

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**KONVANSİYONEL VE ITS-PCR YÖNTEMLERİYLE
TANISI YAPILAN *Yarrowia lipolytica* STRAİNLERİNİN
DİĞER MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLERLE
TANISININ KESİNLEŞTİRİLMESİ VE
EKSTRASELLÜLER ENZİMLERİNİN ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Onur AKPINAR

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Füsun B. UÇAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.04

Sunuş Tarihi : 08.11.2013

Bornova-İZMİR

2013

Onur AKPINAR tarafından Doktora Tezi olarak sunulan “**Konvansiyonel Ve ITS-PCR Yöntemleriyle Tanısı Yapılan *Yarrowia lipolytica* Strainlerinin Diğer Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Tanısının Kesinleştirilmesi Ve Ekstrasellüler Enzimlerinin Üretimi, Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu**” 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 08.11.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Füsun B. UÇAR

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

.....

Üye : Prof. Dr. Abdurrahman Ü. TAMER

.....

Üye : Doç. Dr. İhsan YAŞA

.....

Üye : Doç. Dr. Evrim ÖZKALE

.....

ÖZET

KONVANSİYONEL VE ITS-PCR YÖNTEMLERİYLE TANISI YAPILAN *Yarrowia lipolytica* STRAİNLERİNİN DİĞER MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLERLE TANISININ KESİNLEŞTİRİLMESİ VE EKSTRASELLÜLER ENZİMLERİNİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

AKPINAR, Onur

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Füsün B. UÇAR

Kasım 2013, 241 sayfa

Bu tez çalışmasında, daha önceki çalışmalarda çeşitli yöntemlerle tanısı yapılan 22 *Yarrowia lipolytica* straininin tanısını kesinleştirmek için üç farklı moleküler biyolojik yöntem kullanılmıştır. İlk olarak, ITS1–5.8S–ITS2 bölgesi PCR ile çoğaltılarak ve *Hae*III, *Hinf*I ve *Rsa*I restriksiyon enzimleri ile kesilerek farklı RFLP profilleri elde edilmiştir. Benzer şekilde, 18S rDNA bölgesi PCR ile çoğaltılıp *Hae*III, *Rsa*I ve *Taq*I restriksiyon enzimleri ile kesilerek farklı RFLP profilleri elde edilmiştir. Hem ITS1–5,8S–ITS2 hem de, 18S rDNA bölgelerinin RFLP analizi sonuçları 22 *Y. lipolytica* strainlerinde birbirleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Son olarak, 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaini PCR ile çoğaltılmış ve çoğaltılan bölgenin sekans analizi yaptırılmıştır. Sonuç olarak, üç farklı moleküler biyolojik yöntemle bütün *Yarrowia lipolytica* strainlerinin tanıları kesinleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen enzim taramaları sonucunda, denenen 22 *Yarrowia lipolytica* ribonükleaz (RNaz) enzimi üretirken, bu strainlerden sadece 6 tanesi alkalın ekstrasellüler proteaz (AEP) enzimini ürettiği saptanmıştır. Enzim tarama sonuçlarına göre, en yüksek aktivite gösteren birer *Yarrowia lipolytica* straini seçilmiş ve AEP ve RNaz enzimlerinin üretiminde bu iki *Y. lipolytica* straini kullanılmıştır.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden GPP besiyerinde AEP enzimi üretilmiş ve saflaştırma işlemlerine alınmıştır. Gerçekleştirilen saflaştırma işlemleri sonucunda AEP enzimi, DEAE-selüloz kromatografisi ile % 29,05 verimle 16,46 kat saflaştırılırken Sephadex G-75 kromatografisi ile % 57,76 verimle 4,56 kat saflaştırılmıştır. AEP enziminin karakterizasyon çalışmaları sonucunda, AEP enziminin molekül ağırlığının 30,50 kDa; optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin 30°C; optimum pH ve pH stabilitesinin pH 10,50; N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA peptidini hidrolizleyerek bir kemotripsin tip aktivite gösterdiği; en iyi kazein ve süt tozunu hidrolizlediği; PMSF ile inhibe olarak bir serin proteaz olduğu; aktivitesinin en fazla Mn^{+2} iyonu ile arttığı; SDS ile aktivitesinin yarısını kaybettiği bulunmuştur. AEP enziminin LC-MS/MS analizi sonucunda veritabanındaki *Y. lipolytica* alkalın ekstrasellüler proteaz enzimi olduğu doğrulanmıştır.

Y. lipolytica TEM YL 21 straininden GPP-sitrat besiyerinde RNaz enzimi üretilmiş ve saflaştırma işlemlerine alınmıştır. Gerçekleştirilen saflaştırma işlemleri sonucunda RNaz enzimi, DEAE-selüloz kromatografisi ile % 37,90 verimle 62,58 kat saflaştırılırken Sephadex G-75 kromatografisi ile % 66,10 verimle 27,23 kat saflaştırılmıştır. RNaz enziminin karakterizasyon çalışmaları sonucunda, RNaz enziminin molekül ağırlığının 40,97 kDa; optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin 30°C; optimum pH ve pH stabilitesinin pH 5,0; poly(A) ribohomonükleotidini en fazla hidrolizleme kapasitesinde olmasından dolayı ribonükleazlarının T2 ailesine mensup olduğu; sodyum azid ile inhibe olduğu; aktivitesinin en fazla Mg^{+2} iyonu ile arttığı bulunmuştur. RNaz enziminin LC-MS/MS analizi sonucunda veritabanındaki *Y. lipolytica* T2-benzeri ribonükleaz enzimi olduğu doğrulanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Yarrowia lipolytica*, ITS-RFLP, 18S-RFLP, 26S rRNA sekans analizi, alkalın ekstrasellüler proteaz, ekstrasellüler ribonükleaz, enzim saflaştırma, enzim karakterizasyon.

ABSTRACT**CONFIRMATION OF THE IDENTIFICATION OF THE *Yarrowia lipolytica* STRAINS IDENTIFIED WITH CONVENTIONAL AND ITS-PCR METHODS BY USING OTHER MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS, AND THE PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR ENZYMES**

AKPINAR, Onur

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Füsün B. UÇAR

November 2013, 241 pages

In this thesis study, three different molecular biology methods were used to confirm the identification of 22 *Yarrowia lipolytica* identified with conventional and ITS-PCR Methods in previous studies. Firstly, RFLP profiles were obtained by amplifying the ITS1-5.8S-ITS2 region with PCR and then cutting them with *HaeIII*, *HinfI* and *RsaI* restriction enzymes. Similarly, RFLP profiles were obtained by amplifying the 18S rDNA region with PCR and then cutting them with *HaeIII*, *RsaI* and *TaqI* restriction enzymes. After the RFLP analyses, it was determined that both the ITS1-5, 8S-ITS2 and the 18S rDNA regions in the 22 *Y. lipolytica* strains were compatible with each other. Finally, the D1/D2 domain of the 26S rDNA region was amplified with PCR and then the sequence analysis of the amplified region was performed. As a result, identifications of all the *Yarrowia lipolytica* strains were confirmed with the three different molecular biological methods.

After the screening of the enzymes, it was determined that while all the *Y. lipolytica* strains produced the ribonuclease (RNase) enzyme, only 6 of these strains produced the alkaline extracellular protease (AEP) enzyme. According to enzyme screening results, *Y. lipolytica* strains with the highest activity were selected and then these two strains were used in the production of AEP and RNase enzymes.

The AEP enzyme was produced from the *Y. lipolytica* TEM YL 5 strain in the GPP medium underwent the purification procedures. After the purification procedures, the AEP enzyme was purified 16.46 fold through the DEAE-cellulose chromatography with the 29.05% yield and 4.56 fold through the Sephadex G-75 chromatography with the 57.76% yield. After the characterization of the AEP enzyme, it was determined that the molecular weight of the AEP enzyme was 30,50 kDa, that its optimum temperature and temperature stability were 30° C, that its optimum pH and pH stability were pH 10.50, that it had chymotrypsin type activity since it hydrolyzed the N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA peptide, that it best hydrolyzed casein and milk powder, that it was inhibited by the PMSF resulting in a serine protease and that it achieved the maximum activity with the Mn^{+2} ion and lost half of its activity with SDS. After the LC-MS/MS analysis, of, it was confirmed that the AEP enzyme was the one of the *Y. lipolytica* alkaline extracellular protease enzymes in the database.

The RNase enzyme was produced from the *Y. lipolytica* TEM YL 21 strain in the GPP medium underwent the purification procedures. After the purification procedures, the RNase enzyme was purified 62.58 fold through the DEAE-cellulose chromatography with the 37.90% yield and 27.23 fold through the Sephadex G-75 chromatography with the 66.10% yield. After the characterization of the RNase enzyme, it was determined that the molecular weight of the RNase enzyme was 40.97 kDa, that its optimum temperature and temperature stability were 30° C, that its optimum pH and pH stability were pH 5.0, that it belonged to the T2 family of the ribonucleases since it has the maximum capacity to hydrolyze poly (A) ribohomoribonucleotide, that it was inhibited by the sodium azide and that it achieved the maximum activity with the Mn^{+2} ion. After the LC-MS/MS analysis, of, it was confirmed that the RNase enzyme was the one of the *Y. lipolytica* ribonuclease T2-like enzyme in the database.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, ITS-RFLP, 18S-RFLP, 26S rRNA sequence analysis, alkaline extracellular protease, extracellular ribonuclease, enzyme purification, enzyme characterization.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenip yürütülmesinde bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Füsün B. UÇAR'a, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU ve Dr. A. Akın DENİZCİ'ye, tez çalışmamda strainlerin kullanmama izin veren Yrd. Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN ve Yüksek Biyolog Orçun GÜNGÖR'e, DNA sekans analizi ve protein saflaştırma işlemleri gerçekleştirildiği İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİYOMER)'ne, hiçbir zaman benden yardımlarını esirgemeyen Ali Şahin KÜÇÜKASLAN'a, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine, çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince beni maddi-manevi destekleyen ve bulunduğu yere gelmemde büyük emekleri olan kıymetli aileme, sevgili eşim Selin AKPINAR' a ve biricik kızım Ada Defne AKPINAR'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Ayrıca, doktora eğitimim esnasında burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	8
2.1 Maya Taksonomisi.....	8
2.2 Mayaların Mikrobiyal Ekolojisi	11
2.3 Mayaların Tanılanmasında Kullanılan Yöntemler	12
2.3.1 Konvansiyonel yöntemlerle mayaların tanılanması	13
2.3.2 Moleküler biyolojik yöntemlerle mayaların tanılanması.....	16
2.4 <i>Yarrowia lipolytica</i> Mayasının Genel Özellikleri.....	37
2.4.1 Doğal habitatları ve filogenetik ilişkileri.....	37
2.4.2 Fizyolojisi	40
2.4.3 <i>Yarrowia lipolytica</i> ’ da metabolitlerin salgılanması.....	41

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.4 <i>Yarrowia lipolytica</i> ’ da Dimorfizm.....	44
2.4.5 <i>Yarrowia lipolytica</i> ’ ın Genomu	46
2.4.6 <i>Yarrowia lipolytica</i> mayasının endüstriyel uygulamaları	47
2.4.7 <i>Y. lipolytica</i> mayasında heterolog proteinlerin klonlanması ve üretimi.....	59
2.5 <i>Y. lipolytica</i> ve diğer organizmalar tarafından üretilen enzim tipleri	60
2.5.1 Proteaz enzimi.....	61
2.5.2 Ribonükleaz (RNaz) Enzimi	76
2.6 Maya Hücrelerinden Enzim Saflaştırması	83
2.6.1 Genel protein saflaştırma yöntemleri	83
2.6.2 Protein saflaştırılmasında kullanılan temel kromatografik teknikler..	84
2.6.3 Proteom projelerinde proteinlerin tanılanması.....	89
2.7 Mayalarla İlgili Türkiye’ de Yapılan Çalışmalar	92
3. MATERYAL VE METOT	95
3.1 Materyal	95
3.1.1 Kullanılan mikroorganizmalar	95
3.1.2 Kullanılan besiyerleri.....	95
3.1.3 Kullanılan çözelti, tampon ve bileşikler	98

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.4 Kullanılan başlıca cihazlar.....	112
3.2 Metot.....	114
3.2.1 <i>Yarrowia lipolytica</i> strainlerinin aktifleştirilmesi.....	114
3.2.2 <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin moleküler biyolojik yöntemlerle tanılanması	114
3.2.3 Toplam protein miktarının tayini	122
3.2.4 Tanısı kesinleştirilen <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin alkalın ekstrasellüler proteaz enzimi aktivite taranması, üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu ..	123
3.2.5 Alkalın ekstrasellüler proteaz (AEP) aktivite taranması	123
3.2.6 Alkalın proteaz aktivitesinin belirlenmesi	123
3.2.7 AEP enziminin üretimi	125
3.2.8 AEP enziminin saflaştırılması	125
3.2.9 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	126
3.2.10 Saflaştırılan AEP enziminin karakterizasyonu	128
3.2.11 Tanısı kesinleştirilen <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin ekstrasellüler ribonükleaz enzimi aktivite taranması, üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu	133
3.2.12 Ekstrasellüler ribonükleaz (RNaz) aktivite taranması	133
3.2.13 RNaz aktivitesinin belirlenmesi.....	133
3.2.14 Ekstrasellüler RNaz enziminin üretimi.....	134

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.2.15 Ekstrasellüler RNaz enziminin saflaştırılması	134
3.2.16 Saflaştırılan ekstrasellüler RNaz enziminin karakterizasyonu.....	136
3.2.17 Saflaştırılan AEP ve RNaz enzimlerinin kütle spektrometre analizi	138
4. BULGULAR.....	140
4.1 <i>Yarrowia lipolytica</i> Strainlerinin Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Tanılarının Kesinleştirilmesi.....	141
4.1.1 ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve RFLP analizi	141
4.1.2 18S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve RFLP analizi.....	144
4.1.3 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin PCR ile çoğaltılması ve sekans analizi	148
4.2 Tanısı Kesinleştirilen <i>Y. lipolytica</i> Strainlerinin Alkalın Ekstrasellüler Proteaz (AEP) Enzimi Aktivite Taranması, Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	152
4.2.1 AEP enzim aktivite taranması.....	152
4.2.2 AEP enziminin üretimi.....	153
4.2.3 AEP enziminin saflaştırılması.....	154
4.2.4 AEP enziminin moleküler ağırlığının SDS-PAGE ile belirlenmesi .	157
4.2.5 AEP enziminin zimogram tayini.....	158
4.2.6 Saflaştırılmış AEP enziminin karakterizasyonu	159

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2.7 AEP enziminin LC-MS/MS analizi	165
4.3 Tanısı Kesinleştirilen <i>Y. lipolytica</i> Strainlerinin Ekstrasellüler Ribonükleaz (RNaz) Enzimi Aktivite Taranması, Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	168
4.3.1 RNaz enzim aktivite taranması	168
4.3.2 RNaz enziminin üretimi	170
4.3.3 RNaz enziminin saflaştırılması	171
4.3.4 RNaz enziminin moleküler ağırlığının SDS-PAGE ile belirlenmesi	174
4.3.5 Saflaştırılmış RNaz enziminin karakterizasyonu	175
4.3.6 RNaz enziminin LC-MS/MS analizi	180
5. TARTIŞMA	183
KAYNAKLAR DİZİNİ	205
ÖZGEÇMİŞ	241

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Primer hedef bölgeleri içeren fungal ribozomal genlerin şematik gösterimi (Deak, 2007).	28
2.2 Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması (Aehle, 2007; Akpınar, 2008).	62
2.3 Serin tip peptidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonların şematik gösterimi (Beynon and Bond, 2001).	66
2.4 Aspartik tip peptidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonların şematik gösterimi (Beynon and Bond, 2001).	67
2.5 Sistein tip peptidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonların şematik gösterimi (Beynon and Bond, 2001).	68
2.6 Bovin pankreatik ribonükleaz tarafından katalizlenen iki etkin reaksiyon gösterilmiştir (Beintema and Zhao, 2003; Akpınar, 2008).	78
2.7 RNaz T1 için önerilen mekanizma (Irie, 1997).	79
2.8 RNaz T2 ailesine ait ribonükleazlar tarafından katalizlenen iki etkin reaksiyon gösterilmiştir (Luhtala and Parker, 2010).	81
2.9 İyon değiştirme kromatografisinin temel adımlarının şematik gösterimi (Sattayasai, 2012).	85
2.10 Jel geçirgenlik kromatografisini kullanılarak iki farklı proteinin ayrımı (Sattayasai, 2012).	87
2.11 Afinite kromatografisinin temel adımlarının şematik gösterimi (Sattayasai, 2012).	88
2.12 Hidrofobik etkileşim kromatografisinin temel adımlarının şematik gösterimi (Sattayasai, 2012).	89
3.1 Protein standart grafiği.	122
3.2 Tirozin standart grafiği.	124
3.3 pNa standart grafiği	131

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 <i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin ITS-PCR tanı sonuçları.	142
4.2 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin ITS-PCR tanı sonuçları.	142
4.3 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin ITS bölgesinin <i>RsaI</i> RFLP analiz sonuçları.	143
4.4 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin ITS bölgesinin <i>RsaI</i> RFLP analiz sonuçları.	144
4.5 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 18S rDNA-PCR tanı sonuçları.	145
4.6 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 18S rDNA-PCR tanı sonuçları.	145
4.7 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 18S rDNA bölgesinin <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi kesim sonuçları. ...	146
4.8 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 18S rDNA bölgesinin <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi kesim sonuçları. ...	147
4.9 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 18S rDNA bölgesinin <i>RsaI</i> restriksiyon enzimi kesim sonuçları.	147
4.10 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 18S rDNA bölgesinin <i>RsaI</i> restriksiyon enzimi kesim sonuçları.	147
4.11 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 18S rDNA bölgesinin <i>TaqI</i> restriksiyon enzimi kesim sonuçları.	148
4.12 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 18S rDNA bölgesinin <i>TaqI</i> restriksiyon enzimi kesim sonuçları.	148
4.13 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domainin - PCR tanı sonuçları.	149

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14 <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ile <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domainin – PCR tanı sonuçları.....	149
4.15 Tamura-Nei neighbor joining metodu kullanılarak oluşturulmuş 22 <i>Y. lipolytica</i> straini, <i>Y. lipolytica</i> CBS 6124 tip türü ve <i>Candida sake</i> KBP 3997 (out-grup) arasındaki filogenetik uzaklığı gösteren filogenetik ağaç.	151
4.16 AEP enzim aktivitesi taranması sonrası <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5 straini tarafından skim milk agarda 27°C 48 saat inkübasyon sonucunda açılma zonu.	153
4.17 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5 straininden AEP enziminin zamanla üretimi.	154
4.18 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5' den üretilen AEP enziminin DEAE- selüloz kromatografisi.	156
4.19 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5' den üretilen AEP enziminin Sephadex G-75 kromatografisi.	157
4.20 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5' den üretilip saflaştırılan alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin Coomassie boyama ile boyanmış SDS-PAGE jeli üzerindeki görünümü.	158
4.21 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5' den üretilip saflaştırılan alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin gümüş boyama ile boyanmış SDS- PAGE jeli üzerindeki görünümü.	158
4.22 DEAE-selüloz kolonundan elde edilen AEP enziminin SDS-PAGE zimogram analizi.	159
4.23 Saflaştırılmış AEP enziminin optimum sıcaklık profili.	159
4.24 Saflaştırılmış AEP enziminin sıcaklık stabilite profili.	160
4.25 Saflaştırılmış AEP enziminin optimum pH profili.	161

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26 Saflaştırılmış AEP enziminin pH stabilite profili.	161
4.27 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin fragmentleri ile protein veritabanındaki <i>Y. lipolytica</i> AEP enziminin eşleşen bölgeleri.	166
4.28 RNaz enzim aktivitesi taraması sonrası <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 20 ve TEM YL 21 strainleri tarafından RNA agarda 27°C 48 saat inkübasyonu sonucunda açılma zonunun görünümü.....	170
4.29 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21 straininden RNaz enziminin zamanla üretimi.	170
4.30 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin DEAE- selüloz kromatografisi.	172
4.31 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin Sephadex G-75 kromatografisi.	173
4.32 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21' den üretilip saflaştırılan ekstrasellüler ribonükleaz enziminin Coomassie boyama ile boyanmış SDS- PAGE jeli üzerindeki görünümü.	174
4.33 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21' den üretilip saflaştırılan ekstrasellüler ribonükleaz enziminin gümüş boyama ile boyanmış SDS-PAGE jeli üzerindeki görünümü.....	174
4.34 Saflaştırılmış RNaz enziminin optimum sıcaklık profili.	175
4.35 Saflaştırılmış RNaz enziminin sıcaklık stabilite profili.	176
4.36 Saflaştırılmış RNaz enziminin optimum pH profili.	176
4.37 Saflaştırılmış RNaz enziminin pH stabilite profili.....	177
4.38 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin fragmentleri ile protein veritabanındaki <i>Y. lipolytica</i> T2-benzeri ribonükleaz (RNaz) enziminin eşleşen bölgeleri.....	180

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Mayalar üzerinde taksonomik monografında tanımlanan türlerin ve genus sayıları (Deak, 2007; Akpınar, 2008; Kurtzman et al., 2011).	11
2.2 Maya Karakterizasyonunda Kullanılan Geleneksel Kriterler (Deak ve Beuchat, 1996; Akpınar, 2008).....	14
2.3 Maya identifikasyonu için asimilasyon ve fermentasyon testlerinde kullanılan bileşikler (Barnett, 2000; Akpınar, 2008).....	16
2.4 Önemli Bazı Mayaların ITS1 / 5,8S rDNA / ITS2 Bölgesinin Boyutları (Fujita et al., 2001; Akpınar, 2008).....	29
2.5 Proteazların sınıflandırılması.	63
2.6 Temel üç RNaz ailesinin farklılıkları (Luhtala and Parker, 2010).....	81
4.1 Bu çalışmada kullanılan <i>Yarrowia lipolytica</i> strainlerinin daha önceden yapılan çalışma, izolasyon kaynağı ve tanısında kullanılan yöntemler.	140
4.2 <i>Y. lipolytica</i> strainleri ve tip türün ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri.	143
4.3 <i>Y. lipolytica</i> strainleri ve tip türün 18S rDNA bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri.	146
4.4 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekans analizi sonucunda elde edilen tanılama sonuçları.	150
4.5 <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin tarama sonuçları [(toplam zon - koloni çapından farkı)].	152
4.6 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5' den üretilen AEP enziminin DEAE-selüloz kolonu ile saflaştırma profili.	155
4.7 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5' den üretilen AEP enziminin Sephadex G-75 kolonu ile saflaştırma profili.	156

