikle spesifik ve sınırlı habitata sahip olan türler istisnadır. Sıcaklık testleri, malt extract agar veya MYGP agar kullanılarak yapılmaktadır (Van der Walt., 1970).

2.4. Metilotrofik Mayalarda Metanol Metabolizması ve Enzimler

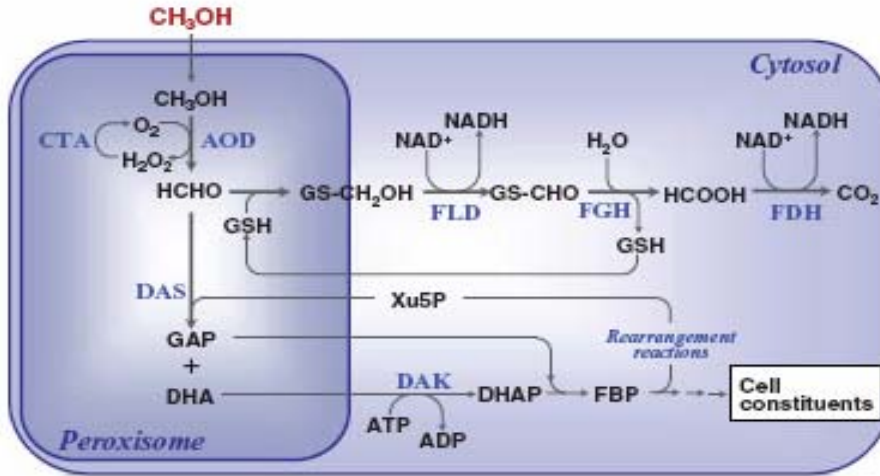


Şekil 2.1. Metilotrofik mayalarda metanol metabolizması (Kunze et al., 2005)

1)- Alcohol oxidase 2)-Catalase 3-Dihydroxyacetone synthase 4- Formaldehyde dehydrogenase 5)-Formate dehydrogenase 6- Dihydroxyacetone kinase GSH-Glutathione, Xu5P-Xylulose -5-phosphate, FBH- Fructose -1,6- bisphosphate

Metanol peroksizomda alkol oksidaz tarafından (1) okside edilir. Bunun sonucunda formaldehit ile hidrojen peroksit oluşur. Hücre içinde oluşan formaldehit toksik etkiye sahiptir ve hücreye zarar verebilir (Yurimoto et al., 2005). Hidrojen peroksit, katalaz(2) enzimiyle su ve moleküler oksijene

indirgenir. Formaldehit, indirgenmiş glutathione ile kendiliğinden reaksiyona gireceği hücre içine difüzlenebilir. Bu kompleks, formaldehit dehidrogenaz (3) ve format dehidrogenaz (4) enzimleriyle önce formata daha sonra karbondioksite okside olur. Alternatif olarak, formaldehit dihidroksiaseton sentaz(5) enziminin faaliyetiyle xylulose- 5- fosfat (Xu5P) ile peroksizomda reaksiyona girip gliseraldehit- 3- fosfat (GAP) ve dihidroksiaseton (DHA) oluşturabilir. Hücre içinde DHA, dihidroksiaseton kinaz (DHAK) (6) enzimiyle fosforilasyona uğrayarak dihidroksiaseton fosfata dönüşür, fruktoz- 1,6- bifosfat aldolaz (7) ile önce fruktoz- 1,6- bifosfata dönüşür, daha sonra fruktoz- 1,6-bifosfataz (8) ile defosforilasyona uğrar. Xu5P yeniden üretilerek formaldehit ile reaksiyona girer. Bu yol izin net sonucu, üçte bir biyomas için kullanılmaya elverişli hale getirilmiş GAP moleküllerinin üretilmesidir (Gleeson and Sudberry., 1988, Kunze et al., 2005).



Şekil 2.2. *Candida boidinii* de metanol metabolizması (Yurimoto et al., 2005).

Alkol oksidaz enzimi değişik mayalardan saflaştırılmıştır ve bu enzimin üzerinde çok çalışılmıştır. Bu enzim ilk olarak *polyporus* genusunda tanımlanmıştır. Daha sonra bu enzimin başka bazidiomisetik türlerde de olabileceği kanıtlandı (Dorgai et al., 2005). Alkol oksidaz enzimi metanol metabolizmasında anahtar bir enzimdir. Alkol oksidaz enziminin en önemli reaksiyonu, metanol metabolizmasının ilk adımını oluşturan, metanolün hidrojen peroksit ve formaldehite oksidasyonudur (Jwanny and Rashad, 1985). Bu enzim homooktamerik bir protein olup moleküler ağırlığı 600 kDa ağırlığındadır (Woodward., 1989, Harder and Brooke., 1990).

Alkol oksidaz enzimi prostetik bir grup gibi FAD içerip çeşitli primer alifatik alkoller, bunların halojen türevlerini ve formaldehiti okside edebilen bir proteindir (Harder an Brooke., 1990, Gingeras et al., 1985, Dorgai et al., 2005). Alkol oksidaz metanol için spesifik bir enzim değildir (Large., 1983).

Tek birimli bir membranla çevrili halde bulunan spesifik bir organel olan peroksizomu ilk tanımlayan, Fukui et al.,(1975) olmuştur. Bu organel, ökaryotlarda glikollat, ürik asit ve yağ asitlerinin parçalanmasında önemli fonksiyonlara sahiptir. Peroksizomlar genellikle katalaz ve bir ya da daha fazla hidrojen peroksit üreten oksidazlardan oluşur (Large., 1983).

Peroksizomlar çok yönlü organeller olup değişik sayıda, boyutta ve değişik protein içeriklerine sahiptir. Mayalarda peroksizomların verimi büyüme koşullarında bulunan özellikle azot ve karbon gibi kaynakların organellerde bulunmasına bağlıdır. Bu yüzden peroksizomların kompozisyonunu istediğimiz şekilde uygulamak oldukça kolaydır. Peroksizomların verimli olarak üretilmesi metilotrofik mayaların tek karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı ortamlardan metanolün kullanıldığı

ortamlara geçilmesiyle olur. Bu peroksizomlar sitosolün %80'nini oluşturur (Harder et al., 1987).

Peroksizomlara ilk olarak *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia* ve *Torulopsis* genuslarına ait dokuz suşun metanolde büyümüş hücrelerinde rastlanmıştır, daha sonra peroksizomların, metanol üzerinde büyüeyebilen diğer mayalarda da bulunduğu anlaşılmıştır. Metanolde büyüme sırasında bu organellerin sayısında bir değişiklik olmamakta, ancak hacimleri önemli ölçüde artmaktadır (Tani and Yamada., 1980).

Alkol oksidazla katalizlenen ilk reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksit, katalaz ile parçalanıp zararsız hale getirilir. Peroksizomlarda bulunmasına rağmen alkol oksidaz kadar çok bulunmayan diğer iki enzim katalaz ve dihidroksiaseton sentazdır (Hoop et al., 1991, Koloczec et al., 2001). Alkol oksidaz ve katalaz metanolde büyüyen mayaların en çarpıcı özelliğidir. Metilotrofik mayalar, hücre fizyolojisinde peroksizomların rolünün anlaşılması için çok güzel bir kaynak oluşturmaktadır (Dorgai et al., 2005).

Peroksizomlarda üretilen formaldehit, enerji üretimi veya asimilasyon için olmak üzere iki şekilde kullanılabilmektedir. Formaldehitin karbon dioksit oksidasyonu için gerekli olan enzimler hücre içinde bulunduğundan, bu enzimlerle reaksiyona girebilmesi için formaldehitin peroksizomal membranı geçmesi gereklidir. Hücre içine geçen formaldehit, glutathione ile bir araya gelerek formaldehit dehidrogenaz enziminin asıl substratı olan S-hidroksimetil glutathionu oluşturur. Bundan sonra oluşan S-formilglutathione, ya formata hidrolizlenip daha sonra format dehidrogenaz ile karbondioksit okside olur ya da doğrudan okside edilir. Formaldehit oksidasyonunda görevli dehidrogenazların özellikleri Çizelge 2. 3 de görülmektedir. Metilotrofik mayalarda, formaldehiti metanole indirgeyen

formaldehit redüktaz enzimi de bulunmuştur. Bu enzim büyük ihtimalle, sadece hücredeki formaldehit konsantrasyonu normal seviyenin çok üstüne çıktığı durumlarda önem kazanmaktadır. Peroksizomlarda oluşan formaldehitin asimilasyonu, ksiloz monofosfat (XuMP) yoluyla gerçekleşmektedir. Peroksizomlarda bulunan ve asimilasyonda görevli ilk enzim olan dihidroksiaseton sentaz (DHAS), verici molekül (Xu5P)'den alıcı molekül formaldehite glikolaldehit transferini katalizleyen özel bir transketolazdır. Bu enzimin özellikleri de Çizelge 2.4'te özetlenmiştir (Harder and Brooke., 1990).

Özellik	Formaldehit dehidrogenaz	Format dehidrogenaz
Moleküler ağırlık	81	74
Alt birimler	2	2
Optimum pH	7.5- 7.9	7.5- 8.5
Görünür Km (mM)	0.25 (HCHO)	13 (HCOOH)
İnhibitörler	0.13 (GSH) 0.09 (NAD) NADH, ATP	0.09 (NAD) NADH, ATP

Çizelge 2. 3. *Candida boidinii*' den saflaştırılmış Formaldehit Dehidrogenaz ve Formaldehit Dehidrogenaz enzimlerinin bazı özellikleri (Harder and Brooke., 1990).

DHAS, in vitro koşullarda kararsız bir enzimdir ancak saflaştırılmış halde GSH veya dodecanthiol ile stabilize edilebilir. Peroksizomlarda düşük seviyede GSH bulunması, DHAS' nin in vivo olarak da stabilize edildiğinin bir göstergesidir. Bu enzimin peroksizomlarda bulunması, substratı olan

Xu5P ve ürünleri DHA ve GAP'nin peroksizomal membrandan geçmelerini gerektirmektedir. Bu organellerin taşınım özellikleri hakkında çok az bilgi vardır. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisinin kullanıldığı bir çalışmada, bu organellerin iç kısmının asidik olduğu (Ph 5.8- 6.0) ve membran üzerinde de 1.2- 1.4 birimlik bir Ph farkı olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal çalışmalar, bu pH farkının, membranda proton translokasyonunu sağlayan ATPase tarafından oluşturulduğunu ve korunduğunu göstermiştir. Metanolde büyüme için gerekli olan çeşitli düşük molekül ağırlıklı (Xu5P, GSH, FAD, TPP, heme, DHA, GAP, Formaldehit) ve/veya yüksek molekül ağırlıklı (Alkol oksidaz, DHAS ve katalazın alt birimleri) bileşiklerin organel membranından geçişinde bu elektrokimyasal proton farkının ne derece önemli olduğu yeni anlaşılmıştır. Özellikle XuMP çevriminde görev alan ikinci bir enzim, dihidroksiaseton kinazdır (DHAK). Bu enzim peroksizomda değil, hücre içinde yer almaktadır. Dihidroksiaseton kinaz' ın dihidroksiaseton ve gliseraldehite afinitesi yüksektir ve ikinci substrat olarak MgATP' ye ihtiyaç duymaktadır (Çizelge 2. 4). Fruktoz- 1,6-bifosfataz (FBPase) da metanol metabolizmasında görevli enzimlerden birisidir ve formaldehit asimilasyonu için gerekli olan Xu5P 'nin yeniden üretilmesinde önemli rolü vardır. Bu enzim, her biri 46 kDa molekül ağırlığına sahip dört benzer alt birimden oluşmakta ve AMP tarafından inhibe edilmektedir (Harder and Brooke., 1990).

Özellik	Dihidroksiaseton Sentaz	Dihidroksiaseton Kinaz
Moleküler ağırlık (kDa)	155	140
Alt birimler	2	2
Optimum pH	6.8- 7. 1	7.5- 8. 2
Kofaktörler	TPP, Mg	Mg
Görünür Km (mM)	0.50 (HCHO) 0.35 (Xu5P)	0.06(DHA) 0.006 (Gliseraldehit) 0.35 (Mg ATP) ADP, fazla ATP
İnhibitörler	0.40(Glikolaldehit) 0.75(Hidroksipirüvat) 0.90(Fruktoz-6-P) GSH, HCHO	
Hücredeki konumu	Peroksizom	Hücre içi

Çizelge 2. 4. Xylulose Monofosfat Çevriminin Anahtar Enzimlerinin Bazı Özellikleri (*Candida boidinii* K1' den saflaştırılmış enzimler) (Harder and Brooke, 1990).

edilir (Koloczec et al., 2001). Kesikli kültürde çeşitli metilotrofik mayaların metanolde logaritmik büyümesi sırasında, metanol metabolizmasında görevli enzimlerin miktarının, glukoz veya etanolde büyüme sırasında gözlenen seviyeden çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Daha çok *Candida boidinii* ve *Hansenula polymorpha* türleri üzerinde yapılmış olan, bu enzimlerin sentezinin regülasyonu hakkındaki ayrıntılı çalışmalar, hiçbir maya türünde bu enzimlerin sentezinin tamamen metanolün varlığına bağlı olmadığını göstermiştir. Örneğin *Hansenula polymorpha*'da alkol oksidaz, formaldehit dehidrogenaz ve format dehidrogenaz, glukozda logaritmik büyüme sırasında hemen hemen hiç bulunmamakta ancak büyüme sabit faza gelip substrat tükendikten sonra sentezleri başlamaktadır. Yani, bu organizmada bu enzimlerin ifadesi büyük ölçüde büyüme substratından etkilenmektedir. Xylose, gliserol, riboz veya sorbitolde büyüyen hücrelerde, metanolde büyüyen hücrelerde belirlenmiş değerlerin %60'ı kadar yüksek bir oranda spesifik aktivite belirlenmiştir. Ribozda büyümekte olan bir kültüre metanol eklenmesi, alkol oksidaz aktivitesini, metanolde büyüyen hücrelerde belirlenmiş değerlere kadar yükselmiştir (Jwanny and Rashad., 1985; Cregg et al., 2005; Harder and Brooke., 1990).

Metanol indüksiyonu tipindeki regülasyonla modifiye edilen bu kısmi katabolit represyon, birçok metilotrofik mayada görülmesine rağmen, aynı büyüme koşulları altında bulunan farklı mayalarda bu enzimlerin ifadesini aynı derecede sağlayamamaktadır (Harder and Brooke., 1990)

Katabolit represyon kaynağı olarak en etkili olanlar genellikle glukoz ve etanoldür, diğer bileşikler için, bazı suşlarda katabolit represyonla kontrol daha sıkıdır ve metanolün çok küçük veya çok büyük indüksiyon etkisi olabilir. Örneğin *Klockera* sp.2201'de, glukozun tükenmesini takiben alkol oksidaz sentezinin derepresyonu, *Hansenula polymorpha*'daki gibi hemen olmamaktadır. Demek ki çeşitli mayaların farklı karbon kaynaklarıyla

katabolit represyonuna duyarlılığı ve metanolün indükleyici olarak etkinliği, suşlar arasında farklılık göstermektedir (Harder and Brooke., 1990).

Metilotrofik mayaların bu özel enzimlerinin sentezinin regülasyonu hakkında daha öğrenilmesi gereken çok şey bulunmaktadır. En azından iki enzimin sentezinin transkripsiyon seviyesinde kontrol edildiği kesin olarak bilinmektedir ancak mRNA sentezinin regülasyonu hakkındaki çalışmalar henüz yayınlanmamıştır (Harder and Brooke., 1990).

Alkol oksidaz, dihidroksiaseton sentaz ve katalaz, peroksizomlarda bulunduğundan, bu enzimlerin hücrede sentezi, bu organelin proliferasyonuna bağlıdır. Metanolde büyümüş olan *H.polymorpha* kültürleri, glukoz veya etanol içeren besiyerlerine transfer edildiği zaman, peroksizomlar ve içlerinde bulunan enzimler parçalanmaktadır. Buna degradatif inaktivasyon denir. Bu peroksizomal enzimlerin tersine, sentezleri tamamen baskılandığı halde hücre içi enzimler parçalanmazlar ancak yeni oluşan hücrelerde miktarları azalır. Bu özellik de maya türleri arasında farklılık göstermektedir (Harder and Brooke., 1990).

Metilotrofik mayalardaki FAD içeren alkol oksidaz enzimi, toplam proteinin önemli bir kısmını (bazı koşullarda % 30'dan fazlasını) oluşturduğundan, metanolde büyüme sırasında FAD sentezinin hızlanması gerekmektedir. Bazı çalışmalar, bunun FAD biyosentezinde gerekli olan ve sentezleri serbest FAD seviyesiyle kontrol edilen enzimlerin miktarının artırılmasıyla sağlandığını ortaya koymuştur (Harder and Brooke., 1990)

2. 5. 2. Karbon akışının düzenlenmesi ve formaldehitin disimilator ve asimilator yollarında paylaşımı

Mayalarda, metanol karbonu, disimilator veya asimilator yollarına girmeden önce alkol oksidaz tarafından formaldehite dönüştürülmektedir. Bu enzimin sentezi dikkatle kontrol edilmektedir, ancak aktivitesinin

regölasyonu hakkında çok az bilgi vardır. Bu durumda, reaksiyon 1 boyunca (Şekil 2. 3.) metanol akışının hücrelerdeki enzim 1 ve onun substrat ve ürünlerinin konsantrasyonuyla kontrol edildiği kabul edilmektedir. Metanolü sınırlı bir ortamda bulunan ve yüksek enzim konsantrasyonuna sahip hücreler, fazla metanole aniden maruz bırakıldığında, metanol oksidasyon hızı formaldehit kullanım hızını aşacağından hücrelerde formaldehit birikir. FAD, enzimden ayrıldığı için alkol oksidaz inaktive olur ve hücreler ölür (Yurimoto et al., 2005).

Büyümekte olan hücrelerde formaldehitin asimilatör ve disimilatör yollarında paylaşımı çok iyi bir şekilde düzenlenmelidir çünkü hücrelerin metanoldeki verimi birçok koşulda sabittir. Sabit koşullarda, gerekli bütün enzimler mevcutken bu paylaşım hücredeki enerji durumuyla kontrol edilir çünkü Xu5P'nin DHAS ile katalizlenen reaksiyon için hazır olma hızını bu etkilemektedir. Xu5P'nin yeniden üretilmesi için ATP gereklidir ve Xu5P, hücre içinde sentezlendikten sonra peroksizomal membrandan geçmelidir. Bu işlem için membran üzerinde bulunması gereken elektrokimyasal proton farkı da ATP harcanarak sağlanır (Harder and Brooke., 1990). Hücede enerji fazlası varken, Xu5P üretimi uyarılır ve formaldehit akışı, asimilasyonun artması yönünde olur. Bunun tersi bir durumda yani hücre içi enerji kısıtlıyken, Xu5P'ın peroksizomlara geçme hızı azalır ve peroksizomlarda formaldehit birikimi olur. Asimile edilemeyen formaldehit, peroksizomal membrandaki elektrokimyasal proton farkı nedeniyle organellerden dışarı difüzenir ve hücre içinde fazla miktarda bulunan GSH tarafından yakalanarak disimile edilir. Kısacası, hücrede enerji fazlayken formaldehit akışı asimilasyon yönündeyken, enerjinin kısıtlı olması bu akışı disimilasyon yönüne çevirmektedir (Koloczek et al., 2001).

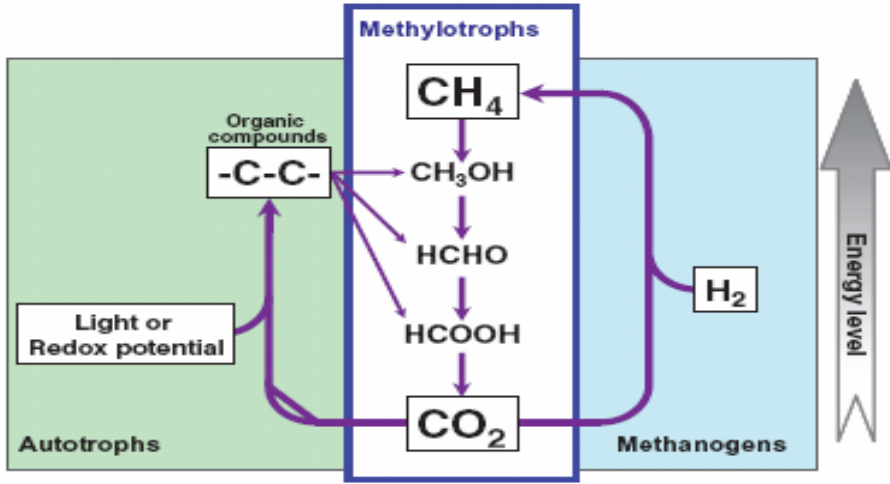
Metilotrofik mayalar, multikarbonlu bileşikler üzerinde, metanolde olduğundan daha hızlı büyümektedir. Bunun sebebinin, formaldehit

sağlanmasında alkol oksidazın kapasitesinin sınırlı olmasına mı yoksa asimilatör veya disimilatör yolizlerinin kapasitesinin sınırlı olmasına mı bağlı olduğu tam olarak bilinmemektedir. Enzimlerin sentezi represlendiğinde, formaldehitin asimilatör yolizine akışı maksimum değere ulaşmaktadır. Ancak Xu5P'in peroksizomal membrandan geçiş kapasitesi sınırlı olduğundan, bu bileşiğin sağlanma hızı belli bir maksimum değeri aşmamakta, böylece katabolit represyonunda gerekli metabolitler birikmeye başlamaktadır. Ancak bu sadece bir hipotezdir ve açıklaması da şu şekildedir: *Hansenula polymorpha*'nın farklı dilüsyon hızlarında sınırlı metanollü kemostat kültürde büyümesi sırasında, sabit hücre veriminde, dilüsyon hızı değeriyle spesifik metanol tüketim hızı arasında lineer bir ilişki gözlenmiştir. Spesifik metanol tüketim hızının 0.42g metanol/g kuru ağırlık/saat'i geçtiği daha yüksek dilüsyon hızlarında, spesifik metanol tüketim hızı ve dilüsyon hızı arasındaki bu lineer ilişki artık devam etmemektedir çünkü tüketilen metanolün daha yüksek bir oranı karbon dioksit okside olmaktadır. Bu koşullarda DHAS, DHAK ve FBPase, maksimum kapasitelerine yakın çalışırken, disimiltör yolizindeki enzimlerin de çok yüksek aktivitede olduğu kaydedilmiştir. Bir hücrenin kullanabileceği metanol karbonu akışının bir üst limiti vardır ve hücreleri bu limiti aşmaya zorlamak için karışımdaki metanolün oranını veya dilüsyon hızını arttırmak, sadece enzimlerin sentezinin represyonuna neden olmaktadır (Harder and Brooke., 1990).

2. 5. 3. Metilotrofik Metabolizmada Temel Bir Bileşik Olan Formaldehit

Tek karbonlu bileşiklerin atmosfere akışı Şekil 2.4'te gösterilmektedir. Anaerobik çevrelerde karbondioksitin metana dönüşümü mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir (metanojenler). Aynı zamanda karbondioksit ototrofik mikroorganizmalar tarafından olduğu kadar yeşil bitkiler tarafından da aerobik ve anaerobik çevrelerde organik bileşiklere dönüştürülür. Metilotroflar tek karbonlu bileşikleri çok indirgenmiş formlara

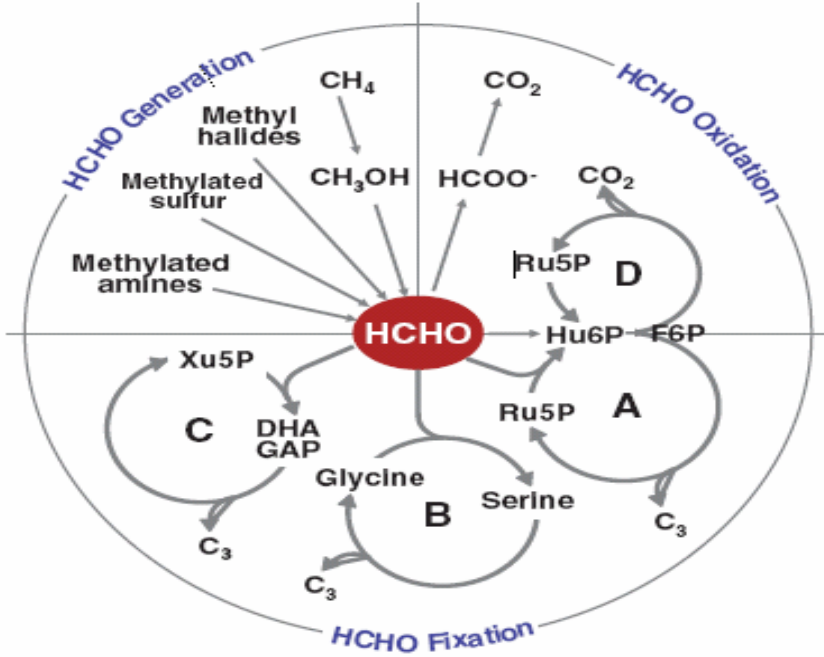
dönüştüren mikroorganizmalardır (Yurimoto et al., 2005).



Şekil 2. 4. Metilotrof, ototrof ve metanojenlerin karbon döngüsündeki rolleri (Yurimoto et al., 2005).

Karbon döngüsünde çeşitli tek karbonlu bileşikler bulunmaktadır. Bunlar: metan, metanol, formaldehit, metillenmiş aminler, metillenmiş sülfür bileşikleri ve metillenmiş halojen gibi bileşiklerdir. Bu bileşikler doğada her yerde bulunabilen biyosferdeki metan döngüsünün temel bileşikleridir. Bu da obligat metilotrofların doğada yalnızca indirgenmiş tek karbonlu bileşikleri kullanabildiğinin aynı zamanda doğada yaygın olarak bulunduklarının bir göstergesidir. İndirgenmiş tek karbonlu bileşiklerin mikrobiyal metabolizması Şekil 2.5'te gösterilmiştir. Tek karbonlu bileşikler ilk önce formaldehite okside olur. Bu da karbondioksitin ileriki oksidasyonlarında enerji oluşumu ve biyosentez asimilasyonu için bir dal

noktasıdır.



Şekil 2. 5. Tek karbonlu bileşiklerin metilotrofik metabolizmadaki ana hatları (Yurimoto et al., 2005).

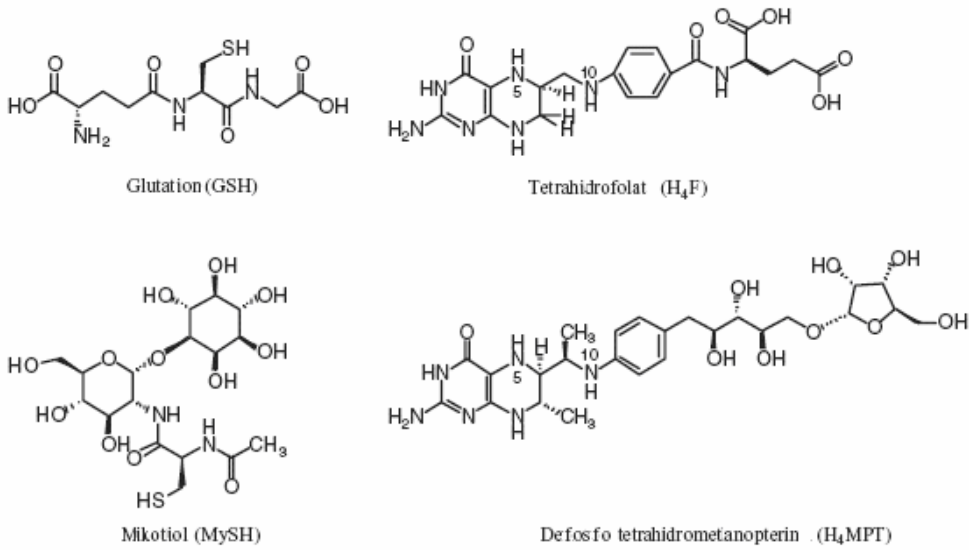
Böylece formaldehitin ileriki aşamaları metilotrofik metabolizmanın anlaşılmasında anahtar bir rol üstlenmektedir. Genel olarak indirgenmiş tek karbonlu bileşiklerin formaldehite oksidasyonu ile ilgili reaksiyonlar tek karbonlu bileşiklerin ve mikrobiyal türlerin varlığına bağlıdır. Örneğin metanolün formaldehite oksidasyonu pyrroloquinoline quinone (PQQ)-bağlı metanol dehidrogenazla gerçekleşir. Formaldehitin karbon dioksit oksidasyonu enerji metabolizması ve formaldehit detoksifikasyonunda anahtar bir basamaktır (Prado et al., 2008). Formaldehit oksidasyonu için çeşitli yollar bulunmaktadır. Bunlar çeşitli lineer kofaktör bağlı yollar ve siklik oksidasyon yollarıdır. Formaldehit fiksasyonunda üç yol bulunmaktadır. Serin yolu, Ribuloz monofosfat yolu (RuMP), ve Xylulose monofosfat yoludur. İlk iki yol prokaryotlarda diğer yol ise mayalarda

bulunmaktadır. Formaldehit metilotrofik metabolizmada çok önemli bir ara bileşik olmasına rağmen oldukça toksiktir. Tüm organizmalar demetilasyon reaksiyonlarının sonucu olarak düşük miktarda formaldehit oluştururlar. Formaldehit prebiotik zamanlarda en çok bulunan bir kimyasaldı. Dolayısıyla tüm organizmalar çevreye adaptasyonu sağlamak için zamanla evrimleşip formaldehitin detoksifikasyonu için yeni metabolik fonksiyonlar kazandılar. Bugün akıllarda olan temel soru ise metilotrofik mayaların yüksek formaldehit konsantrasyonlarıyla nasıl başedebildiğidir (Yurimoto et al., 2005).