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.8 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin oligopeptidil-p-NA konjuge sentetik substratlarına karşı spesifitesi. ..	162
4.9 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin doğal protein substratlara karşı spesifitesi.	162
4.10 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine aktif bölge inhibitörlerinin etkisi.	163
4.11 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi.....	164
4.12 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine çeşitli yüzey aktif maddelerin ve H ₂ O ₂ ' in etkisi. ...	165
4.13 AIQTTPVTQWGLSR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	166
4.14 KAQTGNYAYVR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	166
4.15 GVLNFSGGGPK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	166
4.16 SASQDALWSR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	167
4.17 AQTGNYAYVR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	167
4.18 GSPNAVAYNGVGI peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	167
4.19 HPTVSYVVD SGIR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	167
4.20 SAALSVINQGFTWALNDYISK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	168

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.21 AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	168
4.22 <i>Y. lipolytica</i> strainlerinin ekstrasellüler RNaz enziminin tarama sonuçları [(toplam zon - koloni çapından farkı)]......	169
4.23 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin DEAE- selüloz kolonu ile saflaştırma profili.	172
4.24 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin Sephadex G-75 kolonu ile saflaştırma profili.	173
4.25 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enzim aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi.	178
4.26 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enzim aktivitesi üzerine çeşitli inhibitörlerinin etkisi.	179
4.27 <i>Y. lipolytica</i> TEM YL 21' den saflaştırılan RNaz'ın farklı polihomoribonükleotidlere ve RNA substratlarına karşı özgünlüğü....	180
4.28 IWIPNR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	180
4.29 FLEAAGITPDSSK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	181
4.30 TDFLNALNSNFDGK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	181
4.31 GSTDSFWTHEWKNK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	181
4.32 DAVAAFTSPPLSSADHK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	181
4.33 SGYISEVWYYFHLK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	182

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)**Çizelge****Sayfa**

4.34 DGSGGTPPPTDPSDPPTGGSK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.	182
--	-----

1. GİRİŞ

Maya ve maya benzeri organizmalar funguslar içerisinde homojen ve çok büyük grup oluşturmaktadır. Bugüne kadar tanımlanmış yaklaşık 1500 tür bulunmaktadır (Verachtert and De Mot, 1990; Barnett et al., 2000; Boekhout et al., 2003; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Mayaların taksonomisi moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesine bağlı olarak sürekli değişmektedir. Maya taksonomisindeki değişimin en büyük nedeni kromozom analizleri ve moleküler biyolojik yöntemlerin uygulanmasıdır. Ayrıca maya ve maya taksonomisine ilginin artması da tür sayısının yükselmesine neden olmuştur (Lieckfeldt et al., 1993; Jakobsen and Norvhus, 1996; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Mayalar ticari amaçlar için kullanılan mikroorganizmaların en önemli grubudur. Bilindiği gibi en iyi fermantatif organizmalar olarak mayaların en yüksek aktiviteleri alkol üretimi olup; alkollü içeceklerin üretiminde ticari olarak kullanılmaktadır. Ayrıca mayalar ekmek yapımı, oriental besinlerin ve turşuların üretiminde, B12, β -karoten gibi vitaminlerin üretiminde, besinlerin tekstürünün ve içeriğinin düzenlenmesini sağlayan fosfomannan gibi endüstriyel polisakkaritlerin üretiminde, gliserol ve polihidroksi alkollerin üretilmesinde, protein açığının kapanması için tek hücre proteini olarak üretimde, lipidlerin üretiminde kullanılmaktadır (Phaff et al., 1966; Deak, 1995; Jakobsen and Norvhus, 1996; Hierro et al., 2004; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Mayalar günümüzde en kıymetli endüstriyel mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir. Kullanım alanları arasında gıda, kimya, ilaç ve zirai alanlar bulunmaktadır. Günümüzde moleküler biyoloji teknikleri ve maya hücreleri kullanılarak elde edilen ticari ürünler arasında endüstriyel enzimleri, interferonları ve çeşitli tıbbi ilaçların hammaddelerini saymak mümkündür. Bunlara ilave olarak potansiyel uygulama alanları da düşünülecek olursa yakın bir gelecekte kullanımının daha da artacağını tahmin etmek zor olmayacaktır (Jakobsen and Norvhus, 1996; Yalçın, 2007). Bunların yanı sıra, ökaryotik hücreler içinde en iyi tanınan ve laboratuvar ortamında manipülasyonu en kolay olan organizma grubuna

girdikleri için en ideal konakçı olma özelliği göstermektedirler. Benzer şekilde, ticari açıdan bakıldığında maya hücreleri bakterilere nazaran daha avantajlı görünmektedir. Zira maya hücrelerinin ürettikleri proteinleri bulundukları ortama salgılama yetenekleri oldukça yüksek olduğundan; ticari açıdan da önemli bir avantaja sahiptirler (Hierro et al., 2004; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Fermentasyon, besinlerin güvenli ve kalitesinin korunmasında birkaç yüzyıldır kullanılan oldukça etkili ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Bu rolünün dışında, fermentasyon, besinsel kalitenin gelişmesinde, aroma ve tat üretiminin zenginleştirilmesinde ve besin substratlarının tekstürünün modifiye edilmesinde oldukça önem arz etmektedir. Bütün bu durumlar mikroorganizmalar tarafından yönetilmektedir. Fermentasyon mikroorganizmaları arasından mayalar, şüphesiz önemli mikroorganizma grubudur. Besinlerin fermentasyon proseslerinde kullanılan mayalar, orijinal materyalleri organoleptik, fiziksel ve besinsel olarak modifiye etmekte ve bu yüzden yüzyıllardır ekmek yapımında ve alkollü meşrubatların üretiminde kullanılmaktadır (Romano et al., 2006). Maya endüstrisi en büyük fermentasyon endüstrilerinden biridir. Bugünkü bilgilerimize göre dünyada yılda ortalama 2 milyon ton ekmek mayası üretilmekte ve yaklaşık 2 milyar dolarlık bir ekonomik değer oluşturmaktadır. Oluşturulan bu ekonomik değerın yaklaşık %15-20 gibi oldukça önemli sayılabilecek bir miktarı ülkemizde gerçekleştirilmektedir (Hierro et al., 2004; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Mayalar mükemmel bir protein kaynağıdır ve kalite olarak soya proteinine eşdeğerdir. Zengin lizin içeriğinden dolayı lizin içeriği fakir tahılları destekleyici rolü vardır. Mayalar hayvan yemlerinde de kullanılmaktadır. Özellikle ABD’ de bu amaçla çalışan fermentasyon tesisleri bulunmaktadır. Bu tesislerde üretilen çeşitli maya türleri (*Torula* gibi), üretildikleri ortamlarla beraber ya da ayrı olarak kurutulmakta ve hayvan yemi olarak satılmaktadır (Hierro et al., 2004; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Mayalar çok eski zamanlardan beri iyi bir B vitamini kaynağı olarak tanınmaktadır. B vitaminleri maya sayesinde keşfedilmiş ve biotin, niasin, pantotenik asit ve timin gibi birçok B vitamini ilk olarak mayadan elde edilmiş ve tanınmıştır. Bu nedenle mayalar B vitamini eksiklikleri ve buna bağlı

bozuklukların giderilmesine de yardımcı olmaktadır. Mayalardan elde edilen diğer önemli bir endüstriyel ürün ise “yeast extract” olarak da bilinen maya özütüdür. Dünya çapında yılda yaklaşık 40.000 ton üretilmektedir. Maya özütü ağırlıklı olarak Mono Sodyum Glutamat (MSG) alternatifi olarak gıdalarda doğal lezzet verici madde olarak kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda MSG’a getirilen yasal sınırlamalardan ve tüketici tarafından tercih edilememesi eğiliminden dolayı yeast extract’a olan talep süratle artmıştır. Bugün hazır çorbadan çikolataya, dondurma yapımına kadar çeşitli gıda maddelerinde maya özütü değişik oranlarda kullanılmaktadır. Mayalardan elde edilen ve ticari değere sahip diğer bir ürün ise invertaz enzimidir. İnvertaz enzimi gıda sanayinde özellikle de şekerleme endüstrisinde ortası yumuşak şeker ve çikolataların yapımında kullanılmaktadır (Verachtert and De Mot, 1990; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Mayalar, mandıra ürünlerinden peynir üretiminde ve ayrıca kefir gibi fermente sütlerin üretiminde de gerekli mikroorganizmalardır. Mayalar, öncelikle ürünlerde tek starter kültür olarak kullanılmaktadır ama birçok ürünün üretimi hala spontan fermentasyon ile gerçekleşmektedir. Mayalar birçok durumda ikincil starter kültürdür ve aroma üretiminin zenginleştirilmesi veya diğer mikroorganizmaların büyümesini kolaylaştırmak için kullanılmaktadır (Romano et al., 2006; Akpınar, 2008).

Mandıra ürünlerinin florasında genellikle laktik asit bakterileri tarafından dominant olduğundan bazı önemli literatürler, peynir, kefir ve kıymız gibi fermente süt üretiminin olgunlaşma safhası sırasında tat ve doku gelişiminde mayaların önemli role sahip olduklarından bahsetmektedirler (Fleet, 1990; Deak 2007). Mandıra ürünlerinin üretiminde dominant olan önemli türler; *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Saccharomyces cerevisiae*’dır ama *Galactomyces geotrichum*, *Candida zeylanoides* ve çeşitli *Pichia* türleri de ayrıca önemli mikroorganizmalardır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Mayalar bu kadar yararlı faaliyetlerinin dışında gıdalarda ve içeceklerde bozulmaya neden olmaktadır. Bundan 30-40 yıl öncesine kadar maya konusundaki yayınlarda, gıda kaynaklı mayaların halk sağlığı için önemli

olmadığı, tüketici için tehlikesinin bulunmadığı, hatta fermente gıdalarda (kefir, kırmızı ve bira gibi) yüksek miktarlarda bulunmasının gerektiği bildirilmiştir (Betts et al., 1999; Loureiro and Querol 1999; Hierro et al., 2004). Fakat 1980'den sonra yapılan araştırmalarda, gıda kaynaklı mayaların halk sağlığı ve güvenliği üzerinde durulmaya başlanmıştır. Daha sonra, bu konu çeşitli literatürlerde desteklenerek mayaların alerjik etkisinin bulunduğu hatta *S. cerevisiae*'nin bağırsak iltihabına sebep olduğu belirlenmiştir. (Fleet, 1990; Jakobsen and Narvhus, 1996; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Son yıllarda gıdalarda bozulmaya sebep olan mayaların gıda teknolojisindeki önemi artmış ve önemli ekonomik kayıplardan sorumlu tutulmuşlardır. Gıdalarda bulunan mayaların gıdalarda bozulmaya sebep olduğundan 20. yüzyılın ilk yarısında sıklıkla bahsedilmeye başlanmıştır. Barnett ve arkadaşları (1983) gıdalarda 30 cinse ait 120'ye yakın maya türünün bulunabildiğini belirtmiştir. Pitt ve Hocking (1985), gıdalarda bozulmaya sebep olan mayalardan önemlilerini; *Dekkera bruxellensis*, *Issatchenkia orientalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides* ve *Candida holmii* şeklinde bildirmişlerdir. Mayaları yakın zamana kadar insan sağlığı için önemli olmadığı kanısı mayalar üzerinde durulmasını engellemiş ve bu sebeple meydana gelen ürün kayıplarından bahsedilmemiştir. Mayaların neden olduğu ekonomik kayıplar çok olmasına rağmen, ticari gizlilikten dolayı maya bozulmalarındaki endüstriyel patlamaların ekonomisi ve sonuçları rapor edilmemiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda ve bildirilen raporlarda mayaların gıdalarda önemli bir bozulma etkeni olduğu belirtilmiştir (Fleet, 1990; Jakobsen and Narvhus, 1996; Tempel and Jakobsen, 1998; Betts et al., 1999; Perez et al., 2001; Deak, 2006; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Yarrowia lipolytica, taşıdığı bazı fizyolojik özelliklere bağlı olarak biyoteknolojik açıdan önemli mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Kurtzman, 2000). *Yarrowia lipolytica* mayası dimorfik, heterotallik, askomisetik bir tür olup yağ asitleri ve alkanların içerildiği alifatik karbon kaynaklarını tek

olarak kullanabilen bir obligat aerobtur. Bu durum oksijen varlığında bile respirasyondan çok etanolik fermantasyonu tercih eden *Saccharomyces cerevisiae*' a zıt bir durumdur (Kerscher et al., 2002; Akpınar, 2008). Ayrıca proteaz ve lipaz aktivitesine sahip olması ve hidrokarbonları kullanabilme yeteneği, bu maya türünün izole edildiği kaynaklar açısından da belirleyici olmaktadır (Kurtzman, 2000; Fickers et al., 2004). *Y. lipolytica* ekstrasellüler lipazları (Pignede et al., 2000), alkalın proteaz (Ogrydziak, 1993) ve RNaz' ları salgılama yeteneğine sahiptir (Cheng and Ogrydziak, 1986). Son yıllarda bu enzimler ticari önemi artmış olup birçok alanda kullanılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999). *Y. lipolytica* proteolitik ve lipolitik aktivitelerinden dolayı süt ve süt ürünlerinin bozunmasından sorumlu gösterilen en önemli maya türlerinden biridir. Peynir ve diğer süt ürünlerinin işlenmesi gibi geleneksel gıda teknolojisinde belli rolünden ayrı olarak bu maya, hayvan besinleri için tek-hücre protein üretiminde ve rekombinant proteinlerin salgılanmasında konukçu organizma olarak da kullanılmaktadır. *Y. lipolytica* sürekli olarak birçok heterolog proteini çok iyi salgılandığından dolayı, diğer maya türleri ile rekabet edecek durumdadır (Ogrydziak, 1993). Tüm bunların yanı sıra *Y. lipolytica*, farklı karbon kaynaklarından (glukoz, etil alkol, gliserin, asetat, hidrokarbonlar veya farklı hidrofobik substratlar vb.) yüksek miktarlarda sitrik asit, izositrik asit, α -ketoglutarik asit (α -KGA) ve piruvik asit gibi biyoteknolojik açıdan önemli karboksilik asitleri üretebildikleri (Fickers et al., 2004; Morgunov et al., 2006) ve endüstriyel anlamda sitrik asit üretim proseslerinde kullanıldıkları bilinmektedir (Barth and Gaillardin, 1997; Kurtzman, 2000).

Enzimler çok sayıda kimyasal reaksiyonu yöneten biyokatalizörler olarak bilinmektedir ve deterjan, gıda, ilaç sanayi, diagnostik ve kimya endüstrisinde ticari olarak kullanılmaktadır. Tanımlanmış 3000'den fazla enzim, mezofilik organizmalardan izole edilmiştir (Kumar and Takagi, 1999). Bu enzimler, genel olarak, dar bir pH, sıcaklık ve iyonik etkide fonksiyon göstermektedir. Dolayısıyla, yeni mikrobiyal kaynaklar için araştırmalar sürekli, fakat en önemlisi de biyo-çeşitliliği oluşturmaktadır (Kumar and Takagi, 1999).

Enzimlerin uygulama alanlarının her geçen gün artması enzimlerin daha ekonomik, daha etkin tekniklerle üretilmesini daha da önemli kılmıştır. Potansiyel

enzim kaynakları olarak da mikroorganizmalar çok caziptir. Bu çekiciliğin sebebi, çevresel etkiler ve genetik manipölasyonlarla enzim miktarlarının arttırılabilmesidir. Kuşkusuz yüksek enzim aktivitesi enzim izolasyonunu da kolaylaştıracaktır (Telefoncu, 1997). Endüstriyel uygulama alanı bulmuş enzimlerin çoğu hidrolaz sınıfındadır ve büyük ölçüde mikrobiyal kaynaklıdır (Telefoncu, 1997). Hidrolazlar enzimlerin farklı ve büyük bir grubunu oluşturur ve 1500' den fazla hidrolaz karakterize edilmiştir. Hidrolazlar basit bir substratdaki spesifik bir bağın kırılmasından çeşitli makromoleküllerdeki birçok bağ arasında değişen geniş bir substrat molekül grubunu hidrolizlemektedirler (Telefoncu, 1997).

Proteazlar, peptid bağlarının yıkımını katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler içerisinde alkanin proteazlar, subtilizin ailesi (EC 3.4.21.14) içinde sınıflandırılmaktadır. Çeşitli fiziksel yöntemlerle *Y. lipolytica* alkanin estrasellüler proteazının (AEP) moleküler ağırlığı 28–31 kDa arasında olduğu bilinmektedir (Davidow et al., 1987). *Y. lipolytica* mayasını olgun AEP' ı tahmin edilen protein sekansı subtilisin ailesindeki diğer serin proteazlarla homoloji göstermektedir: *Bacillus subtilis* DY subtilisin ile %32, *Thermoactinomyces vulgaris* thermitase ile %32, ökaryotik *Tritirachium album* proteinaz K'ı ile %42,6 homoloji göstermektedir (Davidow et al., 1987). Alkanin proteazlar, deterjan, dericilik, gıda endüstrisi, gümüşün geri kazanımı, medikal amaç, gıda işleme ve atık geri kazanımı gibi kimya endüstrisinde potensiyeli olan stabil enzimdir (Kumar and Takagi, 1999).

Y. lipolytica' nın salgıladığı diğer önemli bir enzim de ribonükleazdır. Nükleazlar, insanların içinde bulunduğu bütün organizmalarda nükleik asitlerin (DNA, RNA) hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Ribonükleazlar (RNaz) nükleotid residülleri arasındaki fosforik diester bağlarını parçalamasıyla ribonükleik asidi (RNA) depolimerize ederler (Beintema and Zhao, 2003). Ribonükleazlar (RNaz), moleküler biyoloji, gıda ve farmasötik endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanımından dolayı ticari öneme sahiptirler. Önemli bir analitik aracı olarak RNA'nın yapısı ve fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalarda önemli bir görev üstlenirler. Tek hücre protein üretiminde, biyokütle içerisindeki RNA' ların uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. RNaz' lar, ayrıca klinik

kullanımlar veya gıda endüstrisi için nükleotidlerin ticari olarak üretimde kullanılmaktadır. Bazı RNaz' lar t ropatik ajan potansiyellerinden dolayı kullanılmaktadır. Son zamanlarda, bir seri bilimsel çalışmada; tümör oluşumunun kontrolünde, tümör hücrelerinin etkisiz hale getirilmesinde ve HIV-1 virüs replikasyonunun inhibisyonunda RNaz'ların önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (Xiong et al., 2003). Ticari olarak endüstride kullanılan RNase A, sığır pankreasından izole edilmiştir ve birçok araştırmada RNA'yı uzaklaştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Skvortsova et al., 2002).

Yukarıda belirtildiği gibi, farklı endüstrilerde önemli yeri olan mayaların doğru identifikasyonu olmazsa olmaz bir olgu haline gelmiştir. Özellikle son yıllarda moleküler biyolojinin hızlı gelişmesiyle mikroorganizmaların identifikasyonu için yeni teknikler ortaya çıkmıştır. Bu teknikler elektroforetik karyotiplendirme, mitokondrial DNA restriksiyon analizi, ribozomal DNA restriksiyon analizleri, DNA fingerprint, RAPD analizleri ve 5,8S rRNA genlerini (rDNA) ifade eden ITS dizilerinin restriksiyon analizleridir (Rohm and Lechner, 1990; Van der Vassen et al., 1996 ; Baleiras-Couto et al., 1996b; Deak et al., 2000; Perez et al., 2001; Yalçın, 2007). Mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan moleküler teknikler morfolojik ve fizyolojik karakteristiklere dayanan konvansiyonel tekniklere göre daha duyarlı ve spesifik olduğundan mayaların tanısı kısa sürede güvenilir bir şekilde gerçekleştirilecektir. Gelişen teknolojiye bağlı olarak endüstriyel öneme sahip olduğu bilinen proteolitik ve ribon kleolitik mikroorganizmalara ilave olarak potansiyel alkalın proteaz ve ribonükleaz üreticisi yeni mikrobiyal kaynaklara ihtiyaç giderek artmaktadır. Belirtilen nedenlerle bu kaynakların taranması da oldukça önem kazanmıştır (Kumar and Takagi, 1999).

Yukarıda bahsedilen önemlerinden dolayı, bu çalışmada, daha önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilmiş ve hem konvansiyonel hem de ITS-PCR ile tanısı yapılmış *Y. lipolytica* strainlerinin ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesi ile 18S rDNA bölgesinin PCR-RFLP analizi ve 26S rDNA' nın D1/D2 domainleri sekans analizi ile identifikasyonunun kesinleştilmesi, endüstriyel açıdan önemli olan ekstrasellüler alkalın proteaz ve ekstrasellüler ribonükleaz enzimlerinin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Maya Taksonomisi

Fermentasyondan sorumlu olan bu organizmalar, 19. yüzyılın başına kadar yaşayan canlılar olarak fark edilememiştir (Acheampong, 2000; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Saccharomyces cerevisia'nın ilk bilimsel tanımlanmasından beri, maya taksonomisindeki gelişmeler, isimlendirmede tartışmalara neden olmuş ve sürekli değişmiştir (Barnett, 2004; Akpınar, 2008).

1836 ve 1838 yılları arasında, Charles Cagniard-Latour, Friedrich Kützing ve Theodor Schwann mayaların yaşayan organizma gruplarından bir tanesi olduğunu göstermişler ve Schwann bu grup organizmaların funguslar içinde yer aldığını belirtmiştir. 1838'de Julius Meyen, *S. cerevisiae*, *S. pomorum* ve *S. vini*'yi içeren *Saccharomyces* genusunu bulmuştur (Barnett, 2004; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

Emil Christian Hansen 1880'li yılların başında saf maya kültürlerinin elde edilmesini sağlayan teknikler geliştirmiş ve bu sayede maya taksonomisinde pratiklik artmıştır. Aynı araştırmacı 19. yüzyılın sonlarına doğru 200 tür hakkında yayın yapmış ve tanılamasını yaptığı 90 tür halen günümüzde bilinmektedir. 1893 ve 1911 yılları arasında askospor oluşturan birçok yeni maya genusu tanımlanmıştır. 1893'de Paul Lindner, tomurcuklanma ile değil de fizyon ile çoğalan *Schizosaccharomyces pombe*'yi tanıladığını rapor etmiştir (Barnett, 2004; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

1904'de Hansen, *Saccharomycetes*'lerin sistematigi ile ilgili bir yayın yapmış ve bu yayın mayaların sınıflandırılmasında önemli bir basamak oluşturmuştur (Barnett, 2004; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

1928'de Guilliermond, 22 genusu kapsayan ve mayaların identifikasyonu için ayırıcı bir anahtar oluşturmuştur. Araştırmacı identifikasyon için, vejetatif

hücrelerin görünümü, askosporların varlığı veya yokluğu, eğer varsa sayısı ve şekli ve ayrıca mayaların bazı şekerleri fermente etme kapasitelerini dikkate almıştır (Barnett, 2004; Akpınar, 2008).

1931'de, Stelling-Dekker tarafından ilk sınıflandırma çalışması yapılmış ve yayınlanmıştır (Barnett, 2004; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

1942'de, Diddens'in yardımı ile Lodder doktora tezinde bazı anaskosporogenik mayaların sistematigi üzerine çalışmalar yapmış ve çalışmasında kullandığı mayaların çoğunun şekerleri fermente edememesinden dolayı okzonografik metodu kullanarak mayaların karbon kaynaklarını aerobik olarak asimile etme kapasitelerini de test etmiştir (Barnett, 2004; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

1951'de Lynferd Wickerham, mayaların ekoloji ve taksonomisini yetersiz bularak bu kategorilerle ilgili çalışmalar yapmış ve asimilasyon ve/veya fermentasyon için test edilen karbon kaynaklarının sayısını 30'a çıkarmıştır (Barnett, 2004; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

1952'de, Lodder ve Kreger-van Rij en gelişmiş maya sınıflandırmasını bir kitap altında toplamışlardır (The Yeasts: Taxonomic Study). Bu sınıflandırmayı yaparken de önceki çalışmalarda kullanılan benzer teknikleri kullanmışlardır ve 180 türü 3 familya altında toplamışlardır; askosporogenik olan Endomycetaceae, asporogenik (fungi imperfecti) olan Cryptococcaceae ve basidiomisetik yada fungi imperfecti olan Sporobolomycetaceae (Barnett, 2003; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

1970'de Lodder, The Yeasts: a Taxonomic Study'nin ikinci baskısını yayınlamıştır. Bu baskı için 4300 strain çalışılmış ve bu strainler 39 genus ve 349 tür altında sınıflandırılmıştır. Lodder, Wickerham ve belki birkaç araştırmacıdan daha etkilenecek karbon kaynaklarının asimilasyon testlerini 30 ila 40 şeker çıkarmış ve 5 ila 13 arasında da şeker fermentasyonu testi kullanmıştır. Bu kitapta toplanan genuslar, Ascomycetes, Ustilaginales, Sporobolomycetaceae ve diğer

anaskosporogenik mayalar şeklinde 4 grup altında sınıflandırılmıştır (Barnett, 2004; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

1979 yılında Alexopoulos ve Mims, mayaları askomisetik, basidiomisetik ve deuteromisetik mayalar adı altında üç grupta incelemiştir. Askomisetik mayaları, Ascomycetes sınıfı, Hemiascomycetidae alt sınıfı, Endomycetales ordosu ve Saccharomycetaceae familyası altında, basidiomisetik mayaları ise Ustilaginales ordosu ve Ustilaginaceae familyası altında incelemiştir (Alexopoulos et al., 1996; Çorbacı, 2008; Akpınar, 2008).

1984 yılında Kreger-van Rij, 1998 yılında Kurtzman, Fell ve diğer 36 araştırmacı tarafından *The Yeasts: Taxonomic Study* kitabının üçüncü ve dördüncü baskısı yapılmış ama birkaç küçük ayrıntı dışında ilk iki baskı temel alınmıştır (Barnett, 2004; Akpınar, 2008).

Alexopoulos et al. (1996), moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesine bağlı olarak yaptıkları sistemattikte bazı değişiklikler yapmışlardır. Askomisetik mayalar tekrar Saccharomycetales ordosu ve Saccharomycetaceae familyası altında incelenmekle beraber, bazı genuslar aynı ordo altında farklı familyalara sokulmuştur. Daha önce yapılan sistemattikte Saccharomycetales ordosunda yer almayan bazı mayalar bu ordo içerisine alınmıştır (Akpınar, 2008).

Barnett et al. (2000), Askomisetik mayaları, Archiascomycetes, Saccharomycetes ve Hemiascomycetes sınıfları altında toplarken Basidiomisetik mayaları Hymenomycetes, Urediniomycetes ve Ustilaginomycetes sınıfları altında toplamıştır.

Çizelge 2.1 Mayalar üzerinde taksonomik monografında tanımlanan türlerin ve genus sayıları (Deak, 2007; Akpınar, 2008; Kurtzman et al., 2011).

Referans	Takson Türler	Genus
Lodder ve Kreger-van Rij (1952)	164	26
Lodder (1970)	349	39
Barnett ve ark., (1983)	469	63
Kreger-van Rij (1984)	500	60
Barnett ve ark., (1990)	597	83
Kurtzman ve Fell (1998)	692	96
Barnett ve ark., (2000)	678	93
Kurtzman ve ark., (2011)	~1500	~141

2.2 Mayaların Mikrobiyal Ekolojisi

Sıcaklık, su aktivitesi, pH, mevcut O₂, besin maddelerinin bulunması, inhibitörlerin varlığı gibi birçok çevresel faktör mayaların büyümesini etkilemektedir. Mayaların optimum büyüme sıcaklığı 24–48°C arasında olduğundan dolayı büyük çoğunluğu (%98) mezofil olarak dikkate alınmaktadır. Çevresel faktörler mayaların büyüme sıcaklığını etkilemektedir. Solüte konsantrasyonunda bir artış veya su aktivitesinde bir düşüş organizmanın optimum büyüme sıcaklığında 2–6 °C kadar artışa neden olmaktadır (Deak, 2006; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Mikroorganizmanın metabolik aktivitesi için suyun bulunması (A_w) gıdalardaki mikroorganizmaların büyümesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Su aktivitesi çözelti konsantrasyonuna göre değişmektedir. Tuz ve şeker toleransı ile sükroz ve glukoz toleransı arasında farklılıklar vardır. Mayaların büyük çoğunluğu aynı su aktivitesinde tuza göre şekerin daha yüksek konsantrasyonlarına tolerans gösterebilmektedir. Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların büyük çoğunluğu minumum 0,90-0,95 arasındaki su aktivitesinde büyüebilmektedirler. Az sayıda osmotolerant maya genuslarına dahil türler oldukça düşük bir su aktivitesinde büyüebilmektedir. Örneğin,

Zygsaccharomyces rouxii 0,62 gibi düşük su aktivitesine sahip yüksek şekerli gıdalarda büyüeyebilen osmotolerant bir mayadır (Deak, 2006; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Gıdaların mikrobiyal ekolojisinde önemli bir diğer faktör pH'dır. Mayaların çoğu 3-10 arasındaki pH değerlerini tolere edebilir ve optimum pH aralıkları 4,5'dan 6,5'a kadar değişebilmektedir. pH'a tolerans asitin türüne bağlıdır. Genellikle organik asitler inorganik asitlerden daha inhibitör etkiye sahiptir. Propiyonik asit sitrik ya da laktik asite kıyaslandığında, propiyonik asit asetik asitten bile daha fazla inhibitör etkiye sahiptir. Örneğin *Pichia membranafaciens*'in büyüeyebildiği minimum pH değeri asetik asit kullanıldığında 3; tartarik asit ve sitrik asit kullanıldığında 2,2 ve HCl için 1,9'dur (Deak, 2006; Akpınar, 2008).

Mayanın canlılığını sürdürebilmesi ve büyüeyebilmesi için hücrenin plazma membranına karşı bir proton gradienti oluşturarak intraselüler pH'ı 6,5 civarında tutması gerekmektedir. Asit tolerant türler düşük pH'lı çevrelerde protonları hücre dışına aktif olarak pompalayan aktif transport sistemine sahiptir. Etanol konsantrasyonu membran geçirgenliğini etkiler ve bu nedenle maya hücrelerinin hücre içi pH'larını da etkilemektedir. *Saccharomyces* türleri etanole karşı birçok mayadan daha rezistanstır (Deak, 2006; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

2.3 Mayaların Tanılanmasında Kullanılan Yöntemler

Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların önemi her geçen gün artmaktadır (Beuchat, 1987; Deak, 1991; Fleet, 1992; Boekhout et al., 2003). Maya izolatlarının doğru identifikasyonu için bir gıda ürünü ile ilişkili mayaların birkaç analizi önemlidir. Teknolojinin izin verdiği, türlerin identifikasyonu, gıda sistemindeki bozulmaya neden olan mayaların fizyolojik özellikleri ile ekolojik katkısının değerine bağlıdır. Gıdalarda bulunan mayaların identifikasyonu, proses teknolojisinin geliştirilmesi ve ürün kalitesinin değerlendirilmesi için ses getiren bir ekolojik temele dayanmaktadır. Bu yüzden, gıda laboratuvarları maya izolatlarını hızlı bir şekilde identifiye etme kapasitesindedir. Bunun sonucu

olarak, proses kontrolü ile kalite güvenliğinin rutin kısmını doğru şekilde sağlamaktadır (Deak, 1995; Akpınar, 2008).

Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterlere (fenotipik karakterlerin araştırılması) dayanan geleneksel yöntemler mayaları identifiye etmekte kullanılmaktadır ve çalışılması uzmanlık istemektedir. Bu yöntemler kompleks, pahalı ve zaman alıcıdır. Mayaların identifikasyonunu kolaylaştırmak için çeşitli yaklaşımlar denenmiştir. Minyatürize ve basitleştirilmiş bu yöntemler ticari olarak elde edilen manuel kitler, otomatik sistemler ve geleneksel olmayan tekniklerden oluşmaktadır. Moleküler yöntemlere giriş identifikasyon yöntemlerini radikal olarak değiştirmiştir ve türlerin tanılanması için ses getiren temel sağlamıştır (Fernandez et al., 1999; Akpınar, 2008).

2.3.1 Konvansiyonel yöntemlerle mayaların tanılanması

50 yılı aşkın süredir mayalar; morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve üreme karakteristikleri göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. Bu özelliklerine bağlı olarak mikroskopik, kültürel ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir (Montrocher et al., 1998; Loureiro and Querol, 1999; Hierro et al., 2004; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Askomisetik, Basidiomisetik ve imperfect mayaların morfolojik özellikleri, tanımanın ilk basamağında mikroskopik testlerle belirlenir. Hücre şekli, gerçek ve/veya pseudohif oluşturup oluşturumaması, eşeysiz çoğalmanın tomurcuklanma mı yoksa fisyonla mı gerçekleştiği, DBB testi, sporların yapısı, yüzey özellikleri, sayısı ve şekli mikroskopik karakteristikler arasında incelenmektedir (Cosentino et al., 2001; Vaughan-Martini, 2003; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Deak ve Beuchat (1996) tarafından mayaların karakterizasyonunda kullanılan geleneksel kriterler Çizelge 2.2' de özetlenmiştir. Sporların varlığı ve yokluğu ile şekilleri, konjugasyon tipi ve tomurcuklanma, boyut ve hücrenin şekli, hif ve/veya pseudohifin oluşumu, besiyerindeki koloni morfolojisi, karbon kaynaklarının fermentasyonu, karbon ve azot kaynakları üzerinde büyüyebilme, vitamin gereksinimlerinin belirlenmesi, çeşitli sıcaklıklar ile yüksek şeker ve tuz konsantrasyonlarında büyüyebilme, üre hidrolizi ve antibiyotiklere dirençlilik,

bugün kullanılan tipik identifikasyon prosedürlerindeki en genel testlerdendir (Loureiro and Querol, 1999; Acheampong, 2000; Barnett et al., 1983, 2000; Cosentino et al., 2001; Kurtzman and Robnett, 2003; Akpınar, 2008).

Çizelge 2.2 Maya Karakterizasyonunda Kullanılan Geleneksel Kriterler (Deak and Beuchat, 1996; Akpınar, 2008)

Morfolojik Testler	Fizyolojik Testler	Biyokimyasal Testler
Eşeyli üreme Konjugasyon tipi Sporangiosporların şekli Basidiosporların oluşumu	Şekerlerin Fermentasyonu	DBB Reaksiyonu
Eşesiz üreme Tomurcuklanma Fisyon Arthroconidia Ballistoconidia	Karbon kaynaklarının Asimilasyonu	Üreaz reaksiyonu
Mikroskobik büyüme Hücrelerin şekli ve boyu Gerçek hif veya pseudohif Klamidosporlar	Azot kaynaklarının Asimilasyonu	Coenzim Q tipi
Mikroskobik büyüme Besiyerindeki koloniler Sıvı kültürler	Vitamin gereksinimleri Nişasta oluşumu	DNA baz kompozisyonu
	Büyüme sıcaklığı Asetik asit üretimi Sikloheksimide dirençlilik	DNA dizi Homolojisi

Genel olarak tanılamada pek önemi olmayan kültürel testler içerisindeki en değerli parametreler, kolonilerin ürettiği pigmentler (sarı, kırmızı, pembe, turuncu, kahverengi gibi) ile koloninin tekstürüdür (düz, mukoid, gibi) (Deak and Beuchat, 1996; Akpınar, 2008).

Geleneksel tanılamada kullanılan tekniklerin son grubunu biyokimyasal testler oluşturmaktadır. Mikroskopik karakterizasyonu takiben yapılan bu testler, taksonomistler tarafından mikroskopik gözlemlerle birlikte kullanılmaktadır (Verachtert and De Mot, 1990). Kurtzman ve arkadaşları bu grup içerisindeki en önemli testlerin, şekerlerin fermentasyonu ile karbon ve azot kaynaklarının asimilasyonu olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılara göre Çizelge 2.3' de gösterilen bileşiklerden, D-Glukoz, Galaktoz, Maltoz, Me- α -D-Glukozid, Sellobiyoz, Melibioz, Sükroz, Melezitoz, Rafinoz ve D-Ksiloz, hem asimilasyon hem de fermentasyon testlerinde kullanılan karbon kaynaklarıdır (Kurtzman, 1990; Verachtert and De Mot, 1990; Wolf, 1996; Barnett et al., 1983, 2000; Boekhout et al., 2003; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008).

Fenotipik olarak tür seviyesinde güvenilir bir maya tanısı yapabilmek için genellikle 60 ila 100 testin yapılması gerekli olup, nihai sonucun elde edilmesi en azından 3-4 hafta sürmektedir. Bu tanılama şeması rutin bir şekilde gıda endüstrisinde kullanılamadığı için mayaların bazı testlere vermiş oldukları yanıtlara dayanan çeşitli basitleştirilmiş tanılama yöntemleri geliştirilmiştir. Fakat bunlarda maya tanılanmasındaki klasik yöntemlerle aynı yaklaşım üzerine kurulu olduğundan, bilgisayarlarla otomatize edilmiş olsa dahi zaman kaybına sebep olup sıklıkla yanlış ya da belirsiz tanılamaya neden olmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için daha hızlı alternatif tanılama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler maya hücrelerinin toplam proteinlerinin veya uzun zincirli yağ asitlerinin analizi yahut izoenzim profilini temel almaktadır. Ayrıca moleküler biyolojideki son yaklaşımlar maya tanılaması ve karakterizasyonunda yeni tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır (Loureiro and Querol, 1999; Senses-Ergul et al., 2006; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008; Akpınar et al., 2011).

Çizelge 2.3 Maya identifikasyonu için asimilasyon ve fermentasyon testlerinde kullanılan bileşikler (Barnett, 2000; Akpınar, 2008).

Bileşik Grubu	Bileşik Adı
Heksozlar	D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz, L-sorboz
Pentozlar	D-ksiloz, D-riboz, L-arabinoz, D-arabinoz
Disakkaritler	sükroz, maltoz, sellobiyoz, trehaloz, laktoz, melibiyoz
Trisakkaritler	rafinoz, melezitoz
Polisakkaritler	Çözünür nişasta, inulin
Glukozidler	α -Me-D-glukozid, arbutin, salisin
Organik asitler	Süksinat, sitrat, DL-lactat, D-glukonat, D-glukuronat, D-galakturonat, 2-keto-D-glukonat, 5-keto-D-glukonat
Alkoller	eritritol, ribitol(adonitol), D-mannitol, myo-Inositol, metanol, etanol, gliserol, propan 1,2diol, butan 2,3 diol, galaktitol(dulcitol), D-glusitol(sorbitol), ksilitol
Diğer bileşikler	Glukano- δ -lakton, D-glukozamin-HCl, N-asetil D-glukozamin, dekan, hegzadekan

2.3.2 Moleküler biyolojik yöntemlerle mayaların tanılanması

Moleküler biyolojideki son gelişmeler, mayaların taraması, identifikasyonu ve mikroorganizmalarının tiplendirilmesi için yeni tekniklerin gelişmesine yol açmıştır. Fenotipik özelliklerle kıyaslandığında, nükleik asit sekansında gözlenen genotip, büyüme esnasında çevresel etkilerle değişmediğinden dolayı daha stabildir. Bununla birlikte, DNA molekülleri, çok yakın türler ve hatta aynı türe ait strainler arasında sekans rekombinasyonlarıyla ve mutasyonlarıyla farklılaşabilmektedir. Güvenilir şekilde, DNA ve RNA sekansındaki farklılıkların temeli ile karakterize edilebilirler. Ayrıca, evolusyon süreci esnasında, genetik materyaldeki değişiklikler farklı bir taksonomik seviyede organizmaların

ayırımına izin vermekte ve bu organizmaların filogenetik ilişkilerini kavramamızı sağlamaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Geçen yıllar esnasında, moleküler teknikler araştırmaların en önemli kısmını oluşturmaktadır ve mikrobiyolojinin bütün alanlarında ve özellikle gıda mikrobiyolojisinde çok önemli yararlar sağlamaktadır. Bu nedenle organizmaların karakterizasyonu, identifikasyonu ve sınıflandırmasında moleküler tekniklerin kullanımı gittikçe yaygınlaştırılmaktadır. Daha önceleri bu metodlar izoenzim profillemeye, nükleik asit tiplendirme analizleri, maya hücrelerinin uzun zincirli yağ asidi veya toplam protein analizleri üzerine dayanmaktaydı. Bu yöntemlerin çoğu tanımlama ile ilişkili olarak taksonominin bir kısmını saptamak için kullanılmaktaydı ve endüstride uygulanabilmesi ayrıntılı bir şekilde geliştirilememiştir. Ayrıca bu yöntemler gıda ile ilişkili olan mayaları ayırt etmede yeterli derecede etkili olamamıştır. Son yıllarda proteine dayalı moleküler karakterizasyonların yanında moleküler biyolojideki son ilerlemeler maya tanımlanması ve karakterizasyonunda yeni tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır. Bu teknikler elektroforetik karyotiplendirme, mitokondriyal DNA restriksiyon analizi, ribozomal DNA restriksiyon analizi, DNA fingerprint, RAPD analizleri ve 5,8S rRNA genlerini (rDNA) ifade eden ITS dizilerinin restriksiyon analizleridir (Van der Vassen et al., 1996 ; Deak et al., 2000 ; Hierro et al., 2004; Yalçın; 2007; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Nükleik asit seviyesinde farklılıkların taranması için teknikler dört ana sınıfa ayrılmıştır: (1) jel elektroforezinin kullanıldığı direkt tarama, (2) hibridizasyona dayalı tarama, (3) amplifikasyon ile tarama ve (4) sekanslamadır. Son yıllarda moleküler teknikler hem genus hem de alt tür identifikasyonunda kullanılmaktadır.

2.3.2.1 Direkt elektroforetik yöntemler

Nükleik asitler ve özellikle de DNA, identifikasyon ve tiplendirme veya taksonomik çalışmalar için organizmalardan ekstrakte edilmek zorundadır. Bir hücre kültüründen DNA' nın izolasyonu ve saflaştırılması için birçok yöntem geliştirilmiştir (Holm et al., 1986; Mann and Jeffery, 1989; Querol and Barrio,

1990; Kurtzman et al., 2003; Deak, 2007). Özel yöntemler ile DNA direkt olarak doğal örneklerden veya gıda ürünlerinden ekstrakte edilebilir (Dickinson et al., 1995; Ros-Chumillas et al., 2005; Akpınar, 2008).

Nükleer DNA temelli kompozisyonun saptanması (% G+C gibi) moleküler taksonomide kullanılan ilk yöntemdir (Nakase and Komagata, 1968; Price et al., 1978). Araştırmacılar % 1–2 mollük fark gösteren maya türlerini farklı tür olarak düşünmüşlerdir. DNA kompozisyonunun taksonomik önemi, hibridizasyon ve sekanslama yöntemleri ile gölgede kalmıştır. Diğer iki direkt yöntem DNA fraagmentlerinin elektroforetik ayırımına dayanmaktadır ve genel olarak kromozom boyutlu DNA molekülleri identifikasyon ve tiplendirmede kullanılmaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2007).