2. 5. 4. Formaldehit Detoksifikasyonunda Bulunan Kofaktörler

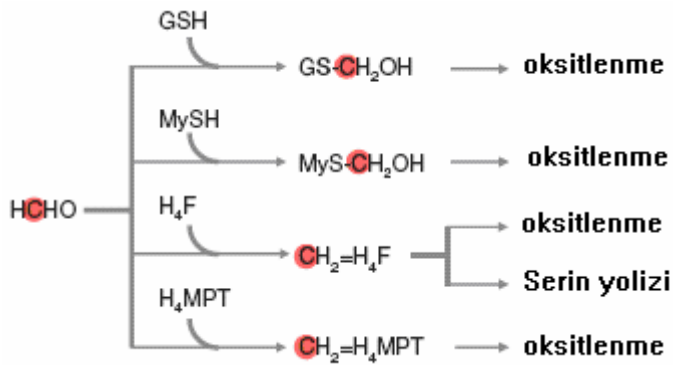
Formaldehitin başlangıç detoksifikasyonunda glutathione, mycothiol, tetrahydrofolate ve tetrahydromethanopterin (Şekil 2.6) gibi kofaktörler bulunur. Formaldehitin yoğunlaşması ve tek karbonlu taşıyıcılar kendiliğinden ya da formaldehit aktive eden enzimin hızlandırıcı etkisiyle oluşur. Bu proseslerle oluşan formaldehit örnekleri enerji üretimi için gerekli olan karbon dioksit oksidasyonunda ya da biyosentez için gerekli olan asimilasyonda kullanılır. Örneğin toksik olmayan S- hidroksimethyl glutathione NAD bağlı dehidrogenaz reaksiyonu ile karbon dioksite okside olur (Koloczek et al., 2001).

Bu reaksiyon bitkiler ve memeliler gibi metilotrofik olmayan organizmalarda görüldüğü gibi metilotrofik olan maya ve bakterilerde de görülebilmektedir. Bazı gram pozitif bakteriler glutathione yerine mycothiol içerir. İlginç olarak bu bakteriler mycothiol ile formaldehitin bir türevi olan thiohemiketal oluştururlar.



Şekil 2. 6. Formaldehit dönüşümünde bulunan kofaktörlerin yapısı (Yurimoto et al., 2005).

Tek karbon bağlı tetrahydrofolate metilotrofik olan ve metilotrofik olmayan birçok organizmada biyosentetik proseslerde kullanılmaktadır. Bazı metilotrofik bakterilerde formaldehit tetrahydrofolate ile enzimatik olmayan bir yolla reaksiyona girer ve methylene-tetrahydrofolate'ı oluşturur. Bu ikili de biyosentez için oksidasyon ya da serin yolizine girer (Şekil2.7).



Şekil 2. 7. Kofaktör bağlı formaldehit dönüşümü (Yurimoto et al., 2005).

S-hydroxymetil glutathione formaldehit dehidrogenaz enzimi ile S-formil glutathione okside edilir. Bu da S-formilglutathione hidrolaz ve format dehidrogenaz enzimi ile karbondioksite okside edilir. S-hidroksimetil mycothiol, mycothiol bağı formaldehit dehidrogenazla S- formilmycothiola okside edilir. Tetrahidrometanopterinle bağı reaksiyonlar genellikle obligat anaerobik arkealarda, metanogen ve asetogenlerde bulunur. Formaldehit ve Tetrahidrometanopterinin yoğunlaşma reaksiyonu aerobik metilotrofik bakteri olan *Methylobacterium extorquens* AM1 de görülmüştür. Metilen-Tetrahidrometanopterin formaldehiti detoksife etmek için gerekli olan ileriki reaksiyonlarda ve enerji oluşumunda kullanılır. Formaldehit ve tetrahidrometanopterinin yoğunlaşması kendiliğinden gerçekleşir ama spesifik bir enzim olan formaldehit aktive eden enzim olan Fae'nin hızlandırıcı etkisi vardır (Yurimoto et al., 2005).

2. 5. 5. Metilotrofik Mayalarda Formaldehit Detoksifikasyonu

Metanol alkol oksidaz (AOX) enzimi tarafından formaldehite dönüştürülür. Formaldehitin bir kısmı doğrudan ksiloz 5- fosfatla dihidroksiaseton ve gliseraldehit 3- fosfat oluşturmak için birleşir. Bu reaksiyon dihidroksiaseton sentaz enzimiyle katalizlenir (DAS). Bu enzim tiamin pirofosfat bağı bir transketolaz çeşididir ve fizyolojik bir substrat gibi ksiloz 5- fosfat ve formaldehit de kullanılır (Yurimoto et al., 2005).

Alternatif olarak formaldehit enzimatik olmayan bir yolla indirgenmiş glutathione ile S- hidroksimetil glutathione oluşturmak için reaksiyona girer. Oluşan ürün daha sonra NAD, glutathione bağı formaldehit dehidrogenaz (FLD), S- formil glutathione hidrolaz, ve NAD bağı format dehidrogenaz (FDH) ile başarılı bir şekilde karbondioksite okside olur. Bu yolizinin iki fizyolojik rolünün olduğu düşünülmektedir. Bunlar: NADH üretimiyle formaldehit detoksifikasyonu ve enerji oluşumudur. Yurimoto et al. (2005)

Candida boidinii de glutathione bağlı formaldehit oksidasyonu yolizinin fizyolojik rolünü yolizindeki her geni bozarak çalışmışlardır. Çalışma sonucu izelge 2. 5'te özetlenmiştir. Bu çalışmada metanolla sınırlı kemostat kültür denemeleri yapılmıştır bu kültürlerde formaldehit toksisitesi minimuma indirilmiştir. *Fld1* ırkı kemostat kültür koşullarında bile metanol üzerinde byyememiştir. Fakat *fgh1* ve *fdh1* ırkları büyüme oranları % 10 ve % 25 olmasına rağmen yabancı türler olduğu için byyebilmektedirler (Yurimoto et al., 2005).

Formaldehit oksidasyon yolizinde NADH'ın iki mol bir mol disimile edilmiş formaldehitten elde edilir. *Fgh1* ve *fdh1* ırkları bir mol NADH oluşturabilirken *fld1* ırkı NADH oluşturamaz. Sonuç olarak bir mol NADH'ın metanol üzerinde büyüme için yeterli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yapılan deneme sonuçları glutathione bağlı formaldehit oksidasyon yolizinin iki fizyolojik fonksiyona sahip olduğu grlmştir. Yapılan çalışmalarda aynı zamanda glutathione bağımsız formaldehit oksidasyonu yolizinin mayalarda formaldehit detoksifikasyonuna katıldığı grlmştir. Birkaç metilotrofik mayanın normal fizyolojik koşullardaki büyüme sırasında çok fazla metil format akümüle ettikleri grlmştir (Yurimoto et al., 2008; Prado et al., 2008; Serrano et al., 2005).

Bundan başka metil format sentezinin alkol dehidrogenaz enzimiyle katalizlendiği grlmştir. Metil format sentezi formaldehit ve metanolden enzimatik olmayan yolla oluşan hemiacetalde bulunan bir hidroksil grubunun dehidrogenasyonunda bulunur. Glutathionsuz formaldehit oksidasyon yolizi metanol metabolizmasına katılmasına rağmen bu katılım glutathionlu oksidasyon yolizinden daha azdır. Bu sonuçlar metilotrofik mayalarda formaldehit oksidasyon yolizinin anlaşılmasına az da olsa katkı sağlamıştır (Yurimoto et al., 2005).

Çizelge 2. 5. Genleri bozulmuş ırkların formaldehit oksidasyonu yolizindeki hücre miktarları (Yurimoto et al., 2005).

İrklar	% Hücre miktarı	NADH
Yabani ırk	100	2
<i>Fld1</i>	0	0
<i>Fgh1</i>	10	1
<i>Fdh1</i>	25	1

2. 6. Metilotrofik Mayaların Kullanım Alanları

2. 6. 1. Tek hücre proteini (THP) üretimi

Birinci ve ikinci dünya savaşları dönemlerinde, proteine olan ihtiyaç nedeniyle, endüstriyel ölçekte mikrobiyal biyomas üretimi gerçekleştirmek amacıyla, insan ve hayvan beslenmesinde kullanılmak üzere proteince zengin olan mayalardan yararlanılmıştır. Savaş sonrası bu tip protein kaynakları alışılagelmiş ucuz ve yeterli miktardaki hayvansal ve bitkisel kökenli protein kaynaklarıyla rekabet edememiştir. Ancak 1950’li yılların ortalarında, hızla artan nüfusun gıda ve özellikle protein ihtiyacının geleneksel gıdalarla karşılanması güç ve hatta yakın bir gelecekte imkansız olacağı görüldüğünden, yeni gıda ve protein kaynaklarının bulunması ve geliştirilmesi çalışmaları önem kazanmıştır. Şüphesiz gıda ihtiyacının büyük bir bölümü yine tarımsal kaynaklardan karşılanmaya çalışılacaktır. Bununla birlikte balık protein konsantreleri, yağlı tohum küspeleri ve THP gibi yeni protein kaynakları üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır (Karapınar., 1983). Ülkemizde THP üretimine ilişkin çalışmalar çeşitli mikroorganizmaların

tarımsal atıklar üzerinde geliştirilmesi konusunda yoğunlaşmıştır. Hidrokarbonların kullanımıyla biyomas üretimi konusunda az sayıdaki çalışmalardan birisi, Dönmez ve Pamir'in çalışmasıdır (Aran ve Karakuş., 1985).

THP üretimiyle ilgili çalışmaların ilk yıllarında, pilot tesislerde elde edilmiş ürünlerin hayvanlar üzerinde denenmesiyle THP' nin sağlık açısından güvenilir olduğu anlaşılmıştır. 1970 yılında, THP üretiminin ilk jenerasyonu sayılabilecek, biri 4.000 ton/yıl (Gangemouth), diğeri 16.000 ton/yıl (Lavera) kapasiteli iki tesis, British Petroleum (BP) şirketi tarafından kurulmuş ve bu tesislerde, airlift tipi fermentörlerde substrat olarak gazyağının kullanımıyla kuru maya üretimi beş yıl boyunca kesintisiz olarak ve büyük bir ticari başarı göstererek sürmüştür (Öztürk., 1997).

Dünyada büyük ilgiyle karşılanan bu ilk endüstriyel girişimlerin ardından, İngiltere, Amerika, Fransa, Hollanda, Almanya ve Japonya da doğal gaz ve metanolden biyoproteinlerin üretilmesi konusunda çalışmalar başlamıştır. 1974 yılında daha büyük kapasiteli iki tesis daha İtalya'da kurulmuştur ancak ilk kurulan Grangemouth ve Lavera tesislerinde üretim durdurulurken, İtalya'daki tesisler üretime bile başlayamamıştır. 1973 yılındaki petrol krizi sırasında THP artık diğer proteinlerle rekabet edebilecek durumda olmadığından, tesisler kapatılmıştır. Ancak İtalya'da petrol ürünlerinden THP üretimi, ekonomik değil politik engellerle karşılaşmıştır. İtalyan Sağlık Bakanlığı, daha sonra doğru olmadığı bilimsel olarak kanıtlanmış, asılsız toksikolojik risk söylentileri çıkarınca basın da bunu sonuna kadar kullanmış ve olumsuz tepkilerin çoğalmasa sonucu İtalya'da THP üretimi yasaklanmıştır (Öztürk., 1997).

1975 yılından itibaren benzer bir durumun yaşandığı Japonya'da, salgın bir hastalık nedeniyle çok hassas olan halk, THP üretiminin en azından

geçici bir süre yasaklanmasını istemiştir. Bütün engellemelere rağmen THP üretimi başka ülkelerde gelişmeye devam etmiş, özellikle metanol proseslerinde büyük gelişmeler gözlenmiştir (Senez., 1986 and Öztürk., 1997).

2. 6. 1. 1. Tek hücre proteini ve kullanım alanları

Besin proteini elde etmek amacıyla; bakteri, maya, alg, fungus gibi mikrobiyal hücrelerin üretilmesiyle elde edilen ürüne tek hücre proteini adı verilmiştir. Tek hücre proteinine biyomas, biyoprotein, mikrobiyal protein gibi isimler verilmektedir.

Tek hücre proteini %50-%85 saf protein içeren konsantre bir üründür (Taylor and Nclonald.,1978). Tek hücre proteini yüksek aminoasit içeriğine sahiptir. Sindirilebilir ve biyolojik yöntemlerle elde edilebilir. Ayrıca çeşitli mineralleri, vitaminleri, karbohidrat ve lipidleri de içermektedir. Tek hücre proteini ile yapılan aminoasit analizlerinde lizin ve metiyonin gibi temel aminoasit içeriklerinin yüksek olduğu sadece kükürtlü aminoasitlerce fakir oldukları tespit edilmiştir (Özgür ve ark., 2003).

Beslenmede çok eskiden beri kullanılan mikroorganizmalardan biri de mayalardır. Mayalar çok eskiden beri özellikle fırıncılıkta kullanılmaktadır. Mayalanarak pişirilen yiyeceklerde pişme sırasında hücrelerden açığa çıkan proteinler, yağlar, karbonhidratlar bulunur. Günümüzde ise tek hücre proteini, yiyecekleri yüksek protein düzeyine getirmek ve diğer yiyeceklerdeki nutrientleri kazandırarak iyileştirmek için katkı maddesi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, tek hücre proteini yüksek nükleik asit içeriği nedeniyle direkt insan tüketimi için uygun değildir. Besinlerle fazla nükleik asit alınımı kandaki ürik asit miktarını artırıp artrit, gut, böbrek taşı hastalıklarına yol açmaktadır. Bu rahatsızlıklara yol açması nedeniyle ürünün hayvan yemlerinde kullanılması daha uygundur. Yem mayaları genellikle kuru maya denilen inaktif hücrelerdir. Bu hücreler bira

yapımında arta kalanlar veya kâğıt hamuru artıkları, melas, peynir altı suyu gibi karbonhidratça zengin değişik büyüme ortamlarında üretilerek ortamdan ayrılırlar. Amerika’da yemlere ilave edilen türler *Saccharomyces cerevisiae*, *S.uvarum*, *Kluyveromyces*, *Candida utilis*’tir. Avrupa’da ise peynir altı suyunda üretilmiş *S.lactis* kullanılmaktadır (Uzeh and A.Ojokoh., 2005).

2. 6. 1. 2. THP üretiminde mikroorganizmaların seçimi ve metanolün avantajları

Büyük ölçekli bir THP üretimi için kullanılacak substratın ucuz olması, THP üretiminin yapılacağı yere yakın ve bol miktarda bulunması, toksik atıklar içermemesi, proste sorun yaratmaması ve mikrobiyal büyümeyi destekleyecek özellikte olması gereklidir. Bu nedenlerle, büyük ölçekli THP prosesleri için tercih edilen substratlar: Metan, metanol ve parafinler olmaktadır (Large., 1983 ve Goma., 1986). Metanın THP üretiminde substrat olarak kullanımını sınırlayan bazı faktörler bulunmaktadır. Metan ucuz bir substrattır ve bol miktarda bulunmaktadır ancak metanın bir yerde depolanması ekonomik değildir, bu nedenle dünyanın birçok yerinde metan büyük ölçüde işe yaramadan beklemektedir (Large., 1983 ve Yurimoto et al., 2005). Metan ve oksijen karışımı patlayıcı özellikte olduğundan, metanın kullanıldığı proseslerde %12. 1’den daha az oksijenle çalışma zorunluluğu bulunmaktadır. Ayrıca proses sırasında çok fazla ısı açığa çıkmaktadır (Karapınar., 1983, Large., 1983 ve Cooney et al., 1975).

THP proseslerinde metanol kullanımının avantajları şu şekilde sıralanabilir

- a) Bol miktarda üretilmektedir, ucuzdur, depolanması ve taşınması kolaydır.
- b) %99.5 oranında saf halde bulunmaktadır.

- c) Suyla tamamen karışabildiği için diğer petrokimyasal maddeler gibi kütle transferi sınırlaması yoktur.
- d) Sınırlı sayıda mikroorganizma tarafından kullanılabildiği için kontaminasyon riski minimumdur.
- e) Kısmen okside olmuş bir bileşik olduğundan, tamamen indirgenmiş hidrokarbonlara oranla ısının uzaklaştırılması ve oksijen ihtiyacı daha azdır.
- f) Metandan daha fazla oksidasyon potansiyeline sahip olduğundan, hücre metabolizması ve biyosentezinde enzimatik dönüşümler için daha uygundur (Goma., 1986)

Çizelge 2.6. Alkanlar ve Metanolden Endüstriyel Ölçekte THP Üretimi (Senez., 1986).

Substrat	Organizma	Proses	Üretim (bin ton/yıl)
n-parafinler	<i>Candida tropicalis</i>	BP-Lavera* Toprina-L	16
	<i>C.lipolytica</i>	BP-Grangemouth* Toprina- G	4
	<i>C.tropicalis</i>	Italproteine * Toprina-G	100
	<i>C.maltosa</i>	Liquichimica-Kanegafuchi*	100
	<i>C.tropicalis</i>	Liquipron	
	<i>C.parafinica</i>	IFP/ Technip	Pilot
	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Roniprot-Dainippon Raniport	60
Metanol		DDR-Schwedt Fermosin	60
	<i>Pichia pastoris</i>	IFP/ Technip	PiloPilot
	<i>P.aganobii</i> , <i>P.pastoris</i>	Mitsubishi Phillips Petroleum Provesteen	

* Çalışmayan tesisler

Metanolden THP üretiminde mayaların bakterilere göre birçok avantajları bulunmaktadır. Hücrelerin daha büyük olması, ürünün filtrasyon veya santrifügasyonla kolayca ortamdan alınmasını sağlamaktadır. Mayaların nükleik asit içeriği daha düşüktür (Mayalarda kuru ağırlığın %7-12'si, Bakterilerde %10-20'si) (Harder ve Brooke., 1990).

Mikroorganizmaların yüksek nükleik asit içeriği, THP'nin hayvan yemi olarak kullanılmasında bir sorun yaratmamaktadır ancak insanlarda ürate oksidase(uricase) enzimi bulunmadığından, pürin bileşiklerinin sindirilmesi plazmada ürik asit artışına ve uzun vadede gut hastalığı gibi bazı metabolik bozukluklara neden olmaktadır. Nükleik asit oranını azaltılması için en basit yöntem, hücrelerin ısı şokuna veya alkali ekstraksiyonuna maruz bırakılmasıdır. Her iki yöntemin birlikte kullanılması da mümkündür (Öztürk., 1997 and Reed., 1982). Mayaların optimum pH'larının düşük olması (4. 0- 5. 5), bakteriyel kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Ayrıca maya THP'si hayvan ve/veya insan tüketiminde, psikolojik olarak bakteriyel THP'den daha çok kabul görmektedir (Colowick et al., 1973).

Mayaların bakteriler karşısında dezavantajları da bulunmaktadır. Protein içerikleri daha düşüktür (mayalarda kuru hücre ağırlığının %40-50'si, bakterilerde %50-70'i), ikilenme süreleri fazladır (mayalarda 3- 10 saat, bakterilerde 2- 3 saat) ve büyüme ortamlarında vitaminlerin bulunması gerekmektedir ki bu da maliyeti yükselten bir faktördür (Öztürk., 1997).

Mayalarla bakteriler arasındaki diğer önemli farklar, biyokimyasal yollarından kaynaklanmaktadır. Bu da daha çok substratın ilk oksidasyonu ile ilgilidir. Bakterilerde bu reaksiyon, biyosentezde kullanılabilecek ATP'nin senteziyle sonuçlanacak şekilde elektron taşınım sistemiyle devam ederken, mayalarda metanol oksidasyonunun ilk adımını katalizleyen alkol oksidazın, substratları olan metanol ve oksijene affinitesi

düşük olduğundan biyosentetik proseslere yetecek kadar enerji oluşmamaktadır (Öztürk., 1997).

Bir başka farklılık metilotrofik maya ve bakterilerdeki karbon asimilasyon yolizinde ortaya çıkmaktadır. Mayalarda, formaldehitten 1 mol gliseraldehit-3-fosfatın sentezlenmesi için 3 mol ATP gerekirken, formaldehit asimilasyonu için ribuloz monofosfat (RuMP) yolizini kullanan bakterilerde bu dönüşüm için net 1 mol ATP gerekmektedir. Bu biyokimyasal farklılıkların bir sonucu olarak mayaların metanoldeki verimi, RuMP yolizine sahip bakterilerden daha düşük olmaktadır. Bu durum çeşitli maya türleriyle denenmiş ve bakterilerin 1g metanol için 0.54g biyomasa yaklaşan hücre verimine karşılık, mayalarda biyomas, 1g metanol için 0.36- 0.42g değerleri arasında bulunmuştur. Alkol oksidazın metanol için yüksek K_m değerine sahip olması, büyümekte olan hücrelerde K_s değerlerinin de yüksek olmasına (4- 17Mm) neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak, maya kültürlerinde maksimum büyüme hızına ulaşabilmek için yüksek metanol oranları (> % 0.1 v/v) kullanmak gerekmekte ancak bazı büyüme koşullarında yüksek metanol oranı alkol oksidazın inaktivasyonu ve büyümenin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır (Harder and Brooke., 1990).

2. 6. 1. 3. Endüstriyel ölçekte THP üretimi

Bugüne kadar metanolden maya tek hücre proteini elde etmede en ayrıntılı ve başarılı çalışma Phillips Petroleum firmasının Amerika'daki yan kolu olan Provesta Co. Tarafından yapılmıştır (Woodward., 1989). 1960'ların sonunda başlayan ciddi bir tarama programının ardından, gerek doğal kaynaklardan izole edilmiş, gerekse kültür koleksiyonlarından sağlanmış maya kültürleri dikkatle incelenerek, THP üretiminde kullanılmak üzere *Pichia pastoris*'in bir suşu seçilmiştir. Bu organizmanın metanol-hücre

dönüşümü oldukça iyidir ve hücresel protein içeriği yüksektir (Harder and Brooke., 1990).

1973 yılında Mitsubishi Gas Chemical Company Inc., metanolden maya hücrelerinin endüstriyel olarak üretimi için, yıllık kapasitesi 500 ton olarak dizayn edilmiş bir pilot tesis oluşturmuştur. Bu prosesin en önemli avantajlarından birisi, yüksek oksijen transfer hızı sağlayabilecek airlift tipi bir fermentöre sahip olmasıdır. Metanolün 20 metreküplük fermentörde uygun şekilde dağıtılmasıyla, *Pichia aganobii* ile 5.65kg hücre/metreküp/saatlik üretim sağlanmıştır. Bu sonucun elde edilebilmesi için 16. 5kg oksijen/metreküp/saatlik oksijen transfer hızı, 0.816kg mol oksijen/metreküp/saatlik volumetrik

Çizelge 2. 7. Provesteen Tek Hücre Proteininin Tipik Kompozisyonu (Harder and Brooke., 1990).

Genel kompozisyon	Ağırlık (%)	Vitamin içeriği	(mg/kg)	Amino asit içeriği	Ağırlık (%)	Mineral içeriği	Ağırlık
Protein		Biotin	1.06	Lys	4.2	Kalsiyum	0.009
ham(%N*6.25)	62	Folic acid	28	Arg	3.5	Magnezyum	0.3
gerçek(biuret)	57	Niacin	640	Thr	2.9	Fosfor	2.5
Kül	11	Pantothenic acid	68	Glu	7.6	Potasyum	2.5
Yağlar	5	Vitamin B-6	56	Gly	2.8	Sodyum	0.1mg/kg
Karbohidratlar	18	Vitamin B-12	0.004	Val	3.3	Demir	340
Nem	4	Thiamine	88	Ile	2.8	Bakır	36
		PABA	73	Tyr	2.0	Çinko	124
		Riboflavin	212	His	1.5	Mangan	26
		Choline	2500	Asp	5.8		
		İnositol	3420	Ser	2.7		
				Pro	2.2		
				Ala	3.4		

				Met	0.7		
				Leu	4.4		
				Phe	2.2		
				Cys	0.5		
				Trp	0.6		

Yoğunluğu (120g hücre/l) ve yüksek üretim (14g hücre/l/saat) göstermiştir (Öztürk., 1997). Metanolden THP üretimi artık çok ilgi duyulan bir konu değildir, ancak fermentör dizaynındaki ilerlemeler, mikroorganizmaların genetik manipulasyonu ve proses kontrol, ikinci kuşak THP proseslerinin gelişmesini sağlayacaktır (Öztürk., 1997).

2. 6. 2. Metilotrofik Mayaların Kimyasal Maddelerin Üretiminde Kullanılması

Metilotrofik mayaların metabolizması hakkındaki bilgiler arttıkça, ilgi odağı, THP üretiminden, başka ürünler ve metabolitlerin üretimi konularına kaymıştır. Kimyasal proseslerle karşılaştırıldığında, metilotrofların kullanıldığı biyoproseslerin potansiyel avantajları bulunmaktadır. Normal koşullarda, çok aşamalı reaksiyonlarla kompleks materyallerin sentezi mümkün olmaktadır (Harder and Brooke., 1990).

2. 6. 2. 1. Amino asitlerin üretimi

Çeşitli amino asitlerin üretimi için metilotrofik mayaların uygun organizmalar olduğu uzun zaman önce farkedilmiştir. Okumura et al.,(1970), metilotrofik mayalardan amino asit üretimi proseslerine ait çeşitli örnekler vermiştir. Bu çalışmada g/l cinsinden amino asit verimleri şu şekilde gerçekleşmiştir: L- alanin, 0.3; L- glutamik asit, 1.5; L-lisin, 0.5; L- treonin, 0.5; L- valin, 0.5 (Öztürk., 1997).

Aromatik bir amino asit olan L- triptofanın *Hansenula polymorpha*'dan elde edildiği belirtilmektedir. Büyüme için L- fenilalanin ve L- tirozine ihtiyaç duyan bir mutant, tek karbon ve enerji kaynağı olarak % 2 metanolde büyüdüğünde az miktarda (28 mg/l) L- triptofan salgılamaktadır. Çalışmalar, triptofanın antimetabolitleri olan 5- florotriptofan veya antranilata dayanıklı olan *H. polymorpha* mutantlarının triptofol, indol asetik asit ve indol asetaldehit gibi triptofan birikimi yaptığını göstermiştir. Ayrıca *H. polymorpha* mutantlarının triptofol, indol asetik asit ve indol asetaldehit gibi triptofan katabolitlerini hücre dışında biriktirdiği rapor edilmiştir. *Candida boidinii* 2201, hücre içinde oldukça yüksek miktarda L- metiyonin depolamaktadır. Lim and Tani'nin (1988) bir çalışmasında etiyonine dayanıklı olan mutant bir suşun, kültür koşulları optimize edildiğinde çok daha fazla L- metiyonin biriktirdiği görülmüştür (Harder and Brooke., 1990; Tani., 1991).

2. 6. 2. 2. Nükleotid koenzim üretimi

Metanolde büyüme sırasında, metilotrofik mayalardaki alkol oksidaz enzimi, hücredeki toplam proteinin %30'unu geçmektedir. Bu enzim enzim proteinin 1 molü başına 8 mol FAD içermektedir ve hücrelerde FAD miktarının artmasının, FAD biyosentezi yolizindeki son enzim olan FMN adeniltransferazın derepresyonuna neden olduğu gözlenmiştir. FAD sentezinin metanolle gözle görünür derecede indüklenmesi, metilotrofik mayalardan FAD üretme ihtimali olabileceğini düşündürmüştür. 0.5 mg/ml AMP ve % 3.5 metanol içeren bir ortamda bulunan tanımlanmamış bir maya kültürüne riboflavin veya FMN (0.5 mg/ml) eklendiğinde, 4 gün sonra 45.4 mg/l FAD oluştuğu rapor edilmiştir (Öztürk., 1997; Koloczec et al., 2001; Dorgai et al., 2005; Fonseca et al., 2003).

Tani et al.,(1982), metilotrofik *Kloeckera* sp. 2201 ile AMP'den ATP üretimi için bir prosedür geliştirmiştir. Formaldehitin oksidasyonu sırasında NAD^+ indirgenmekte, oluşan NADH, mitokondrideki solunum zincirinde okside olmakta ve daha sonra ADP'nin fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Böylece, metanolün oksidasyonu ve AMP'nin ADP'ye fosforilasyonu ile devam eden bir oksidatif fosforilasyon sisteminin kullanımıyla, AMP'den ATP'nin sentezini sağlayan bir sistem geliştirilmiştir (Harder and Broke., 1990).

Tani and Yamada (1984) *Candida boidinii* 2201 hücreleri zymolase/sorbitol ile muamele edildiğinde ATP üretiminin daha etkin olduğunu görmüşlerdir. Optimize edilmiş prosesle, 6 saat içinde 60mM AMP'den 38mM ATP elde edilmiştir. Bununla birlikte, bu proses ATP'nin ticari olarak üretilmesi için uygun değildir çünkü AMP kararsız bir kimyasaldır ve oldukça pahalıdır. *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis* genuslarına ait birçok maya türünün, metanol, adenosin ve adenini ATP'ye dönüştürebildiği bilinmektedir (Harder and Broke., 1990).

2. 6. 2. 3. Metil keton üretimi

Metil ketonlar, endüstriyel açıdan oldukça önemli solventlerdir. Hou et al., gaz hidrokarbonların mikrobiyal oksidasyonunu incelerken, metanolde büyüyen metilotrofik mayaların, sekonder alkollerini okside edip ilgili metil ketonları üretebildiklerini göstermiştir. Metanol, metilamin, metilformat veya propilaminde büyümüş olan *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, bazı *Pichia* ve *Torulopsis* türleri, izopropanol, 2- bütanol, 2- pentanol ve 2- hekzanolü sırasıyla aseton, 2- bütanon, 2- pentanon ve 2- hekzanona okside edebilmektedir (Öztürk., 1997; Harder and Brooke., 1990).

2. 6. 2. 4. Sitrik asit üretimi

Candida boidinii, floroasetat varlığında metanolde büyüdüğünde, yaklaşık 1g/l konsantrasyonuna kadar sitrik asit salgılayabilmektedir. *Candida* sp. Y- 1'in floroasetata dayanıklı mutantının, 4 günlük kùltivasyondan sonra 5 g/l sitrik asidi kùltür ortamına salgıladığı bulunmuştur (Harder and Brooke., 1990).

2. 6. 2. 5. Gliserol üretimi

Deterjan ve yağ asitlerinin üretimi sırasında yan ürün olarak elde edilen gliserolün düzenli olarak sağlanamaması nedeniyle gliserol fermentasyonuna olan ilgi artmıştır. Metilotrofik mayalar, dihidroksiasetonun fosforlandığı ve oluşan fosfatın Xu5P'nin yeniden üretilmesi için kullanıldığı XuMP yoliziyle metanolü asimile etmektedirler. Bazı mikroorganizmalarda dihidroksiaseton, gliserol disimilasyonunun okside olmuş ürünüdür. Bazı araştırmacılar metilotrofik mayalarda metanolün asimilasyonu ve gliserolün disimilasyonunda dihidroksiasetonun rolünü araştırmış ve gliserol disimilasyonunun ilk basamağıyla ilgili olarak *Candida boidinii* 2201'de gliserol kinaz içeren fosforilatif yolizinin; *Hansenula ofunaensis*'te NAD⁺'a bağlı gliserol dehidrogenaz içeren oksidatif yolizinin ve *H.polymorpha*'da her iki yolizinin bulunduğunu belirlemişlerdir. Dihidroksiaseton, mayalardaki metanol metabolizmasında ara üründür (Tani., 1991).

Hansenula ofunaensis hücreleri metanolde büyüdüğünde dihidroksiaseton redüktaz aktivitesiyle hücre içi gliserol içeriği arasında bir bağlantı bulunmaktadır (Tani and Yamada., 1987). Düşük oksijenli ortamda büyüyen hücrelerde enzimin aktivitesi artmakta, gliserol sentezinde de artış gözlenmektedir. Dihidroksiaseton redüktaz sentezi için en etkili karbon kaynağı metanoldür. *Hansenula polymorpha*'nın dihidroksiaseton kinaz içermeyen mutant bir suşu, metanolde büyüdüğünde dihidroksiaseton ve

gliserol biriktirmektedir. Gliserol metabolizması eksik olan bir mutantın kullanılmasıyla metanolden gliserol üretimi için fermentatif bir proses geliştirmek mümkündür (Tani., 1991).

2. 6. 2. 6. Poliollerin üretimi

Gıda endüstrisinde, gıdaların nemli ve yumuşak kalmasının sağlanmasında, askorbik asit sentezinde ve diyabetikler için tatlandırıcı olarak sorbitolün kullanımı yaygındır. Metilotrofik mayalar, NADH üretiminde metanolün enerji kaynağı olarak görev yaptığı bir sistemle glukozdan sorbitol üretebilmektedir. Metanol ve xylose içeren bir ortamda sorbitol üretimi oldukça yüksek olan *Candida boidinii* 2201 hücreleri hazırlanmıştır. Bu kültürle, 20g/l glukoz ve fruktozdan sırasıyla 8.8g/l ve 19.1g/l sorbitol elde edilmiştir (Tani., 1991).

Pratik bir hazırlama metodu bulunmayan, renksiz kristaller halinde bulunup 70- 73° C’de eriyen tatlı bir heksitol olan iditol, pratik uygulamalar için çok fazla incelenmemiştir. İditol, *Candida boidinii* 2201 tarafından, iditol dehidrogenaz enzimiyle sorbozdan üretilmektedir. İditol üretiminde görevli enzimler, metanol ve D- xylose içeren ortamda büyüyen hücrelerde maksimum aktivite göstermektedir. Metanol varlığında, sorbozdan %98 dönüşüm hızıyla en yüksek iditol miktarı (148 g/l) elde edilmiştir (Tani., 1991).

Gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan ve sorbitolden iki kat daha fazla tatlı olan xylitol, kimyasal olarak xylose’ un hidrojenasyonu ile üretilmekteyse de son zamanlarda mayalardan fermentatif ve biyokatalitik proseslerle elde edilmesi konusunda da çalışmalar yapılmaktadır. *Candida boidinii* 2201, xylose içeren ortamda xylitol ve xylulose üretebilmekte, hatta %2 metanol içeren xylose besiyerinde daha fazla miktarda xylitol (48.5g/l) ve xylulose (3.3g/l) oluşturmaktadır (Tani., 1991)

2. 6. 2. 7. Metilotrofik mayalar ve enzimlerinin biyokatalizör olarak kullanılması

Metilotrofik mayaların, metanolün oksidasyonu için sahip oldukları enzimlerin niteliği, bu enzimlerin biyoteknoloji ve diğer proseslerde kullanılabilmesi nedeniyle büyük ilgi uyandırmıştır. Metanol metabolizmasında alkol oksidaz enzimiyle katalizlenmekte olan ilk reaksiyon sonucunda formaldehit ve hidrojen peroksit oluşması, özellikle deterjan üreticilerini harekete geçirmiştir. 1975 yılında Henkel Co., sıvı deterjan sistemlerinde hidrojen peroksit oluşumu için katalaz içermeyen alkol oksidaz tabletlerinin kullanımı konusunda bir patent almıştır. Daha sonra bu enzimin tüm hücre veya izole edilmiş peroksizomlar halinde katı faz materyallere immobilize edilmesi konusunda çalışmalar yapmıştır. Bu tip immobilize preparatlar, alkollerin oksidasyonu için veya katalaz aktivitesinin bulunmadığı durumlarda hidrojen peroksit üretimi için kullanılabilir. 1982 yılında Unilever firması, alkol oksidazın konsantre deterjanda inaktif olduğu ve suyla seyreltildiğinde aktif hale geçtiği bir deterjan sisteminin patentini almıştır. Temizlik maddeleri endüstrisinde bu sistemin, geleneksel sistemlere göre avantajları olduğu kesindir (Fonseca et al., 2003, Harder and Brooke., 1990).

Alkol oksidazdan, metanolden formaldehit üretiminde de yararlanılmaktadır. Metanolden formaldehit üretimi 500- 600°C’de gerçekleşen kimyasal bir prosestir. Oysa mikrobiyal bir prosesin kullanılması, hem dönüşümün daha az enerjiyle gerçekleşmesini hem de yan ürün oluşumunun minimize edilmesini sağlamaktadır. Günümüzde yıllık toplam formaldehit üretimi 4 milyon tonun üzerindedir ve endüstriyel olarak üretilen metanolün yaklaşık %40’ı bu amaçla kullanılmaktadır. Bu kimyasal prosese alternatif olarak *Hansenula polymorpha* ve *Candida boidinii* S2’nin kullanıldığı biyolojik prosesler üzerinde çalışılmaktadır. *Candida boidinii*

S2'nin alkol oksidaz aktivitesi yüksek olan bir mutantı, metanolü sınırlandırılmış kemostat kültürde yüksek formaldehit prodüktivitesi göstermektedir (Tani., 1991).

Alkol oksidazın, primer alkollerin belirlenmesi ve enzim assay'leri gibi başka kullanımları da bulunmaktadır. Ayrıca *Pichia pastoris*'ten izole edilen enzim, Alcoscan adı altında kit halinde pazarlanmakta ve insan tükürüğündeki alkol konsantrasyonunu belirlemekte kullanılmaktadır. *Candida boidinii* ve *Pichia pastoris* ile asetaldehit üretimi çalışmaları da yapılmaktadır (Tani., 1991; Harder and Brooke., 1990; Souza., 2001).

2. 7. Metilotrofik Mayalarla İlgili Genetik Çalışmalar

Metilotrofik mayaların biyokimyasal ve fizyolojik olarak incelenmeleri, ortaya genetik ve moleküler biyoloji ile uğraşan araştırmacıların ilgisini çekecek sonuçlar çıkarmıştır. Bunlardan bir tanesi, metilotrofik mayaların sahip olduğu enzimlerdir. Metanol metabolizmasında gerekli olan enzimlerin, sadece hücreler metanolde büyürken ortaya çıktığı fark edilmiştir. Bu genlerin ifadesinin metanol tarafından düzenlendiği açıkça ortadadır. İkincisi ise, alkol oksidaz ve dihidroksiaseton sentaz gibi, metanol ve metabolizmasındaki bazı enzimlerin, hücrede peroksizomlar denilen organellerde yer almasıdır. Metilotrofik mayaların bu özellikleri nedeniyle bu mayaların hem klasik hem de moleküler genetiği konusundaki çalışmalar son yıllarda büyük hız kazanmıştır (Harder and Brooke., 1990).

Bilinen dört metilotrofik maya genusu iki gruba ayrılmaktadır. *Candida* ve *Torulopsis* genusuna ait türler asporogeniktir, dolayısıyla genetik olarak belirlenebilecek bir yaşam çevrimleri bulunmadığından bu türlerin klasik genetikleri, mutantlarının izolasyonu ve karakterizasyonu ile sınırlı kalmaktadır. *Hansenula* ve *Pichia* türleri ise askomisetik'tir. Genetik

çalışmalar daha çok, yaşam çevrimleri birbirine çok benzeyen *Pichia pinus* ve *Hansenul polymorpha* türleri ile yapılmaktadır (Cregg., 1987).

2. 7. 1. Metanolle regüle edilen genler

Mayalardaki metanol yolizi enzimlerinin sentezinin transkripsiyon seviyesinde kontrol edilebileceği, ilk olarak 1983 yılı sonunda rapor edilmiştir. Roa *polymorpha* hücrelerinde in vitro translasyon teknikleri kullanmışlardır. Transkripsiyonel kontrolün varlığını kesin olarak kanıtlanması, metanolle regüle edilen genlerin izolasyonu ve karakterizasyonu mümkün olmuştur. *Pichia pastoris* ile çalışan Ellis et al.,(1985), aşağıdaki üç geni tanımlayabilmiştir: AOX1, alkol oksidaz ve DAS1, dihidroksiaseton sentazı şifrelemekte, üçüncüsü ise fonksiyonu bilinmeyen 40.000 dalton'luk bir proteini şifrelemektedir. *Saccharomyces cerevisiae*'da, klonlanmış DNA sekansının fonksiyonunu, o sekansa sahip olmayan mutant suşlar oluşturarak incelemek mümkündür. Bu teknik site-specific gene disruption ya da gen yer değiştirmesi olarak adlandırılmaktadır. In vitro rekombinant DNA metotları kullanılarak, klonlanmış bir DNA parçasında bir veya daha fazla değişiklik yapılabilir. Bu teknik *Pichia pastoris* 'e uygulanmış ve bu mayanın genomunun iki adet fonksiyonel alkol oksidaz genine (AOX1 ve AOX2) sahip olduğu bulunmuştur. Mutant analizleriyle AOX1'in metanolde büyüyen hücrelerde metanol oksidasyon aktivitesini sağlayan temel gen olduğu, AOX2'nin ise daha düşük seviyede ifade edilip metanolde daha az aktif olduğu belirlenmiştir (Cregg and Maden., 1988). Metilotrofik bir maya olan *Candida boidinii*'deki TRM1 geni de metanolle indüklenen birkaç proteinin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlamaktadır (Yurimoto et al., 2008).

2. 8. Metilotrofik Mayaların Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılması

Metilotrofik mayaların genetiği ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bunun nedeni bu mayaların metanol üzerindeki büyüme sırasında çok iyi regüle edilmiş ve yüksek oranda ifade edilen enzimlere sahip olmalarıdır. Bu enzimler çevre biyoteknolojisinde ve diğer proseslerde kullanılmaktadır. Metilotrofik mayaların biyoteknolojide kullanılması özellikle son yıllarda rağbet görmüştür. Bu genoslardan *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Yarrowia* ve *Trichosporon* gibi türler büyük öneme sahiptir (Kaszycki et al., 2006). Bu türlerden bazıları kirli toprakların temizlenmesinde, ağır metal kontaminantların biyoremediasyonunda ve mikrobial sensör olarak kullanılmaktadır (Kaszycki et al., 2006; Wagner and Harder., 1987). *Pichia pastoris* biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan önemli bir konukçudur. Yabancı proteinlerin sentezini yüksek verimde sağlamada çok başarılıdır (Cregg and Cereghino., 2000; Daly and Cregg., 2005; Macauley et al., 2005). *Pichia pastoris*'in ifade sistemi *Saccharomyces cerevisiae* ile karşılaştırıldığında *P.pastoris*'in ifade sistemi daha avantajlıdır. *P.pastoris*'te oluşturulan ucuz bir ortamda hücre içi protein salgısı daha yüksektir. Metilotrofik bir maya olan *P.pastoris* metanolü tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Metanol metabolizmasında ilk basamak metanolün alkol oksidaz tarafından oksitlenmesidir. Hücreler metanol üzerinde büyütüldüğünde güçlü bir promotor olan AOX1 geni sayesinde heterolog protein sentezi için birçok vektör dizayn edilebilmektedir. Böylece yüksek oranda protein sentezi sağlanmaktadır (Daly and Cregg., 2005). Gen ifadesinin metanolle indüklenmesi bazı koşullarda uygun olmayabileceğinden AOX1 promotoruna alternatif olarak farklı promotorlar kullanılabilir. GAP promotoru (gliseraldehyde 3- phosphate dehydrogenase) AOX1 ile karşılaştırılabilir düzeyde yüksek protein ifadesi sağlamaktadır. FLD1(glutathione bağlı formaldehyde dehydrogenase) promotoruda yüksek

protein ifadesi sağlar. Aynı zamanda ucuz bir azot kaynağı olan metilamin tarafından indüklenebilir. Diğer alternatif promotorlar olan PEX8 ya da YPT1 ise düşük protein ifadesi sağlamalarına rağmen diğer promotorlardaki protein ifadesi sırasında meydana gelebilecek yanlış protein katlanmaları ya da posttranslasyonel hatalar olduğunda bu promotorlar tercih edilebilir (Cereghino and Cregg., 2000; Daly and Cregg., 2005; Macauley et al., 2005).

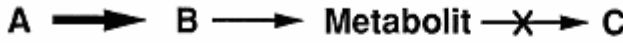
Pichia pastoris'te bir ifade sisteminin oluşturulması için tercih edilen yöntem ifade sisteminin *Pichia pastoris* genomuna integrasyonunu içermektedir. Bu da üretici strainlerin maksimum stabilitesini ve genoma bağlanan bu sistemin çok sayıda kopyasını sağlar böylece rekombinant proteinin yüksek ifadesi sağlanmış olur (Sreekrishna et al., 1997).

2. 8. 1. Metilotrofik mayaların biyoteknolojik uygulamalardaki hücresel fonksiyonları

Kullanışlı bileşiklerin üretimi için temelde 2 tane geleneksel mikrobiyal metot geliştirilmiştir. Bunlardan biri Fermentatif metot, diğeri ise enzimatik metottur. Fermentatif metotta metabolitin kendisi (Şekil 2. 8), kullanışlı bir bileşiktir ve hücre büyümesiyle metabolitlerin üretimi ikiye katlanır. Bu metodun iyi bir örneği Antibiyotik ve Amino asit fermentasyonlarıdır. Enzimatik metotta hücreler biyokatalist olarak kullanılır ve hücrenin büyümesi gerekmemektedir. Reaksiyon substratı olarak yalnızca metabolitler değil suni bileşiklerde kullanılabilir. Bu iki konveksiyonel metot temel bilimler olan mikrobiyoloji, biyokimya ve genetik tarafından desteklenir. 1970'lerin sonunda Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi bu metotlara yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Fermentatif metabolit üretimi biyosentetik genlerin arttırılmasıyla büyük oranda hızlandırılabilir. Bu teknolojiler metabolik mühendislik olarak adlandırılmaktadır. Enzimatik metotla yüksek termostabilite ve yüksek spesifite gibi özelliklere sahip olan

bir süper enzim enzim mühendisliği yoluyla elde edilebilir (Walker., 1998; Kato et al.,1999).

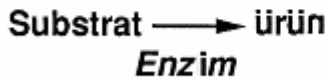
Fermentatif Yöntem



Biyokimya
Mikrobiyoloji
Genetik

Yeni Ürün

Enzimatik metot



Metabolizma mühendisliği

Genetik mühendisliği

Protein Mühendisliği

"Süper Enzim"

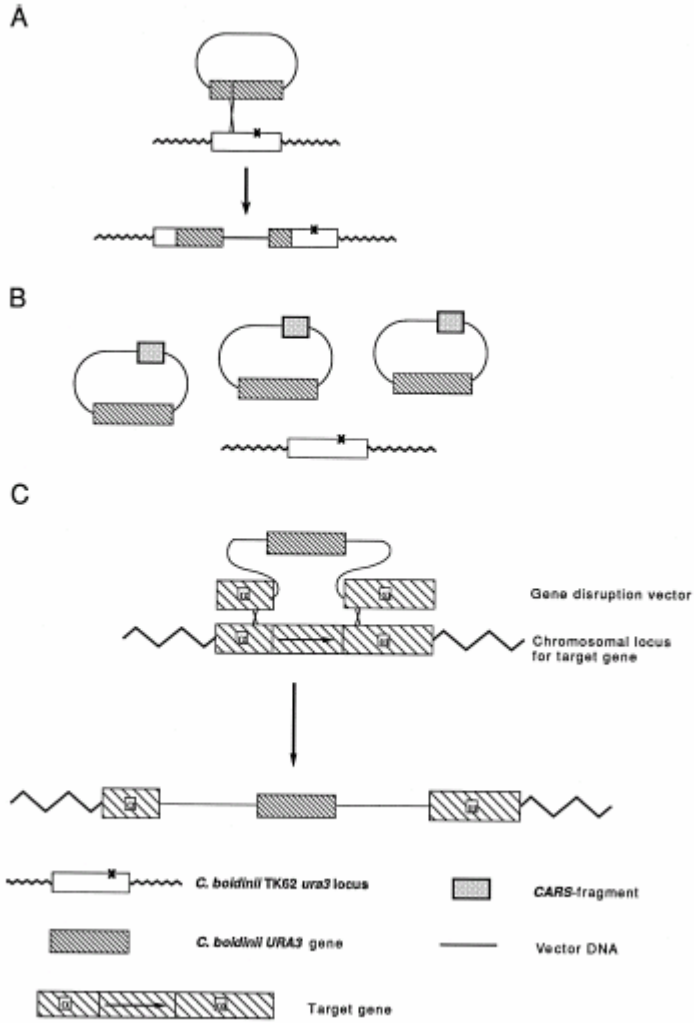
Şekil 2. 8. Biyokimya, Mikrobiyoloji ve Genetikte süper enzim oluşumu ve yeni protein sentezi için fermentatif ve enzimatik metotlar (Kato et al., 1999).

Metilotrofik bir ökaryot olan *Candida boidinii* (başlangıçta *Kloeckera* olarak tanımlanmıştır) metilotrofik bir maya olarak akademik ve uygulamalı alanlarda üzerinde çok çalışılan bir organizmadır. 1970 yılında metanol asimilasyonu ve disimilasyonu yolizleri C1 metabolizmasındaki her enzimin saflaştırılmasıyla açıklanmıştır (Kato et al., 1999).

2. 8. 2. Metilotrofik mayalarda güçlü ve regüle edilebilir genler

Maya gen ifadeleri aşağıdaki avantajlara sahiptir. a) maya hücreleri endüstriyel düzeyde yüksek bir verime sahiptir. b) salgılama için gerekli olan ökaryotik intraselüler yapılar vardır. c) protein modifikasyonu ve katlanması maya hücrelerinde vardır. *Candida boidinii* sitrik asit, ATP ve aldehitler gibi kullanışlı metabolitlerin üretiminde potansiyel bir üreticidir. *Candida boidinii*

için bir transformasyon sistemi urasil oksotrof (ura3) strain, kromozomal integratif vektör ve özerk bir replikasyon vektörüyle inşa edilir. *C.boidinii*'deki her spesifik gen eğer bu hücre için öldürücü olmayacaksa bozulabilir (genetik transformasyon için) (Şekil 2.9). Alkol oksidaz geni metanol büyümesi sırasında çok fazla sentezlenir fakat glukoz ya da etanol varlığında baskılanır. *C.boidinii*'deki heterolog gen ifadesi AOD1 promotoru altında *Saccharomyces cerevisiae*'nin adenylate kinase, ifade vektörü olan pTRex kullanılarak oluşturulmuştur (Kato et al., 1999).



Şekil 2. 9. *Candida boidinii*'de moleküler transformasyon A) integratif transformasyon B) replikatif sekansla(ARS) transformasyon C) gen bozulması (Kato et al.,1999).

2. 8. 3. Metilotrofik mayaların heterolog gen ifadeleri için taşıyıcı olarak kullanılması

Saccharomyces cerevisiae, genetiği ve moleküler biyolojisi hakkındaki detaylı bilgiler sayesinde heterolog proteinlerin üretiminde taşıyıcı olarak kullanılmak üzere, *Escherichia coli*'ye alternatif olarak

geliştirilmiştir. *S.cerevisiae*'nin kullanılmasıyla, bazı proteinlerin laboratuvar ölçeğinde az miktarlarda, başarılı bir şekilde üretildiği rapor edilmiştir. Ancak laboratuvar ölçeğindeki prosesleri, daha faydalı olacak ölçeklere büyütmede problemler çıkmaktadır. Bu problemlerin sebeplerinden birisi, ifade için seçilen promotor'ların zayıf ve iyi regüle edilmemiş olmalarıdır. İfade yapıları, normal olarak multi- kopyalı plazmitlere yerleştirilmekte ve yüksek hücre yoğunluğunda çalışan fermentörlerde plazmit dağılımı, kopya sayısı ve stabilite sorun haline gelmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* ifade sistemlerindeki bir başka sorun ise, yabancı proteinlerin yeterli seviyede salgılanmaması ve ürünün biyolojik aktivitesinin düşük olmasıdır. Memeli veya hayvan hücre kültürlerinin kullanılması, biyolojik aktivitesi yüksek proteinler elde edilmesini sağlamaktaysa da, maliyeti yükseltmektedir. Oysa metilotrofik mayaların metabolik yolları, enzimleri ve bu enzimlerin hücredeki konumları sayesinde, metanol regülasyonu altında yüksek verimli bir ifade sisteminin oluşturulması mümkündür. Tek karbonlu bileşikler üzerinde büyürken metilotrofik mayalar yüksek oranda alkol oksidaz üretmekte ve bu enzim de peroksizomlarda yer almaktadır. Bu sırada peroksizomların hacmi, toplam hücre hacminin %80'ini oluşturacak kadar artmaktadır. Bu özellikler, yabancı genlerin ifade edilmeleri için taşıyıcı olarak metilotrofik mayaların kullanılmasını ve yabancı proteinlerin, proteolize karşı korunacakları bir yer olan peroksizomlarda paketlenmelerini mümkün kılmaktadır (Cregg and Maden., 1988; Harder and Brooke.,1990, Stockar et al., 2007; Cregg et al., 2005).

2. 8. 4. *Pichia pastoris*'in heterolog proteinlerin üretiminde taşıyıcı sistem olarak kullanılması

Son yıllarda, metanolü metabolize edebilen endüstriyel bir maya türü olan *Pichia pastoris*'in taşıyıcı olarak kullanıldığı sistemlerde heterolog protein üretimi konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Bu organizmanın alkol

oksidaz promotorunun (AOX1) izolasyon ve karakterizasyonu gerçekleştirildiği gibi, bir transformasyon sistemi de geliştirilmiştir. Bu sistemde, bir ifade vektörüne eklenmiş olan yüksek oranda ifade edilmiş alkol oksidaz ve dihidroksiaseton sentaz promotor'ları sayesinde, sadece büyüme sırasında gerekli olacak uygun karbon kaynağının seçilmesi veya metanol ekleyip heterolog genlerin ifadesinin başlatılması ile yabancı proteinlerin sentezinin indüklenmesi ve düzenlenmesini sağlamak mümkündür. Bu organizma, THP üretimi için geliştirildiğinden, uzun süreli sürekli kültürde yüksek hücre yoğunluğunun sağlanması için uygun büyüme koşulları konusundaki çalışmalar daha önce zaten yapılmıştır. Yani *Pichia pastoris*, heterolog gen ifadesi için ideal bir sistem oluşturmaktadır. Bu ifade sistemiyle, transformasyona uğratılmış hücrelerin metanolde büyümesi sırasında, toplam proteinin %20'sine yakın miktarda yabancı protein üretilmesi sağlanmıştır. Bu sistemin en başarılı uygulaması, hepatit B yüzey antijeninin üretilmesi olmuştur. Yapısal gen, yaklaşık 24 kDa'luk hidrofobik bir proteini şifrelemektedir. İfade vektörünün yapılması için, alkol oksidaz geninin promotoru başlangıç kodonunun hemen üzerinden bağlanmış ve sentetik EcoR1 bağlayıcıları eklenmiştir. Sadece kodlama sekansı bulunan hepatit geni parçasının hemen ardından ise alkol oksidaz geninden alınmış, transkripsiyonu sona erdirme sinyalleri gelmektedir. Organizma ilk olarak hepatit monomeri üretimi gerçekleştirilmeden %6 gliserollü ortamda büyütülmüştür. Daha sonra ortama metanol eklenmiş, böylece alkol oksidaz promotoru çalışmaya başlamıştır. 150- 200 saat sonunda toplam proteinin %2-3'ü olacak şekilde 400- 600 mg/l antijen üretilmiştir. Yapılan çalışmalar, bu ifade sisteminin, üretkenlikle herhangi bir kayıp olmadan 240L hacme kadar ölçeğinin büyütülebileceğini göstermiştir (Ohi et al., 2008; Harder and Brooke., 1990; Dunn and Tuttle., 1995; Kunze et al., 2005).

2. 8. 5. *Pichia pastoris*'ten heterolog proteinlerin salgılanması

Pichia pastoris'in taşıyıcı olarak kullanıldığı heterolog protein üretimi sisteminin kullanımının arttırılabilmesi için, bu mayadan protein salgılanması konusu araştırılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen proteinlerin büyük bir kısmı doğal olarak salgılanan proteinler veya viral glikoproteinler gibi hücre yüzeyi proteinleridir. Bu nedenle, heterolog proteinleri sitoplazmik proteinler olarak üretmek ya da salgılama yolizini kullanıp sentezlemek şeklinde iki alternatif yol arasından seçim yapılması gerekmektedir. Heterolog proteinlerin salgılanarak elde edilmesi daha avantajlı görülmektedir. Çünkü bu yolla proteinin otamdan uzaklaştırılıp saf halde elde edilmesi daha kolay olmakta, proteinin konformasyonu doğru olmakta ve proteinin translasyon sonrası modifikasyonu daha iyi olmaktadır. Ürünün saflık derecesinin yüksek olması açısından, proteinin hücreden dışarı salgılanması, sitoplazmada üretilmesinden çok daha iyidir. Bu açıdan, *Pichia* sisteminin diğer ifade sistemlerine göre üstünlükleri bulunmaktadır. *Pichia pastoris* hücreleri proteinsiz minimal besiyerinde büyüdüklerinden kültür ortamında bulunan proteinleri sadece *P.pastoris*'in salgıladığı proteinler oluşturmaktadır (Digan et al., 1988).