Restriksiyon endonükleaz analizleri

Restriksiyon endonükleaz analizleri (REA) geliştirilen ilk DNA temelli yöntemdir. Bu basit yöntemde DNA restriksiyon endonükleazlarla kesiliyor ve oluşan fragmentler jel elektroforezi ile ayrılmaktadır. Etidyum bromid bantları boyayarak UV ışık altında bantların görünmesini sağlamaktadır. Genelde, bütün genomun restriksiyon analizi çok kompleks modellerle sonuçlanmaktadır ve evrimsel gösterimi zordur. Restriksiyon fragment uzunluklu polimorfizm (RFLP), jel membran filtreleri üzerine (Southern blotting) DNA fragmentinin transferi ile işaretli DNA probları ile hibridize edildikten sonra daha iyi gözlenmektedir. Günümüzde, genomik DNA' nın REA'sı prob hibridizasyonu olmaksızın nadiren kullanılmaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Mayalarda, rDNA sekanslarının çoklu kopyaları kadar olmasa da mitokondiryal genom (mtDNA) sekansı RFLP modellerinde çok sıklıkla kullanılmaktadır. mtDNA polimorfizmi özellikle şarap mayalarında maya türlerini karakterize etmek için kullanılmaktadır (Querol and Ramon, 1996; Fernandez-Espinar et al., 2001; Lopez et al., 2001; Martorell et al., 2005a; Deak, 2007). mtDNA-RFLP, hem strainlerin tiplendirmesi hem de tür identifikasyonu gibi hızlı parmak izi yöntem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, *Metschnikowia* genusu (Gimenez-Jurado et al., 1995), *Zygosaccharomyces* genusu (Guillamon et al.,

1997) ve *Saccharomyces sensu stricto* (Nguyen et al., 2000)' da taksonomik çalışmalarda kullanılmaktadır. mtDNA–RFLP' nin spesifitesi DNA problemleri kullanılarak artmaktadır (Querol et al., 1992). Mitokondriyal genomun bazı bölgeleri ori-rep-tra sekansı (Piskur et al., 1995) gibi DNA markırlarının gelişimi için veya *cox1* geni (Lopez et al., 2003) için uygundur (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Pulsed – field jel elektroforezi

Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) nükleik asitleri analiz etmek için diğer bir direkt yöntemdir. PFGE, sürekli elektriksel alanın değişimi kullanılarak büyük DNA moleküllerinin (kromozom boyutunda) dağılımını mümkün kılmaktadır. Bu elektriksel alanın değişimi DNA molekülünün boyutuna bağlı olarak jel üzerinde göçü farklı olmaktadır. Yöntem, mayalar ve diğer ökaryotik organizmaların kromozom boyutlarının ve sayısını (karyotipleme) çalışmak için geliştirilmiştir ve etkili bir taksonomik araç olmaktadır (Boekhout et al., 1993; Vaughan-Martini et al., 2003; Deak, 2007). Karyotip analizleri birçok maya türünde kromozom polimorfizmlerinin yüksek seviyesi görülmektedir ve tür içi değişiklikleri fazla olduğu görülmektedir (Naumov et al., 1995; Tornai-Lehoczki and Dlauchy, 1996; Belloch et al., 1998; Gente et al., 2002; Deak, 2007). Yöntemin çözünürlüğü nadir-kesen endonükleazlı kromozomal DNA' nın kesilmesi ve keza spesifik problemlerin uygulanması ile artmaktadır (Török et al., 1991; Jespersen et al., 2000; Deak, 2007). Bu bira ve şarap strainlerini farklılaştırmak için kullanışlı bir yöntem olduğu ispatlanmıştır (Guillamón et al., 1996; Yamagishi and Ogata, 1999; Tornai-Lehoczki and Dlauchy, 2000; Deak, 2007). PFGE gıda ve içeceklerle ilişkili çeşitli maya türlerinin karakterizasyonu için uygulanabilmektedir (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

2.3.2.2 DNA hibridizasyon yöntemleri

Isısal denatürasyon DNA'nın iki ipliğini birbirinden ayırır ve komplementer iplikler soğutulduğu zaman tekrar birbiriyle birleşmektedir. Keza, DNA moleküllerinin karışımı işleme alındığı zaman, iki tek iplik komplementerliği yeterli ise hibrid çift iplikli DNA oluşmaktadır. Dolayısıyla, nükleik asit

hibridizasyonu tahmin edilen farklı organizmaların genetik ilişkilendirmesine izin vermektedir. Nüklear DNA ilişkisinin (DNA–DNA homolojisi) ölçülmesi maya strainleri arasındaki spesifik ilişkinin saptanmasının temelini oluşturmaktadır (Kurtzman and Phaff, 1987; Kurtzman and Robnett, 2003; Deak, 2007). En az %80 DNA ilişkisi gösteren strainler aynı türe ait olduğu düşünülmekteydi (Martini and Phaff, 1973). Pek çok deneysel şart dubleks oluşumunu etkilemesine rağmen, birçok istisna eşeyssel uyumluluğun çok düşük (% 20-50) DNA homolojisinde bile gerçekleştiği gösterilmiştir. Hibridizasyon tekniği taksonominin temelini teşkil etmektedir (Kurtzman, 2006; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Kurtzman (1990) heterotallik mayaların DNA karşılaştırmalarının fertilitite ile kuvvetli bir korelasyon gösterdiğini söylemiştir. Bu çalışmaların ilki *Pichia amylophila* ve *Pichia mississippiensis* türleri iyi bir şekilde eşleşmişler ama askospor oluşturmamışlardır. Bu iki tür sadece %25 DNA homolojisine sahiptir. Dolayısıyla eşeyli üremenin eksik olduğunu bulmuşlardır. DNA ilişkileri ve fertilitite arasında kuvvetli bir korelasyon olmasına karşılık bunun dışına çıkan olaylar da vardır. Yüksek oranda DNA homolojisi gösteren türler arasında fertilitesinde düşüklük gözlenmiştir. Kromozomdaki değişiklikler strainler arasındaki fertilititeyi etkilemektedir (Verachtert and De Mot, 1990; Akpınar, 2008).

Pichia lindneri ve *Hansenula minuta* arasında %75 DNA homolojisi saptanmasına karşın bu 2 genus sadece nitrat asimilasyonu testiyle birbirinden ayrılmıştır. Dolayısıyla, G-C içeriğinin saptanmasında olduğu gibi DNA homolojisi de tek başına taksonomik bir kriter olarak kullanılamamaktadır (Verachtert and De Mot, 1990; Akpınar, 2008).

Genel olarak, hibridizasyonda DNA problemleri kullanılmaktadır. Bu teknikte, tek iplikli nükleik asit molekülleri kısa, işaretlenmiş oligonükleotit sekansı (DNA probu) ile muamele edilir ve uzamasına izin verilerek bir hibrid oluşturur. Hibridizasyon direkt olarak radyoaktif veya florescent işaretler ile veya indirekt olarak enzim reportörleri ile saptanmaktadır. DNA problemleri mikroorganizmaların hızlı taranması için etkili araçlar oluşturmaktadır. Keza, bir prob gibi kullanıldığı

oligonükleotid sekansının spesifitesine dayanan spesifik identifikasyonda ve alt tiplendirmede de kullanılmaktadır (Soll, 2000). Spesifik DNA problemleri rRNA gibi korunmuş kodlama sekansında veya insersiyon elementleri, tekrarlayıcı mikrosatellit veya minisatellit sekansları ve hatta sentetik oligonükleotidler gibi değişken sekanslardan oluşmaktadır. Bu yöntemler tiplendirme için kullanışlıdır ve genel olarak DNA parmak izi olarak isimlendirilir (Baleiras-Couto et al., 1996a, b). rRNA genlerinin çoklu kopyaları spesifik DNA problemlerinin bağlanması için mükemmel hedeflerdir. Ribotiplendirme yöntemi bakterileri tiplendirilmesinde ve identifikasyonunda kullanılan tanısal amaçlar için geliştirilmiş otomatik bir araçtır (RiboPrinter®). Son zamanlarda sadece mayalar için geliştirilmiştir (Arvik et al., 2005). rDNA sekansının polimeraz zincir reaksiyonunu (PCR) mümkün olduğundan dolayı yöntemin bir versiyonu yaygın olmaktadır (Akpınar, 2008).

2.3.2.3 Amplifikasyon teknikleri

PCR'ın bulunması yeni moleküler tekniklerin gelişimine yol açmıştır. PCR, birçok defa tekrarlanmış üç aşamadan oluşan bir termo-döngüde, in vitro DNA sentezi ile spesifik DNA sekanslarının eksponansiyel amplifikasyonuna izin veren güçlü bir araçtır (Saiki et al., 1988; Akpınar, 2008).

Temel olarak, reaksiyonunun spesifitesi, denatüre olmuş tek iplikli DNA'ya hibridize olan oligonükleotid primerin sekansı ile saptanmıştır. DNA probu, primerler ya tek kopya ya da çoklu kopya sekanslarına dayanmaktadır. Çoklu kopya sekansları, bir primer olarak kullanıldığı zaman daha fazla duyarlılık sağlamaktadır. Mitokondriyal DNA ve ribozomal DNA sekansları (PCR ribotiplendirme) en sık kullanılan yöntemlerdir (Giesendorf et al., 1996; Akpınar, 2008).

Amplifiye edilmiş ürünlerin saptanması için en basit yöntem PCR ürünlerinin etidyum bromür ile boyanarak agaroz jel üzerinde ayrılmasıdır. PCR ampikonları, problemler ile RFLP veya hibridizasyon ile daha ileri analiz edilebilirler (Mitchell et al., 1994; Shin et al., 1999). Agaroz jel elektroforezine dayanan boyut saptama türü identifikasyonunu doğrulamak için yeterli değildir. Ampikonlar hızlı

ve doğru şekilde kapiler elektroforezde boyutlandırılabilirler (Turenne et al., 1999). Çeşitli post-amplifikasyon yöntemi strainlerin ve türlerin ayırt edilmesi için artan potansiyeli bulunmaktadır (Akpınar, 2008).

Temel PCR tekniğinin çeşitli varyasyonları geliştirilmiş ve mayalar için uygulanmaktadır. Fernández-Espinar et al. (2006), tür identifikasyonu ve tür içi tiplendirme için güncel ve mükemmel bir PCR yönteminin gözden geçirilmesini sağlamışlardır (Akpınar, 2008).

Parmak izi PCR

PCR primerleri, bilinen sekanslarının (REP-PCR, interrepeat PCR) tekrarlayan genomik elementlerinin amplifikasyonu için araç olmaktadır. Mikrosatellit parmak izi maya strainlerini tiplendirmek için kullanılmaktadır (Baleiras-Couto et al., 1996a; Gallego et al., 1998). Intron splice bölgeleri, δ -elementleri ve (GAC)₅ veya (GTG)₅ gibi sentetik tekrarlar maya strainlerini karakterize etmekte kullanılırlar (de Barros Lopes et al., 1996; Fernández-Espinar et al., 2001; Caruso et al., 2002). Hatta prokaryotik tekrar elementleri (enterobakteriyal repetitive intergenic consensus “ERIC” sekansı) fungal DNA’nın amplifikasyonu için kullanılmaktadır (Deak et al., 2000; Akpınar, 2008).

Nadiren amplifiye olmuş polimorfik DNA analizi (RAPD) veya rastgele seçilmiş primed PCR (AP-PCR) olarak isimlendirilen basit bir PCR yöntemi, kısa, önceki sekans bilgisi olmaksızın sentetik primerleri kullanır. Standart PCR’a karşı RAPD analizi rasgele seçilmiş nükleotit sekanslı tek bir primer çalışmaktadır ve nadiren bütün genomu karşı komplementer sekansları amplifiye ederler. 10 bp uzunluğundaki oligonükleotidler (dekamer) büyük bir varyasyonu ticari olarak bulunabilmektedir. RAPD basitliğinden dolayı çok popüler bir yöntemdir; bununla birlikte, düşük-şiddetli şartlarda spesifik olmayan primerler kullanıldığından yöntemin tekrarlanması düşüktür (Deak, 2007). RAPD yöntemleri, özellikle, tür seviyesinden aşağıdaki ilişkilendirmeyi saptamak için kullanışlıdır (alt tiplendirme) ve türleri ayırmak için de kullanılmaktadır (Romano et al., 1996; Andrighetto et al., 2000; Akpınar, 2008).

PCR ribotiplendirme

Moleküler yöntemlerin kullanılması tür ve daha yüksek taksonlar arasındaki evrimsel ilişkileri göz önüne alarak türlerin sınıflandırılmasına katkı sağlamaktadır. Filogenetik çalışmalarda, tek bir genin nükleotit sekasında benzerlik veya farklılıklar saptanabilmekte ve karşılaştırılmaktadır. Türler arasındaki benzerlik ortak atayı yansıtırken; sekans farklılıklarının derecesi evrimsel uzaklığı göstermektedir (Deak, 2007).

Ribozomal RNA (rRNA) kodlayan genler filogenetik amaçlar için sıklıkla çalışılmaktadır. Ribozomlar bütün canlılarda bulunmakta olup rDNA hem küçük (SSU) hem de büyük ribozom alt birimleri (LSU) çoklu kopyalar halinde yer almaktadır. Bu moleküller farklı domainlere sahip olup bunların bazıları oldukça korunmuş iken diğerleri ise oldukça değişkenlik göstermektedir. Dolayısıyla bu bölgeler türler arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemede kullanılmaktadır. Mayalarda küçük alt birimde 18S rDNA molekülü yer alırken, büyük alt birimde ise 5S, 5,8S ve 26S rDNA molekülleri yer almaktadır. Bu rDNA moleküllerinin her biri tek bir birimde çoklu kopyalar halinde transkripte edilmektedir ve bu moleküller birbirlerinden internal ve eksternal boşluklar (ITS ve ETS) ile ayrılmaktadır. Her bir birim arasında bir intergenik transkripte olmayan boşluklar bulunmaktadır ve genellikle 5S rDNA bu bölgede meydana gelir ve gen kümesinden ayrı olarak transkripte olmaktadır (Deak, 2007).

rDNA karşılaştırmaları mayalar arasındaki yakınlık ve uzaklık ilişkilerinin her ikisini de gerçekleştirecek temele sahiptir. Sekanslama yöntemleri gelişmeden önce rDNA çifti arasındaki benzerlik re-assosiasyon ve restriksiyon fragment uzunluklu polimorfizm ile yapılmaktaydı. Mayalar için ilk sekanslama yaklaşık 120 nükleotit içeren küçük 5S rDNA' ın gerçekleştirilmiştir. İlk sekanslama çalışmaları 5S rDNA üzerine odaklanmıştı ve basidiomisetik maya grupları arasında septal porun ultra-yapısı ile korelasyon göstermiştir. Ayrıca 5S rDNA sekansı *Schizosaccharomyces pombe* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayalarını büyük bir evrimsel fark ile birbirinden ayırt etmeyi de sağlamıştır. Bununla birlikte, 5S rRNA genlerinin korunmuş yapısı sadece geniş bir filogenetik akrabalığın tahmin edilmesine yardım etmektedir (Deak, 2007).

Hızlı ve otomatize PCR temelli sekanslama yöntemleri geliştiğinden beri ~ 1700 bp boyutundaki 18S rDNA, ~ 600 bp boyutundaki 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domiani ve ~ 600 bp boyutundaki ITS1–5,8S–ITS2 bölgesinin kısmi ve tam sekansları birçok maya türü için tanılamada kullanılmaktadır. rDNA' ın küçük alt biriminin korunmuş sekansı geniş filogenetik analizlere izin verirken; büyük alt birimlerinde yer alan domain ve ITS sekansları çok daha fazla değişkenlik göstermektedir ve tür seviyesinde tanılamaya izin verdiği bilinmektedir. Ribozomun büyük alt biriminin domainleri ve ITS sekanslarının boyutunun küçük olmasından dolayı universal olarak filogenetik ilişkileri oluşturmada ve tür identifikasyonuna izin vermektedir. Ribozomun büyük alt biriminin D1/D2 domaini sekansı ile ilgili yapılan derlemeler birkaç istisna hariç aynı türün strainlerinde sadece % 0–1 arasında nükleotit farklılığı bulunduğunu; türler arasındaki intragenik farklılığın ise % 3–25 olduğunu göstermektedir. Nükleotit farklılığı derecesi yüzdesel nüklear DNA (nDNA) ilişkisi ile korelasyon göstermektedir ki bu benzerlik aynı türün strainleri arasında % 70' den daha fazladır. Bununla birlikte, % 50 veya daha az nDNA benzerliği olan bölgelerde nükleotit farklılık göstermektedir ancak tahmin edilenden azdır. Bu konu ile ilgili bir örnek verecek olursak, *Candida* anamorfları ile çok yakın ilişkili *Pichia* türleri arasında DNA benzerliği % 37 – 68 arasında değişirken D1/D2 domain de bu fark sadece 1–3 nükleotiti geçmemektedir. Farklı genoslarda türler arasındaki değişimler farklı rDNA bölgelerindeki eşit olmayan nükleotit yer değişimi oranlarından kaynaklanabilmektedir. D1/D2 ve ITS bölgelerinin analizlerinden sağlanan tiplendirme genel olarak benzer olsa da bazen ITS sekansları, D1/D2 bölgesinde benzerlik göstermeyen türler arasında farklılık göstermektedir. Sonuç olarak, tek bir gendeki nükleotit farklılık sayısına dayanan maya takson tanımı tek başına güvenilir değildir (Deak, 2007).

Tür identifikasyonları için PCR ile çoğaltılmış rDNA'nın restriksiyon analizi (RFLP) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu PCR-RFLP tekniği amplifiye edilmiş rDNA restriksiyon analizi (ARDRA) olarak da bilinmektedir. Birçok primerle (White et al., 1990), rDNA genlerinin veya intergenik bölgelerinin (ITS, ETS ve NTS) bir kısmı veya bütünü amplifiye edilebilir. Değişen rDNA bölgelerinin korunmuş amplifikasyonu ile çeşitli restriksiyon enzimlerinin (örneğin, *HaeIII*, *HinfI*, *RsaI*, ve diğerleri) ampikonların analizi ve mümkün olan çeşitli

taksonomik seviyede organizmanın farklılaştırılmasını sağlamaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

5,8S rRNA genine komşu olan ITS1 ve ITS2 bölgeleri sıklıkla kullanılan bölgelerdir (Guillamón et al., 1998; Fernández-Espinar et al., 2000; Caggia et al., 2001; Redzepovic et al., 2002; Esteve-Zarzoso et al., 2004). Esteve-Zarzoso ve ark. (1999) 132 maya türünü kapsayan bu bölgenin bir veritabanını oluşturmuşlardır (<http://yeast-id.com>). Bu yöntem, *Debaryomyces* (Ramos et al., 1998), *Hanseniaspora* (Bujdoso et al., 2001; Cadez et al., 2002), *Metchnikowia* (Valente et al., 1997), *Dekkera* (Egli and Henick-Kling, 2001), *Zygosaccharomyces* (Esteve-Zarzoso et al., 2003) ve *Saccharomyces* (Fernandez-Espinar et al., 2000; Naumova et al., 2003) gibi çeşitli maya genuslarında türlerin taksonomik çalışması için kullanılmıştır. Şarap, bira, meyve suyu, yoğurt ve süt ürünleri gibi çeşitli gıda ve içeceklerle ilişkili mayaların karakterizasyonu için kullanılmıştır. Dlačhy ve ark. (1999) 18S rRNA geni ile ITS spacer' ını içeren rDNA bölgesinin RFLP analizi kullanarak 128 tür için bir veri tabanı geliştirilmiştir. Bu yöntem, *S. cerevisiae* ve *S. paradoxus*' ın farklılaşmasına izin vermektedir (Redzepovic et al., 2002). Diğer birçok çalışma farklı rDNA bölgelerini (örn., NTS, 18S-NTS, ITS2, 18S, and 26S) çoğaltmaktadır ve çeşitli restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır. Bu PCR-RFLP yönteminin potansiyel çözümlemesine rağmen D1/D2 büyük alt birim domainlerinden elde edilen verilerle karşılaştırılabilir (Berbee et al., 2000; Scorzetti et al., 2002) ve hatta bazen üstünlükler sağlamaktadır (Fell and Blatt, 1999; Kurtzman, 2005). Bununla birlikte, standart bir yöntemin ve tek bir veri tabanının eksikliğinden dolayı genel kullanımlar için büyük bir dezavantajdır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Primerler, nüklear rRNA genlerine ilave olarak mt-rDNA sekansını çoğaltmak için kullanılmaktadır. Bütün mtDNA' nın RFLP' si genel olarak, mayalarda, tür seviyesinin aşağısında farklılıkları göstermek için indikatör olarak kullanılmaktadır (Belloch et al., 1997; Guillamón et al., 1997; Fernández-Espinar et al., 2001; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

PCR çeşitleri ve alternatif amplifikasyon yöntemleri

Amplifikasyonun duyarlılığı ve özgüllüğü standart protokollerin çeşitli modifikasyonları ile geliştirilebilmektedir. Kuyucuklu PCR (nested PCR) tekniği, internal primer olarak ilk PCR amplifikasyon ürününün sekansını kullanarak ikinci bir döngü gerçekleşmektedir. Kuyucuklu PCR yöntemi, tatlı şaraplarda *Dekkera* (*Brettanomyces*) strainlerinin saptanması için kullanılmaktadır (Ibeas et al., 1996; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Multipleks PCR da primerlerin bir çiftinden daha fazlası aynı PCR şartları altında eş zamanlı olarak kullanılmaktadır. Mannarelli ve Kurtzman (1998) insan patojenik mayaları identifikasyonu için dört primer kullanmışlardır. İki universal primer 18S rRNA geninden geliştirilmiştir ve iki spesifik primer 26S rRNA geninin değişken D1/D2 bölgesinden elde edilmiştir. mtDNA'da *cox1* (sitokrom oksidaz alt birim 1) geninde intronlardan elde edilen altı primer şarap fermentasyonunun denetlenmesi için multipleks PCR' da kullanılmaktadır (López et al., 2003). Fujita ve ark. (2001), medikal açıdan önemli *Candida* ve *Trichosporon* türleri arasındaki farklılıklar için ITS-5,8S ve ITS2 rDNA bölgeleri eş zamanlı olarak primer olarak kullanılmaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

PCR–RFLP'nin spesifik bir modifikasyonu olan amplifiye edilmiş fragment uzunluklu polimorfizm (AFLP) analiz yöntemi restriksiyon kesimlerinden rasgele seçilmiş DNA fragmentlerini çoğaltmaktadır. Çoğaltılmış ürünler, PAGE denatürasyonu ile ayrılırlar ve yüksek çözünürlüklü spesifik bir parmak izi üretirler (de Barros Lopes et al., 1999). Kompleks teknik klinik mayaların identifikasyonunda (Theelen et al., 2001; Borst et al., 2003) ve bira mayası strainlerin identifikasyonunda (Perpete et al., 2001) ve keza filogenetik çalışmalarda (Lopandic et al., 2005) uygulama bulmaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

PCR'a ek olarak çeşitli diğer amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir: ligaz zincir reaksiyonu (LGC), nükleik asit sekans temelli amplifikasyon (NASBA), Q β replikaz amplifikasyon, iplik değiştirme amplifikasyonu (SDA), dönen daire amplifikasyonudur. Bu konu, Schweitzer ve Kingsmore (2001) tarafından

yayınlanmıştır. Bunlardan pek azı mayalar için kullanılmıştır. LGC *Zygosaccharomyces bailii* ve *Zygosaccharomyces bisporus* gibi gıdalarda bozulmaya neden olan mayaları ayırmak için kullanılmıştır (Stubbs et al., 1994). NASBA, medikal açıdan önemli olan *Candida* türlerinin taranması için PCR'a iyi bir alternatif olarak gözükmektedir (Widjoatmodjo et al., 1999; Borst et al., 2001; Loeffler et al., 2003; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Reverse transkripsiyon PCR (RT-PCR) RNA'ların çoğaltılması için bir yöntemdir. DNA'ya zıt olarak, mRNA'ın devir zamanı kısadır; transkripte edilmiş mRNA'lar birkaç dakika içinde yarı ömrünü tamamlamaktadır. Bu yüzden, mRNA'ların taranması, DNA temelli yöntemlere nazaran hücre tanılamada daha iyi bir indikatördür. RNA'ların ile PCR taranması, RNA'ların DNA'a değiştirilmesi ile başarılabilir; bununla birlikte, bu kompleks ve duyarlı bir yöntemdir. RT-PCR'nın temel uygulaması RNA virüslerini çalışmak içindir, fakat bu hücrel organizmalara kadar yapılabilmektedir. Son zamanlarda, gıdalarda canlılık gösteren mayaların saptanması için kullanılmaktadır (Bleve et al., 2003; Cocolin et al., 2004; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

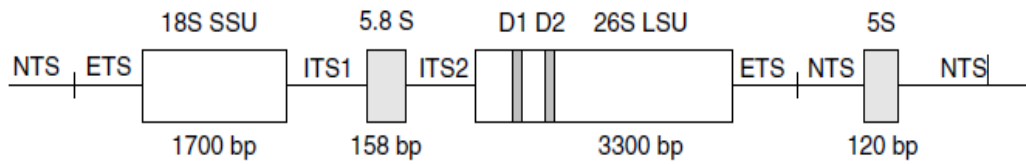
Son yıllarda ribozomal RNA (rRNA) genlerini hedefleyen PCR teknikleri oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bazı hemiascometetik mayaların rRNA genleri, 9 kb'lık bir fragmentin 100-150 ardışık tekrarından oluşan genomik bir bölgedir. Bu fragmentler 2 transkripsiyonel birim içermektedir. Bunlardan birincisi (7kb) 18S, 5,8 S ve 28S'lik rRNA'lar ile ITS1 ve ITS2 olarak adlandırılan iki internal transcribed spacer (ITS) için kod oluşturan gen kümelerinden oluşmaktadır. Zıt yönde transkribe edilen ikinci birim ise 5S'lik rRNA'ya ait kodu içermektedir (Loureiro and Querol, 1999; Caggia et al., 2001; Martorell et al., 2005a).