Mikroorganizmalardan protein elde edilmesi çalışmalarının bir başka amacı, istenilen proteinin doğru konformasyonla elde edilmesidir. Salgılanan proteinler genellikle sülfidril bakımından zengindir ve disülfid bağı oluşmasını destekleyecek şekilde okside edici özelliktedir. Oysa sitoplazmada, bunun tam tersi olarak indirgen bir ortam mevcuttur ve disülfid bağları oluşamaz. Proteinin ortamdan alınması için hücrelerin parçalanması, disülfid bağlarının çok hızlı ve rastgele oluşmasına neden olur. Disülfid bağları doğru şekilde oluşmuş sülfidrilce zengin proteinlerin üretiminin en iyi yolu, salgılama yolizlerinin kullanılmasıdır. Proteinin sitoplazmada üretilmesi yerine dışarıya salgılanmasının diğer avantajı, salgılama yolizinde

translasyon sonrası modifikasyonların gerçekleşmesidir. Bu modifikasyonlar arasında, proteinin olgunlaşması için proteolitik ayrılma ve N- asparagine bağlı oligosakkaritlerin eklenmesi bulunmaktadır. Bu tip modifikasyonlar protein konformasyonunu ve tedavi amaçlı kullanılacak proteinlerin serum rezidans süresini etkilemektedir. Bu modifikasyonlar sadece proteinlerin salgılanması sırasında meydana gelmektedir ve sitoplazmik ifadeyle hiçbir ilgisi yoktur (Digan et al., 1988).

Gelecekteki uygulamalarda, yeni endüstriyel enzimlerin üretiminde şüphesiz *P.pastoris* ifade sisteminin kullanımı yaygınlaşacaktır. Bu alanda rekombinant teknolojisinin kullanılması, enzim üretimi için birçok suşun optimize edilmesi ihtiyacını ortadan kaldıracaktır. İç salgılama oranı düşük olduğundan, bu sistemle daha saf enzimler elde edilebilecektir. Rekombinant organizmalarla protein üretimi çok yeni bir teknolojidir. Bu konuda bilimsel veriler arttıkça, daha üretken ifade sistemleri oluşturabilecek ve mayalar, özellikle *Pichia*, bu konuda yaygın olarak kullanılacaktır (Digan et al., 1988; Ohi et al., 2008).

2. 9. Metilotrofik Mayalarla İlgili Olarak Ülkemizde Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde metilotrofik mayaların izolasyonu ve tanılanması ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Araştırmalar sadece THP üretimiyle sınırlı kalmıştır. Bu çalışmalar da çeşitli mikroorganizmaların tarımsal atıklar üzerinde geliştirilmesi konusunda yoğunlaşmıştır. Hidrokarbonların kullanımıyla THP üretimi konusunda ise çok az çalışma bulunmaktadır. Öztürk, (1997) tarafından metilotrofik mayaların izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili bir tez çalışması yapılmıştır. Metilotrofik mayaların çeşitli metabolitlerin üretiminde kullanılmasıyla ilgili olarak ülkemizde yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır.

3. MATERYAL VE METOTLAR

3. 1. Materyal

3. 1. 1. Kullanılan örnekler

Metilotrofik mayaların bulunma ihtimali yüksek olan ortamlar daha çok, çiğ süt, çürümüş meyve, turşu suyu, çürüyen bitki materyali ve organik maddeler açısından zengin olan topraklar olduğundan bu özellikteki topraklardan ve metanı parçalayabilecek özellikte metilotrofik mayaların bulunabilmesi ihtimaliyle, metan gazının fazla miktarda bulunduğu İzmir Harmandalı Düzenli Atık Depolama Tesisi'nden, diMenna'nın (1957) önerdiği, steril kapların toprakta mayaların en çok bulunduğu 2- 10cm derinliğinde yeni kazılmış kısımlara daldırılması yöntemiyle toprak örnekleri alınmıştır (Large., 1983; Harder and Brooke., 1990; Kaszycki et al., 2006; Cooney et al.,1975; Rose and Harrison., 1969). Örneklerin alındığı kaynaklar çizelhe 3.1'de verilmiştir. (Çizelge 3.1)

Çizelge 3. 1. Mayaların İzole Edildiği Örnek Sayısı ve İzole Edildiği Kaynaklar

Örnek Sayısı	Kaynak
1	Turşu suyu örneği
2	Adıyaman TPAO toprak örneği
1	Turşu suyu örneği
1	Turşu suyu örneği
2	Adıyaman TPAO toprak örneği
2	Adıyaman TPAO toprak örneği
2	Adıyaman TPAO toprak örneği
3	Adıyaman TPAO toprak örneği
4	Ege ünv. Yurdu toprak örneği

4	Ege ünv. Yurdu toprak örneği
4	Ege ünv. Yurdu toprak örneği
5	Adıyaman petrol kuyusu toprak örneği
6	Adıyaman petrol kuyusu toprak örneği
6	Adıyaman petrol kuyusu toprak örneği
7	İzmir Harmandalı Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği
7	İzmir Harmandalı Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği
7	İzmir Harmandalı Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği
8	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği
8	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği
9	Çürük şeftali meyvesi
9	Çürük şeftali meyvesi
10	İzmir Ürkmez Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği
10	İzmir Ürkmez Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği
10	İzmir Ürkmez Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği
11	Adıyaman TPAO toprak örneği
11	Adıyaman TPAO toprak örneği
11	Adıyaman TPAO toprak örneği
12	Çiğ sokak sütü örneği
12	Çiğ sokak sütü örneği
13	Ege üniversitesi Yurt Kazan dairesi toprak örneği
13	Ege üniversitesi Yurt Kazan dairesi toprak örneği
14	Ege Üniversitesi Kampus toprak örneği
14	Ege Üniversitesi Kampus toprak örneği
14	Ege Üniversitesi Kampus toprak örneği
15	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği
15	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği

16	Adıyaman TPAO toprak örneği
17	Adıyaman TPAO toprak örneği
18	Çiğ sokak sütü örneği
19	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği
20	Ege Üniversitesi kampüsü toprak örneği

3. 1. 2. Mayaların İzolasyonu ve Tanılanmasında Kullanılan Besiyerleri

3. 1. 2. 1. Zenginleştirme besiyeri

Ogata et al.,'ın (1975) önerdiği besiyeri, toprak örneklerinin zenginleştirilmesi için kullanılmıştır.

Maya ekstraktı	0.05g
Metanol	0.1 ml
Distile su	100 ml

Maya ekstraktı distile suda çözündürüldükten sonra otoklavda 120° C'de 15 dk sterilize edilmiş ve metanol daha sonra eklenmiştir.

3. 1. 2. 2. İzolasyon besiyeri

Tek karbon, azot veya vitamin kaynağı temel alınarak hazırlanan, diğer bütün besin elementleri sağlanmış birçok seçici besiyeri bulunmaktadır. Bu amaçla normal olarak bazal yeast nitrogen base veya yeast carbon base besiyerleri kullanılmaktadır (Beech and Davenport, 1971). Bu çalışmada El Nawawy and Gnan (1983) tarafından önerilen seçici besiyeri kullanılmıştır.

Difco Bacto Yeast Nitrogen Base	0.67g
Metanol	0.1 ml
Agar	2.00g
Distile su	100 ml

Difco Bacto Yeast Nitrogen Base ve agar distile suda çözündürüldükten sonra otoklavda 120° C'de 15 dk sterilize edilmiş ve metanol daha sonra eklenmiştir. Ayrıca, besiyeri sterilize edildikten sonra, daha önce filtrasyonla sterilize edilmiş cycloheximide ve streptomycin çözeltileri, son konsantrasyonları sırasıyla %0.01 ve 50µ/ml olacak şekilde beşiyerine eklenmiştir. Cycloheximide ve streptomycin kullanımı, Kascyzki et al., (2006) tarafından önerilmektedir.

3.1. 2. 3. Tanılama besiyerleri

***Yeast Nitrogen Base Agar**

Difco Bacto Yeast Nitrogen Base 6.7g

Agar 20g

Distile su 1000 ml

İçerik distile suda çözündürüldükten sonra otoklavda 120° C'de 15 dk sterilize edilmektedir. Bu besiyeri, Barnett et al'ın (1983,2000) önerdiği, aerobik büyüme için karbon kaynağı olarak organik bileşikleri kullanma kapasitesinin ve cycloheximide varlığında büyümenin belirlenmesi testlerinde kullanılmaktadır.

***Yeast Carbon Base Agar**

Difco Bacto Yeast Carbon Base 11.7g

Agar 20g

Distile su 1000 ml

İçerik distile suda çözündürüldükten sonra otoklavda 120° C' de 15 dk sterilize edilmektedir. Bu besiyeri, Barnett et al'ın (1983, 2000) önerdiği, aerobik büyüme için azot kaynaklarını kullanma kapasitesinin belirlenmesi testlerinde kullanılmaktadır.

***Malt Yeast Glucose Peptone Broth/Agar (MYGP)**

Malt ekstrakt	3g
Malt Yeast ekstrakt	3g
D-glukoz	10g
Peptone	5g
(Agar)	10g
Distile su	1000 ml

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121⁰C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri saf kültürlerin stoklanmasında, testlerde kullanılmak üzere taze kültürlerin hazırlanmasında, pseudomisel oluşturmayan vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi, Diazonium Blue B ve farklı sıcaklıklarda büyüme testlerinde kullanılmaktadır (Barnett et al., 1983; Wickerham., 1951).

***Malt Extract Broth / Agar**

Malt Extract	30g
Pepton	5g
(Agar)	20g
Distile Su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121⁰C’de 15 dakika süre ile steril edilmiş ve pH 5,4’e ayarlanmıştır (Kreger-van Rij., 1984; Tamer ve ark.,1989). Bu ortam pseudomisel oluşturmayan vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi, ballistosporların mikroskopik olarak incelenmesi, yüksek D- glukoz konsantrasyonlarında büyümenin ve farklı

sıcaklıklarda büyümenin belirlenmesi testlerinde kullanılmaktadır (Barnett et al., 1983, 2000).

***Yeast Extract Broth**

Yeast Extract	3g
Pepton	5g
Distile Su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121⁰C’de 15 dakika süre ile steril edildikten sonra şekerlerin fermentasyon testlerinde kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989; Barnet et al., 1983, 2000). (Farklı metanol konsantrasyonlarında üremede ve formaldehiti kullanma testide de kullanılmıştır) (Kratochilova., 1990; Koloczec et al., 2001)

***Vitamin Free Agar**

Bacto Vitamin Free Yeast Base	16. 7g
Agar (Oxid)	20g
Distile su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121⁰C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri hücrelerin vitamin ihtiyacının belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnet et al., 1983, 2000).

***Osmofilik Yeast Ekstrakt Agar**

Yeast Ekstrakt	3g
Pepton	5g
Agar (Oxid)	20g
Distile su	1000 ml

Ortama %50 ve %60 (w/w) olacak şekilde D glukoz eklenerek otoklavda 121⁰C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların

yüksek şeker konsantrasyonlarında büyüebilme kapasitesinin test edilmesinde kullanılmıştır (Barnet et al.,1983, 2000).

***Üre Agar**

KH ₂ PO ₄	2g
Pepton	1g
Fenol Kırmızısı	0,012g
NaCl	5g
Agar	20g
Distile su	1000 ml
Dekstroz (Glikoz)	2g
Üre solusyonu (%20) *	20 ml

*Üre solüsyonu, membran filtre ile steril edildikten sonra, otoklavda 121 °C’ de, 15 dakika sterilize edilen ortama, steril koşullarda ilave edilmiştir. İzolatlarda ayırt edici bir özellik olan üreaz aktivitesinin bulunup bulunmadığını saptamak amacıyla kullanılmıştır (Van der Walt., 1970; Barnett et al., 1983, 2000; Atlas and Parks., 1997; Atlas., 2004).

***Yeast Pepton Glukoz Agar (YPD)**

Yeast Extract	10g
Pepton	20g
D-Glukoz (Dekstroz)	20g
Agar (Oxoid)	20g
Distile Su	1000 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 121⁰C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların asetik asit üretiminin saptanmasında kullanılmıştır (Strauss et al., 2001).

***Gorodkowa Agar**

D-glukoz	1g
Pepton	10g
NaCl	5g
Agar	20g
Distile su	1000 ml

İçerik, distile suda çözündürüldükten sonra otoklavda 120°C'de 15 dk sterilize edilmektedir. Bu besiyeri ascosporların mikroskopik olarak incelenmesinde kullanılmaktadır (Phaff et al.,1966; Van der Walt, 1970; Barnett et al.,1983,2000 ve Tamer ve ark., 1989).

***Asetate Agar**

Potasyum asetate	9.8g
D-Glukoz	1.0g
NaCl	1.2g
MgSO4.7H2O	0.7g
Maya ekstraktı	2.5g
Agar	20g
Distile su	1000 ml

İçerik, distile suda çözündürüldükten sonra otoklavda 120°C'de 15 dk sterilize edilmektedir. Bu besiyeri, askosporların mikroskopik olarak incelenmesinde kullanılmaktadır (Phaff et al.,1966; Van der Walt., 1970; Barnett et al.,1983).

***Saboraud'un % 4 Glucose- % 0.5 Yeast Extract Agarı**

D-Glukoz	40g
Pepton	20g
Maya ekstraktı	5g
Agar	20g
Distile su	1000 ml

İçerik, distile suda çözündürüldükten sonra otoklavda 120°C'de 15 dk sterilize edilmektedir. Bu besiyeri, bazidiyomisetik mayaların ayırt edilmesinde yararlanılmakta olan diazonium blue B renk testinde kullanılmaktadır (Van der Walt., 1970).

3. 1. 3. Boya ve Çözeltiler

Çalışmalarımızın çeşitli safhalarında kullanılan çözelti ve diğer kimyasallar aşağıda verilmiştir.

***Lugol İyot Çözeltisi**

İyot	5g
KI	10g
Distile Su	100ml.

Kullanım için çözeltinin 1: 5 oranında seyreltilmesi gerekmektedir. Bu çözeltiden özellikle *Cryptococcus* genusuna ait belli türlerin ayırdedilmesi amacı ile kullanılmakta olan hücre dışı nişasta benzeri bileşiklerin üretilmesi testinde indikatör olarak yararlanılmıştır (Barnet et al.,1983, 2000).

***Peptonlu Su**

Pepton	1g
Distile Su	1000 ml.

Örneklerden dilüsyonların hazırlanması için izolasyon aşamasında kullanılmıştır.

***Malachite Yeşili**

Malachite yeşili	5g
Distile su	1000 ml

Bu boya, askosporların mikroskop altında gözlenebilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Van der Walt., 1970).

***Safranin**

Safranin	0.5g
Distile su	1000 ml

Bu boya, askosporların mikroskop altında gözlenebilmesi amacıyla, malachite yeşili ile birlikte kullanılmaktadır (Wan der Walt., 1970).

***Diazonium Blue B (DBB) Çözeltisi**

pH 7'deki soğuk 0.1M tris- HCL tampon çözeltisinin her mililitresi için 1 mg DBB tuzu eklenmektedir. Bu çözelti, basidiomycetic mayaların ayırt edilmesinde yararlanılmakta olan DBB renk reaksiyonunda kullanılmaktadır (Barnett et al.,1983).

***Tris- HCL Tampon Çözeltisi**

A: 0.2M tris çözeltisi

B: 0.2M HCL

50ml A ve 47 ml B çözeltisinden alınarak distile suyla 200 ml'ye tamamlanır ve pH 7 olan Tris- HCL çözeltisi elde edilir. Bu çözelti, DBB çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Kaplan., 1955).

3. 2. Metot

3. 2. 1. Mayaların İzolasyonu

Metilotrofik mayaların izolasyonu için, organik atıklarca zengin topraklar, çiğ süt, çürümüş meyve ve turşu suyundan alınan örnekler 3. 1. 2. 1’de bahsedilen metanol içeren zenginleştirme besiyerinde, 27°C’de shaker’da 48 saat inkübe edildikten sonra, zenginleştirilmiş kültürden katı örnekler için 10 gr, sıvı örnekler için 10 ml alınarak içerisinde 90 ml steril peptonlu su bulunan erlenlere aktararak 10 dakika homojenize edilmiştir. Karışımın homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra bu 10⁻¹’lik seyreltmeden içerisinde 9 ml fizyolojik su bulunan tüplere 1’er ml alınarak 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ve 10⁻⁶’lık seyreltmeler yapılmıştır. Bu son dört seyreltmeden 1’er ml alınarak petrilere konulmuştur ve seçici besiyeri olarak kullanılan % 0.1 metanollü Nitrogen Base ortamı kullanılarak her dilüsyon için paralel ekimler yapılmıştır. 27°C’de 2 gün inkübasyona bırakılan petrilere oluşan kolonilerden elde edilen maya izolatlarının fakültatif ya da obligat metilotrof olup olmadıklarını anlamak için Malt Yeast Glukoz Pepton ortamı kullanılmıştır. Sonuçta mayaların bu ortamda ürediği görüldüğünden saf kültürlerin stoklanması, mayaların saklanması uygun bir ortam olarak önerilen malt yeast glucose peptone agar kullanılmış, stoklar +4°C’de muhafaza edilerek dört ayda bir yenilenmiştir (Beech and Davenport., 1971; Kirsop., 1984; Kirsop and Kurtzman., 1990; Öztürk., 2007).

3. 2. 2. Mayaların İdentifikasyonu

İzolatların genus ve tür düzeyinde tanımlanması için Barnett et al., (1983,2000) tarafından önerilen, metanol kullanan mayalarla ilgili tayin anahtarı (Çizelge 4.1) ve glukozu fermente eden mayalarla ilgili tayin anahtarı (Çizelge 4.2) kullanılmıştır. İzole edilen strainler MYGP’de

üredikleri için fakültatif olduğu düşünülerek glukozu fermente edebilen mayalarla ilgili tayin anahtarı da kullanılmıştır.

3. 2. 2. 1. Metilotrofik Olduğu Düşünülen Mayaların Farklı Metanol Konsantrasyonlarına Olan Toleranslarının Saptanması

3. 2. 1’de belirtilen yöntem kullanılarak elde edilen izolatlar Barnett et all., (1983, 2000) tarafından önerilen Yeast Ekstrakt Broth ortamı kullanılarak bu besiyerine değişen konsantrasyonlarda (% 1(v/v), %2(v/v), %3(v/v), %4(v/v), %5(v/v), %6(v/v), %7(v/v)) metanol koyarak izolatların bu konsantrasyonlarda üreyip üremediği test edilmiştir (Kratochilova., 1990).

3. 2. 2. 2. Farklı Sıcaklıklarda Büyüme

Çalışmamızda 30° C, 35° C, 37° C, 40° C, 45° C, 48°C ve 50° C arasındaki değişen sıcaklıklarda Barnet et all., (1983, 2000) tarafından önerilen Malt Ekstrakt Agarda denemeler yapıp izolatların bu sıcaklıklardaki büyüme kapasitesine bakılmıştır.

3. 2. 2. 3. Metilotrofik Olduğu Düşünülen Mayaların Formaldehiti kullanma Kapasitesinin Saptanması

Koloczek et al, (2001) tarafından tarafından önerilen %1 ml oranında formaldehit içeren Yeast Ekstrakt Broth (Barnet et all., 1983,2000) ortamı kullanılarak izolatların bu konsantrasyonda üreyip üremediği test edilmiştir.

3. 2. 2. 4. Metilotrofik Olduğu Düşünülen Mayaların Metilamini Kullanma Kapasitesinin Saptanması

Metilotrofik mayalar metilamini normalde azot kaynağı olarak kullanmaktadır. Elde ettiğimiz izolatların metilamini kullanma kapasitelerine bakmak için Bellion and Johns, (1991) tarafından önerilen %1 ml oranında metilamin içeren Yeast Ekstrakt Broth (Barnet et all., 1983,200) ortamı

kullanılarak izolatların metilamini kullanıp kullanmadığı test edilmiştir (Glukoz ortama sonradan eklenmiştir).

4. BULGULAR

4. 1. İzolatların Elde Edilmesi

3. 2. 1.'de belirtilen yöntemle, 20 farklı örnekten (12 adet toprak, 3 adet turşu suyu, 3 adet çiğ süt, 2 adet çürük meyve) farklı görünüşteki maya kolonileri seçilerek toplam 42 izolat elde edilmiştir. Bu 42 izolat yukarıda bahsettiğimiz gibi fakültatif oldukları düşünülerek öncelikle MYGP ortamında büyütülmüştür (Şekil 4.1).



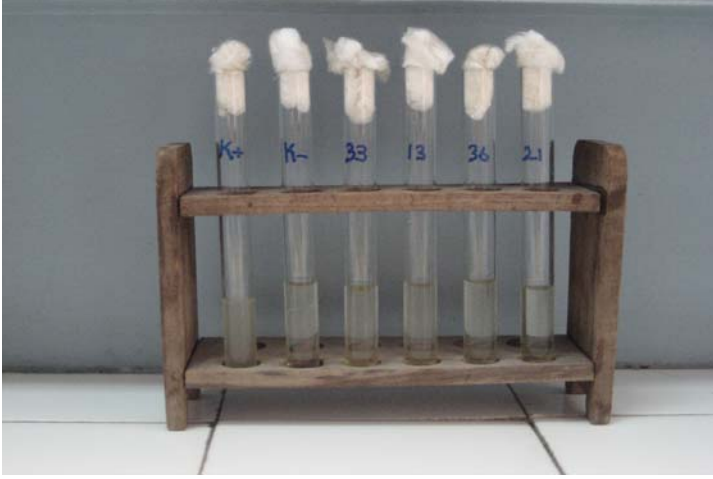
Şekil 4. 1. 12 numaralı izolatın MYGP agardaki kolonilerin 27°C'de 2 günlük görünümü

MYGP besiyerinde 19 numaralı izolat üremediğinden metanol açısından obligat olduğu düşünülerek metanollü N-Base agarda büyütülmeye çalışılmıştır. Fakat burada da üremediğinden daha sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır. Daha sonra bu strainler yukarıda bahsettiğimiz Barnett et al., (1983,2000) tarafından önerilen Yeast Ekstrakt Broth ortamı kullanılarak tanılamaya gidilmiştir. Aynı zamanda izolatların sıvı besiyerinde değişen metanol oranlarına olan toleransı (Şekil 4.2, 4.3, 4.4), katı besiyerindeki

üremeleri (Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8), formaldehiti kullanma kapasiteleri (Şekil 4.9) ve metilamini kullanma kapasitelerine bakılmıştır (Şekil 4.10)

4. 1. 1. Karbon kaynağı olarak metanol kullanan mayaların değişen metanol konsantrasyonlarına olan toleransı

Karbon kaynağı olarak metanolü kullanan mayaların değişen metanol konsantrasyonlarına olan toleransının ölçülmesi için Barnett et al., (1983,2000) tarafından önerilen Metanol içeren Yeast Ekstrakt Broth kullanılarak değişen konsantrasyonlarda (%1- %7) metanol kullanılarak strainlerin toleransına bakılmıştır (Kratochilova., 1990). %1- %5 (Şekil 4.2, Şekil 4.3) arasındaki metanol konsantrasyonlarında izolatların hepsinde (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 21, 22, 23, 26, 27, 29, 31, 35, 40 ve 41 numaralı izolat hariç) benzer yoğunlukta üreme görülmüştür. 21 ve 35 numaralı izolatlar %1 oranındaki metanolde üremiş olup bunun üstündeki oranlarda üreyememiştir. %6 metanol içeren besiyerinde ise değişen yoğunlukta üreme görülmüş olup en iyi üreyen türlerin 13, 14, 15, 20, 25, 32, 36, 37, 38 ve 39 numaralı izolatların olduğu görülmüştür. %7 metanol konsantrasyonunda ise hiçbir izolatta üreme görülmemiştir (Şekil 4.4). Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de ise izolatların %1 metanollü katı (N-Base Agar) besiyerindeki genel koloni görünimleri verilmiştir.



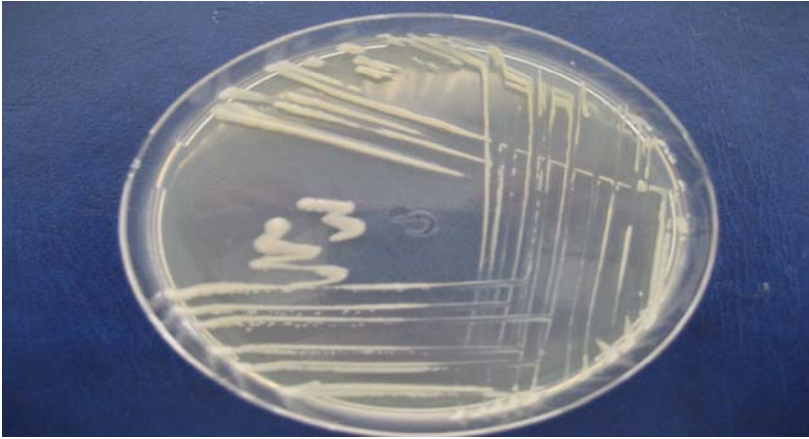
Şekil 4. 2. % 1 Metanol İçeren Yeast Extract Broth'da Bazı İzolatların 2 Günlük Görünümü (işaretli izolatlar metilotrof olarak tanılanmıştır)



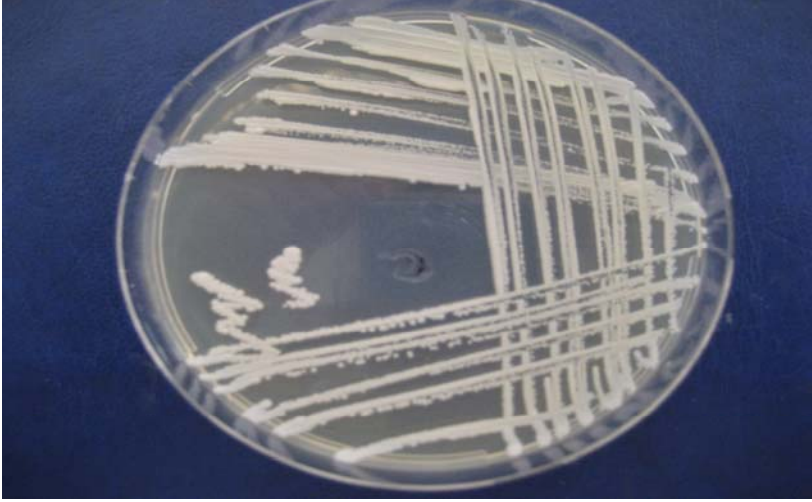
Şekil 4. 3. %5 Metanol İçeren Yeast Extract Broth'da İzolatların 2 Günlük Görünümü



Şekil 4. 4. %7 Metanol İçeren Yeast Extract Broth'da İzolatların 2 Günlük Görünümü (işaretli izolatlar metilotrof olarak tanılanmıştır)



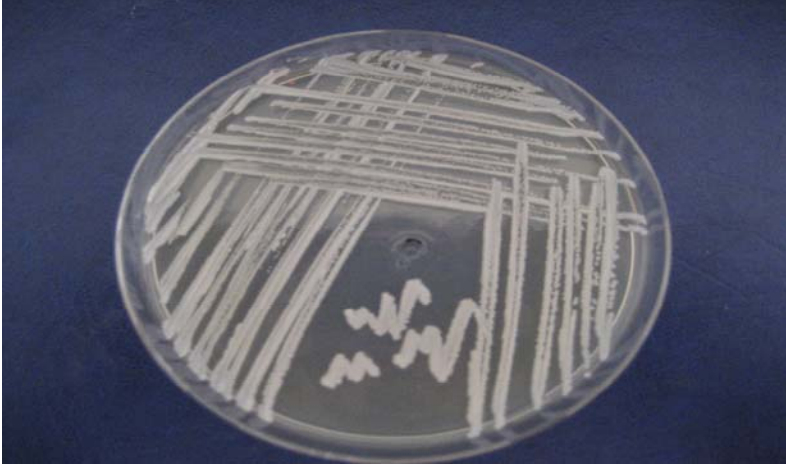
Şekil 4. 5. 33 numaralı izolatın %1 metanollü N Base agarda 27°C'de 2 günlük genel koloni görünümü



Şekil 4. 6. 36 numaralı izolatın %1 metanollü N Base agarda 27°C’de 2 günlük genel koloni görünümü



Şekil 4. 7. 34 numaralı izolatın %1 metanollü N Base agarda 27°’de 2 günlük genel koloni görünümü



Şekil 4. 8. 10 numaralı izolatın %1 metanollü N Base agarda 27°C’de 2 günlük genel koloni görünümü

4. 1. 2 Karbon kaynağı olarak metanol kullanan mayaların formaldehiti kullanma kapasitesi

Fakültatif metilotrof olduğu düşünülen izolatlar Koloczek et al, (2001) tarafından önerilen % 1ml oranında formaldehit içeren Yeast Ekstrakt Broth ortamına ekilmiştir. Bu konsantrasyondaki büyümeye bakıldığında 13, 14, 15, 20, 25, 32, 36, 37, 38 ve 39, 33 ve 21 numaralı izolatlar üremiş diğerlerinde ise üreme saptanmamıştır (Şekil 4. 9).



Şekil 4. 9. % 1 Formaldehit İçeren Yeast Extract Broth'da İzolatların 2 Günlük Görünümü (Numaralı izolatlar metilotrofik olarak tanılanmıştır)

4. 1. 3. Karbon kaynağı olarak metanol kullanan mayaların metilamini kullanma kapasitesi

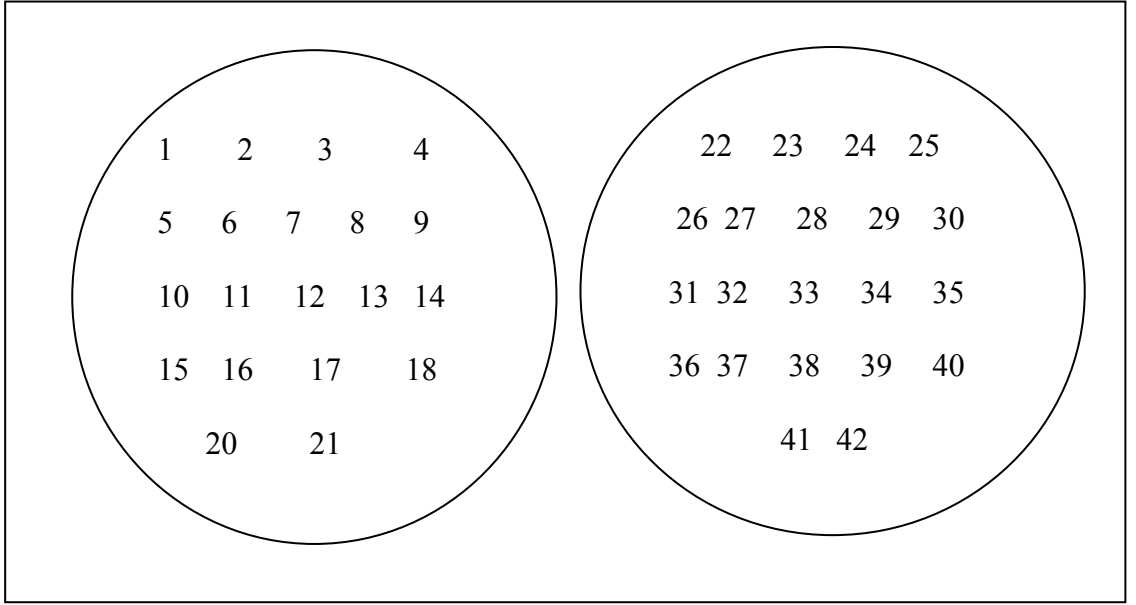
Elde ettiğimiz izolatların metilamini kullanma kapasitelerine bakmak için Bellion and Johns, (1991) tarafından önerilen %1ml oranında metilamin içeren Yeast ekstrakt broth ortamı kullanılmış fakat başlangıçta üreme görülmemiş daha sonra ortama glukoz eklenmiş ve düşük yoğunlukta olsa bile 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 25, 32, 36, 37, 38, 39, 33, 28, 30, 34 ve 42 numaralı izolatların ürediği diğer izolatların ise üremediği saptanmıştır (Şekil 4.10).



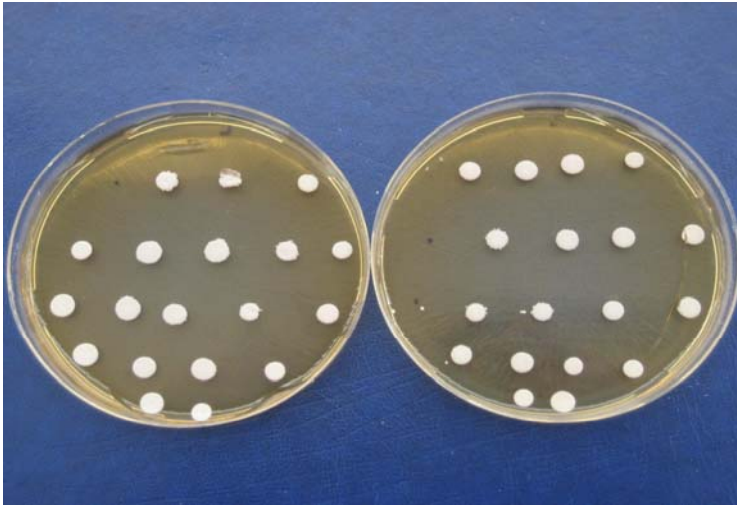
Şekil 4. 10. % 1 Metilamin İçeren Yeast Extract Broth'da İzolatların 2 Günlük Görünümü (Numaralı izolatlar metilotrofik olarak tanılanmıştır)

4. 1. 4. Farklı Sıcaklıklarda Büyüme

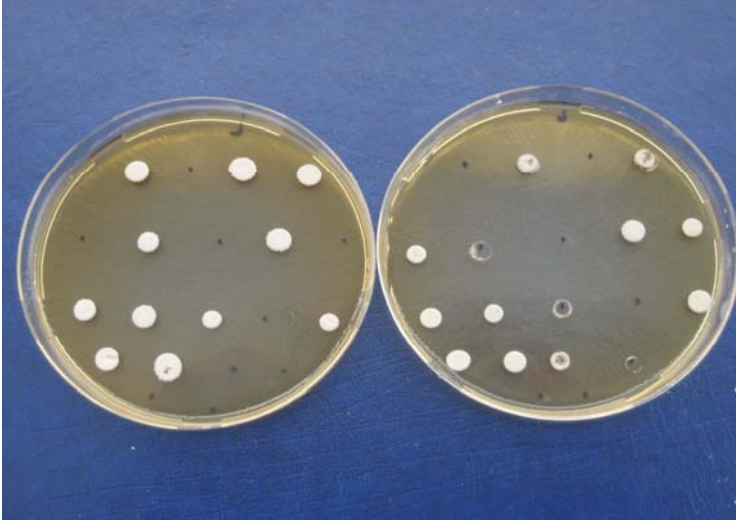
Araştırmamızda, izole edilen metilotrofik mayaların inkübasyonu 27°C'de gerçekleştirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan sıcaklık denemelerinde (30° C, 35° C, 37° C, 40° C, 45° C, 48°C ve 50° C) izolatların farklılık gösterdiği saptanmıştır. 40°C'de 1, 26 ve 31 numaralı izolatlar hariç hepsinin ürediği görülmüştür (Şekil 4.11). 45°C'de 2, 5, 7, 9, 13, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 28, 34, 40 ve 41 numaralı izolatlar hariç diğerlerinde üreme görülmüştür (Şekil 4.12). 48°C'de 3 az da olsa 11, 15, 16, 17 ve 18 numaralı izolatlarda üreme görülmüş, diğerlerinde üreme görülmemiştir (Şekil 4.13). 50°C'de ise hiçbir izolatta üreme görülmemiştir (Şekil 4.14). 26 numaralı izolat 40°C'de üreyemediği halde 45°C'de üremiş, 17 numaralı izolat ise 45° C'de üremediği halde 48°C' de üremiştir.



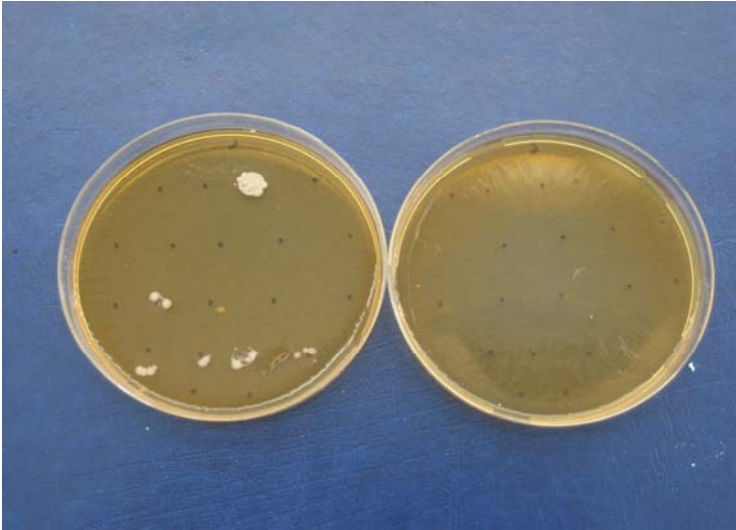
Fenotipik Tanılama Testlerinde İzolatların Ekilmesinde İzlenilen Sıra; 1- 42 Arası İzolat Numaraları.



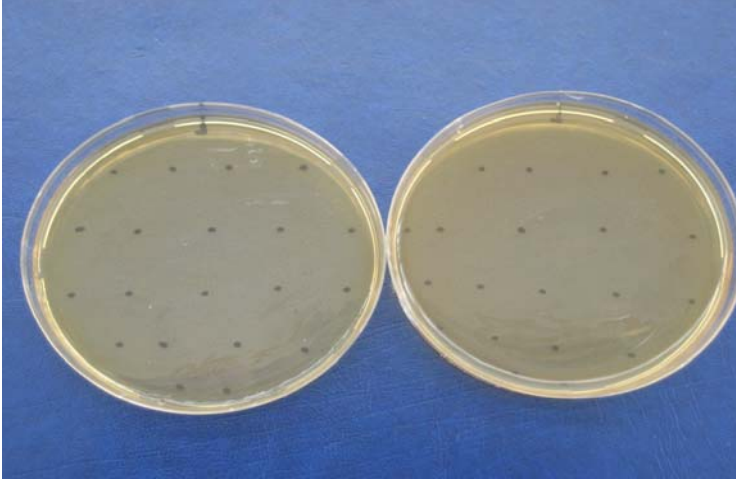
Şekil 4. 11. Malt Ekstrakt agarda 40 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



Şekil 4. 12. Malt Ekstrakt Agarda 45°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



Şekil 4. 13. Malt ekstrakt agarda kolonilerin 48°C’de 2 günlük görünümü



Şekil 4. 14. Malt ekstrakt agarda kolonilerin 50⁰C’de 2 günlük görünümü

4. 2. İzolatların Tanımlanması

4. 1’de belirtilen 41 izolat besiyerine % 0.1 oranında metanol ilave edilerek elde edildiği için aslında 41 izolatın besiyerinde metanolden başka karbon kaynağı olmadığı için 41 izolatın hepsi metilotrofik maya olarak değerlendirilmiş ve Malt Yeast Glukoz Pepton Agarda büyütülmüştür. İzolatlar bu besiyerinde glukozu karbon kaynağı olarak kullandıkları için izolatlar fakültatif metilotrof olarak kabul edilmiştir. Dolayısıyla bu izolatların %0.1’lik gibi düşük bir metanol konsantrasyonunda büyümelerinden dolayı metilotrofik olarak değerlendirilmesi şüphe götürmektedir. Belirtilen nedenlerle 41 izolatın hepsi identifikasyon denemesine alınmış ve hepsinin farklı oranlardaki metanol toleransına bakılmıştır. Ancak daha sonra yapılan %1(v/v), %2(v/v) ve %(3v/v) metanol konsantrasyonunda bütün izolatlar üremiş (1, 3, 4, 5, 6, 7, 21, 22, 23, 26, 27, 29, 31, 35, 40 ve 41 numaralı izolatlar hariç), %4(v/v) ve üzerindeki metanol konsantrasyonlarında (%5(v/v), %6(v/v) 41 izolatın 25’i üremiş (2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 24, 25, 28, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39,

42) diğerleri ürememiştir. Ancak 8 numaralı izolat % 1 ve üstündeki metanol konsantrasyonlarında üremesine rağmen daha sonra tekrarlanan çalışmalarda bu metanol konsantrasyonunda üremediği görülmüştür. Nitekim tanılamada da metilotrofik maya olmadığı görülmüş, bu yüzden metilotrof olarak değerlendirilmemiştir. 21 ve 35 numaralı izolatlar ise %1'in üzerindeki metanol konsantrasyonlarında üreyememesine rağmen daha sonra yapılan tanılamada metilotrof olarak tanımlanmışlardır. İzolatların genus ve tür düzeyinde tanımlanması, Barnett et al., (2000) tarafından önerilen “metanol kullanan mayalar” ile ilgili 9 numaraları tayin anahtarı (Çizelge 4.1) ve glukozu fermente edebilen mayalarla ilgili tayin anahtarı (Çizelge 4.2) kullanılmıştır. 1 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida bertae*, 2 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida ovalis*, 3 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida chilensis*, 4 numaralı izolat *Pichia* genusunun *Pichia holstii*, 5 numaralı izolat *Lodderomyces* genusunun *Lodderomyces elongisporus*, 6 numaralı izolat *Rhodotorula* genusunun *Rhodotorula minuta*, 7 numaralı izolat *Debaryomyces* genusunun *Debaryomyces castellii*, 8 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida sequanensis* türü, 22 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida incommunis*, 23 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida albicans*, 26 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida glabrata*, 27 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida stellimalicola*, 29 numaralı izolat *Pichia* genusunun *Pichia holstii* türü, 31 numaralı izolat *Stephanoascus* genusunun *Stephanoascus smithiae*, 35 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida nemodendra*, Değişik toprak örneklerinden izole edilen 13,14, 15, 20, 25, 32, 36, 37, 38 ve 39 numaralı izolatlar *Pichia* genusunun *Pichia angusta* türü, 40 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida chilensis* türü 21, 28, 30, 34 ve 42 numaralı izolatlar *Pichia* genusunun *Pichia ciferrii*, 2 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida ovalis* türü, 17 ve 33 numaralı izolatlar *Candida* genusunun

Candida boidinii türü, 9 ve 12 numaralı izolatlar *Pichia* genusunun *Pichia kodamae* türü, 11 ve 18 numaralı izolatlar *Pichia* genusunun *Pichia methanolica* türü, 16 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida methanosorbosa* türü, 10 ve 24 numaralı izolatlar *Pichia* genusunun *Pichia pini* türü, 35 numaralı izolat *Candida* genusunun *Candida nemodendra* türü olarak tanımlanmıştır. Bu türlerin sistematik kategorileri de Çizelge 4. 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Metanol Kullanan Mayaların Tayin Anahtarı (Barnett et al., 2000).

Testler	Negatif	Pozitif
1 Eritritol Asimilasyonu	2	27
2 D-Galaktoz Asimilasyonu	3	15
3 Sellobiyoz Asimilasyonu	4	10
4 DL-Laktat Asimilasyonu	5	9
5 α,α -TrehalozAsimilasyonu	6	7
6 Sellobiyoz Fermentasyonu	<i>Candida maris</i>	<i>Pichia pini</i>
7 Sellobiyoz Fermentasyonu	8	<i>Pichia pini</i>
8 D-Triptofan Asimilasyonu	<i>Pichia minuta</i>	<i>Candida pignaliae</i>
9 Sellobiyoz Fermentasyonu	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Pichia pini</i>
10 α,α -TrehalozAsimilasyonu	<i>Candida sonorensis</i>	11
11Sellobiyoz Fermentasyonu	12	14
12 Kuinik Asit Asimilasyonu	<i>Pichia minuta</i>	13
13 0.01% Sikloheksimid Asimilasyonu	<i>Pichia henricii</i>	<i>Pichia glucozyma</i>

14 Nitrit Asimilasyonu	<i>Pichia pini</i>	<i>Pichia glucozyma</i>
15 α,α -Trehaloz Asimilasyonu	16	22
16 D-Ksiloz Asimilasyonu	17	18
17 Sellobiyoz Fermentasyonu	<i>Dipodascus ambrosae</i>	<i>Pichia pini</i>
18 L-Sorboz Asimilasyonu	19	20
19 Sellobiyoz Fermentasyonu	<i>Dipodascus armillariae</i>	<i>Pichia pini</i>
20 Sellobiyoz Fermentasyonu	21	<i>Pichia pini</i>
21 37° C'deki Büyüme	<i>Dipodascus albidus</i>	<i>Dipodascus australiensis</i>
22 DL-Laktat Asimilasyonu	23	25
23 Sellobiyoz Fermentasyonu	24	<i>Pichia pini</i>
24 L-Sorboz Asimilasyonu	<i>Candida nitratophila</i>	<i>Pichia ofunaensis</i>
25 D-Glukoz Fermentasyonu	17	26
26 Nitrit Asimilasyonu	28	40
27 Nitrit Asimilasyonu	29	39
28 D-Galakturonik Asit Asimilasyonu	30	34
29 L-Sorboz Asimilasyonu	31	32
30 α,α -Trehaloz Asimilasyonu	<i>Pichia kodamae</i>	<i>Pichia pini</i>
31 Sellobiyoz Fermentasyonu	33	<i>Pichia methanolica</i>
32 Sellobiyoz Asimilasyonu	<i>Candida pini</i>	<i>Pichia pini</i>
33 Sellobiyoz Fermentasyonu	35	36
34 D-Glukoz Fermentasyonu	<i>Candida nemodendra</i>	<i>Pichia pini</i>
35 Sellobiyoz Fermentasyonu	37	38
36 Sellobiyoz Asimilasyonu	<i>Pichia trehalophila</i>	<i>Pichia pini</i>

37 Sellobiyoz Fermentasyonu	<i>Pichia methanolica</i>	<i>Candida ovalis</i>
38 D-Triptofan Asimilasyonu	<i>Candida celluloytica</i>	<i>Pichia naganishi</i>
39 Melesitoz Asimilasyonu	41	47
40 Sellobiyoz Asimilasyonu	42	46
41 Melesitoz Asimilasyonu	43	45
42 DL-Laktat Asimilasyonu	44	<i>Candida nanaspora</i>
43 D-Galaktoz Asimilasyonu	<i>Pichia finlandica</i>	<i>Pichia philodendri</i>
44 37° C'deki Büyüme	<i>Candida boidinii</i>	<i>Pichia methylica</i>
45 α,α -Trehaloz Asimilasyonu	<i>Pichia ciferrii</i>	<i>Pichia angutsa</i>
46 37° C'deki Büyüme	48	13
47 Kuinik Asit Asimilasyonu	<i>Pichia ciferrii</i>	49
48 37° C'deki Büyüme	<i>Pichia capsulata</i>	<i>Pichia angutsa</i>
49 0.01% Sikloheksimid Asimilasyonu		

Çizelge 4. 2. Glukozu Fermente Eden Mayaların Tayin Anahtarı (Barnett et al., 2000)

Testler	Negatif	Pozitif
1 Maltoz Asimilasyonu	2	530
2 Etilamin Asimilasyonu	3	187
4 Niasin Asimilasyonu	5	38
38 D-Galaktoz Asimilasyonu	39	97
39 10% NaCl Asimilasyonu	40	70

40 1% Asetik Asit Asimilasyonu	41	<i>Dekkera anamola</i>
41 Raffinoz Fermentasyonu	42	63
42 L-Lizin Asimilasyonu	43	54
43Bütan2,3 diol Asimilasyonu	44	52
44 Raffinoz Asimilasyonu	45	50
45 0.01% Sikloheksimid Asimilasyonu	46	<i>Pichia pini</i>
187 0. 1% Sikloheksimid Asimilasyonu	188	422
188 w/o Pridoksin Asimilasyonu	189	234
189 D-Mannitol Asimilasyonu	190	214
214 Raffinoz Asimilasyonu	215	231
215 Salisin Asimilasyonu	216	230
227 D-galaktoz Asimilasyonu	228	230
228 L-Sorboz Asimilasyonu	229	<i>Pichia pijperi</i>
229 37°C'deki Büyüme	<i>Candida ernobii</i>	<i>Pichia kodamae</i>
422 Metanol Asimilasyonu	423	513
513 Salisin Asimilasyonu	514	524
514 Nitrat Asimilasyonu	515	517
517 Eritritol Asimilasyonu	518	519

519 D-galaktoz Fermentasyonu	520	<i>Candida nanaspora</i>
520 α,α Trehaloz Asimilasyonu	<i>Candida boidinii</i>	<i>Pichia philodendri</i>
521 D-galakturonik Asit Asimilasyonu	522	529
522 α,α Trehaloz Asimilasyonu	523	524
524 Nitrit Asimilasyonu	525	528
525 D-Triptofan Asimilasyonu	526	<i>Candida ovalis</i>
526 Eritritol Asimilasyonu	527	<i>Pichia methanolica</i>
528 D-galaktoz Asimilasyonu	304	<i>Candida methanosorbosa</i>
530 Eritritol Asimilasyonu	531	960
1046 w/o Biotin&Thiamin Asimilasyonu	1047	1058
1047 0.01% Sikloheksimid Asimilasyonu	1048	1051
1051 Raffinoz Asimilasyonu	1052	1057
1052 Bütan 2,3 diol Asimilasyonu	1053	1056
1053 Laktoz Asimilasyonu	1054	<i>Candida chilensis</i>
1054 D-Galakturonik Asit Asimilasyonu	1055	<i>Candida incommunis</i>
1055 40°C'deki Büyüme	<i>Ambrosiozyma platypodis</i>	<i>Pichia angutsa</i>
1058 Kuinik Asit Asimilasyonu	1059	<i>Pichia anamola</i>
1059 Inulin Asimilasyonu	<i>Pichia ciferrii</i>	<i>Pichia lynferdii</i>

Çizelge 4. 3. Mayaların İzole Edildiği Kaynaklara Göre Genus ve Türlerin Dağılımı

Örnek Numarası	İzole edilen Kaynak	İzolat Numarası	İzolatın Genus ve Türü
1	Turşu suyu örneği	1	-----
2	Adıyaman TPAO toprak örneği	2	<i>Candida ovalis</i>
1	Turşu suyu örneği	3	-----
1	Turşu suyu örneği	4	-----
2	Adıyaman TPAO toprak örneği	5	-----
2	Adıyaman TPAO toprak örneği	6	-----
2	Adıyaman TPAO toprak örneği	7	-----
3	Adıyaman TPAO toprak örneği	8	-----
4	Ege üniv. Yurdu toprak örneği	9	<i>Pichia kodamae</i>
4	Ege üniv. Yurdu toprak örneği	10	<i>Pichia pini</i>
4	Ege üniv. Yurdu toprak örneği	11	<i>Pichia methanolica</i>
5	Adıyaman petrol kuyusu toprak örneği	12	<i>Pichia kodamae</i>
6	Adıyaman petrol kuyusu toprak örneği	13	<i>Pichia angusta</i>
6	Adıyaman petrol kuyusu toprak örneği	14	<i>Pichia angusta</i>
7	İzmir Harmandalı Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği	15	<i>Pichia angusta</i>

7	İzmir Harmandalı Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği	16	<i>Candida methanosorbosa</i>
7	İzmir Harmandalı Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği	17	<i>Candida boidinii</i>
8	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği	18	<i>Pichia methanolica</i>
8	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği	20	<i>Pichia angusta</i>
9	Çürük şeftali meyvesi	21	<i>Pichia ciferrii</i>
9	Çürük şeftali meyvesi	22	-----
10	İzmir Ürkmez Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği	23	-----
10	İzmir Ürkmez Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği	24	<i>Pichia pini</i>
10	İzmir Ürkmez Düzenli Atık Toplama Tesisi toprak örneği	25	<i>Pichia angusta</i>
11	Adıyaman TPAO toprak örneği	26	-----
11	Adıyaman TPAO toprak örneği	27	-----
11	Adıyaman TPAO toprak örneği	28	<i>Pichia ciferrii</i>
12	Çiğ sokak sütü örneği	29	-----
12	Çiğ sokak sütü örneği	30	<i>Pichia ciferrii</i>
13	Ege Üniversitesi Yurdu kazan dairesi toprak örneği	31	-----
13	Ege Üniversitesi Yurdu kazan dairesi toprak örneği	32	<i>Pichia angusta</i>
14	Ege Üniversitesi Kampus toprak örneği	33	<i>Candida boidinii</i>

14	Ege Üniversitesi Kampus toprak örneği	34	<i>Pichia ciferrii</i>
14	Ege Üniversitesi Kampus toprak örneği	35	<i>Candida nemodendra</i>
15	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği	36	<i>Pichia angusta</i>
15	İzmi, Ahmetbeyli toprak örneği	37	<i>Pichia angusta</i>
16	Adıyaman TPAO toprak örneği	38	<i>Pichia angusta</i>
17	Adıyaman TPAO toprak örneği	39	<i>Pichia angusta</i>
18	Çiğ sokak sütü örneği	40	-----
19	İzmir, Ahmetbeyli toprak örneği	41	-----
20	Ege Üniversitesi kampüsü toprak örneği	42	<i>Pichia ciferrii</i>

Çizelge 4. 4. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri (Alexopoulos et al., 1996)

Kingdom: <i>Fungi</i> Phylum: <i>Ascomycota</i> Classis: <i>Ascomycetes</i> Ordo: <i>Saccharomycetales</i>	
Familya1: <i>Candidaceae</i>	Familya 2: <i>Saccharomycetaceae</i>
Genus 1: <i>Candida</i>	Genus 1: <i>Pichia</i>
Species 1: <i>ovalis</i>	Species 1: <i>kodamae</i>
Species 2: <i>boidinii</i>	Species 2: <i>pini</i>
Species 3: <i>methanosorbosa</i>	Species 3: <i>methanolica</i>
Species 4: <i>nemodendra</i>	Species 4: <i>angusta</i>
	Species 5: <i>ciferrii</i>

4. 3. Tanımlanan İzolatların Dahil Olduğu Genusların Özellikleri

4. 3. 1. *Pichia* Genusun Özellikleri

Multilateral tomurcuklanma ile çoğalan hücreler çeşitli şekillerdedir ve bazı türleri pseudomisel oluşturur. Askosporlar küresel, şapka veya Satürn şeklindedir. Her askusta 1- 4 (bazen daha fazla) askospor oluşur. Şekerlerin fermentasyonu türlere göre değişmektedir. Nitrat asimilasyonu, üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Phaff ve ark., 1966; Wickerham., 1951,1952,1970; Lodder and Kreger van Rij., 1952; Wickerham ve Burton., 1952,1962; Banwart., 1981; Barnett ve ark., 1983; Kreger van Rij., 1984; Beneke and Stevenson., 1987 ve Frazier and Westhoff., 1988). 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 21, 24, 25, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39 ve 42 numaralı izolatlar *Pichia* genusunun özelliklerini göstermiştir. *P.kodamae*, *P.pini*, *P.methanolica*, *P.angusta* ve *P.ciferri*'nin fermentasyon ve asimilasyon özellikleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

4. 3. 2. *Candida* genusunun özellikleri

Multilateral tomurcuklanma ile çoğalan hücreler ovoid, silindirik, elongat nadiren apikulat şeklindedir. Bazı türleri pseudomisel oluştururken bazı türlerde gerçek misel mevcuttur. Genellikle inositol pozitif olan strainler pseudomisel oluşturur. Askus ve askospor oluşumu gözlenmektedir. Bazı türler ekstra polisakkaritler üretebilir. Üreaz, şekerlerin fermentasyonu ve nitrat asimilasyonu türlere göre değişmektedir (Phaff ve ark., 1966; Wickerham., 1951, 1952, 1970; Lodder and Kreger-van Rij., 1952; Wickerham ve Burton., 1962; Banwart., 1981; Barnett ve ark.,1983; Kreger van Rij., 1984; Beneke ve Stevenson., 1987 ve Frazier ve Westhoff., 1988). 2, 17, 16, 33 ve 35 numaralı izolatlar *Candida* genusunun özelliklerini göstermiştir. *C.ovalis*, *C.boidini*, *C.methanosorbosa* ve *C.nemodendra*'nın fermentasyon ve asimilasyon özellikleri Çizelge 4. 5'te verilmiştir.

Çizelge 4. 5 Tanılanan İzolatların Literatürde Verilen Özellikleri ile Morfolojik ve Fizyolojik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması (Barnett et al., 2000).