ITS bölgelerinin uzunluğu türe göre değişiklik göstermesine karşın bütün türlerde 18S, 5,8S ve 28S rRNA'ların boyutu esasen aynıdır (Fernandez et al., 1999) ITS1 bölgesi, 18S ve 5,8S rRNA genleri arasında bulunurken ITS2 bölgesi, 28S rRNA genleri arasında bulunmaktadır. ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgelerinin dizileri veya fragment boyutları türler arasında farklıdır (Çizelge 2.4). Bu nedenle ITS1 ve ITS2 bölgeleri, fungusların aranmasında ve identifikasyonunda

kullanılmaktadır (Guillamon et al., 1998; Fujita et al., 2001; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanılmasıyla fungusların 5,8S rDNA bölgesi ile ITS1 ve ITS2 bölgeleri amplifiye olmaktadır. ITS3 ve ITS4 primer çiftinin kullanılmasıyla da ITS2 bölgesi amplifiye olmaktadır. ITS1 primeri 18S, ITS3 primeri 5,8S ve ITS4 primeri 28S rDNA bölgelerini kodlamaktadır (Şekil 2.1) ITS1 ve ITS4 primerleri ile test edilen bütün funguslar 350-880 bp. boyutunda fragment oluştururken ITS3 ve ITS4 primerleri ile 233-432 bp. boyutunda ürün oluşmuştur. Amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutları bazı türlerde hemen hemen aynıdır. Örneğin, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* 'de yaklaşık 520 bp., *C. saitoana* ve *P. anamola*'da yaklaşık 614 bp.'dir. Fakat bu organizmaların ITS3 ve ITS4 primer çifti ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu, türe spesifik farklılıklar göstermiştir. Bunun tam tersi ITS3 ve ITS4 primerleri ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu *C. utilis* ve *Stephanoascus ciferri* için yaklaşık 356 bp. iken ITS1 ve ITS4 primerleri ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu türe spesifik farklılıklar oluşturmuştur (Fujita et al., 2001; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Gıda endüstrisinde bozunmaya sebep olan mikroorganizmaların hızlı tanılanması büyük önem taşımaktadır. PCR'a dayalı hızlı tarama teknikleri gıda endüstrisindeki mayaların saptanması ya da tanılanması için kalite kontrolün önemli bir parçası olarak kullanılmaktadır (Loureiro and Querol, 1999; Deak, 2007; Akpınar, 2008).



Şekil 2.1 Primer hedef bölgeleri içeren fungal ribozomal genlerin şematik gösterimi (Deak, 2007).

Çizelge 2.4 Önemli Bazı Mayaların ITS1-5,8S rDNA-ITS2 Bölgesinin Boyutları (Fujita et al., 2001; Akpınar, 2008)

Tür	Boyut (bp)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	360
<i>Pichia pastoris</i>	380
<i>Candida sake</i>	450
<i>Candida tropicalis</i>	517
<i>Pichia anamola</i>	614
<i>Candida zeylanoides</i>	620
<i>Debaryomyces hansenii</i>	640
<i>Pichia farinosa</i>	700
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	725
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	740
<i>Candida boidinii</i>	750
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	775
<i>Torulaspora delbrüeckii</i>	800
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850

Genel olarak maya taksonomisinde kullanılan belli başlı testler yukarıda sıralanmıştır. Türlerin tanımlanmasında ilk olarak fizyolojik testler rol oynamaktadır (Loureiro and Querol, 1999). Moleküler teknikler yalnızca mayalar arasındaki bağlantıların açığa çıkarılmasında değil aynı zamanda evlasyonel ilişkilerin belirlenmesinde de kullanıldığı için sınıflandırmada önemli bir kriter olabilir. Fakat bu teknikler, rutin identifikasyon prosedürlerine kolaylıkla dahil edilemedikleri ve kullanılmaları halinde karşılaşılabilecek sakıncalar nedeniyle mayaların identifikasyonu bugün halen fizyolojik testler ve üreme yapıları üzerine kuruludur. Dolayısıyla, moleküler biyolojik tekniklerin, konvansiyonel tanılama teknikleri ile desteklenmesi gerekmektedir (Acheamong, 2000; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Post – amplifikasyon yöntemleri

Amplifiye edilmiş ürünlerin saptanması için yöntemlere ek olarak, diğer post amplifikasyon analitik yöntemlerinin çeşitleri yüksek çözünürlüklü elektroforez ile geliştirilmiştir ve aynı boyuta sahip ampikonlarda polimorfizmlerin saptanmasına izin vermektedir. Denatüre edici gradiyent jel elektroforezi (DGGE) ve termal gradiyent jel elektroforezi (TGGE), DNA helezonunun kısmi denatürasyonu ile amplifikasyon ürünlerini ayırmaktadır. DNA helezonunun elektroforetik hareketi kendi sekansından farklıdır (Muyzer, 1999). Bu yöntemler çiğ sütteki maya populasyonlarının (Cocolin et al., 2002), şarap fermentasyonu esnasındaki maya populasyonlarının (Manzano et al., 2005) ve hamurdaki mayaların (Meroth et al., 2003) profilini saptamak için kullanılmıştır. Fermente edilmiş kahve ve üzüm içindeki karışık popülasyondaki azınlık türler DGGE kullanılarak saptanabilir (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Tek iplikli konformasyonel polimorfizm (SCCP), elektroforetik harekette değişikliklere sebep olan tekrar uzamış tek iplikli PCR ürünleri arasındaki sekans bağımlı farklılıkların avantajına sahiptir. SCCP yöntemi medikal açıdan önemli mayalar ile fırsatçı fungusların teşhisinde kullanılmaktadır (Walsh et al., 1995; Hui et al., 2000; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Terminal RFLP (T-RFLP) analizi PCR’da fluorescent olarak işaretli primerler iş görmektedir ve son restriksiyon fragmentinin ayırmak için uygun restriksiyon enzimleriyle kesimi takip edilir (Marsh, 1999; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

2.3.2.4 Sekanslama

Yeni bir DNA ipliği sentezleme yeteneğindeki DNA polimeraza dayanan Sanger sekanslama, hedef DNA ipliğini sekansını göstermektedir. DNA polimeraz, tek iplikli DNA’ ın bir parçasına komplementer yeni bir DNA ipliğini, serbest nükleotidin 5’-hidroksil ucundan bir primerin ucundaki nükleotidin 3’-OH grubunun serbest nükleotidine bağlanarak çoğaltmaktadır. Tek iplikli DNA’ ın küçük bir parçası olan primer kalıp DNA’ ın bir ipliği ile hibridize olabilir ve

nükleotitlerin başarılı bir şekilde eklenmesi ile uzayabilmektedir. Nükleotit tri fosfatların (dNTP) kaynağının yanında, Sanger yöntemi dNTP' lere ile ilişkili küçük miktarda 2',3'-didioksinükleotit trifosfatlar (ddNTP) da gerekmektedir. ddNTP' ler reaktif olmayan 3'-OH grubuna sahip olduklarından primer uzamasına dahil olur olmaz DNA sentezi sonlanmaktadır. Tipik bir reaksiyon karışımında dNTP' leri (dATP, dTTP, dCTP ve dGTP) ve ddNTP' leri (ddATP, ddTTP, ddCTP ve ddGTP) içermektedir. Primer uzaması komplementar ddNTP ile eşleştirilmiş nükleotit oluşuncaya kadar devam etmektedir. Çeşitli boyutlarda ddNTP ile biten birçok fragment bir reaksiyon esnasında üretilmektedir. Radyoaktif kükürt veya fosfor izotopları işaretlenmiş dNTP' lerin yardımıyla yeni sentezlenmiş DNA kalıbına yer almaktadırlar. Dolayısıyla, bütün fragmanlar radyografi ile saptanabilir olabilmektedir. Fragmentler poliakrilamid jel elektroforezi ile boyutlarına bağlı olacak şekilde ayrılabilir ve sekans saptanabilecektir. Olası dört nükleotidin nispi pozisyonlarını saptamak için farklı bir ddNTP her birini içeren dört reaksiyon beraber paralel yürütülmelidir (Kavanagh, 2011).

rDNA sekansı identifikasyon, taksonomik ve filogenetik çalışmalar için kullanılan en önemli karakterdir. rDNA'nın avantajı bütün yaşayan organizmalarda bulunması ve çoklu kopyalar halinde ortak bir evrimsel orijine sahip olmasıdır ve çok korunmuş olan rDNA bir türe ait olan bütün strainler arasında hem farklılıkları göstermek hem de daha yüksek taksonları betimlemek için kullanılmaktadır (Kurtzman, 2006; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Hem taksonomik amaç hem de filogenetik ilişkileri kurmak için rDNA'nın iki bölgesi en çok kullanılan yöntemdir. Bu rDNA'nın iki bölgesi küçük ribozomal alt birimin 18S rDNA'nın kısmi veya bütün sekansı ve ribozomun büyük alt biriminin yaklaşık 600 nükleotitlik D1/D2 domainidir. Kurtzman ve Robnett (2003) bütün askomisetik mayaların D1/D2 sekansını saptamışlardır ve Fell ve ark. (2000) bütün basidiyomisetik mayalar için bu sekansı yayınlamıştır (Akpınar, 2008).

Geçmişte, klonlama ile moleküler sekanslama teknik çaba gerektiren, pahalı ve zaman alıcı prosedürlerdi. Otomatize edilmiş cihazlar (örn., the ABI Prism

capillary electrophoresis sequencer) ve sekans karşılaştırmaları için gen banka veri tabanları kullanılarak PCR temelli direkt DNA sekanslama teknolojisinin ortaya çıkmasıyla moleküler çalışmalarda bu yöntemler çok kullanılan rutin araçlar haline gelmişlerdir. 20 yıl önce, sekanslama türlerin identifikasyonuna yardımcı olan çok güvenilir olan bir yöntemdi. rRNA genlerinin bütün ve kısmi sekansı taksonomik çalışmalarda (Valente et al., 1999) ve filogenetik ilişkilendirmelerde (Kurtzman and Robnett, 2003) oldukça fazla kullanılmaktadır. Son yıllarda, mayaların sınıflandırması rDNA sekansının analizine dayanmaktadır (Fell et al., 2000; Kurtzman and Robnett, 2003; Kurtzman and Fell, 2006; Akpınar, 2008).

Filogenetiğin amacı birçok populasyon, tür veya genleri kendi aralarındaki evrimsel ilişkiye dayalı bir şekilde bir araya getirmektir. Evrimsel ilişkiden türlerin tarihsel gelişimi anlaşılmalıdır ve genellikle bir evrimsel ağaç ile gösterilmektedir. Vejetatif hücre morfolojisi, eşey durumu, fermantasyon ve büyüme testlerine fizyolojik cevaplar gibi fungal sistematığın klasik yöntemleri fungal türleri özel bir genus veya aileye yer almasını sağlayabilmektedir. Fungal fosil kayıtlarının sınırlı olması ve fungusların çok sayıda morfolojik karakter göstermesinden dolayı fungal sekans verilerinin (RNA, DNA ve protein) fungal türler arasındaki evrimsel ilişkiyi belirlemede başarılı bir alternatif yaklaşım olarak kullanılmaktadır. Birçok durumda, hizalanmış sekanslar bir uzaklık matrisin olarak işlem görmektedir. Birbiri ile çok yakın ilişkili türler çok küçük bir uzaklığa sahip iken uzak türler birbirlerinden çok daha uzak akrabalık göstermektedir. UPGMA, minimum evrim, neighbour joining gibi filogenetik algoritmalar filogenetik ağaçlar olarak uzaklık matrisini göstermek için sıklıkla kullanılmaktadırlar (Kavanagh, 2011).

Yaşamın fungal ağacına ait filogenetik markırlarının seçimi zorlu bir konudur. İdeal olarak, bir filogenetik markır bütün türlerde bulunan ve horizontal gen transferi geçiren genlere benzemeyecek şekilde yavaş evrimsel bölgeleri olmalıdır. Bu nedenle, fungal organizmalar arasında kabul gören akrabalık ilişkilerinde 18S rDNA kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tek-gen analizleri bütün organizmalarda bulunan evrimsel bir tarihe sahip filogenetik markırlara bağlıdır. Bununla birlikte, bireysel genler sınırlı sayıda bölge içerdiğinden sınırlı

rezolüsyon sağlamaktadırlar. Bu sebepten dolayı, alternatif bir yaklaşım farklı tek gen filogenilerinin çoklu gen filogenilerine dönüştürülerek filogenetik ilişkilerin oluşturulmasına dayanmaktadır (Kavanagh, 2011).

2.3.2.5 Son gelişmeler

PCR teknolojisi ve cihazları sürekli gelişmektedir. Bu alandaki gelişmeler sadece uygulamalarda yeni yöntemlerin bulunması olmayıp keza ölü ve canlı hücrelerin DNA'ları arasındaki farklılıklar ile kantitatif tarama gibi konvensiyonel analizlerde karşılaşılan bazı problemleri çözmeye yardımcı da olmaktadır. Gelişmiş yeni yöntemler ve cihazlar dünyanın her yerinde geliştirilmektedir (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Real – time PCR

PCR teknolojisindeki önemli bir yenilik gerçek zamanda amplifikasyon reaksiyonunun gözlenmesidir. Yöntemin temeli, çift iplikli DNA'nın içine SYBR Green gibi fluorescent bir boyanın eklemesine dayanmaktadır ve her PCR döngüsü esnasında bu proses gözlemlenebilmektedir. Bu gereksiz amplikonların taranmasını sağlamaktadır. Amplifiye edilmiş ürünler, onun erime eğrisinin analizi ile daha ileri karakterize edilebilirler. Eğer bilinen konsantrasyonda bir kalıp örnek DNA ile çoğalırsa keza ikinci miktar belirtme olasıdır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Daha ilerlemiş gelişme fluorescent problemlerin kullanılmasıdır ve fluorometreli kapılar termal devrenin entegrasyonudur. Otomatik TaqMan sistemi (Perkin-Elmer Applied Biosystems) Taq polimerazın 5' ekzonükleaz aktivitesine dayanır ve fluorogenik bir boya prob kullanılarak raportör boyalı (örn., FAM) 5' uç ve giderici bir boyalı (örn., TAMRA) 3' uç işaretlenir. Bu fluorsenste ekponansiyel olarak artışla sonuçlanır ve amplifiye edilmiş DNA'nın miktarıyla orantılıdır (Guiver et al., 2001). Gıda ve içeceklerdeki mayaların taranmasında uygulamaları artmıştır (Phister and Mills, 2003; Casey and Dobson, 2004; Martorell et al., 2005b; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Diğer bir prob sistemi olan the Light Cycler (Roche Diagnostics), biri fluoresan ile işaretli diğeri fluoroforlu spesifik iki hibridizasyon probu arasındaki fluoresans rezonans elektron transferine dayanmaktadır. Hedefin annealingi esnasında her iki prob hibridize olduğu zaman bir eksitasyon enerjisinin transferi fluorofor için ölçülebilen ışığın emilmesiyle sonuçlanmaktadır. Yayılmış fluoresans, gerçek zamanda saptanmış, PCR esnasında üretilen DNA miktarıyla orantılıdır. Ölçümler mümkün olmakla birlikte ampliconlar erimiş nokta analizi ile identifiye edilebilmektedir (Loeffler et al., 2000; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Peptid nükleik asit problemleri

Bir pseudopeptid olan peptid nükleik asit (PNA), DNA' nın şeker-fosfat bağının bir poliamid zinciriyle yer değiştirmesiyle oluşmaktadır. Bunlara nükleotid bazları DNA' daki gibi aynı boşlukta bağlanmaktadır (Stender et al., 2002). Değişmemiş zincirinden dolayı, PNA geleneksel DNA problemlerinden daha spesifik ve daha hızlı hibridizasyon gösterdiğinden daha tercih edilebilir hibridizasyon karakteristiği göstermektedir. Ayrıca, bütün bakteri türleri ile *S. cerevisiae* mayasının taranmasında standartize edilmiş fluoresans in situ hibridizasyon (FISH) yönteminde PNA problemleri kullanılmaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Fluoresans in situ tarama

Mikroorganizmaların kültürasyonu olmaksızın doğal habitatlarında direkt gözlenmesi için duyarlı ve doğru moleküler tekniklerle FISH kombine olmuştur. FISH, bozulmamış hücre içindeki hedef sekansın fluorescent boyayla işaretli spesifik bir nükleik asit probunun hibridizasyonuna dayanmaktadır. Epifluoresent mikroskopi, flow sitometri veya lazer tarayıcı kullanılarak fluorescent sinyaller taranmaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

FISH, hem çevresel örneklerdeki bakteriyel çeşitliliği çalışmak için hem de mikrobiyal komünitenin populasyon analizini için oldukça çok kullanılmaktadır. Funguslarla ilgili az çalışma bulunmaktadır (Li et al., 1997). Bu teknik patojenik mayaların saptanması için kullanılmıştır (Lischewski et al., 1997). Son yıllarda,

FISH–PNA şarapta bozulmaya neden olan *Dekkera* - *Brettanomyces* mayalarının identifikasyonu için kullanılmaktadır (Stender et al., 2001; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Fluoresans prob hibridizasyonunun flow sitometrisi

Son zamanlarda gelişen multipleks teknolojisi, flow sitometrik saptama ve değerlendirme ile kombine olmuş fluorescent prob hibridizasyonuna dayanmaktadır. Tür-spesifik DNA yakalama problemleri fluorescent boncuğa bağlanmaktadır ve hedef ampikonların hibridizasyonu flow sitometre ile saptanmaktadır. Aynı zamanda, 100 farklı spesifik prob seti amplikasyondan sonra bir saatten az bir sürede genel olarak kuyucuklu kitin her bir kuyucuğunda analiz edilebilir. Bu yöntem ticari bir teknolojinin (Luminex) uygulamasıdır ve klinik mayaları çalışmak için uygulanmaktadır (Diaz and Fell, 2004; Page and Kurtzman, 2005; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Yeşil Fluoresans Protein

Spesifik bir genin fonksiyonunun analizi, *Aequorea* deniz anasından izole edilen yeşil floresans proteini (GFP) gibi raportör genin sokulmasıyla mümkün olmaktadır. GFP ifadesi konfokal (odaktaş) ve floresans mikroskopisi veya flow sitometri kullanılarak taranabilmektedir. GFP *S. cerevisiae*'nin gen ifadesinin miktarını ölçmek için kullanılmaktadır (DeWulf et al., 2000) ve bireysel *S. cerevisiae* hücrelerinin büyüme dinamiği ile glukoamilaz salgılamasının ilişkilendirilmesinde de kullanılmaktadır (Porro et al., 2000; Deak, 2007; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

DNA microarray

Mikroarray teknolojisi, gen ifade profillerinin ve genom farklılıklarını anlamak için güçlü, yüksek verimli ve eşi görülmemiş fırsatlar sağlamaktadır. Bir mikroçipe bağlanmış referans bir genomdan binlerce oligonükleotit içeren DNA microarrayleri (DNA çipleri), ilgili genomdan floresans olarak işaretlenmiş DNA ile hibridize olabilmektedir. İki genom arasındaki farklı lokuslar ya DNA

sekansında ya da gen ifadesinde sayılabilir veya haritalanabilmektedir. Bu DNA homolojisi/farklılıklarının paralel bir analizini izin vermektedir ve fonksiyonel genomu çalışmak için transkripsiyonel profiller sağlamaktadır (Gingeras and Rosenow, 2000; Ye et al., 2001; Deak, 2007). Maya genom projelerinin tamamlanması DNA mikroarray teknolojisinin gelişmesine büyük bir katkı sağlamıştır (Brown and Botstein, 1999; Deak, 2007). Tamamlanmış mikrobiyal genomların kullanılabilirliğinin artması ve DNA mikroarray kullanımı, genetik, fizyoloji, ekoloji, patogenesis ve diğer alanlarında içerildiği birçok alanda katkılar sağlamaktadır. Bu teknoloji ayrıca tanı amaçlı bir araç olarak henüz araştırılmamıştır. Birçok tipik tür için rRNA gen tek sekansı ve birçok anahtar fonksiyonel gen, türlerin identifikasyonu için bir hibridizasyon arrayinde düzenlenmiştir ve daha sonra test organizmasından elde edilen DNA prob haline getirilir (Cho and Tiedje, 2001; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Son zamanlarda, mikolojideki microarray uygulamaları genomik ve gen ifadesi çalışmalarında olmaktadır (Williams, 2002). Bununla birlikte, bu teknik hızlı genetik identifikasyon için güçlü bir araçtır ve kominite yapısı ve çeşitliliğini çalışmaktadır. Birkaç sene öncesine kadar, DNA çipleriyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktaydı. Bunlardan şarap mayalarının gen ifadesi Perez-Ortin ve ark. (2002) tarafından yayınlanmıştır. Fermentasyon şartları altında ve yabancı ile endüstriyel maya strainleri arasındaki ifade modelleri fizyolojik özelliklerle uyumlu önemli farklılıklar göstermektedir ve bu şarap teknolojisinin gelişmesi için kullanılmaktadır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Minyatürize edilmiş moleküler analitik teknolojideki ileri gelişmeler beklenilmektedir. Microarray, mikroçip, biyoelektronik çip ve diğer araçlar daha küçük çapta (nanoteknoloji) yeni tarama yöntemleri sağlamaktadır ve kompleks analitik prosedürlerin (lab-on-a-chip tools) çoklu aşamalarına entegre olacaktır (Deak, 2007). Otomatize edilmiş bir elektroforez aracı mayaların hızlı taranması için multipleks PCR'da kullanılmaktadır (Fujita et al., 2001). Biyoçip teknolojisi genomik ve proteomik temelli testlerin arasında uygulanacaktır. İster istemez, gelişmeler gıda mikolojisine kadar yayılacaktır (Deak, 2007; Akpınar, 2008).