Testler	Literatür suşlarının özellikleri		Tanılanan suşların özellikleri		
FERMENTASYON	<i>C.ovalis/C.boidinii</i>		<i>C.ovalis/C.boidinii</i>		
			2	17	33
D-Glukoz	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	+	-
Me- α -D glukozid	-	-	-	-	-
Sukroz	-	-	-	-	-
α,α -Trehaloz	+	-	+	-	-
Melibioz	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-
Sellobioz	D	-	+	-	-
Melesitoz	-	-	-	-	-
Raffinoz	-	-	-	+	+
Inulin	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	-	-	-	-	-
ASİMİLASYON					
Maltoz	-	-	-	-	-
D-Glukoz	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	-	-	+	-	+
L-Sorboz	+	+, -	-	-	-
D-Glukozamin	-	+, -	+	-	+
D-Riboz	+	+	+	+	+
D-Ksiloz	+	+	+	-	-
L-Arabinoz	+	+, -	+	-	-
D-Arabinoz	D	D, -	-	-	-
L-Ramnoz	-	-	+	-	-
Sukroz	-	-	+	-	-
α,α -Trehaloz	-	-	+	+	+
Me- α -D-Glukozid	+	-	+	+	+
Sellobiyoz	-	-	-	-	-

Salisin	+	-	+	-	-
Arbutin	+	-	+	-	-
Melibioz	+	-	+	-	-
Laktoz	-	-	+	-	-
Raffinoz	-	-	+	-	-
Melesitoz	-	-	+	+	+
Inulin	-	-	-	+	+
Nışasta	-	-	-	+	+
Gliserol	-	-	+	+	+
Eritritol	+	+,D	W	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+
Ksilitol	+	+	+	+	+
L-Arabinitol	+	+	+	+	+
D-Glunitol	+	+	+	-	-
D-Mannitol	+	+	+	-	-
D-Galaktitol	+	+,D	+	+	+
Myo-inositol	-	-	-	+	-
D- Glukano- 1. 5 Lacton	-	-	+	-	-
2-Keto-D-Glukonat	+	+, -	-	+	-
5-Keto-D-Glukonat	-	+, -	+	-	-
D-Glukuronat	?	-	+	-	-
D-Galakturnik Asit	+	-	+	+	+
DL-Laktat	-	-	-	+	+
Süksinat	-	-	-	+	+
Sitrat	+	+	+	+	+
Metanol	+	+, -	+	+	+
D-Glukonat	+	-	+	-	+
Etanol	+	+	+	-	-
Propan 1,2 diol	-	+	+	-	-
Bütane 2,3 diol	-	+, -	-	-	-
Kuinik Asit	-	-	-	-	-
D-Glukarat	-	-	W	-	+
D-Galaktonat	-	-	-	+	+
Nitrat	-	-	-	+	+
Nitrit	-	+, -	-	+	+
Etilamin	+	+	-	-	-
L-Lizin	+	+	-	-	-
Kadaverin	+	+	+	-	-
Kreatin	-	+	+	+	+

Kreatinin	-	-	+	-	-
D-Glukozamin	-	-	+	+	+
İmidazol	-	-	-	+	+
D-Tripofan	+	-	+	-	-
BÜYÜME					
Vitaminsiz büyüme	-	+, -	+	+	+
Miyo-inositol	+	-	+	-	-
Pantothenat	+	+	+	+	-
Biotin	-	+	+	+	+
Tiamin	+	-	+	+	+
Biotin & Tiamin	-	+	+	+	+
Pyridoksin	+	-	+	+	+
Niasin	+	+	+	+	+
p-Aminobenzoik Asit	+	+	+	+	-
FARKLI SICAKLIKLAR					
25° C	+	+	+	+	+
30° C	+	+	+	+	+
35° C	+	+, -	+	+	+
40° C	-	-	+	+	+
45° C	-	-	-	-	+
48° C	?	-	-	+	-
50° C	?	-	-	-	-
ANTİBİYOTİK DİRENCİ					
%0.01 Sikloheksimid	+	-	-	-	-
%0.1 Sikloheksimid	+	-	+	+	+
YÜKSEK ŞEKER KONST.					
%50 D-Glukoz	-	-	+	+	+
%60 D-Glukoz	-	-	+	+	+
EK KARAKTERİSTİKLER					
Niştasta oluşumu	-	+	-	-	-
Üre hidrolizi	-	-	-	-	-
Asetik asit oluşumu	-	-	-	-	-
DBB reaksiyonu	-	-	-	-	-
%10 NaCl	+	-	-	-	-
%16NaCl	-	-	-	-	-
MORFOLOJİ					
Beyaz/krem koloni	+	+	+	+	+

Tomurcuklanma	+	+	+	+	+
Pseudomisel	-	+	+	+	+
Askospor	+	+	-	-	-

+ : Pozitif **-** : Negatif

D: 7 günden daha uzun süre bekletildiğinde sonuç alındı

W: zayıf büyüme gözlemlendi

?: sonuç bilinmiyor

Çizelge 4. 5. (Devam)

Testler	Literatür suşlarının özellikleri		Tanımlanan suşların özellikleri			
FERMENTASYON	<i>P.kodamae- P.pini</i>		<i>P.kodamae- P.pini</i>			
			9	12	10	24
D-Glukoz	+	+, -	+	+	+	+
D-Galaktoz	-	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	+	+	+	-
Me- α -D glukozid	-	-	-	-	-	-
Sukroz	-	-	-	-	-	-
α , α -Trehaloz	-	+, D	-	+	+	+
Melibioz	-	-	-	+	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-
Sellobiyoz	-	+	-	-	-	-
Melesitoz	-	-	-	+	+	+
Raffinoz	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	-	-	-	-	-	-
ASİMİLASYON						
Maltoz	-	-	+	+	+	-
D-Glukoz	+	+	W	+	+	+
D-Galaktoz	-	D, -	-	-	+	+
L-Sorboz	-	+, -	-	-	-	-
D-Glukozamin	-	+, -	-	W	-	-
D-Riboz	+	+, D	-	-	-	-
D-Ksiloz	+	+, -	-	W	W	W
L-Arabinoz	+	+, -	-	W	+	+
D-Arabinoz	-	+, -	-	-	-	-

L-Ramnoz	-	+, -	-	-	-	-
Sukroz	-	-	+	-	W	+
α, α -Trehaloz	-	+, D	-	-	+	+
Me- α -D-glukozid	-	-	-	-	-	-
Sellobiyoz	-	-	-	-	-	-
Salisin	+	+, D	-	W	+	+
Arbutin	+	+, D	-	-	-	-
Melibioz	+	+, -	-	-	-	-
Lakttoz	-	-	-	-	-	-
Raffinoz	-	-	-	-	-	-
Melesitoz	-	-	-	-	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-
Gliserol	-	-	-	-	-	-
Eritritol	D	+, D	+	+	+	+
Ribitol	+	+, D	+	+	+	+
Ksilitol	+	+, -	+	+	+	+
L-Arabinitol	+	+, -	-	W	W	W
D-Glusitol	+	+, D	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+, D	-	-	-	-
D-Galaktilol	D, -	-	-	-	-	-
Miyo-inositol	-	+, -	-	-	-	-
D-Glukano- 1.5 Lakton	+, D	+, D	-	-	-	-
2-Keto-D-Glukonat	-	+, -	-	-	-	-
5-Keto-D-Glukonate	?	D, -	-	-	-	-
D-Glukuronat	-	-	-	-	-	-
D-Galakturnik Asit	-	-	-	-	-	-
DL-Laktat	-	D, -	-	-	-	-
Süksinat	+, D	+, -	-	+	-	-
Sitrat	+, D	+, -	-	-	-	-
Metanol	D	+, D	+	+	+	+
D-Glukonat	+	+	+	+	+	+
Etanol	-	+, -	W	W	+	+
Propan 1,2 diol	-	-	-	W	-	-
Bütan 2,3 diol	-	+, -	-	-	-	-
Kuinik Asit	-	-	-	-	-	-
D-Glukarat	-	-	-	-	-	-
D-Galaktonat	-	-	-	-	-	-
Nitrat	-	-	-	-	-	-
Nitrit	-	-	-	W	-	-

Etilamin	+	+, -	+	-	+	+
L-Lizin	+	+, -	+	+	+	+
Kadaverin	+	+, -	-	-	-	-
Kreatin	-	-	-	-	-	-
Kreatinin	-	W, -	-	-	W	W
D-Glukozamin	-	-	-	-	-	-
İmidazol	-	-	-	-	-	-
D-Triptofan	-	-	-	-	-	-
BÜYÜME						
Vitaminsız büyüme	-	-	-	-	-	-
Miyo-inositol	+	+	+	+	+	+
Pantotenat	+	+	+	+	+	+
Biotin	?	W, -	+	-	-	-
Tiamin	-	+, -	+	+	+	+
Biotin & Tiamin	-	-	-	-	-	+
Piridoksine	?	+	+	+	+	+
Niasin	-	+, -	+	+	+	+
p-Aminobenzoik Asit	+	+	+	+	+	+
FARKLI SICAKLIKLAR						
25° C	+	+	+	+	+	+
30° C	+	+	+	+	+	+
35° C	+	+, -	+	+	+	+
40° C	+	+, -	+	+	+	+
45° C	?	+, -	-	+	+	-
48° C	?	?	-	-	-	-
50° C	?	?	-	-	-	-
ANTİBİYOTİK DİRENCİ						
%0.01 Sikloheksimid	+	+	+	+	+	+
%0.1 Sikloheksimid	+	+	+	+	+	+
YÜKSEK ŞEKER KONST.						
%50 D-Glukoz	-	+, -	-	-	-	-
%60 D-Glukoz	-	-	-	-	-	-
EK KARAKTERİSTİKLER						
Nişasta oluşumu	-	-	-	-	-	-
Üre hidrolizi	-	-	-	-	-	-
Asetik asit oluşumu	-	-	-	-	-	-

DBB reaksiyonu	-	-	-	-	-	-
%10 NaCl	-	D, -	-	-	+	+
%16NaCl	-	-	-	-	-	-
MORFOLOJİ						
Beyaz/krem koloni	+	+	+	+	+	+
Tomurcuklanma	+	+	+	+	+	+
Pseudomisel	+	+	+	-	-	-
Askospor	+	+	-	-	-	-

+ : Pozitif **-** : Negatif

D: 7 günden daha uzun süre bekletildiğinde sonuç alındı

W: zayıf büyüme gözlemlendi

?: sonuç bilinmiyor

Çizelge 4. 5. (Devam)

TESTLER	Literatür suşlarının özellikleri		Tanımlanan suşların özellikleri											
FERMENTASYON	<i>P.methanolic</i> <i>P.angusta</i>		<i>P.methanolic</i> - <i>P.angusta</i>											
			11	18	13	14	15	20	25	32	36	37	38	39
D-Glukoz	+	+,D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	D,-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Me-α-D glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	-	D,-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
α,α-Trehaloz	D	+,D	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Melibioz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellobiyoz	D	D,-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melesitoz	-	D, -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinoz	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASİMİLASYON														
Maltoz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
D-Glukoz	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	D,+	-,D	-	+	+	-	-	+	-	+	W	W	W	W

[illegible]

%16NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MORFOLOJİ															
Beyaz/krem koloni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tomurcuklanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudomisel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Askospor	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Pozitif - : Negatif

D: 7 günden daha uzun süre bekletildiğinde sonuç alındı

W: zayıf büyüme gözlemlendi

?: sonuç bilinmiyor

Çizelge 4. 5. (Devam)

TESTLER	Literatür suşlarının özellikleri		Tanımlanan suşların özellikleri					
FERMENTASYON	<i>C.methanosorbosa/P.ciferrii</i>		<i>C.methanosorbosa- P.ciferrii</i>					
			16	21	28	30	34	42
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	+,D	D	+	+	-	+	+	+
Maltoz	-	+,D	-	+	+	-	-	-
Me- α -D glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	-	+	+	+	-	-	+	+
α , α -Trehaloz	+	-	+	-	-	-	-	-
Melibioz	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellobiyoz	D,-	D	-	-	-	-	-	-
Melesitoz	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinoz	-	+,D	+	+	-	+	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	D	-	+	+	+	+	+
D-Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-
ASİMİLASYON								
Maltoz	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktaz	+	+,D	+	+	+	+	+	+
L-Sorboz	+,D	-	+	+	-	-	-	W
D-Glukozamin	+	-	W	+	+	+	+	+
D-Riboz	+	+,D	+	+	-	-	-	+
D-Ksiloz	+	+, -	W	W	+	+	+	+
L-Arabinoz	+	+, -	+	+	W	+	+	+
D-Arabinoz	-	+, -	+	+	+	+	+	+
L-Ramnoz	+	+, -	-	+	-	-	-	-

Sukroz	-	+	-	+	+	+	+	+
α,α -Trehaloz	-	+	-	+	+	+	+	+
Me- α -D-glukozid	+	+,D	+	+	+	+	+	+
Sellobiyoz	-	+	-	+	+	+	+	+
Salisin	+, -	+, -	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+,D	+	+	+	+	-	+
Melibiyoz	+	+	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinoz	-	-	-	-	-	-	-	-
Melesitoz	-	+	-	+	-	+	+	-
Inulin	-	+	-	+	+	+	+	+
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliserol	-	+	-	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	-	+	+	+	+
Ribitol	-	+	-	+	+	+	+	+
Ksilitol	+	+,D	+	+	+	+	+	+
L-Arabinitol	+	+, -	+	-	+	+	+	+
D-Glusitol	+	+,D	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktitol	+	+	+	+	-	+	+	+
Miyo-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukano- 1.5 Laktone	-	-	-	+	+	-	-	-
2-Keto-D-Glukonat	+,D	+,D	+	+	+	+	+	+
5-Keto-D-Glukonat	-	-	+	+	-	-	-	-
D-Glukuronat	-	?	-	-	-	-	-	-
D-Galakturnik Asit	D		+	+	-	+	-	+
DL-Laktat	-	+,D	-	+	+	+	+	+
Süksinat	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	+	-	+	+	-	+	-	-
Metanol	+	+,D	+	+	+	+	+	+
D-Glukonat	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+,D	+	+	+	+	+	+
Propan 1,2 diol	+	+, -	W	+	+	+	+	+
Bütane 2,3 diol	D, -	+,D	-	+	+	+	+	+
Kuinik Asit	-	+,D	-	+	+	+	+	+
D-Glukarat	-	+,D	-	-	+	+	-	-
D-Galaktonat	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrit	+	-	+	-	-	-	-	-
Etilamin	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lizin	+	+	+	+	+	+	+	+
Kadaverin	+	+	+	+	+	+	+	+
Kreatin	-	+, -	-	-	-	-	-	-
Kreatinin	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukozamin	+	-	+	-	-	-	-	-
İmidazol	-	-	-	W	+	+	+	+
D-Triptofan	W, -	-	+	-	-	-	-	-
BÜYÜME								
Vitaminsız büyüme	-	-	-	-	-	-	-	-
Miyo-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+

Pantotenat	+	+	+	+	+	+	+	+
Biotin	-	+	-	+	+	+	+	+
Tiamin	+	+	+	+	+	+	+	+
Biotin & Tiamin	-	+	-	+	+	+	+	+
Pridoksin	+	+	+	+	+	+	+	+
Niasin	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Aminobenzoik Asit	+	+	+	+	+	+	+	+
FARKLI SICAKLIKLAR								
25° C	+	+	+	+	+	+	+	+
30° C	+	+	+	+	+	+	+	+
35° C	+	+, -	+	+	+	+	+	+
40° C	+	-	+	+	+	+	+	+
45° C	-	-	+	-	-	+	-	-
48° C	?	-	+	-	-	-	-	-
50° C	?	-	-	-	-	-	-	-
ANTİBİYOTİK DİRENCİ								
%0.01 Sikloheksimid	+, -	-	+	+	+	+	+	+
%0.1 Sikloheksimid	D	-	+	-	-	-	-	-
YÜKSEK ŞEKER KONST.								
%50 D-Glukoz	-	+	-	+	+	+	+	+
%60 D-Glukoz	-	+	-	+	+	+	+	+
EK KARAKTERİSTİKLER								
Nişasta oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-
Asetik asit oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-
%10 NaCl	-	+	-	+	+	+	+	+
%16NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
MORFOLOJİ								
Beyaz/krem koloni	+	+	+	+	+	+	+	+
Tomurcuklanma	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudomisel	+	+	+	+	+	+	+	+
Askospor	-	+	-	-	-	-	-	-

+ : Pozitif **-** : Negatif

D: 7 günden daha uzun süre bekletildiğinde sonuç alındı

W: zayıf büyüme gözlemlendi

?: sonuç bilinmiyor

Çizelge 4. 5. (Devam)

TESTLER	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri
FERMENTASYON	<i>Candida nemodendra</i>	<i>Candida nemodendra</i>
		35
D-Glukoz	-	-
D-Galaktoz	-	-
Maltoz	-	-
Me- α -D glukozid	-	-
Sukroz	-	-
α,α -Trehaloz	-	-
Melibioz	-	-
Laktoz	-	-
Sellobiyoz	-	-
Melesitoz	-	-
Raffinoz	-	-
Inulin	-	-
Nişasta	-	-
D-Ksiloz	-	-
ASİMİLASYON		
Maltoz	-	-
D-Glukoz	+	W
D-Galaktoz	+	+
L-Sorboz	+	+
D-Glukozamin	-	+
D-Riboz	+	+
D-Ksiloz	+	+
L-Arabinoz	+	+
D-Arabinoz	+,D	-
L-Ramnoz	-	-
Sukroz	-	-
α,α -Trehaloz	-	-
Me- α -D-glukozid	+	+
Sellobiyoz	-	-

Salisin	+, -	+
Arbutin	+, -	+
Melibiyoz	+, D	-
Laktoz	-	-
Raffinoz	-	-
Melesitoz	-	-
Inulin	-	-
Nişasta	-	-
Gliserol	+	+
Eritritol	+	+
Ribitol	+	+
Ksilitol	+	+
L-Arabinitol	+	+
D-Glusitol	+, D	+
D-Mannitol	+	+
D-Galaktitol	+	+
Miyo-inositol	+, D	+
D-Glukano- 1.5 Laktone	-	-
2-Keto-D-Glukonat	D, -	-
5-Keto-D-Glukonat	-	-
D-Glukuronat	-	-
D-Galakturonik Asit	-	-
DL-Laktat	-	-
Süksinat	-	-
Sitrat	D, -	+
Metanol	+	+
D-Glukonat	-	-
Etanol	+	+
Propan 1,2 diol	+	+
Bütan 2,3 diol	-	-
Kuinik Asit	-	-
D-Glukarat	-	-
D-Galaktonat	-	-
Nitrat	-	-
Nitrit	-	-
Etilamin	-	-

L-Lizin	+	+
Kadaverin	+	+
Kreatin	+	+
Kreatinin	-	-
D-Glukozamin	-	-
İmidazol	-	-
D-Triptofan	-	-
BÜYÜME		
Vitaminsiz büyüme	-	-
Miyo-inositol	-	+
Pantotenat	+	+
Biotin	+	+
Tiamin	-	-
Biotin & Tiamin	+	+
Pridoksin	-	-
Niasin	+	+
p-Aminobenzoik Asit	+	+
FARKLI SICAKLIKLAR		
25° C	+	+
30° C	+	+
35° C	-	+
40° C	-	+
45° C	-	+
48° C	?	-
50° C	?	-
ANTİBİYOTİK DİRENCİ		
%0.01 Sikloheksimid	-	-
%0.1 Sikloheksimid	-	-
YÜKSEK ŞEKER KONST.		
%50 D-Glukoz	-	+
%60 D-Glukoz	-	+
EK KARAKTERİSTİKLER		
Nişasta oluşumu	-	-
Üre hidrolizi	-	-
Asetik asit oluşumu	-	-
DBB reaksiyonu	-	-
%10 NaCl	-	+

%16NaCl	-	-
MORFOLOJİ		
Beyaz/krem koloni	+	+
Tomurcuklanma	+	+
Pseudomisel	+	+
Askospor	+	-

+ : Pozitif - : Negatif

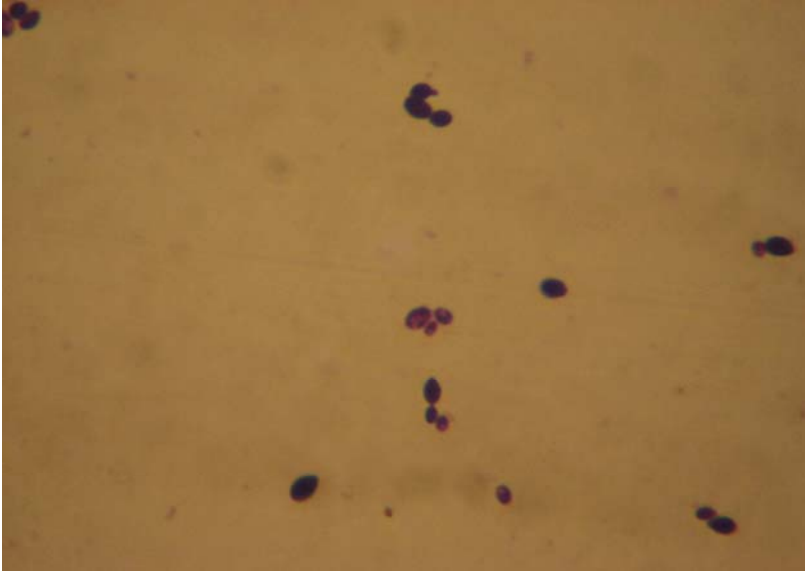
D: 7 günden daha uzun süre bekletildiğinde sonuç alındı

W: zayıf büyüme gözlemlendi

?: sonuç bilinmiyor

4. 4. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Fotoğrafları

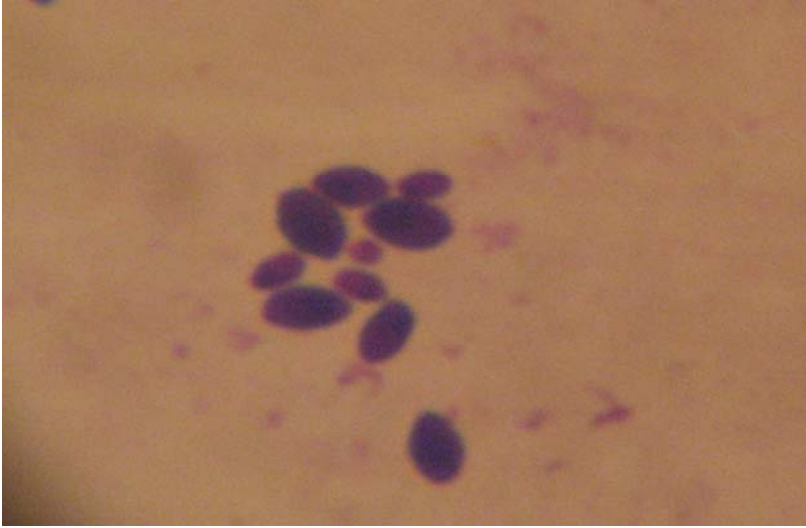
Tanılanan izolatların genel koloni görünüşleri, MYGP broth'da 2 günlük mikroskopik görünüşleri, seçici besiyeri olarak kullanılan metanollü nitrogen base agarda oluşan kolonilerin görünüşleri, D-Glukoz fermentasyonu, üre testlerine ait sonuçlar ve tanılamada kullanılan bazı asimilasyon testlerine ait sonuçlar Şekil 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38'de görülmektedir.



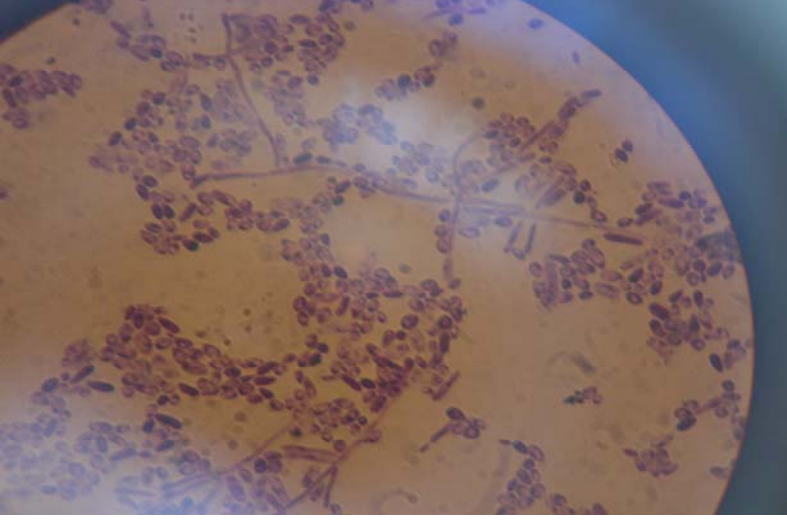
Şekil 4. 15. 18 numaralı izolat olan *Pichia methanolica*'nın MYGP broth'daki vejetatif hücrelerinin 2 günlük görünümü (1000X)



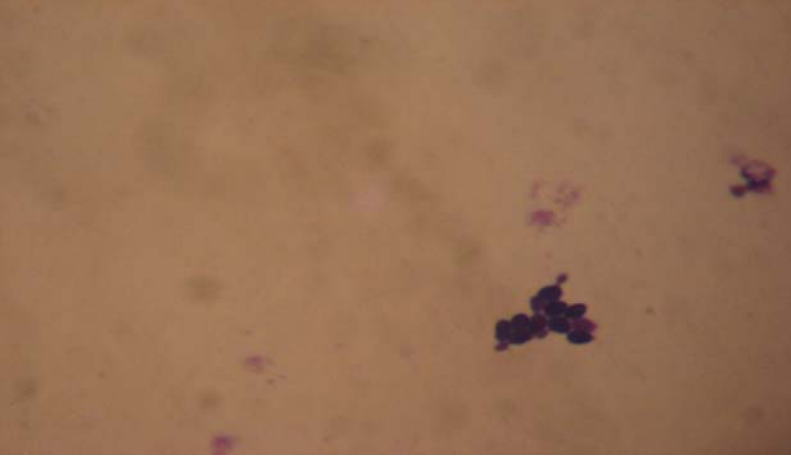
Şekil 4. 16. 18 numaralı izolat olan *P.methanolica*'nın MYGP agarda 2 günlük genel koloni görünüşü



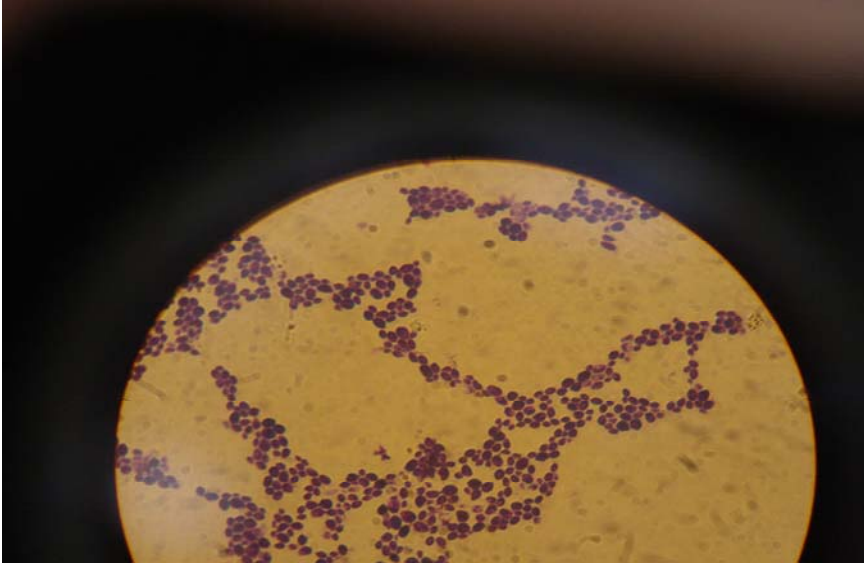
Şekil 4. 17. 36 numaralı izolat olan *P.angusta*'nın MYGP broth'daki vejetatif hücrelerinin 27°C'daki 2 günlük görünümü (1000X)



Şekil 4. 18. 34 numaralı izolat olan *P.ciferrii*'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerinin 27°C'daki 2 günlük görünümü (1000X)



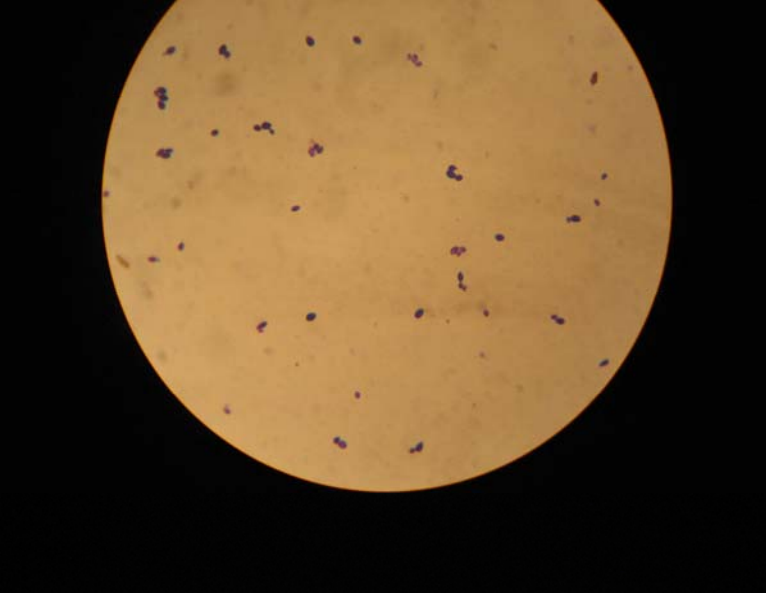
Şekil 4. 19. 10 numaralı izolat olan *P.pini*'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerin 27°C'da 2 günlük görünümü (1000X)



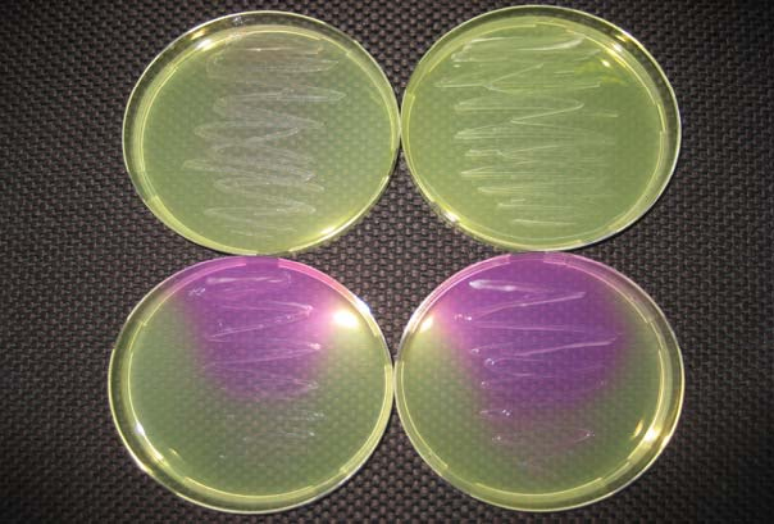
Şekil 4. 20. 12 numaralı izolat olan *P.kodamae*'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerin 27°C'da 2 günlük görünümü (1000X)



Şekil 4. 21. 12 numaralı izolat olan *P.kodamae*'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerin 27°C'da 2 günlük görünümü



Şekil 4. 22. 33 numaralı izolat olan *C.boidinii*'nin MYGP broth'daki vejetatif hücrelerin 27°C'da 2 günlük görünümü (1000X)



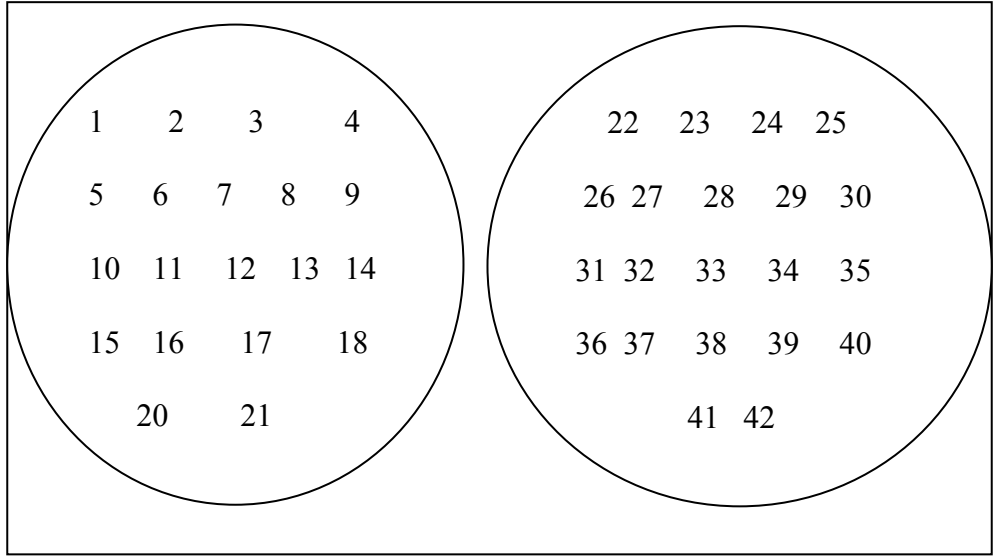
Şekil 4. 23. Üre Agar'da 27°C'da 2 Günlük Kolonilerin Üre Hidrolizi Testi
(Üre pozitif olan izolatlar metilotrofik maya olarak tanılanmamıştır)



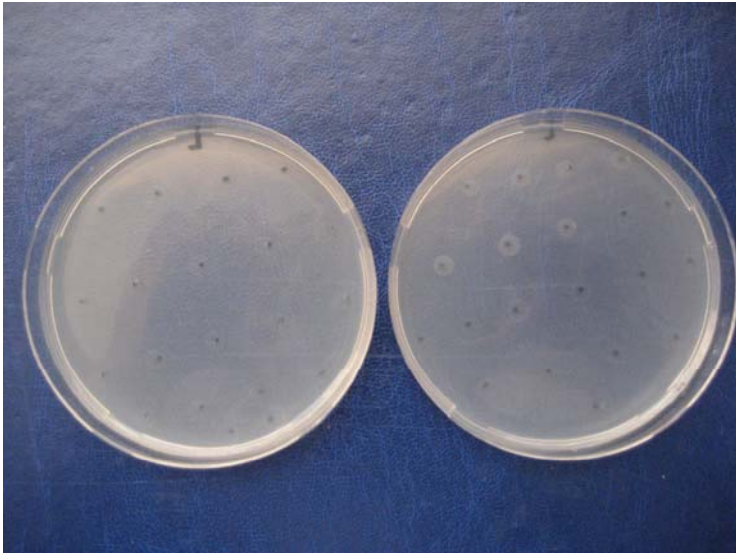
Şekil 4. 24. MYGP agarda 27°C'da 10 günlük kolonilerin 55°C'da 1- 2 saat tutulmasıyla oluşan DBB testi (DBB pozitif olanlar metilotrof olarak tanılanmamıştır).