Sonuçta, moleküler tekniklerin çok büyük kapasitesi ve esnekliği şarap mayalarının çalışıldığı çeşitli uygulamalarda çokça gösterilmiştir (Jain, 2002; Deak, 2007; Akpınar, 2008).

2.4 *Yarrowia lipolytica* Mayasının Genel Özellikleri

Askomisetik maya olan *Yarrowia lipolytica* (önceleri *Candida*, *Endomycopsis* veya *Saccharomyces lipolytica* olarak isimlendirilirdi) en sık çalışılan ‘non-conventional’ maya türlerinden biridir. ‘non-conventional’ mayalar olarak isimlendirilen grup üzerindeki temel ve biyoteknolojik araştırmalar günden güne artmaktadır. ‘non-conventional’ terimi, ‘conventional’ olarak bilinen yani iyi çalışılmış mayalar olan *Saccharomyces cerevisiae* ve bazı kısıtlamalarla *Schizosaccharomyces pombe*’den bu grup mayaları ayırmak için kullanılmıştır (Barth and Gaillardin, 1997; Akpınar, 2008).

Y. lipolytica’nın patojenik olduğu düşünülmemiştir (Barth and Gaillardin, 1997; Fickers et al., 2005).

2.4.1 Doğal habitatları ve filogenetik ilişkileri

Yarrowia lipolytica strainleri süt ürünlerinden kolaylıkla izole edilebilirler. Ayrıca, et veya karides içeren salatalardan da ya da soya sosundan da izole edilebilirler. Anaerobik şartlar altında bu mayanın hayatta kalmaması, *Kluyveromyces marxianus* strainlerine zıt olarak süt ürünlerinden kolayca eliminasyonuna izin vermektedir (Barth and Gaillardin, 1997). Asimile edilmiş substratların geniş bir tarifi Kreger-van Rij (1984) ve Barnett et al. (2000) tarafından yapılmıştır. Glukoz, alkoller, asetat ve yağ asidi veya alkanlar gibi hidrofobik substratlar karbon kaynağı olarak kullanılırken sukroz kullanılamaz (Akpınar, 2008). Ekstrasellüler lipolitik ve proteolitik aktivilerine bağlı olarak 5-10 °C aralığında kuvvetli büyüme göstermektedirler. Bu maya aynı zamanda toprak, atık ve petrol türevleri ile kirlenmiş çevrelerden de izole edilebilirler (Fickers et al., 2005).

Herhangi eşeyli üreme yapısı tanılanmadığı dönemde organizmalar *Candida* generusu içerisinde sınıflandırılmaktaydı. Amerika Birleşik Devleti, Peoria'da bulunan Northern Regional Research Laboratory'de Wickerham tarafından altmışların sonunda *Candida lipolytica*'nın seksüel formu identifiye edilmiştir. 1945'de, bir tahıl işleme fabrikasında lif tortusunun kavanozundan izole edilen bir kültür uygun bir ortama yerleştiği zaman askus formu hifal elementlere tutturulmuş bulunmuştur. Bu askuslardan izole edilen 1–4 adet spor çeşitli boyut ve şekildedir ama bu sporların yaşama kapasitesinin çok düşük olduğu bulunmuştur. A ve B olarak isimlendirilen iki eşem tipi eşeyli üreme esnasında identifiye edilebilir. Neredeyse diğer bütün türlerden izole edilen yabancı tipler bu iki eşem tipinden biriyle çok düşük frekansta da olsa eşleşmektedir, bu da çoğu doğal izolatin haploid (nadiren diploid) olduğunu göstermektedir. Eşeyli form önceleri *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham, 1970) daha sonra *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow, 1972) ve son olarak *Yarrowia lipolitica* olarak sınıflandırılmıştır (Barth and Gaillardin, 1997; Akpınar, 2008).

1990' ların başında başlayan filogenetik yaklaşımları kullanılarak mayaların tekrar sınıflandırma çabaları sayesinde *Y. lipolytica*'nın ve onun anamorfik türlerinin filogenetik yerleşimi gerçekleştirilmiştir. rRNA'ın küçük alt birimi ve 26S rRNA'ın kısmı gen sekanslarının karşılaştırılması ile *Y. lipolytica*'nın kendisine en yakın olan birçok *Candida* üyesi ve bilinen askomisetik maya genuslarından filogenetik olarak uzak olduğu ve ayrıca en yakın akrabalık ilişkisinin *Wickerhamiella domercqiae* türü ile olduğu gösterilmiştir. *Y. lipolytica* o zamandan beri birçok farklı mayayı barındıran Hemiascomycetes içinde yer almaktadır (Groenewald et al., 2013).

Çeşitli gözlemler *Y. lipolytica*'nın diğer askomisetik mayalardan oldukça farklı olduğunu göstermektedir: yüksek G+C içeriği, rDNA bölgesinde ITS ve ETS bölgelerinin alışık olunmayan yapısı (Deak, 2006; Deak, 2007), yüksek ökaryotlara benzer büyüklükteki snRNA (Barth and Gaillardin, 1997) ve endoplasmik retikuluma doğru proteinlerin taşınmasında görevli olan sinyal tanıma partiküllerini kodlayan 7S RNA'lara sahiptir. *S. cerevisiae*, *K. lactis*, veya *C. albicans*'daki eşleniğindeki homolog genler düşük seviyede benzerlik göstermektedir (tipik olarak amino asit seviyesinde % 50-60 oranında),

dolayısıyla Southern hibridizasyonu vasıtasıyla homolog genleri klonlanmaya kalkışmak birçok durumda engellenmiştir. Naumova ve ark., (1993) *Y. lipolytica* genlerinin *Saccharomycopsis*, *Endomyces* veya *Endomycopsella* genusunun türlerinin DNA'ları ile çok iyi hibridize olmadığı belirtilmişlerdir. Eskiden bu genusların bazıları *Y. lipolytica* gibi aynı genus altında sınıflandırılıyorlardı. Benzer olarak, *Y. lipolytica*'nın *S. cerevisiae*'da direkt olarak ifade edilen çok az geni mevcuttur, RNA polimeraz II promotorları ve/veya ilgili transkripsiyon faktörleri ise oldukça farklıdır. 7S RNA genleri, intron yapısı ve ARS fonksiyonu hakkındaki son zamanlardaki veriler, bu türün diğer birçok mayayla karşılaştırıldığı zaman oldukça kendine özgü olduğu saptanmıştır. İyi korunmuş fonksiyonlara sahip genlerinin (glikolitik genler, ribozomal RNA genleri) sekanslarını karşılaştırmaya dayanan evolusyoner ağaçlar, *Y. lipolytica*'nın bir dalının *S. pombe*'den ayrıldığını diğer dalının ise diğer askomisetik mayalardan ayrıldığını göstermektedir (Barth and Gaillardin, 1997). Bu ayrılmanın gerçekten pozitif bir tarafı *Y. lipolytica* ve diğer maya genleri arasındaki yapısal korumanın gözlenmesidir. *Y. lipolytica* mayasının diğer maya türlerinden ayırt edici birçok yapının olması bu mayanın tanımlanmasında faydalar sağlamaktadır. (Akpınar, 2008).

Knutsen ve arkadaşları (2007) *Yarrowia* ve onunla yakın ilişkili *Candida* türleri arasındaki filogenetik yakınlığı kurmak için D1/D2 domaininin ve ITS bölgesinin sekans analizi, PCR-aracılı parmak izi analizi, DNA-DNA reassosiasyonu, eşem deneyleri gibi birçok teknikten faydalanmış ve *Y. lipolytica* ile *Candida deformans*'ın birbiri ile yakın türler olduğu bulunmuştur. Kurtzman et al. (2011)'a göre, birçok *Candida* türü *Yarrowia* genusu ile yakındır: *C. deformans*, *C. galli*, *C. hollandica*, *C. oslonensis*, *C. alimentaria*, *C. phangngensis*, *C. yakushimensis* ve *C. hispaniensis*. Adı geçen *Candida* türleri ITS ve D1/D2 bölgeleri *Y. lipolytica* ile benzerlik göstermektedir ve diğer maya türlerinden kolaylıkla ayrılabilir. Çünkü ITS bölgeleri ve D1/D2 domainleri *Yarrowia* genusu türlerinin identifikasyonu için güvenilir bir araçtır (Knutsen et al. (2007); Groenewald et al., 2013).

2013 yılında Amsterdam' da toplanan mikologlar, fungal sınıflandırmada fungusların karakterizasyonu temel olarak kendi filogenetik gruplamalarına göre

yapılacağı kararı alınmıştır. Bu karar fungal sınıflandırma ve *Yarrowia* genusu üzerine büyük bir etki sağlayacaktır. Çünkü bundan sonra birçok *Candida* türü *Yarrowia* genusu altında verilecektir (Groenewald et al., 2013).

2.4.2 Fizyolojisi

Y. lipolytica zorunlu aerobik bir maya olup n-alkanlar, yağ asitleri, yağlar gibi hidrofobik substratları sahip olduğu spesifik metabolik yol izleri ile etkili bir biçimde parçalama kapasitesindedir (Coelho et al., 2010). *Y. lipolytica* n-alkanları ve 1-alkenleri karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Bu maddelerin asimilasyonunda ilk aşama, hücre yüzeyinde küçük damlacıklar oluşturarak bu maddelerin özümsemesine yardımcı olacak emülsifikasyonu sağlamasıdır. Lipozan adı verilen 27 kDa büyüklüğündeki bir emülsifer hücreler n-alkanlar üzerinde büyürken indüklenmektedir. Hücre içine n-alkanlar girdikten sonra, n-alkanlar bir sitokrom P-450 monooksijenaz sistemi ile hidroksillenmektedir. Sitokrom P-450 birçok *Y. lipolytica* straininde saptanmıştır ve bu enzimin sentezi n-alkanlar üzerinde büyürken indüklenirken; glukoz, etanol veya asetat üzerinde hücreler büyürken indüklenmemektedir. Sitokrom P-450 endoplazmik retikulumun membranında lokalize olmaktadır (Barth and Gaillardin, 1997).

Y. lipolytica glukoz, früktoz ve mannoz gibi birçok heksozları parçalama kapasitesindedir. Bununla birlikte, hücre membranları bu şekerlere karşı serbest geçirgenlik göstermemektedir. Dolayısıyla, karbohidrat metabolizmasının ilk aşaması di- ve trisakkaritler hariç karbohidratların hücre dışında hidrolize edilmesidir. Karbohidratların taşınması membranda yer alan permeaz adı verilen spesifik taşıyıcılar ile gerçekleşmektedir. Glukoz, fruktoz gibi birçok monosakkarit *Saccharomyces cerevisiae*' da kolaylaştırılmış difüzyon ile prosesi ile gerçekleşirken diğer mayalarda bu durum farklılık gösterebilmektedir. *Y. lipolytica* glukozu, ortamdaki glukoz konsantrasyonundan bağımsız olarak iki komponentli sistemle taşımaktadır (Coelho et al., 2010).

Y. lipolytica C₁₂ veya C₁₄ yağ asitlerine, C₁₆ ve C₁₈ doymuş veya doymamış yağ asitlerine spesifik, yağ asidi taşıyıcı sistemlerine sahiptir. Oktanoik asit ve dekanöik asit bu maya tarafından alınamamaktadır. *S. cerevisiae*' ın tersine, bu maya palmitat üzerinde büyüdüğü zaman hızlı bir şekilde indüklenebilen bir hücre

içi 100 kDa büyüklüğünde yağ asit taşıyıcısı protein sentezlenmektedir. Düşük moleküler ağırlığa sahip yağ asit taşıyıcı protein (15 kDa) bu mayanın sitozolünde saptanmıştır. Bir anabolik açıl-CoA sintetaz I aktivitesi peroksizom, mitokondri ve sitoplazmada saptanmıştır. Bu aktivite ile hücre dışı yağ asitleri hücre lipidlerine dönüştürülür. Katabolik açıl-CoA sintetaz II çoğunlukla peroksizomlarda yer almaktadır ve yağ asitlerinin β -oksidasyonundan sorumludur (Barth and Gaillardin, 1997).

Y. lipolytica etanol üretemezken etanolü % 3' e varan konsantrasyonlarda kullanabilmektedir. Etanolün yüksek konsantrasyonu toksiktir. Birçok NAD^+ ve NADP^+ bağımlı alkol dehidrogenazlar *Y. lipolytica*' da saptanmıştır (Barth and Gaillardin, 1997; Coelho et al., 2010). Gliserol birçok maya tarafından aerobik şartlar altında karbon kaynağı olarak gliserol-3-fosfat veya dihidroksiaseton yol izlerinden biri ile asimile etmektedirler (Coelho et al., 2010).

Y. lipolytica asetik, laktik, propionik, malik, süksinik, sitrik ve oleik asitlerini tek karbon ve enerji kaynağı olarak çoğu zaman besiyeri pH' sıندان bağımsız olarak kullanma kapasitesindedir (Coelho et al., 2010).

Birçok *Y. lipolytica* straini tek karbon kaynağı olarak asetat üzerinde etkili büyüebilmektedir. Ortamda sodyum asetat % 0,4 konsantrasyona varıncaya kadar tolere edilebilmektedir (Barth and Gaillardin, 1997; Coelho et al., 2010).

2.4.3 *Yarrowia lipolytica*' da metabolitlerin salgılanması

2.4.3.1 Organik asitler

Sitrik ve İzositrik asit

Yabani tip *Y. lipolytica* strainleri, karbon kaynağı olarak n-parafin üzerinde büyütüldüklerinde sitrik asit ve izositrik asidin karışımlarını salgılamaktadırlar. Düşük akonitaz aktivitesine sahip strainlerin sitrik asit:izositrik asidi 60:40 oranından 97:3 oranına yükselttiğini bildirmiştir. Glukoz veya gliserol ortamında sitrat:izositrat oranı 92:8 iken n-parafin ortamında bu oran 67:33' e düşmektedir (Barth and Gaillardin, 1997).

α -ketoglutarik asit ve diğer organik asitler

Sınırlı tiamin kaynağında n-alkanlar üzerinde büyüyen *Y. lipolytica* strainleri büyük miktarda α -ketoglutaratı salgılamaktadırlar. Ayrıca metiyonin biyosentezinde bir mutasyona sahip olan haploid bir strain glukoz üzerinde büyüme esnasında bu organik asidi çok fazla miktarda salgılamaktadır. Ayrıca lösün okzotrofu bir *Y. lipolytica* straini kullanılarak yüksek verimli izopropilmalik asitin üretildiği belirtilmiştir (Barth and Gaillardin, 1997).

2.4.3.2 Proteinlerin salgılanması

Ekstrasellüler alkalın proteaz (AEP)

Y. lipolytica strainleri pH 6,8 de zengin (YPD tip) ortam üzerinde büyütüldüklerinde alkalın ekstrasellüler proteazın (AEP) büyük miktarlarını (1–2 g/L) salgırlar (Ogrydziak, 1988; Ogrydziak, 1993; Akpınar, 2008).

AEP, *XPR2* geni tarafından kodlanmaktadır ve *XPR2* geni AEP sentezlenmesini, salgılanmasını ve/veya aktivitesini kontrol eden en az 11 genden biridir (Ogrydziak and Mortimer, 1977; Simms and Ogrydziak, 1981). Bu gen ve üç farklı strainden klonlanmış ve sekansı yapılmıştır (Davidow et al., 1987; Nicaud et al., 1989). AEP subtilisin familyasının 32 kDa luk bir proteazı olup hücre içinde 55 kDa luk bir prekürsörün proses edilmesiyle oluşturulmuştur (Matoba and Ogrydziak, 1989; Matoba et al., 1988). Propeptidin proses edilmesi (processing) üzerindeki tek bir bölgenin glikozasyonu ve 15-amino asit presekansının uzaklaştırılmasını içermektedir. Golgi dipeptidil aminopeptidaz tarafından 9 N-terminal dipeptidlerde bulunan (X-Ala veya X-Pro) kuyruğunun etkili hidrolizi gerçekleştirilmiş ve Lys-Arg bağlantısındaki propeptit uzaklaştırılarak olgun protein elde edilmiştir. Bu fonksiyonu üstlenen endopeptidaz *XPR6* geni tarafından kodlanmaktadır. *XPR6* geni bir *KEX2* homoloğu olup klonlanıp sekansı yapılmıştır (Enderlin and Ogrydziak, 1994). Propeptidin uzaklaştırılmasının olgun proteinin katlanması, hücre dışına taşınması ve aktivasyonu için gerekli olacağı gösterilmiştir (Barth and Gaillardin, 1997).

AEP sentezinin regülasyonu komplekstir ve hücrenin karbon, azot, kükürt, pH ve diğer durumlarından etkilenmektedir. Bir promotor çalışması şunlarla başlamaktadır; internal delesyonlar ve in vivo footprint TATA box'tan 700 bp (UAS1) ve 40 bp (UAS2) upstreaminde yerleşen iki ana UAS'ler olduğu gösterilmiştir (Blanchin-Roland et al., 1994). Her bir UAS'in genel transkripsiyon faktörleri (RAP1- ve çoğunlukla ABF1-benzeri) için hedefler içerdiği görünmüştür. Bu UAS'lar LEU2 TATA box ve inisiyasyon bölgesini oluşturan minimal bir promotoru aktive edebilmektedir. *XPR2*'nin transkripsiyonel kontrolünü etkileyen rastgele mutasyonlar en az dört lokusu etkilemiş ve identifiye edilmiştir. Bunlardan biri çinko-parmak transkripsiyonel aktivatörü (Y1Rim1p) olup, bu aktivatör çevre pH'sı tarafından kontrol edilen senteze ve aktiviteye sahiptir (Barth and Gaillardin, 1997; Akpınar, 2008).

Asit ekstrasellüler proteaz

Y. lipolytica strainleri pH 4,0' da protein içeriği açısından zengin (YPD tip) ortamı üzerinde büyütüldüklerinde bu ortamda asit proteaz aktivitesi saptanmıştır. Önceleri, 28, 32 ve 36 kDa boyutlarında üç protein türünün olduğu düşünülse de son yayınlarda bu üç proteinin tek bir asit proteazın kısmi parçalanma ürünleri olduğu bulunmuştur. İlginç olan ise asit proteaz indüksiyonunun, AEP indüksiyonunda besiyeri pH' sı hariç kullanılan şartlara çok benzemesidir. Asit proteazı kodlayan genler klonlanmış ve sekansı saptanmıştır. Asit proteaz, alışılmışın dışında 5' upstream bölgesinde bir preproenzim olarak kodlanmaktadır. İlginç olan ise hem asit hem de alkalın proteazın bazı promotor parçalarının korunmuş olmasıdır (Barth and Gaillardin, 1997).

Ekstrasellüler Ribonükleaz (RNaz)

Salgılanmış bir RNase aktivitesi alkalın proteaz salgılayan şartlar altında büyüyen *Y. lipolytica* kültürlerinde taranmıştır, 45 kDa' luk protein AEP tarafından 43 kDa ve 34 kDa lık proteinlere kısmi degrede olmaktadır (Cheng and Ogrydziak, 1987). RNase muhtemelen bir 73 kDa luk glikozillenmiş prekürsör olarak sentezlenmektedir (Cheng and Ogrydziak, 1987; Akpınar, 2008), ancak bu fikrin doğrulanabilmesi için proteinin salgılama yol izinde görev alan genlerin

tanılanması gerektirmektedir (Barth and Gaillardin, 1997). Nitekim Dujon ve ark. (2004) yapılan çalışmada RNaz enziminin ve bu enzimin salgılanmasında görev alan genler tanılanmıştır.

Ekstrasellüler Fosfataz

Y. lipolytica strainleri inorganik fosfat kaynakları açısından eksik bir ortamda büyütüldüklerinde hücre çeperine bağlı bir asit fosfataz aktivitesi indüklenmektedir. 90 – 200 kDa molekül ağırlığında glikozillenmiş bir protein saflaştırılmış ve endoglikosidaz uygulaması ile 60 kDa' luk bir proteine çevrilmiştir. Antikor denemeleri sonucunda bu proteininin *S. cerevisiae* major asit fosfatazıyla ilişkilendirilmiştir (Barth and Gaillardin, 1997).

Ekstrasellüler lipaz ve esteraz

Y. lipolytica strainleri, gliserol esterinin 1 ve 3. pozisyonlarındaki oleil rezidülerine karşı bir lipaz aktivitesi göstermektedir. Lipaz aktiviteleri birçok araştırmacı tarafından farklı strainlerde denenmiştir. Çalışılan lipazlardan birisi optimum pH' sı 6,2–6,5 civarında olup hücre çeperinde gömülü şekilde glukoz varlığından etkilenmeyecek şekilde faaliyet göstermektedir. İkinci lipaz aktivitesi sorbitan monooleat ile indüklenmekte ve ekstrasellüler sıvıda görev yapmaktadır. Ekstrasellüler lipaz bir stabilizer/aktivatör olarak oleik aside gereksinim gösterirken; çepere-bağlı lipazlar oleik aside gereksinim göstermez ve bu özelliği ile ekstraseller lipazdan farklılık göstermektedir. Ayrıca, *Y. lipolytica* lipazı 2,4-dimetilglutarik asit monoesterleri ve mezo-siklopentan diollerin transesterifikasyonu gerçekleştirme kapasitesinde olduğundan deri endüstrisinde veya peynir yapımında kullanılabilmektedir (Barth and Gaillardin, 1997).

2.4.4 *Yarrowia lipolytica*' da Dimorfizm

Dimorfizm çevre şartlarına bağlı olarak fungusların maya-benzeri tek hücre ya da misel oluşturma kapasitesi olarak tanımlanabilir. Dimorfizm fenomeni birçok fungus için oldukça önemlidir. Çünkü bu fungusların insan veya bitkilerde patojen olmasında yani fungus virulansı ile direkt ilişkilidir. Bu kompleks fenomenin çevresel değişikliklere cevap olarak hücresel düzenin büyük

modifikasyonuna gereksinimi olmaktadır. Mayadan misele geçiş unipolar büyüme ve asimetrik bölünme ile ilişkilidir (Coelho et al., 2010).

Y. lipolytica'nın yabanıl tip strainleri düz, parlaktan çok kıvrık ve mat olabilen çeşitli koloni şekillerini göstermektedir. Koloni morfolojisi hem büyüme şartlarına (aerasyon, karbon ve azot kaynakları, pH vs.) hem de strainin genetik alt yapısına dayanmaktadır. Yabanıl tip izolatlar çeşitli koloni tiplerine neden olabilmektedirler, her biri diğer tiplere neden olabilmektedir: bu dengesizliğin (instability) nedeni laboratuvar strainlerinde gözlenmemiştir ve bilinmemektedir (Barth and Gaillardin, 1997; Akpınar, 2008).

Y. lipolytica doğal bir dimorfik fungustur. Dimorfik maya hücreleri hem pseudohif hem de septalı hif oluştururlar (Barnett et al., 2000). Gerçek miseller genişliği 3–5 μm ve boyu birkaç mm'ye varan septalı hiflerden oluşmaktadır. Apikal hücreler sıklıkla 100 μm 'yi geçmektedir, hâlbuki segmentleri 50–70 μm boyutundadır. Her segmentte tek bir nukleus vardır. Septalar diğer filamentöz mayalara benzemeyecek şekilde askomisetik-tip sentral por göstermektedir ve endoplazmik retikulum bir segmentten diğerine geçebilmektedir (Kreger-van Rij and Veenhuis, 1973; Akpınar, 2008; Coelho et al., 2010).

pH dimorfik geçiş için en önemli parametrelerden birisidir. Misel oluşumu maksimum olarak nötral pH civarında gerçekleşirken, pH 3 gibi düşük pH' larda bu olay gerçekleşmemektedir. Son olarak besiyerinin başlangıç pH' sından çok final pH' sının dimorfizm açısından önemli olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir *Y. lipolytica*'ın yüksek alüminyum (Al) konsantrasyonlarında (0,5–1 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$) büyümesi etkilenmemektedir. Ancak Al elementi, maya-hif dönüşümünü inhibe ederek hücre morfolojisinde değişikliğe sebep olmaktadır. Glukoz ve amonyum gibi karbon ve azot kaynakları ise misel oluşumu için önemlidir. Ayrıca *Y. lipolytica* hücreleri hayvan serumunda büyütüldüklerinde miselial gelişim göstermektedirler (Coelho et al., 2010).

Fungal dimorfik gelişiminde etkili olan dış sinyallerin alınımında iki sinyal transdüksiyon mekanizması iş görmektedir. *Y. lipolytica* mayasında mitojen aktiviteli protein kinaz (MAPK) ve siklik-AMP bağımlı protein kinaz (PKA) yol

izleri birbiri ile zıt çalışmaktadır. MAPK sinyal yol izi miselial büyüme için gerekli iken fonksiyonel PKA yol izi maya-benzeri formun büyümesi için gereklidir (Coelho et al., 2010).

Kullanılan strainlere bağlı olarak farklı hücre şekillerinin oranı muhtemelen koloni seviyesinde gözlemlenen morfolojik farklılıklara bakılarak açıklanmaktadır. Güvenilir şartlar bilinmemektedir; bununla birlikte, maya hücrelerinin öncelikli şekline sebep olur veya miselial gelişimi indüklemektedir (Barth and Gaillardin, 1997). Miselial gelişim hem magnezyum sülfat ve ferrik kloritin eksikliğinde hem de sistein ve indirgenmiş glutathione'un eklenmesiyle inhibe edilmektedir. Rodriguez and Domiguez (1984) tek karbon kaynağı olarak N-asetilglukozamin içeren minimal bir ortamda maya-misel dönüşümünü tam ve üretken indüklemişlerdir, fakat bu strain bağımlı gibi gözükmemektedir. Guevara-Olvera ve ark., (1993) N-asetilglukozamin içeren ortamda inokulasyon esnasında hücreler ısı şokuyla maya-misel dönüşümünü teşvik etmişlerdir (Akpınar, 2008).

Bazı çalışmalar maya-hif dönüşümü esnasında oluşan fizyolojik değişiklikleri taramayı çalışmaktadır (Barth and Gaillardin, 1997). Maya ve hifsel hücre kompozisyonlarının karşılaştırılması göstermiştir ki hifsel çeperlerde amino-şekerler ve indirgenmiş protein içeriği daha fazla bulunmaktadır (Vega and Domiguez, 1986). Ayrıca N-asetilglukozamin içeren ortamda büyütülen hifsel hücrelerde ornitin dekarboksilaz aktivitesi ve poliamin hücre havuzu artmıştır (Barth and Gaillardin, 1997; Akpınar, 2008).

SEC14, *GPR1* (Barth and Gaillardin, 1997) genlerinde mutasyonlar ile *XPR6*'nın delesyonu mayadan hif dönüşümüne güçlü etkileri olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, bu dönüşümün regülasyonunda direkt olarak içerilen bu genler tarafından kodlanan proteinler bilinmemektedir. Morfolojik mutantlar tamamen hif oluşturmamaktadır. Hif formu kolonilerin görsel kontrolünden sonra kolaylıkla seçilmektedir (Barth and Gaillardin, 1997; Akpınar, 2008).

2.4.5 *Yarrowia lipolytica*' in Genomu

Y. lipolytica' in G+C oranı % 49,6–51,7 olup eksponansiyel büyüyen haploid hücrelerin deoksiadenosin tayini ile genomunun yaklaşık 11 Mb olduğu

ve *S. cerevisia* genomundan daha küçük olduğu saptanmıştır. Pulsed field jel elektroforezi ile yapılan kromozom ayrımı ile yabancı tip strainlerin boyutlarının (12,7–22,1 Mb) beklenenden daha fazla olduğu saptanmıştır. Farklı strainler arasında kromozom uzunluklu polimorfizm denemelerinde kromozom sayılarının 4–6 arasında değiştiği belirtilmiştir. Farklı genetik yapılara sahip olan doğal *Y. lipolytica* izolatları arasında düşük spor oluşturma oranı gözlemlenmiştir. Sistematik bir araştırmada 24 yabancı tip izolatta DNA plasmidi saptanmamıştır (Barth and Gaillardin, 1997).

Y. lipolytica'ın mitokondrial genomu yüksek yoğunluğa sahiptir (1,687 g cm⁻³) ve GC oranı % 24,9' dur. 14,5 mm halkasal bir molekülden meydana gelmektedir. *Y. lipolytica*'ın mitokondrial genomunda *S. cerevisiae* ve *K. lactis*'de olduğu gibi korunmuş ATPaz alt birimleri, rRNA ve 4S RNA için genleri bulunmaktadır (Barth and Gaillardin, 1997).

2.4.6 *Yarrowia lipolytica* mayasının endüstriyel uygulamaları

Y. lipolytica'ın hidrofobik substratları etkili kullanımı, metabolit ve proteinleri yüksek miktarda salgılama kapasitesi gibi spesifik özelliklerinden dolayı, bu maya farklı uygulama alanlarında hızlı bir şekilde kullanım alanı bulmuştur (Barth and Gaillardin, 1997).

2.4.6.1 *Y. lipolytica* mayasından tek hücre proteini (SCP) ve tek hücre yağı (SCO) üretimi

Yarrowia lipolytica mayasının endüstriyel kullanımı ilk olarak British Petroleum (BP) tarafından gerçekleştirilmiştir. 1950 ve 1970' lerde çok sayıda şirket farklı mikrobiyal kaynakları (bakteri, küf, maya ve alg) yüksek kaliteli protein (tek hücre proteini) elde etmek için büyük ölçekli üretimi yönünden araştırmışlardır. Biyokütle gelişimi için etanol, metanol gibi petrol ve diğer endüstrilerin atıkları kullanılmıştır (Groenewald et al., 2013). 1960' ların ortasından 1980' lere kadar, *Y. lipolytica* n-alkanlardan tek hücre proteini (SCP) üretmek için büyük ölçekli fermentörlerde kullanılmıştır. Son yıllarda ise bu teknolojiler, kakao-yağının yerine alacak tek hücre yağının (SCO) üretimi için kullanılmaktadır. Endüstriyel yağlar ve gliserolde yapılan çalışmalar sonucunda

lipid kompozisyonu modifiye edilerek tek hücre yağları elde edilmiştir (Barth and Gaillardin, 1997).

2.4.6.2 *Y. lipolytica* mayasından ara moleküllerin üretimi

Yarrowia lipolytica mayası özellikle TCA-döngüsü ara metabolitleri olan sitrik asit (CA), izositrik asit (ICA), 2-ketoglutarik asit (KG) ve purivik asit (PY) gibi organik asitleri bol miktarda üretilip besiyerine salgılama yeteneği ile tanınmaktadır (Barth and Gaillardin, 1997; Kamzolova et al., 2009, 2012; Moeller et al., 2011; Rywinska et al., 2012; Groenewald et al., 2013). Bu organik asitler, azot kaynağı, tiamin, fosfat ve mineral tuz bileşiklerinin (P, S, Mg) eksikliğinde ve düşük maliyetli karbon kaynaklarından (alkanlar, bitkisel yağlar, etanol, melas, nişasta hidrolizatı) üretilmektedir. Azot açlığı CA ve ICA salgılamasını tetiklerken; düşük pH' da tiamin eksikliğinde temel olarak KG ve PY salgılanmaktadır. *Y. lipolytica* geleneksel olarak melas üzerinde büyütülen *Aspergillus niger*' in sitrat üretme prosesine alternatif olarak önerilmektedir. Çünkü geleneksel prosesde çevreye zararlı önemli miktarlarda katı ve sıvı atık birikimi olmaktadır. Farklı substratları sitrik asit üretiminde kullanan *Y. lipolytica* mayası kesikli beslemeli fermentörde 250 g/L' ye varan CA üretme kapasitesindedir. Dahası, *Y. lipolytica* şeker toleransı, ürün izolasyonunun kolaylığı, atık minimizasyonu gibi avantajlar da sağlamaktadır. Bununla birlikte, CA üretiminde *Y. lipolytica*' ın kullanılmasının bir dezavantajı CA ve ICA' ın eş zamanlı olarak üretilmesidir. Glukoz, gliserol veya etanol üzerinde CA/ICA oranı 90:10 iken bu oran trigliseritler ve alkanlar üzerinde 60:40' a düşmektedir. Ayrıca, *Y. lipolytica* KG' yı % 90 verimlilikle alkanların varlığında büyütüldüğünde 195 g/L civarında bir verimle üretilmiştir. Bu üretim seviyeleri *Y. lipolytica*' ın CA ve KG üretimi için kullanışlı olabileceğini göstermektedir. (Barth and Gaillardin, 1997).

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) sitrik asit üretiminde *Y. lipolytica* mayasının kullanılmasını “genellikle güvenilir kabul edilir” (GRAS) statüsünde değerlendirmektedir. Yaklaşık 45 yıl önce, Pfizer şirketi sitrik asit için *Yarrowia*-temelli bir proses geliştirmiş, daha sonra Pfizer şirketi sitrik asit işletmesini Archer Daniels Midland şirketine satmış ve hala bu

şirketin Decatur'da bulunan fabrikasında sitrik asit üretimi *Yarrowia lipolytica* kullanılarak gerçekleştirildiği literatürde belirtilmektedir (Groenewald et al., 2013).

2.4.6.3 *Y. lipolytica*' ın Biyoremediasyonda Kullanımı

Hidrokarbon ile kontamine toprakların biyoremediasyonu

Petrol kirliliği ekolojik ve çevresel zararlarının en önemli sebeplerinden birisidir. Bu olay karada, denizde ve içme sularının bulunduğu çevrelerde meydana gelmektedir. *Y. lipolytica*' ın strainleri petrol ile kirlenmiş topraklardan izole edilip biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Avusturya' lı bir grup Alp dağlarından izole ettikleri bir psikrofilik *Y. lipolytica* straini bir sensör olarak kullanmışlardır. Laboratuvar çalışmalarında bu strain 0–30 °C sıcaklıkları arasında büyümekte olup (optimum 15–20 °C) dizel yağlarının % 68' ini 10 gün içinde parçalamıştır. Alp dağlarının biyoremediasyonunda bu strain ile yapılan daha ileri çalışmalar ile bu strainin toprakta bulunan toprak flora mikroorganizmalarını inorganik fertilizasyon ile biyolojik olarak uyararak psikrofilik strainlerin biyo-kütle artışına kıyasla çok daha verimli bir biyoremediasyon sistemi olduğunu göstermiştir. *Y. lipolytica* RM7/11 straininin saf hidrokarbon parçalama yeteneğini de araştırılmış ve 10°C, 8 günün sonunda n-hekzadekanın % 40' ı, n-dodekanın % 35' i parçalanmıştır (Bankar et al., 2009).

Bu psikrofilik izolatin en önemli uygulaması, orta uzunluklu alkanların gözlenmesi için bir biyosensör olarak kullanılmasıdır. Geleneksel olarak, alkanların analizi, oldukça maliyetli olan sıvı kromatografi ve gaz kromatografi-kütle spektrofotometri gibi duyarlı tekniklerle yapılmaktadır. Bununla birlikte, bazı teknikler yerinde büyük alan gözlenmesi için uygun değildir. Örnek hazırlama ve ekstraksiyon süreci zaman alıcı ve pahalı olup bazı cihazlar özel ekipman ihtiyacı da bulunmaktadır. Bu engelleri aşmak için yukarıda bahsi geçen psikrofilik *Y. lipolytica* RM7/11 straini temelli bir biyosensör klasik sisteme alternatif olarak geliştirilmiştir. Sensör oluşturulurken hücreler cam boncukların üzerine polietilenimin kullanılarak immobilize edilmiş ve daha sonra kapalı bir cam kolonda paketlenmiştir. Alkan asimilasyonu prosesi esnasında oksijen tüketimi bir Clark oksijen elektrodu kullanılarak saptanmıştır. Dedektör ile

kaydedici arasındaki bağlantı ile çıkan alkan on-line olarak gözlemlenmiştir. Oksijen tüketimi ve dodekan konsantrasyonu arasında linear ilişki 20 °C’ de 100 mM’ a kadar gözlemlenirken, en az saptama sınırı da 3 mM’ dır. Bu sensör soğuk iklimlerdeki biyoremediasyon prosesini ve yer altı sularının in situ analizini gerçekleştirmede de kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu rapor olası bir alan uygulaması geliştirmek için *Y. lipolytica*’ ın önemini vurgulamaktadır (Bankar et al., 2009).

Sucul çevrelerde biyoremediasyon

Denizlerde rutin gemi taşımacılığı, tankerlerden petrol transportu, gemileri dengelemekte kullanılan safra suyunun denizlere bırakılması gibi birçok faktör tarafından sürekli kirlenmektedir. Diğer taraftan, petrol tanker kazaları, deniz aşırı petrol platformlarından kaçaklar gibi kirletici sebeplerde deniz ve okyanuslarda akut petrol kirliliğinin sebebidir. Tuzu tolere edebilen *Y. lipolytica* NCIM 3589 straininin Hindistan’ daki ham petrolün alifatik fraksiyonunu büyük ölçüde degrade edebildiği rapor edilmiştir. Bu strain ayrıca saf alkanlardan n-hekzadekan (% 60), n-tetradekan (% 50), n-oktadekan (% 45), n- dekan (% 40) ve n-dedekani (% 40) 24 saat içerisinde parçalamaktadır (Zinjarde et al., 1998; Bankar et al., 2009).

Açık çevresel sistemlerde, işlevsel mikroorganizmanın dilüsyon etkisini engellemek için iki ana strateji kullanılmaktadır: (i) yağ-su ara yüzeyinde spesifik olarak oleofilik gübrenin kullanımı, (ii) hidrokarbon parçalayan mikroorganizmaların immobilizasyonudur. Parafinize edilmiş magnezyum amonyum fosfat formunda oleofilik gübrenin kullanımı petrol parçalamasını % 10–15 oranında arttırmıştır. Bütün-hücre immobilizasyon prosesi de bu sistemlere başarılı bir şekilde uygulanmıştır. *Y. lipolytica* NCIM 3589 agar-aljinat kompozit boncuklara immobilize edilmiştir ve aljinat hidrokarbonların parçalanması için uygun yüksek porosite sağlamıştır. Bazı immobilize hücreler alifatik fraksiyonları çok etkili bir şekilde parçalamış ve sürekli biçimde kullanılmıştır (Zinjarde and Pant, 2000). Diğer bir *Y. lipolytica* straini (180) petrol-absorbe edici poliüretan köpüğe (PUF) immobilize edilmiş ve su yüzeyinden petrol filmini etkili bir biçimde parçalamıştır. Yapılan denemeler sonucunda, test edilen Arap hafif

petrolünün alifatik fraksiyonunun % 50' sini ve aromatik fraksiyonun % 20 – 25' ini parçaladığı gösterilmiştir. Ayrıca, *Y. lipolytica* immobilizasyonunda kitinin kullanılmasının daha uygun bir matrik olacağı da belirtilmiştir (Bankar et al., 2009).

Hidrokarbon parçalanması ile ilişkili çalışmaların çoğu laboratuvar seviyesindedir. Bununla birlikte, petrolle kirlenmiş kumlu alanların doğal şartlarını simülasyonu üzerine yapılan bir raporda, alkan parçalanması esnasında *Candida maltosa* ve *Yarrowia lipolytica* mayalarının dominant oldukları ve ayrıca *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* ve *Candida tropicalis* gibi diğer maya strainlerinden çok daha etkili oldukları gösterilmiştir (Bankar et al., 2009).

2.4.6.4 Atıkların azaltılmasında *Y. lipolytica*' ın kullanılması

Farklı *Y. lipolytica* strainleri birçok atığın uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Özellikle zeytin karasuyu (OMW) ve palmiye yağı atık suyunun (POME) değerlendirilmesinde etkilidirler. Zeytinyağı işlenmesinden açığa çıkan yüksek kimyasal oksijen ihtiyacına sahip (COD) zeytin karasuyu özellikle Akdeniz havzasında ciddi problemlere sebep olmaktadır. Zeytin karasuyunun işlenmesinde *Y. lipolytica* ATCC 20255 straini başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu strain 24 saat içinde kimyasal oksijen ihtiyacını % 80 oranında azaltmıştır. Biyo-kütle verimi (tek hücre proteini) 22,45 g/L' dir. Başka bir *Y. lipolytica* straini (PO1) kimyasal oksijen ihtiyacını % 41,22' ye kadar indirgemiş ve diğer strainlerin bazıları sitrik asit üretirken diğer strainlerde yüksek lipaz aktivitesi göstermiştir (Bankar et al., 2009).

Diğer bir çalışmada ise *Y. lipolytica* W29 straini kalsiyum aljinata immobilize edilerek yağ atık sularını 50 saat içinde parçalayarak kimyasal oksijen ihtiyacını 2000 mg/L civarına indirmiştir. *Y. lipolytica* NCIM 3589 straini palmiye yağı atık suyunu 48 saat içerisinde % 90 oranında azalttığı rapor edilmiştir (Bankar et al., 2009).

2.4.6.5 *Y. lipolytica* mayasının biyodönüşümde kullanılması

***γ*-lakton aromasının üretimi**

γ-Dekalakton meyve yağlarında bulunan aromalardır. Çilek, kayısı ve şeftali gibi bazı meyve aromalarının formülasyonunda ve ayrıca ekmek ve viski gibi birçok fermente üründe kullanılmaktadır. Tat katma uygulamalarında en önemli uygulama alanını laktonlar oluşturmaktadır ve yıllık yüzlerce tona varan pazarı bulunmaktadır. Hint yağının *Y. lipolytica* tarafından mikrobiyal olarak kolayca laktonlara dönüşmektedir ve bu prostesten elde edilen verim en yüksek ürün konsantrasyonuna ulaşmaktadır (Fickers et al., 2005).

Bu süreçte, 4-hidroksi-dekanoik asidin (C10) oluşumuna kadar risinoleil-CoA' ın (C18) β -oksidasyonuna gerek duyulmaktadır. Üretimin en önemli parçasını β -oksidasyonun kontrolü oluşturduğundan açıl-CoA oksidaz eksik *Y. lipolytica* mutantları verim artışının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu amaçla iki strateji uygulanmıştır: (i) C10 lakton-öncüllerinin β -oksidasyonunun azaltılması; (ii) C10' dan daha kısa açıl-CoA' ın β -oksidasyonunda içerilen enzimlerin delesyonu ile aroma bileşiklerinin parçalanmasıdır. İkinci strateji için, iki β -oksidasyon döngüsü arasındaki metabolitlerin varlığı global açıl-CoA oksidaz aktivitesinin azaltılması yolu ile avantajlı hale gelmektedir (Fickers et al., 2005).