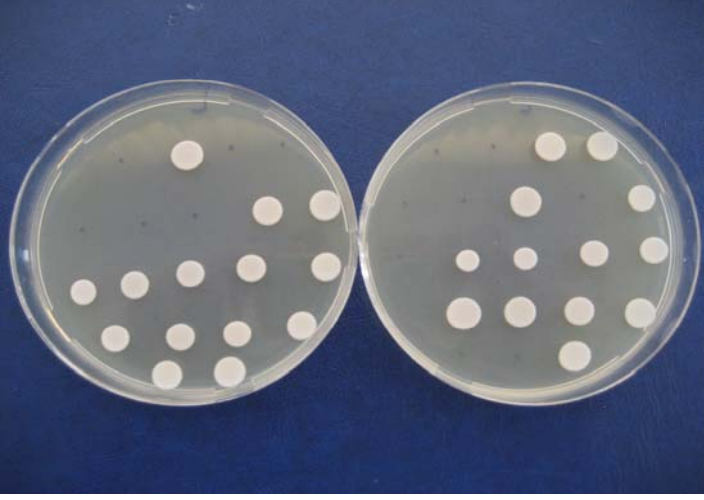
Şekil 4. 25. D-Glukoz İçeren Yeast Extract Broth'da 27 °C'de 7 Günlük Fermentasyon Testi (işaretlenen izolatlar metilotrofik maya olarak tanılanmıştır).



Şekil 4. 26. Fenotipik Tanılama Testlerinde İzolatların Ekilmesinde İzlenilen Sıra; 1- 42 Arası İzolat Numaraları.



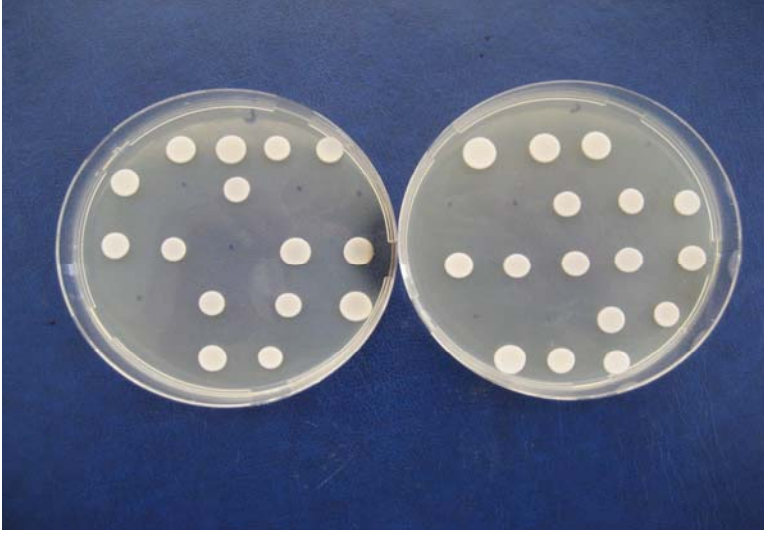
Şekil 4. 27. N- Base Agarda 27⁰C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü (Negatif Kontrol)



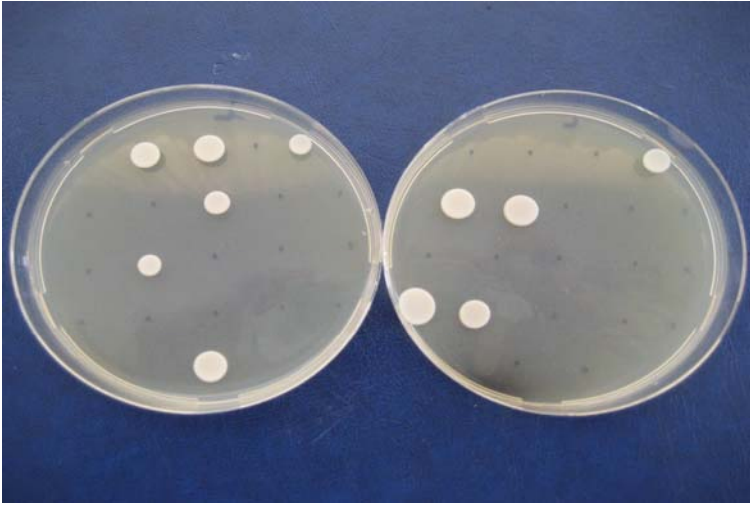
Şekil 4. 28. %1 Metanol İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



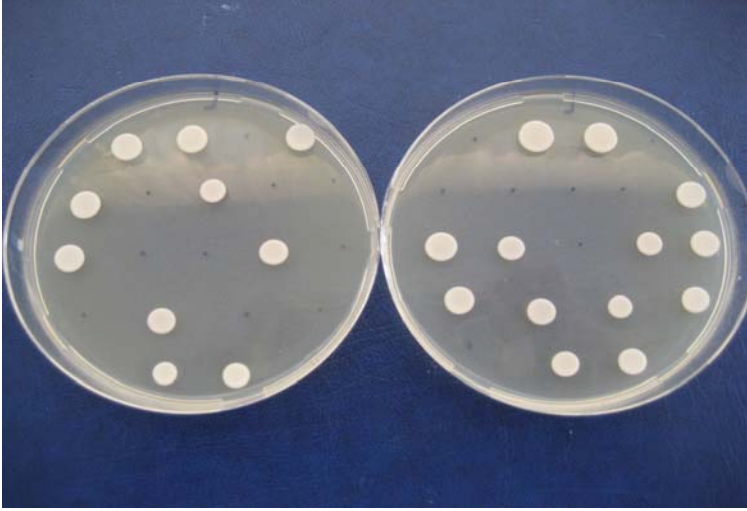
Şekil 4. 29. %10 NaCl içeren % 0.1 Metanollü N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



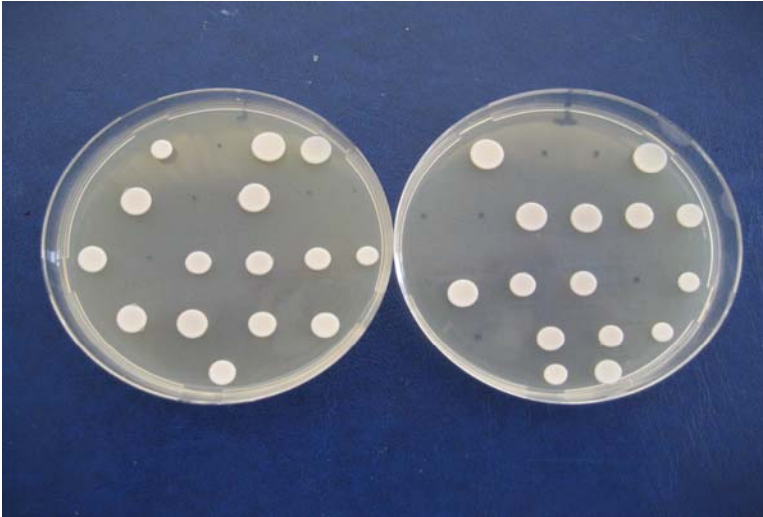
Şekil 4. 30. Trehaloz İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



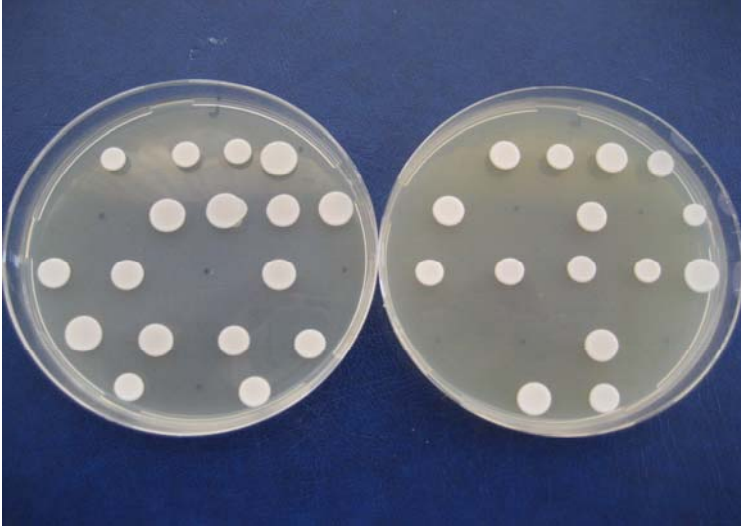
Şekil 4. 31. Melibiose İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



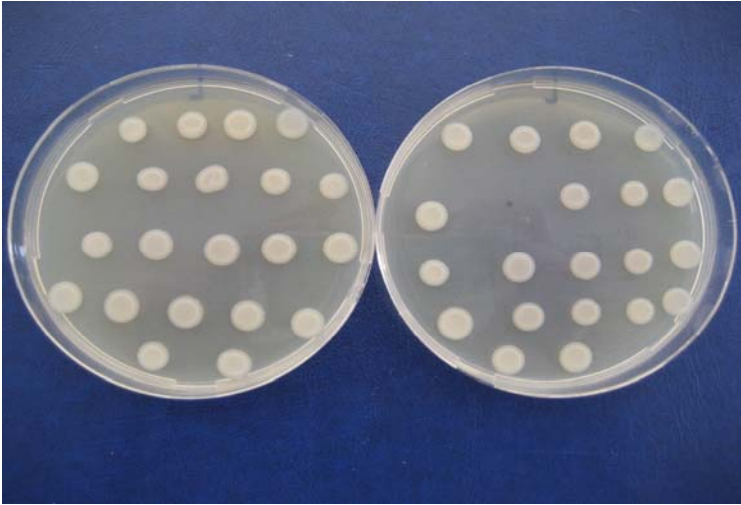
Şekil 4. 32. Galaktoz İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



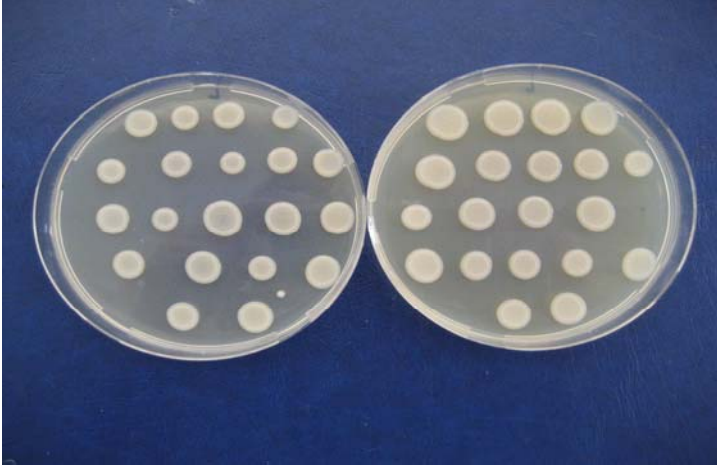
Şekil 4. 33. Nitrat (NO_3) İçeren C- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



Şekil 4. 34. Sukroz İeren N- Base Agarda 27°C'de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



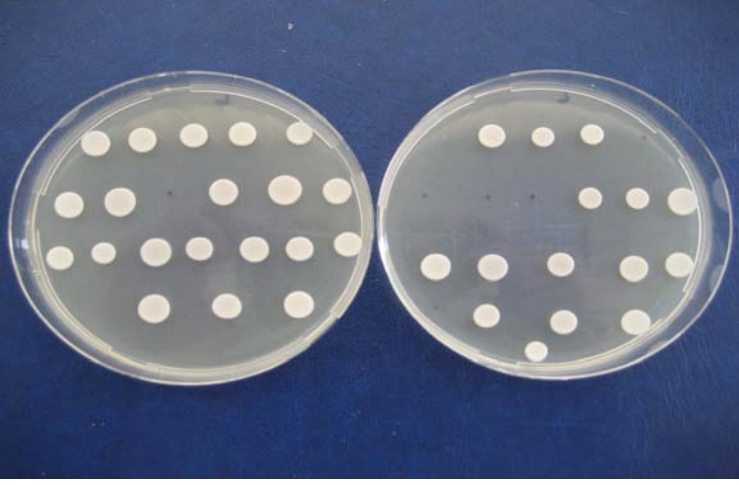
Şekil 4. 35. Glukoz İçeren N- Base Agarda 27°C'de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



Şekil 4. 36. %0.01 Oranında Sikloheksimid İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



Şekil 4. 37. Maltoz İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü



Şekil 4. 38. Eritritol İçeren N- Base Agarda 27°C’de Kolonilerin 2 Günlük Görünümü

5.TARTIŞMA

Metilotrofik mayalar çevreye olan faydalarından, ve biyoteknolojideki uygulama alanlarından dolayı son yıllarda üzerinde çok çalışılan organizmalardır (Yurimoto et al., 2005; Nakagawa et al., 2005; Kato et al., 1999).

Metilotrofik mayaların izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar bu mayaların daha çok bitkisel materyal ve organik maddeler bakımından zengin olan topraklarda bulunduğunu göstermiştir (Nakagawa et al., 2005, Large., 1983, Rose and Harrison., 1989, Dijkhuizen, 1993, Koloczec et al., 2001). Ağaçlar ve ağaçlarda yaşayan böcekler de metilotrofik mayaların doğal ortamıdır (Dijkhuizen, 1993). Metilotrofik mayaların çiçekler, çürümüş meyveler ve çiğ sütte de bulunabileceği belirtilmektedir (Large, 1983). Ogata et al.'ın (1975), metilotrofik mayaların izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili çalışmasında izolasyonun doğal kaynaklardan gerçekleştirildiği belirtilmiş, ancak bu kaynakların ne olduğu açıklanmamıştır. El Nawawy and Gnan (1983), kompost, çiğ süt, toprak ve turşu suyu örneklerinden metilotrofik maya izolasyonu yapmıştır. Koloczec et al. (2001), tarafından yapılan bir çalışmada ise metilotrofik bir maya olan *Trichosporon* genusunun hastane ortamında bulunabileceği gösterilmiştir.

Son zamanlara kadar, metilotrofik mayaların tek karbon ve enerji kaynağı olarak metan, formaldehit, metilaminler, pektin gibi diğer tek karbonlu bileşikler kullanmadığı düşünülmekteydi ancak son yıllarda tek karbon ve enerji kaynağı olarak metanı da kullanabilen metilotrofik mayalar izole edilebilmiştir. Ancak bu mayaların hangi doğal kaynaklardan izole edildiği hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Hangi türlerin metilotrofik olduğu, daha çok kültür koleksiyonları taranarak belirlendiğinden doğadan

izolasyon konusunda çok fazla bilgi bulunmamaktadır (Harder and Brooke, 1990).

Araştırmamızda, çürümekte olan bitkisel materyal açısından zengin olan topraklar ve ham petrolün çıkarıldığı tesisler izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. Çünkü metilotrofik mayalar petrolü de büyüme için kullanmaktadır. Ayrıca metan kullanabilen mayaların da izole edilebileceği düşünülerek, metan gazının bol miktarda bulunduğu genel atık toplama tesislerinden alınan topraklardan da izolasyon gerçekleştirilmiştir. Ancak bu topraklarda da organik madde çok fazla olduğundan, izolasyonu gerçekleştirilen mayaların metanı kullanıp kullanmadığı bilinmemektedir (Koloczek et al., 2001). Bunun yanında literatürde belirtildiği gibi çiğ süt, çürümüş meyve ve turşu suyundan da izolasyon yapılmıştır (El Nawawy and Gnan, 1983).

Yakın zamana kadar yapılan tüm çalışmalarda izole edilen metilotrofik mayalar çok sınırlıdır. Ogata et al.'ın (1975) izole ettiği metilotrofik mayalar, *Candida Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Kloeckera* ve *Rhodotorula* genuslarına aittir. Kültür koleksiyonlarının taranmasıyla da, metanolde büyüeyebilen maya türlerinin *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* ve *Torulopsis* genuslarına ait olduğu belirlenmiştir. Optimum koşullar kullanıldığında en sık izole edilen türler de *Pichia pinus*, *Hansenula polymorpha* ve *Candida boidinii* olmaktadır. El Nawawy and Gnan (1983), *Rhodotorula* ve *Hansenula* genuslarına ait suşlar izole etmiştir. Barnett et al., (1983, 2000), tanılama anahtarında metilotrofik maya olarak sadece *Candida*, *Hansenula* ve *Pichia* genuslarına ait 32 türü kabul etmiştir. Araştırmamızda, izole edilen metilotrofik maya suşlarının *Candida* ve *Pichia* genuslarına ait olduğu belirlenmiştir. Ogata et al. (1975), izole ettiği metilotrofik maya suşlarını 28°C'de, Cooney et al., (1975), ise 37°C'de inkübe etmişlerdir. İzole edilen *Hansenula polymorpha*'nın optimum büyüme sıcaklığı 37° C olarak

belirtilmektedir (El Nawawy ve Gnan, 1983; Harder ve Brooke, 1990). Genel olarak mayalar için optimal sıcaklık 25-28° C olarak kabul edilmektedir (Rose ve Harrison, 1969; Van der Walt, 1970; Beech ve Davenport, 1971; Kirsop ve Kurtzman, 1980, Öztürk, 1997, Koloczec et al., 2001 ve Kurtzman., 1990).

Araştırmamızda, izole edilen metilotrofik mayaların inkübasyonu 27°C’de gerçekleştirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan sıcaklık denemelerinde (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 48°C ve 50°C), 48°C’e kadar üreyebilen izolatların 3, 11, 18, 15, 16 ve 17 numaralı izolatlar olduğu görülmüştür. 50°C’de ise hiçbir izolat ürememiştir.

Genellikle maya izolasyonu için tavsiye edilen besiyerleri Malt extract agar, MYGP agar gibi genel amaçlı besiyerleridir (Wickerham,1951; Koloczec et al; 2001, Rose ve Harrison., 1969; Beech and Davenport., 1971; Barnett et al.,1983; Kirsop., 1984, Cooney et al., 1975; Öztürk., 2007). Ancak tek karbon, azot veya vitamin kaynağı temel alınarak hazırlanan, diğer bütün besin elementleri sağlanmış birçok seçici besiyeri de bulunmakta ve izolasyon için de kullanılabilir. Bu amaçla, normal olarak basal yeast nitrogen base veya yeast carbon base besiyerleri kullanılmaktadır (Beech and Davenport, 1971). %0.1 metanollü yeast nitrogen base agar besiyeri, El Nawawy and Gnan (1983) tarafından metilotrofik mayaların izolasyonu için seçici besiyeri olarak önerilmektedir. Ogata et al (1975), %1 ve %3 metanol içeren besiyerinde denemeler yapmıştır. Metilotrofik mayaların izolasyonu için gerekli olan optimum koşullarda, metanol konsantrasyonunun %0.1- 0.5 (v/v) arasında tutulması önerilmektedir çünkü %0.5’ten yüksek metanol konsantrasyonlarında bazı türlerin büyümesi inhibe olmaktadır (Rose and Harrison., 1989 ve El Nawawy and Gnan., 1983). Ancak mayaların %0.4- 4 metanol konsantrasyonlarında büyüebilme özellikleri de denenmiş ve bazı

Hansenula türlerinin bu metanol konsantrasyonlarında büyüyebildiği belirlenmiştir (Kratochilova., 1990).

Araştırmamızda, zenginleştirme ortamı olarak Ogata et al. (1975) tarafından önerilen %1 metanollü yeast extract broth, izolasyon için ise El Nawawy and Gnan (1983) tarafından önerilen %0.1 metanollü yeast nitrogen base agar besiyerleri kullanılmıştır (Öztürk, 1997, Cooney et al., 1975). Metanol besiyerleri sterilize edildikten sonra ortama eklenmiştir çünkü metanol otoklavda sterilize edilememektedir. Metanolün filtrasyonla sterilizasyonu da denenmiştir ancak filtre kağıdını erittiği için başarılı olunamamıştır. Çalışmalarda % 99.5 oranında saf metanol kullanıldığı için çalışmalar sırasında metanolden veya başka bir kaynaktan oluşan kontaminasyona rastlanmamıştır.

Mayalar için hazırlanmış olan besiyerlerinde küfler de sıklıkla büyümektedir. İzolasyon sırasında küflerin elimine edilmesi için cycloheximide, bakterilerin elimine edilmesi için ise streptomycin antibiyotiklerinin kullanılması tavsiye edilmektedir. Cycloheximide genellikle mayaları değil, küfleri etkilemektedir. Bu antibiyotiklerin besiyerlerine sırasıyla %0.01 ve 50µg/ml oranında kullanımı, Fell et al. (1960); tarafından önerilmektedir (Martin, 1950; Beech ve Davenport, 1971; Jarvis ve Williams, 1987). Barnett et al. (1983), %0.01 ve %0.1 oranında cycloheximide kullanılmasını ve bu antibiyotiğin filtrasyonla sterilize edilmesini önermektedir. Araştırmamızda, steril izolasyon besiyerine, filtrasyonla sterilize edilmiş cycloheximide ve streptomycin antibiyotikleri, besiyerindeki son konsantrasyonları %0.01 ve 50 µ/ml olacak şekilde eklenmiştir.

Saf kültürlerin saklanması, mayalar için uygun ortam olarak önerilen besiyerleri malt extract agar ve MYGP agardır. Stokların +4° C'de muhafaza edilerek normal olarak 4- 6 ayda bir yenilenmesi tavsiye

edilmektedir (Beech and Davenport, 1971; Kirsop and Kurtzman, 1988). Araştırmamızda literatürde belirtilen süreden daha kısa sürede kontaminasyon riskine karşı 2- 3 ayda bir yenilenmiştir.

Maya izolatlarının genus ve tür düzeyinde tanımlanması için başvurulacak çeşitli referanslar bulunmaktadır. Wickerham (1951, 1952), Lodder and Kreger-van Rij (1952), Wickerham and Burton (1952, 1962), Alexopoulos (1962, 1979, 1996), Phaff et al. (1966), Barnett et al., (1983, 2000), Komagata and Lee (1983), genel olarak mikoloji alanında çalışmalar yapmış olan ve maya taksonomisiyle ilgilenen araştırmacılarıdır. Alexopoulos (1962), özellikle fungus taksonomisiyle ilgili çalışmaları olan en önemli mikologlardan birisidir. Araştırmacı Introductory Mycology adlı kitabında mayaları askomisetik, aseksüel askomisetik ve basidiomisetik mayalar olarak sınıflandırmıştır. Phaff et al. (1966) mayaları askosporogenik, ballistosporogenik, asporogenik ve maya benzeri organizmalar olmak üzere dört grupta incelerken, Beneke ve Stevenson (1987), *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* olarak iki grupta, Frazier ve Westhoff (1988), *Askosporogenous*, *Ballistosporogeneous* ve *Fungi Imperfecti* olarak üç grupta incelemişlerdir. Bazı araştırmacılar fungusları izolasyon kaynağına göre değerlendirerek tanılama yollarına gitmişlerdir. Örneğin Jarvis ve Williams (1987), Beneke ve Stevenson (1987) ve Frazier ve Westhoff (1988), daha çok gıda maddeleri ve içeceklerden izole edilen funguslar için çok kapsamlı olmayan bir tanılama anahtarı da vermiştir. Barnett ve ark. (1983, 2000) tarafından izolasyon kaynağına göre tanılama anahtarlarının bulunduğu kitap, maya taksonomisi ile ilgili çalışmalar yapan araştırmacıların en çok başvurduğu referanslardan birisidir.

Yapılan çalışmada, izole edilen mayaların genus ve tür düzeyinde tanımlanması için Barnett et al.'ın (2000) önerdiği, metilotrofik mayaların

tanılanması ile ilgili 9 numaralı tayin anahtarı ve Glukozu fermente eden mayaların tayin anahtarı kullanılmıştır. Bu tayin anahtarında 16 tane test bulunmaktadır. Ancak şüphesiz, bir maya suşunun genus ve tür düzeyinde tanılanabilmesi için bu testler yeterli değildir. Bu nedenle, bu tayin anahtarındaki testlerin sonucuna göre genus ve tür adları belirlenen maya suşlarının diğer özelliklerinin de literatürde verilen özelliklerle uyumlu olup olmadığının anlaşılması için aynı kaynağa başvurulmuş ve *Candida ovalis*, *Candida boidinii*, *Pichia kodamae*, *Pichia pini*, *Pichia methanolica*, *P. ciferrii*, *P. angutsa* ve *Candida methanosorbosa* olarak tanılanan 26 izolatin diğer özellikleri de test edilerek literatürdeki bilgilerle karşılaştırılmıştır. İzolatların kültürel ve fizyolojik özelliklerinin test edilmesi gibi yaklaşık 104 test yapılmıştır.

İzole edilen maya suşlarının tanımlanmasındaki ilk adım, mayaların morfolojik özelliklerinin incelenmesidir. Wickerham (1951,1970), Wickerham and Burton (1962), Banwart (1981), Barnett et al. (1983) ve Beneke and Stevenson (1987), *Candida* ve *Pichia* türlerinin malt extract ve MYGP agar üzerinde krem rengi koloniler oluşturduğunu belirtmektedir. Hücrelerin tomurcuklanma özelliğinin, boyutlarının ve şekillerinin belirlenmesi için Van der Walt (1970) ve Barnett et al.(2000), benzer yöntemler vermiştir. Phaff et al.(1966), Wickerham (1970), Banwart (1981), Beneke and Stevenson (1987) ve Frazier and Westhoff'a göre (1988), *Candida* ve *Pichia* genuslarına ait olan türlerin seksüel reproduksiyonu tomurcuklanma ile olmakta, hücreler de küresel, elips veya silindirik şekilde, tek, çift veya gruplar halinde bulunmaktadır. Hücrelerin pseudomisel oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Van der Walt (1970) ve Barnett et al. (2000), iki değişik yöntem önermiştir. Wickerham (1970), Banwart (1981), Barnett et al. (1983), Beneke and Stevenson (1987) ve Frazier and Westhoff'a göre (1988), *Candida* ve *Pichia* genuslarına ait bazı türler

pseudomisel oluştururken bazıları da oluşturmamaktadır. Araştırmamızda izole edilen maya suşlarının da yukarıda belirtilen özelliklerde olduğu belirlenmiştir. Wickerham and Burton (1962), Van der Walt (1970), Barnett et al. (1983), Beneke and Stevenson (1987), Cregg (1987) ve Kurtzman'a göre (1990), *Candida* ve *Pichia* genusuna ait türler homotalliktir. Yani normalde vejetatif haploid olarak bulunan türler. Özellikle azot eksikliğinde diploid hücreler oluşturmakta ve yavru hücreler tek bir ana hücreden oluşmaktadır (Cregg, 1987). Ancak *Pichia* ve *Candida*'nın bazı türlerinin heterotallik olduğu, yani iki eşem tipinin bulunduğu ve eşleşmenin bu iki zıt eşem tipi arasında gerçekteştiği bulunmuştur (Van der Walt., 1970 ve Cregg., 1987). Normalde *Candida methanosorbosa*, *Candida nemodendra* ve *Candida ovalis* türleri hariç *Pichia methanolica*, *P. kodamae*, *P. angusta*, *P. ciferrii* ve *P. pini* şapka şeklinde 1 -4 kadar askospor oluşturmaktadır (Barnett et al., 2000 ve Beneke and Stevenson, 1987). Araştırmamızda, incelenen türlerde askospor oluşumunun gözlenmesi için tavsiye edilen besiyerlerinden ilk olarak Gorodkova agar denenmiş, sonuç alınamayınca Asetat agar denenmiştir (Phaff et al., 1966 ve Barnett et al., 2000). Ancak bu besiyerinde de askospor oluşum gözlenmeyince, izole edilen suşların heterotallik olabileceği düşünölmüştür.

Mayaların tanımlanmasında morfolojik testlerden sonraki basamak, hücrelerin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin test edilmesidir. Literatürde *Pichia* ve *Candida* genuslarına ait türlerin, şekerleri fermente etmesinin ve karbon kaynaklarının asimilasyonu özelliklerinin türlere göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir. *Candida genusu* genel olarak şekerleri fermente edemezken *C. boidinii* ve *C. ovalis* sadece glukozu, *C. methanosorbosa* glukoz ve galaktozu fermente edebilmekte *C. neoedendra* ise hiçbir şekeri fermente edememektedir. *Pichia* genusunda da şekerlerin

fermentasyonu türlere göre değişmektedir. *P.methanolica* ve *P.kodamae* yalnızca glukozu fermente ederken, *P.pini*, glukoz ve α,α -Trehaloz'u, *P.ciferrii*, glukoz, galaktoz, maltoz, sukroz, sellobiyoz, rafinoz ve nişastayı, *P.angusta* ise glukoz, maltoz, sukroz, α,α -Trehaloz, sellobiyoz ve melezitos'u fermente edebilmektedir. İncelenen suşların fermentasyon özelliğinin ve karbon kaynaklarının asimilasyonu testlerinin sonuçlarının, literatürde verilen (Barnett et al., 2000) sonuçlara uyumlu olduğu görülmüştür.

Günümüzde metilotrofik olan *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis* maya genuslarının aslında birbirlerine son derece yakın olduğu tartışılmaktadır. Çeşitli kemotaksonomik kriterler, metilotrofik *Candida* ve *Torulopsis* genuslarındaki suşların, *Hansenula* ve *Pichia*'nın imperfect formları olduğunu göstermektedir. Lee and Komagata (1978), 31 yeni izolat ve metilotrofik olduğu bilinen 44 suş üzerinde bir taksonomik çalışma yaparak, kültürel ve fizyolojik karakterler ve kemotaksonomik kriterleri baz alıp inceledikleri 75 suşun hepsinin *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis* genuslarına ait olduğu sonucuna varmışlardır. Bu araştırmada da *Candida* ve *Torulopsis* genuslarındaki metilotrofik suşların aslında *Hansenula* ve *Pichia*'nın imperfect formları olabileceği ileri sürülmüştür. Hücre DNA'larının G- C içeriği, ubiquinone sistemleri, hücre duvarı mannanlarının proton manyetik rezonans spektrumları ve diğer fizyolojik karakteristikler, bu bulguyu desteklemektedir (Harder and Brooke, 1990). Tanılama testleri arasında bulunan cycloheximide'de büyüme testinde kullanılan antibiyotik konsantrasyonlarının %0.01 ve %0.1 $\mu\text{g/ml}$ olmasının nedeni, mayaların çok düşük cycloheximide konsantrasyonlarına adapte olabilmeleridir. Bu test, yukarıda belirtilen konsantrasyonlar kullanıldığında, türlerin karakterizasyonunda sınırlı uygulama alanı bulmaktadır. Bu antibiyotiğe dirençli olan mayaların modifiye edilmiş 80S ribozomlara sahip olduğu, dolayısıyla bu bölgede protein sentezini engelleyen bu antibiyotikten

etkilenmedikleri düşünülmektedir (Barnett et al., 1983). Araştırmamızda izole edilen maya suşları da bu konsantrasyonlar'daki cycloheximide'te büyüebilmiştir.

Maya türlerinin birçoğunun, yüksek D-glukoz konsantrasyonlarında büyüebildiği belirtilmektedir (Van der Walt, 1970). Barnett et al. (2000)'e göre, *P.angusta*, *P.pini* ve *P.ciferrii* %50 D-Glukoz konsantrasyonlarında büyüebilmekte *P.kodamae* ve *P.methanolica* ise %50 D-Glukoz konsantrasyonlarında büyüememektedir. *Candida* türlerinden *C.boidinii*, *C.ovalis*, *C.nemodendra* ve *C.methanosorbosa* %50 D-Glukoz konsantrasyonlarında büyüememektedir. İncelenen suşlardan *Pichia* türleri literatüre uyumluluk gösterirken, *Candida* türleri ise literatürden farklı sonuçlar göstermiştir.

Mayaların üreyi amonyağa hidroliz etme yeteneklerinin farklı olması, bu özelliğin mayaları ayırt etmede kullanılabilmesini sağlamaktadır. Barnett et al. (2000)'e göre *P.angusta*, *P.pini*, *P.ciferrii* *P.kodamae*, *P.methanolica* *C.boidinii*, *C.ovalis*, *C.nomedendra* ve *C.methanosorbosa* suşları üreaz enzimine sahip olmadığından üreyi hidroliz edememektedir. İncelenen suşların da üreyi hidroliz etmediği belirlenmiştir.

Diazonium blue B (DBB) renk testi, bazidiomisetik mayaların askomisetik mayalardan ayırt edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bazidiomisetik mayaların oluşturduğu koloniler, DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk almakta, askomisetik mayalarda ise herhangi bir renk değişimi olmamaktadır. Askomisetik mayalar olan *Pichia* ve *Candida* genusları da DBB çözeltisi ile renk değiştirmemektedir. Bu test için iki farklı besiyeri önerilmektedir. Bunlar MYGP agar ve Saboraud'un %4 glukozlu agarıdır. Bu testin gerçekleştirilmesi için ya 10 günlük kültürün birkaç saat 55°C'de tutulması (Barnett et al., 1983) ya 3 hafta 25°C'de inkübe edilen kültüre DBB

çözeltisi eklenmesi (Van der Walt and Hopsu-Havu, 1970) ya da inkübasyonun 5- 7 güne indirilip daha sonra kültürün 16 saat boyunca 55-60°C’de tutularak üzerine DBB çözeltisi eklenmesi (Van der Walt, 1970) önerilmektedir (Lodder, 1970 ve Barnett et al., 1983). Yapılan çalışmada MYGP agar kullanılarak, 10 günlük kültüre DBB çözeltisi eklenip, test gerçekleştirilmiş ve incelenen suşların bu testin sonucunda negatif tepki verdiği gözlenmiştir.

Maya türlerinin sistematik kategorileri Alexopoulos (1979) ile Fraizer and Westhoff (1988) tarafından verilmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçlarında, tanılanan suşların sistematik kategorileri verilirken, genel olarak fungus taksonomisi üzerinde çalışmış olan Alexopoulos’un (1979) sistematik kategorisi, daha çok gıdalarla ilgili olan mikroorganizmalar hakkında çalışma yapan Frazier and Westhoff’un (1988) sistematik kategorisine tercih edilmiştir.

İzolasyonu gerçekleştirilen 26 adet metilotrofik maya suşundan 10 tanesi *P.angusta*, 2 tanesi *C.boidinii*, 2 tanesi *P.kodamae*, 2 tanesi *P.pini*, 2 tanesi *P.methanolica*, 5 tanesi *P.ciferrii*, 1 tanesi *C.methanosorbosa*, 1 tanesi *C.nemodendra* ve 1 tanesi de *C. ovalis* türü olarak tanımlanmıştır.

İzole edilen bu türlerin formaldehit ve metilamini kullanma kapasitesine bakılmıştır. Bu kimyasalların tanımladığımız izolatlar tarafından kullanılıp kullanılmadığını test etmek için literatürde belirtilen metanollü yeast extract broth kullanılmıştır. Denemede Ogata et al. (1975) ve Barnet et al., (1983,2000) tarafından önerilen sıvı besiyeri olan metanollü yeast extract broth kullanılmıştır. Bu ortama %1, %2, %3, %4, %5, %6 ve %7(v/v) oranında değişen konsantrasyonlarda metanol kullanılmıştır. Bu deneme sonucunda maya izolatlarının %1- %6 oranındaki metanolde büyüebildiği gözlenmiştir. %1 -%6’ya kadar olan konsantrasyonlarda büyüme gözlenmiş fakat izolatların üreme yoğunluğu birbirinden farklıdır. Bu

konsantrasyonlarda en yoğun büyüme gösteren türün *P.angusta* olduğu saptanmıştır. 35 numaralı izolat olan *C.nomedendra* %1 metanol içeren ortamda büyümesine rağmen daha sonraki denemelerde ürememiştir. Formaldehit doğa için toksik bir ara bileşik olduğundan doğadan uzaklaştırılması gerekmektedir. Metilotrofik mayalar bu bileşiği daha az toksik olan formlara dönüştürebilmektedir. Koloczek et al, (2001) tarafından önerilen yeast extract broth içeren besiyerine %1 ml oranında formaldehit eklenip deneme yapılmıştır. Bu denemenin sonucunda 21, 28, 30 ve 34 numaralı maya suşlarının %1 oranındaki formaldehitte büyüemediği diğer suşların ise az da olsa büyüebildiği tespit edilmiştir. Son olarakta metilamin bileşiği kullanılmıştır. Bellion and Johns'a göre (1991), bakteriler metilamini karbon kaynağı olarak kullanırken, metilotrofik mayalar metilamini azot kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Bellion and Johns (1991), çalışmalarında yeast extract broth'a glukoz eklemeyip sadece metilamin eklemiştir. Bu durumda izolatların üremediği ancak besiyerine glukoz eklendiğinde izolatların ürediği saptanmış. Çalışmamızda bu uygulamalar yapıldığında 21 numaralı izolat hariç diğerlerinin ürediği görülmüştür. Bu da metilaminin bu strainler tarafından karbon kaynağı olarak kullanılamadığının göstergesidir. İzole edilen strainler metanol dışındaki karbon kaynaklarını kullanabildiğinden bunların obligat değil fakültatif metilotrof oldukları sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak metanol, formaldehit ve metilamin'i parçalama ya da kullanma açısından en toleranslı olan türün *P.angusta* olduğu saptanmış ve daha ileriki araştırmalarda, moleküler ve genetik tanılamaları da yapıldıktan sonra, endüstriyel olarak kullanılması amaçlanmaktadır.

KAYNAKLARIN DİZİNİ

Alexopoulos, C.J., 1962. Introductory Mycology. 2nd Ed., John Wiley and Sans, New York, 220p.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., 1979. Introductory Mycology. 3rd Ed., John Wiley and Sans, New York, 307p.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwesh, M., 1996. Introductory Mycology. 4nd Ed., John Wiley and Sans, New York, 867p.

Atlas, R.M., Parks, L.C., 1997. Handbook of Microbiological Media. 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, 1705p.

Atlas, R.M., 2004. Handbook of Microbiological Media. 3th Ed., CRC Press, Boca Raton, 2

Aran, N. ve Karakuş, M., 1985, Melastan yem mayası üretimi. TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Projesi, MBEAE Matbaası, 1, 10, Kocaeli.

Banwart, G.J., 1981. Basic Food Microbiology. AVI Publishing Co., Inc., Westport, 519 p.

Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D., 1983. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Pres, Cambridge.

KAYNAKLAR (devam)

Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. 3th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1139p.

Beech, F. W., and Davenport, R.R., 1971. Isolation, purification and maintainance of yeasts, 153- 182, Methods in Microbiology. Vol.4, **Booth, C.** (Ed), Academic Pres, London.

Bellion, E., and Jones J. G., 1991. Methylamine metabolism in *Hansenula polymorpha*: an in vivo ¹³ C and ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Study. Journal of Bacteriology, p. 4959- 4969.

Beneke, E. S., and Stevenson, K. E., 1987. Classification of food and beverage fungi. 1- 17, Food and Beverage Mycology, 2nd Ed., **Beuchat, L. R.** (Ed), Van Nostrand Reinhold Publishers, New York.

Colowick, S. P., Cooney C. L., and Levine D. W., 1973. Isolation and Characterization of a Thermotolerant Methanol- Utilizing Yeast. Applied Microbiology, p. 982- 990.

Cooney, C. L., Levine, D. W., and Snedecor, B., 1975. Production of single cell protein from methanol, Journal of Food Thecnology. p. 33- 42.

Cregg J. M., and Cereghino GPL., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbial Rev. 24: 45- 66.

KAYNAKLAR (devam)

Cregg, J. M., 1987. Genetics of methylotrophic yeasts. 158- 168, Microbial Growth on C1 Compaunds, Proceedings of the 5th International Symposium, **Van Verseveld, H. W., and Duine, J. A.** (Ed), Martinus Nijhoff Publishers, Boston.

Cregg, J. M., and Madden, K. R., 1988. Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host system for the production of foreign proteins. Development in Industrial Microbiology, 29: 33- 41.

Cregg, J. M., Cos, O., Serrano, A., Montesines, J. L., Ferrer, P., Valero, F., 2005. Combined effect of the methanol utilization phenotype and gene dosage fed- batch cultures. Journal of Biotechnology, p. 321- 335.

Daly, R., and Cregg, J. M., 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol Recogn, 18: 119- 138.

Digan, M. E., Tschoop, J., Grinna, L., Lair, S. V., Craig, W. S., Veliçelebi, G., Siegel, R., Davis, G. R., and Thill, G. P., 1988. Secretion of heterologous proteins from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Developments in Industrial Microbiology, 29: 59- 65.

Dijkhuizen, L., 1993. Methylotrophs, 269, Biotechnology. Vol. 1, 2nd Ed., **Rehm, H. J., and Reed, G.** (Ed), VCH Publishers, New York.

KAYNAKLAR (devam)

Dorgai, L., Kucsera, J., Rubiera, Roger., Urban, G., and Szamecz, B., 2005. Identification of four alcohol oxidases from methylotrophic yeasts. Wiley Interscience, Yeast. p. 669- 676.

Dunn, J. A. W., and Tuttle, D., 1995. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Journal of Cell Science, USA.

El Nawawy, A., and Gnan, S. O., 1983. Isolation and propagation of new methanol utilizing microorganisms. Journal of Biotechnology and Bioengineering, 25: 863- 865.

Fonseca, L. P., Gibson, T. D., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S., and Azevedo, A. M., 2003. Thermal and operational stabilities of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 37- 45.

Frazier, W. C., and Westhoff, D. C., 1988. Food Microbiology. 4th Ed., McGraw Hill Book Co., New York, p. 516.

Fukui, S., Tanaka, S., Kawamoto, S., Yasuhara, Y., Teranishi., and M. Osumi., 1975. Ultrastructure of methanol- utilizing yeast cells: appearance of microbodies in relation to high catalase activity. J. Bacteriol, 123: 317- 328.

Gingeras, T. R., Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., and Harpold, M. M., 1985. Isolation of Alcohol Oxidase and Two Other Methanol Regulatable Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. American Society for Microbiology, p. 1111- 1121.

KAYNAKLAR (devam)

Gleeson, M. A., and Sudberry, P. E., 1988. The methylotrophic yeast. *Yeast*, 4: 1- 15.

Goma, G., 1986. Trends on optimization of biomass production; application to SCP production, 17- 32, *Perspectives in Biotchnology and Applied Microbiology*. **Alani, D. J., and Young, M. M.** (Ed), Elsevier Applied Science Publishers, New York.

Harder, W., Trotsenko, Y. A., Bystrykh, L. V., and Egli, T., 1987. Metabolic regulation in methylotrophic yeast. In: van Verseveld H.W, Dijine J. A (Eds) *Microbial growth on C1 compounds*. Proceedings of the 5th International Symposium, Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht p. 139- 149.

Harder, W., and Brooke, A. G., 1990. Methylotrophic yeasts, 395- 427, *Yeast: Biotecgnology and Biocatalysis*. **Verachtert, H. and DeMot, R.**(Ed), Marcel Dekker Inc., New York.

Hoop, M. J. D., Cregg, J. R., Gunnink, K., Sjollemen, K., Veenhuis., and Ab, G., 1991. Overexpression of alcohol oxidase in *Pichia pastori*. *Federation of European Bochemical Societies*, 299- 302.

Jarvis, B. and Williams, A. P., 1987. Methods for detecting fungi in foods and beverages, 612, *Food and Beverage Mycology*. 2nd Ed., **Beuchat, L. R.** (Ed), Van Nostrand Reinhold Int. Co. Ltd., New York.

KAYNAKLAR (devam)

Jones, J. G., and Bellion, E., 1991. Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha*. Biochem. J. 280: 475- 481.

Jwanny, E. W., and Rashad, M. M., 1985. Metabolism of methanol by yeast and SCP production. J. Basic Microbiol. 25 (10) :645- 651.

Kaplan, N., 1955. Methods in Enzymology. Vol. 1, Academic Press, Inc., Publishers, 144, New York.

Karapınar, M., 1983. Tek hücre proteini üretiminde karbon ve enerji kaynakları. E. Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi, Seri B: Gıda Mühendisliği, 1(1): 137- 150.

Kaszycki, P., Czechowska, K., Petryszak, P., Miedzobrodzki, J., Pawlik, B., and Koloczek, H., 2006. Methylophilic extremophilic yeast *Trichosporon* sp: a soil- derived isolate with potential application in environmental biotechnology. Acta Biochimica Polonica, p 463- 473.

Kato, N., Tani, Y., and Sakai, Y., 1999. Biotechnological application of cellular functions of the methylophilic yeast. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic p. 161- 173.

Kirsop, B. E., 1984. Maintenance of Microorganisms: A Manual of Laboratory Methods. **Kirsop, B. E., and Snell, J. J. S. (Eds),** Academic Press Inc., London.

KAYNAKLAR (devam)

Kirsop, B. E., and Kurtzman, C. P., 1980. Living Resources for Biotechnology: Yeasts, Cambridge University Pres, Cambridge.

Klei, V. D., Paulina O., and Marten V., 2005. Alcohol oxidase : A coplex peroksisomal, oligomeric flavoprotein. FEMS Yeast Research, Vol 5, Issue, 11, p 975- 983.

Koloczek, H., Malec, P., Tyszk, M., and Kaszycki, P., 2001. Formaldehyde and methanol biodegradation with the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. An application to real wastewater treatment. Kluwer Academic Publishers, Biodegradation 12: 169- 177.

Kratochilova, A. K.,1990. Yeast and Yeast-Like Organisms. VCH Publishers, New York.

Kreger-van Rij, N.J. W., 1984. The Yeast a Taxonomic Study. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, 1082p.

Kurtzman, C. P., 1990. Classification and general properties of yeasts, 1-34, Yeast: Biotechnology and Biocatalysis. **Verachtert, H and DeMot, R.** (Eds), Marcel Dekker, Inc., New York.

Kunze, G., Gellissen, G., Gaillardin, C., Cregg, J. M., Berardi, E., Veenhuis, M., and Klei, Ida Van Der., 2005. New Yeast Expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Yarrowia lipolytica*- A comparision. FEMS Yeast Research, 1079- 1096.

KAYNAKLAR (devam)

Large, P. J., 1983. Methylo trophy and Methanogenesis. Van Nostrand Reinhold Co. Ltd., Washington, 88p.

Lee, J. D., and Komagata K., 1983. Further Taxonomy Study of Methanol-Assimilating Yeasts With Special References to Electrophoretic Comparison of Enzymes. J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 395- 416.

Lodder, J., and Kreger-van Rij, N.J.W., 1952. The Yeasts- A Taxonomic Study. North Holland Publishing Co., Amsterdam.

Macauley, P. S., Fazenda, M. L., Mc Neil, B., and Harvey, L. M.,2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast,22: 249- 270.

Martin, J. P., 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycine in the plate method for estimating soil fungi. Soil Sci.,69, 215- 233.

Nakagawa, T., Yamada, K., Fujimura, S., Ito, T., Miyaji, T., and Tomitzuka, N., 2005. Pectin utilization by the methylo trophic yeast *Pichia methanolica*. Microbiology, p. 2047- 2052.

Ogata, K., Tani, Y., and Kato, N., 1975. Oxidation of methanol by yeasts, Proceedings of the International Symposium on Microbiol Growth on C1 Compounds. The Society of Fermentation Technology Organizing Committee (Eds), Tokyo.

KAYNAKLAR (devam)

Ohi, H., Miami, M., Kuko, M., Naoko, T., 2008. Recombinant human fibrinojen expressed in the yeast *Pichia pastoris* was assembled andbiologically active Protein Expression and Purification. Vol 59, issue 2, p 289- 296.

Özgür, M., Yılmaz, Ş. Yavuz., ve Emre, K., 2003. Tek hücre proteinini üretimi. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü /Bornova- İzmir.

Öztürk, A., 1997. Metilotrofik Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bornova/İzmir.

Öztürk Y., H.T., 2007. Beyaz peynirlerde bozulmaya neden olan *yarrowia lipolytica* ve *debaryomyces hansenii*'nin fenotipik ve genotipik identifikasyonu, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 206s.

Phaff, H. J., Miller, M. W., and Mrak, E. M., 1966. The Life of Yeasts. Harvard University Pres, Cambridge, 186p.

Prado, O. J. Veigna M. C., and Kennes, C., 2008. Removal of formaldehyde, methanol, dimethyleter and carbon monoxide chemosphere.Vol 70, Issue 8, p 1357- 1365.

Reed, G., 1982. Microbial biomass, single cell protein and other microbial products. 541- 581, Prescott and Dunn's Industrial Microbiology, 4th Ed., Reed, G. (Ed), AVI Publishing Co., Inc., Westport.

KAYNAKLAR (devam)

Rhem, H. J., 1986. Single cell protein production from petroleum derivatives and its utilization as food and feed, 1- 16, Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology. Alani, D. J. and Young, M. M. (Eds), Elsevier Applied Science Publishers, New York.

Rose, A. H., and Harrison, J.S. , 1969. The Yasts, Vol. 1, Biology of yeasts. Academic Pres, London.

Rose, A. H., and Harrison, J.S., 1989. The Yasts, Vol. 3, 2nd Ed., Academic Pres, London.

Senez, J. C., 1986. The economical aspects of SCP production from petroleum derivatives, 33- 60, Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology. Elsevier Applied Science Publishers, New York.

Serrano, A. C. O., Montesinos, J. L. and Ferrer, P., Cregg, J. M., and Valero, F., 2005. Combined effect of the methanol utilization phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed- batch cultures. Journal of Biotechnology, p 321- 335.

Sibirniy, A. A., Titorenko, V. I., Gonchar, M. V., Ubiyvovk, V. M., Ksheminskaya, G. P., and Vitvitskaya, O. P., 1998. Genetic control of methanol utilization in yeasts. J. Basic Microbiol. 28: 293- 319.

S. F. D'Souza., 2001. Appl. Biochem. Biotechnol.

KAYNAKLAR (devam)

Spencer J. F. T., Ragout D. S., and Laluec L.C., 2002. Non- Conventional Yeasts. Appl. Microbiol Biotechnol, 58: 147- 156.

Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., and Kropp, K. E., 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene, 190: 55- 62.

Stockar, U., V, Ian., M. Carmen, J., 2007. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut⁺ strain in transient continuous cultures. Journal of Biotechnology, Vol 130, Issue 3, p 236- 246.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P.,2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by *non-Saccharomyces* winw yeasts, Journal of Applied Microbiology 91,182-190.

Tamer, A. Ü., Uçar, F., Karaboz, İ., Bursahoğlu, M., ve Oğultekin, R., 1989. Mikrobiyoloji Laboratuar Kılavuzu, E. Ü. Fen Fakültesi Teksirler Serisi, No. 55, Bornova, İzmir.

Tani, Y., 1991. Production of useful chemicals by methylotrophs, 253- 270, Biology of methylotrophs. **Goldberg, I., and Rokem, J. S. (Eds),** Butterworth- Heinemann, Boston.

Tani, Y., and Yamada, H., 1980. Microbial utilization of C1 compounds, Biotechnology and Bioengineering. 22(1): 163- 175.**Taylor, A. G., and Nclonald, D. S., 1978.** Single cell protein and it's production, A process for the production of single cell protein which comprises cultivating. British Poultry Science

KAYNAKLAR (devam)

Trotsenko, Y., and Ashin, V., 2000. Alcohol oxidase of the methylotrophic yeast: new findings. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, p 295-303.

Van der Walt, J. P., 1970. Criteria and methods used in classification, 34-114, *The Yeasts: A Taxonomic Study*. **Lodder, J.** (Ed), North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385 p.

Uzeh R. E., and Ojokoh, A. O., 2005. Production of *Saccharomyces cerevisiae* biomass in papaya extract medium. *African Journal of Biotechnology*, Federal University of Technology. Department of Microbiology, Vol. 4(11), p 281- 284.

Walker, G. M., 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester, New York.

Wagner, G. H., and Harder, W., 1987. Methylotrophic yeasts, 1986. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53: 29- 36.

Wickerham, L. J., 1951. *Taxonomy of Yeasts*. U. S. Dept. Agriculture, Techn. Bul. No. 1029, 1- 56.

Wickerham, L. J., 1952. Recent advances in the taxonomy of yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 6, 317- 332.

KAYNAKLAR (devam)

Wickerham, L. J., and Burton, K. A., 1952. Occurrence of yeast mating types in nature. J. Bacteriol. 63, 449- 451.

Wickerham, L. J., and Burton, K. A., 1962. Phylogeny and biochemistry of the genus *Hansenula*. Bacteriol. Rev, 26, 382- 397

Wickerham, L. J., 1970. *Hansenula* h.et P.Sydow, 226- 308, The Yeasts: A Taxonomic Study. **Lodder, J.** (Ed), North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385 p.

Woodward, J. R., 1989. Methylotrophic organisms and their uses: An update. Enzyme Microb. Technol. 11: 457- 458.

Yurimoto, H., Kato, N., and Sakai, Y., 2005. Assimilation, Dissimilation, and Detoxification of Formaldehyde, a Central Metabolic Intermediate of Methylotrophic Metabolism. The Chemical Record 606- 8502, Kyoto, Japan.

Yurimoto, H., Sasano, Y., Yanaka, M., and Sakai, Y., 2008. Trm1p, a Zn(II)₂Cys₆- Type Transcription Factor, Is a Master Regulator of Methanol-Specific Gene Activation in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii*. Division of Applied Life Science, Japan Science and Technology, Tokyo, Japan.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Adıyaman’da doğan Zübeyde HANOL, sırasıyla 100.yıl İlk Okulu, Menderes İlköğretim Okulu ve Erdemir Lisesininden mezun olmuştur. 2000 yılında girdiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2005 yılında başarıyla tamamlamıştır. Şubat 2006’da Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

“Çevresel Biyoteknolojide Uygulama Potansiyeline Sahip Metilotrofik Mayala Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonları” adlı yüksek lisans tezi hazırlamıştır.