Hekzanal aroma üretimi

Y. lipolytica mayasının hidrofobik substratlara karşı olan eğilimi ve lipit türevli bitkisel aroma üretimi için heterolog bir biyo-dönüşüm sistemini ifade edebilmesi için bu türün seçilimini arttıran genetik araçları da düşündüğümüzde, lipoksigenaz/hidroksiperoksidaz liyaz (HPL) yol izinin ürünleri olan bu ürünler, bitki stresine karşı üretilmektedir. İlk enzim poly-doymamış C18-yağ asitlerini ikinci bir enzim ile parçalanacak olan hidroksiperoksidazlara dönüştürmektedir. Bu bileşikler uçucu aldehitler olup bitkilerin lezzetlerinde bir artışa sebep olmaktadır. Bazı proseslerde bitkilerden bu ürünleri üretmek için geliştirilmekle birlikte liyazların büyük instabilizasyonu nedeniyle üretim çok kısa sürede

durmaktadır. *Y. lipolitca*' da HPL ifadesi daha fazla hekzanalın yüksek verimle üretilmesini sağlamıştır (Fickers et al., 2005).

***Y. lipolitca*' da 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) transformasyonu**

Son 20-30 yıldır, 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) gibi patlamalar sonucunda topraklar, yüzey suları ve yeraltı suları kirlenmektedir. TNT karsinogenik özellik göstermesinden dolayı biyoremediasyonu zorunlu kimyasallardandır. *Y. lipolitca* tarafından TNT detoksifikasyonunda iki yol izinden gerçekleşmektedir: (i) direkt aromatik halkanın indirgenmesi ve (ii) nitro grubunun indirgenmesi. Tropikal denizsel *Y. lipolitca* NCIM 3589 straini TNT' yi tek karbon ve azot kaynağı olarak kullanamamaktadır. Ancak glukoz ve amonyum sülfat içeren besiyerlerinde TNT' yi tamamen transforme etmektedir. Ana yol izini oluşturan nitro gruplarının indirgenmesi aşaması sonucunda amino türevleri (turuncu renkli) oluşmaktadır. Bununla birlikte, glukoz konsantrasyonunda bir artış hidrit-Meisenheimer kompleksi (H-TNT – kırmızı şarap rengine) ara molekül oluşması ile halka indirgenmesi sağlanabilmektedir. Bu hidrit, daha sonra, 2,4-dinitrotoluen ve 2-nitrotoluene ardışık şekilde denitre edilmekte ve bu iki bileşikte diğer mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanılarak TNT' in tamamen detoksifikasyonunu sağlamaktadır (Bankar et al., 2009).

Ekonomik önemi olan ürünlerin biyotransformasyonu

Y. lipolitca eritritol ve mannitol üretiminde özellikle uzak doğuda kullanılmaktadır. Çünkü eritritol tatlandırıcı, aroma arttırıcı, formülasyon yardımcısı, nem tutucu, stabilizer, kıvam arttırıcı ve metal bağlayıcı gibi özelliklerinden dolayı gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Çin, Japonya, Kore ve Norveç' de dağıtılan bu ürün *Yarrowia*-türevli eritritolün GRAS başvurusu yapılmıştır (Groenewald et al., 2013).

Yağ cisimcikleri adı verilen ve *Y. lipolytica*' ın hücre içerisinde büyük miktarlarda biriktirilen bu ürün lipofilik ürünlerin aşırı üretimi için yenilik sunmaktadır. Linoleik asit yabanıl *Y. lipolytica* hücreleri tarafından sentezlenmektedir, buna karşılık genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak

elde edilen rekombinant strainler eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid, arachidonic acid, konjuge linoleik asit veya γ -linoleik asitleri aşırı miktarda üretmekte olduğundan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesine (FDA) *Yarrowia*-türevli EPA-zenginleştirilmiş yağlar için GRAS başvurusu yapılmıştır (Groenewald et al., 2013).

Y. lipolytica' ın hücreleri ve lipazları enantiyoselektif çözünürlük (hidroliz, oksidasyon veya redüksiyon) ve re-esterifikasyon reaksiyonlarına uygulanabilmektedir. Özellikle farmasötik endüstrisinde enantiyomerik olarak saf moleküllere olan ihtiyaç, her iki enantiyomerlerin farmakolojik etkisi üzerine gerekli yasal düzenlemeler sağladığından gelişmektedir. Tek bir enantiyomerin ilaç olarak pazarı her sene yaklaşık % 10 artmakta olup 2002' de dünya çapında 160 milyar dolara ulaşmıştır. Rasemik bir karışımın enzimatik yöntemle çözülmesi oldukça ilgi çekici olup *Y. lipolytica*' ın Lip2p ekstrasellüler lipazı 2-halogeno-karboksilik asitlerin çözünürlüğü için oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Bu asidik ara ürün birçok ilacın (analjezik, prostaglandin, prostosiklin, yarı-sentetik penisilin) üretiminde yer almaktadır. *Y. lipolytica*' ın Lip2 lipazı tarafından katalizlenen 2-bromo-*p*-tolilasetik asit etil esterlerin çözünürlüğünü, bir *S*-enantiyomerlik gösterir ki ve bu *Burkholderia cepacia* lipazından elde edilen sonuç ile en iyi benzerlik göstermektedir. Ticari lipazların hiçbiri rasemik karışımının çözünürlüğünü sağlayamamaktadır. Bununla birlikte, analjezik ve peptid içermeyen angiotensin II-reseptör antagonistiklerinin bir öncül molekülü olan 2-bromo-*o*-tolilasetik asit *Y. lipolytica* lipazı tarafından çözülebilmektedir. *Y. lipolytica* elde edilen lipaz bu çözünürlüğü sağlayabilecek tek enzimdir. Aynı zamanda, *Y. lipolytica* lipazı *B. cepacia*' dan elde edilen lipazdan yüz kat daha fazla aktif olduğu bilinmektedir (Fickers et al., 2005).

Y. lipolytica mayasının farklı bileşikleri hidroksilleme kapasitesi yüksektir. Bu özellik onun farklı biyotransformasyon proseslerini gerçekleştirmesi ile açıklanmaktadır. Kiral β -hidroksi karboksilik asit optik olarak aktif farmasötiklerin sentezinde kullanılan bir ara bileşiktir. Bir *Y. lipolytica* mutant straini (KCCM50506-Kore straini) β -hidroksi bütirik asidi sentezleme kapasitesindedir. Yabani-tip strainler β -hidroksi asidi akümüle etme

kapasitesinde değildirler. Glukoz gibi hızlı kullanılan bir karbon kaynağı varlığında bu mutant hidrokşi asitleri akümüle etmektedir (Bankar et al., 2009).

L-Dopa (3,4-dihidroksi fenil L-alanin) Parkinson hastalığında kullanılan bir ilaç olup, *Aspergillus oryzae* ve *Erwinia herbicola*' in mutantlarından L-tirozinin L-Dopa' ya biyotransformasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. *Y. lipolytica*' ın hızlı büyümesi, çevre dostu doğası ve bu transformasyonu kolay gerçekleştirmesi açısından potansiyel bir aday olarak değerlendirilmektedir. L-tirozinin L-Dopa' ya dönüşümü birkaç hidroksilleme aşaması içermektedir. *Y. lipolytica* kahve renkli bir pigment olan melanini sentezlemektedir. Bu dönüşümün ilk reaksiyonu L-tirozinin L-Dopa' ya dönüşümüdür. Sonraki aşamada L-Dopa domamin, melanin ve mealanozin'e dönüştürülmektedir. Diatomit varlığında, L-tirozinin L-Dopa' ya dönüşümü *Y. lipolytica* tarafından doğal olarak gerçekleştirilmektedir. L-tirozin diatomite yüksek bağlanma afinitesi sahiptir. Bu durum tirozinaz enziminin salgılanmasını indükleyerek L-Dopa sentezini arttıracak şekilde reaksiyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Sonuç olarak, biyotransformasyon başladıktan 15 dakika sonra 2,0 mg/ml diatomit eklendikten sonra, L-tirozinden (2,68 mg/ml) 2,96 mg/ ml verimle L-Dopa üretilmektedir. Reaksiyon zamanı (30 dakika) ve maya hücresi konsantrasyonu (2,5 mg/ml) optimize edildikten sonra 12,5 kat oranda yüksek L-Dopa üretimi sağlanmıştır (Bankar et al., 2009).

6,7-epoksigeraniol' ün halkalı hale transformasyonu diğer bir önemli proses olarak rapor edilmiştir. Bu bileşiğin biyotransformasyonu üzerine yapılan çalışmalar esnasında *Y. lipolytica* (AR71), *Botryis cinerea* ve *S. cerevisiae* fungusları 6,7-epoksigeraniol' ün 2-metil-2-(2-hidroksietil)-5-(2-hidroksiprop-2-il) tetrahidrofurana dönüşümünü gerçekleştirdiği ve *Y. lipolytica*' nın 5 gün içerisinde % 99 verimlilikle en yüksek halkalı yapıya biyotransformasyonunu gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir (Bankar et al., 2009).

2.4.6.6 *Y. lipolytica* mayasının gıda endüstrisinde kullanımı

Birçok çalışma *Y. lipolytica* mayasının çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunduğunu göstermektedir ve bu mayanın gıda-tarım endüstrisi için önemli olduğunun altı çizilmektedir. Özellikle *Y. lipolytica*' nın da olduğu farklı

mayaların geleneksel süt ürünleri, sucuk ve diğr et ürünlerindeki varlığı, gıda endüstrisinde üretim, olgunlaşma ve bozunmada görev aldıkları nı göstermektedir. Portekiz tipi peynir üretimi esnasında pigment oluşumu zerine *Y. lipolytica*' ın etkisi son yıllarda çalışılmış olup bu peynirin olgunlaşmasında görev aldığı rapor edilmiştir. Diğr peynirlere *Y. lipolytica*' nın eklenmesinin olgunlaşmayı arttırdığı ve peynir kalitesini ykselttiğı belirtilmiştir. Olgunlaştırılmış eddar peynirlerine *Y. lipolytica* ve *D. Hansenii*' nin starter kültür olarak ilave edildiğı birçok kaynakta belirtilmektedir. Geniş bir proteaz ve lipaz aktivitesi olduğundan süt endüstrisinde *Y. lipolytica* strainlerin seçimi oldukça önemlidir (Fickers et al., 2005).

2.4.6.7 *Y. lipolytica*' ın metallere etkileşimi

Ağır metallere ve kirleticiler endüstriyel süreçler ve antropojenik aktiviteler sonucunda sucuk ve karasal çevrelerde birirmektedir. Bu kirleticilerin birçoğu insanlara toksik olmakla birlikte evre üzerinde ciddi olumsuz sonuçları bulunmaktadır. *Y. lipolytica* ağır metallere birlikte diğr kirleticileri tolere etme kapasitesindedir. Melanin varlığında ve Zn-süperoksid dismutazın (SOD) bakır tolerasında görev almaktadır. 2 – 4 mM bakır varlığında *Y. lipolytica* büyümesi esnasında, büyüme hızı, lag faz uzamasına rağmen etkilenmemektedir. Düşük bakırın konsantrasyonları sitozolde biriktirilmekte ve bir eşik değerin üzerinde metal konsantrasyonları üzerinde indüklenen doğal metal atma sistemi ile uzaklaştırılmaktadır. Kahverengi pigment olan melaninin üretiminde bakırın bağlanması ve akmlasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Hücre eperi metal iyonlarının hücreye girmesinde ana engellerden birisidir. Ek olarak, Zn-süperoksit dismutaz enzim seviyeleri keza etkilenmektedir. Bu enzimin metal iyonları tarafından üretilen toksik aktif oksijen türlerinden kaynaklanan zararlara karşı hücreyi koruduğu bilinmektedir. *YICRF1* geni, sitozolde bulunan bakır-duyarlı transkripsiyon faktörünü kodladığı tanılanmıştır. Sitolde bulunan CRF1' in rolünün metallothionein' lerin (sisteince zengin düşük moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı proteinler) bakır dirençliliğinin gelişmesinde SOD enzimiyle birlikte görev aldığı bulunmuştur (Bankar et al., 2009).

Y. lipolytica CCM 4510 straininin Zn, Co, Ni, Cd metallerine karşı tolerans gösterdiği rapor edilmiştir. Hücre çeperi ve hücre membranı yapılarında yüksek metal konsantrasyonlarını depolamak için büyük bölgelerin olduğu bulunmuştur. Metal toksisitesi ve metallothioneinler arasındaki ters bağlantı bulunmaktadır. Toksik metallerin hücre içi konsantrasyonu düşük iken hücrelerde metallothioneinlerin yüksek konsantrasyonları bulunmaktadır. Diğer taraftan, hücre için gerekli metallerin konsantrasyonu yüksek iken metallothioneinlerin konsantrasyonu düşüktür. Bir çalışmada toksik ağır metallerin detoksifikasyonunda metallothioneinlerin önemi gösterilmiştir. Alüminyumun *Y. lipolytica* büyümesi üzerine etkisi araştırılmış ve 0,5 – 1 mM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ' den hücre büyümesi etkilenmemiş ancak filament oluşumu inhibe edilmiştir. Alüminyuma maruz kalan hücreler H^+ fazlasını atan güçlü bir sistem sayesinde pH' da güçlü bir düşme meydana getirmiştir. pH' daki bu ani düşüşün misel oluşumunu inhibe ettiği ve güçlü bir H^+ atış sisteminin rolü ile alüminyum toleransında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Bankar et al., 2009).

2.4.6.8 *Y. lipolytica*' dan yeni doğal enzimlerin üretimi ve uygulamaları

Y. lipolytica' dan hidrofobik substratların kullanımında görev alan lipaz, proteaz, fosfataz gibi endüstriyel önemi olan enzimleri üretimi Barth ve Gaillardin (1997) tarafından derlenmiştir ancak bu derleme de bütün detayları kapsamamaktadır. Son yıllarda, *Y. lipolytica*' ın kendisinden doğal olarak üretilen inulinaz, α -mannosidaz, esteraz ve spesifik lipazlar gibi veya bu mayada heterolog protein olarak ifade edilen lakkaz, β -glukanaz, proteaz, alginat liyaz ve epoksi hidrolaz (EH) gibi enzimler üretilmiş ve uygulama alanı bulmuştur (Bankar et al., 2009).

Karbohidratlar üzerine etkili olan iki enzimden ilki olan inulinazlar son yıllarda *Y. lipolytica*' da rapor edilmiştir. İnulinaz enzimi fruktoz polimeri olan inulinin (β -(2-1)-bağlı fruktoz) hidrolizini katalizlemektedir. İnulin özellikle yer elması, Dahlia yumruları ve hindiba kökü gibi bitkilerde depo edilen karbohidratlardandır. İnulin inulinazlar tarafından hidrolize edilerek yakıt etanol ve yüksek früktoz şurubu üretimi için talep edilen ürün sunmaktadır. *Candida*, *Sporotrichum*, *Pichia* ve *Kluyveromyces* genuslarına ait mayaların inulinaz

enziminin ticari olarak kabul edilebilir verimlilikte üretim için bir potansiyel vaad ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, Gao et al. (2007) denizsel bir *Y. lipolytica* straininin 62,85 U/ml inulinaz salgıladığını rapor etmiştir. Bu enzimin optimum pH' sının 5,0, sıcaklık optimumunun 60 °C olduğu belirtilmiş ve şekerleme ile diğer gıda ürünlerinde kullanılabileceği söylenmektedir (Bankar et al., 2009).

Ekzo- α -mannosidazlar, α -D-mannosidlerdeki α -D-mannoz residüllerindeki terminal indirgenmemiş residülleri hidrolizlemektedir. Bazı mannosidazlar glikoproteinlerin N-bağılı şeker zincirinin işlenmesinde görev almakta ve terminal mannosidik residüllere karşı yüksek spesifite göstermektedir. *Y. lipolytica* tarafından üretilen ekzo- α -mannosidaz enzimi hücre ekstraktının ham partikül fraksiyonunda yer alıp optimum pH' sı 6,0' dır (Bankar et al., 2009).

Y. lipolytica' dan esteraz ve lipaz enzimlerini kodlayan genler klonlanmış, protein dizisi çıkartılmış ve bazı endüstriyel uygulamaları bilinmesine rağmen esteraz ve epoksi hidrolazlar son zamanlarda enanthio-seçici transformasyonlarda kullanılmaktadır. Denizden izole edilmiş *Y. lipolytica* CL180 straininin enanthio-seçici esteraz enzimi ofloksasin ester rasemik karışımının çözülmesinde kullanılmaktadır. Ofloksasin, bir rasemik karışım olarak bir florokinolon olarak işlevsel olup S formu (levofloksasin) biyolojik olarak aktif bir enantiomerdir. CL180 straini R ve S-ofloksasin esterlerini % 52 enantiomerik fazlalık ile üretmektedir (Bankar et al., 2009). Keza lipazlar da farmasötik açıdan değerli ara bileşiklerin enantiomerik çözünürlüğünde görev almaktadır. *Y. lipolytica*' ın ekstrasellüler lipazı 2-bromo-arilasetik asit esterlerinin çözülmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca n-oktandaki l-oktanollü R-formunun transesterifikasyonu ve S-enantiomerine dönüştürmede de kullanılmaktadır. Bu ekstrasellüler lipaz 2-bromo-o-tolilasetik asit etil esterlerinin katalizlenmesinde de iş görmektedir. *Y. lipolytica*' dan elde edilen esteraz ve lipazlar yukarıda adı geçen kiral bileşiklerin rasemik karışımından S-formunun zenginleştirilmesinde başarılı şekilde kullanılmaktadır (Bankar et al., 2009).

2.4.7 *Y. lipolytica* mayasında heterolog proteinlerin klonlanması ve üretimi

Y. lipolytica hem akademik amaçlar hem de olası ticari uygulamalar için güvenilir, çok yönlü ve popüler bir heterolog protein ifade sistemi sağlamaktadır. Bu mayanın birçok proteini doğal olarak salgılama yeteneği ilave avantajlar sağlamaktadır. Düşük aşırıglukolizasyon, yüksek salgılama verimliliği, iyi ürün verimi ve performans tekrarlanması gibi özellikleri de diğer avantajlarını oluşturmaktadır (Madzak et al., 2004; Bankar et al., 2009). Madzak et al. (2004) yapılan derlemede *Yarrowia lipolytica*' dan 42 heterolog protein üretildiği belirtilmiştir. Son yıllarda, ekonomik önemi olan bazı enzimler *Y. lipolytica*' da klonlanmış ve ifade edilmiştir. Çevre açısından önemli enzimlerden olan lakkazlar fenoller ve ilgili bileşiklerin oksidasyonunda görev almaktadırlar. Bu enzim ligninin parçalanmasında ve pestisid, boyalar ve polisiklik aromatik hidrokarbonların transformasyonunda rol oynamaktadırlar. Bu enzim, biyo-hücrelerde oksijen katotların gelişiminde, ksenobiyotiklerin biyolojik-parçalanmasında, biyosensörlerde, immunoassaylerin işaretlenmesinde uygulama alanı bulmaktadır. Beyaz-çürükçül mantar olan *Trametes versicolor*' dan elde edilen bir lakkaz *Y. lipolytica*' da ifade edilmiştir ve bir sinyal peptitle beraber 499-amino asitlik lac III b' in tam uzunluklu cDNA' sı klonlanmış ve 2,5 mg/L veya 0,23 U/L olacak şekilde ifade ettirilmiştir (Bankar et al., 2009).

Saf β -glukonazın yüksek seviyeleri *Y. lipolytica*' da ifade edilmiş bir birleştirilmiş FLAG epitoplu *Aspergillus fumigatus*' dan elde edilmiştir. FLAG epitopu afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları kolay olup konakçının diğer salgılama protein kontaminantlarından etkili bir şekilde uzaklaştırılmaktadır. Bu enzim *Candida albicans*' ın hücre çeperinden elde edilen β -1,6,-glukan polimerini parçalamasını sağlayarak hücre çeperinde yer alan glikozilfosfatidilinositol gömülü proteinlerin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Keza, β -glukonaz fungal hücre çeperinde yer alan mannoproteinlerin diğer üyelerinin izolasyonunda da kullanılmaktadır (Bankar et al., 2009).

Yüzey display vektörlerinin (pINA1317-YICWP110) gelişmesi ve ticari hale gelmesiyle *Y. lipolytica* daha popüler bir sistem haline gelmiştir. Denizsel *Aureobasidium pullulans* HN2-3 mayasından alkalın proteaz geni klonlanmış, bu

yüzey display vektörün çoklu klonlama bölgelerine birleştirilmiş ve *Y. lipolytica* hücrelerinde ifade edilmiştir. YICWP110-cDNAALP2 taşıyan transformantlar alkalın proteaz aktivitesine (691,26 U/g) sahiptir. Alkalın proteaz aktivitesi gösteren hücreler angiotensin-çevirici enzim (ACE) inhibitör aktivitesi ve farklı proteinlerden antioksidant aktivite gösteren biyoaktif peptitlerin üretiminde de kullanılmıştır. G7a straininin tek hücre proteinlerinden elde edilen peptitlerde en yüksek ACE inhibitör aktivitesi sağlanırken, *Spirulina* proteininden elde edilen peptitlerden en yüksek antioksidant aktivite gözlemlenmiştir (Bankar et al., 2009).

pINA1317-YICWP110 vektörü *Vibrio harveyi* bakterisinden elde edilen hemolizini klonlama ve aşırı ifade için de başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Hedef protein başarılı bir şekilde maya hücrelerinde gözlemlenmiş ve bu maya hücreleri eritrositleri parçalayarak rekombinant proteinin fonksiyonel olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçların ışığında, yüzey display sistemler biyokatalistlerin immobilizasyonunda, biyodönüşümünde, canlı aşılarda geliştirilmesinde kullanılacağı gösterilmiştir (Bankar et al., 2009).

2.5 *Y. lipolytica* ve diğer organizmalar tarafından üretilen enzim tipleri

Enzimler çok sayıda kimyasal reaksiyonu yöneten biyokatalizörler olarak bilinmektedir ve deterjan, gıda, ilaç sanayi, diagnostik ve kimya endüstrisinde ticari olarak kullanılmaktadır. Tanımlanmış 3000' den fazla enzim, mezofilik organizmalardan izole edilmiştir (Kumar and Takagi, 1999). Bu enzimler, genel olarak, dar bir pH, sıcaklık ve iyonik etkide fonksiyon göstermektedir. Ayrıca, endüstriyel şartlar altında, enzimlerin teknolojik uygulamaları tavsiye edilmeyen enzim deposu olarak bilinmektedir. Dolayısıyla, yeni mikrobiyal kaynaklar için araştırmalar sürekli, fakat en önemlisi de biyoçeşitliliği oluşturmaktadır. Ekstremofil olarak bilinen çeşitli uç çevrelerdeki mikroorganizmalar, enzimlerin önemli bir kaynağı olarak düşünülmektedir (Telefoncu, 1997; Akpınar, 2008).

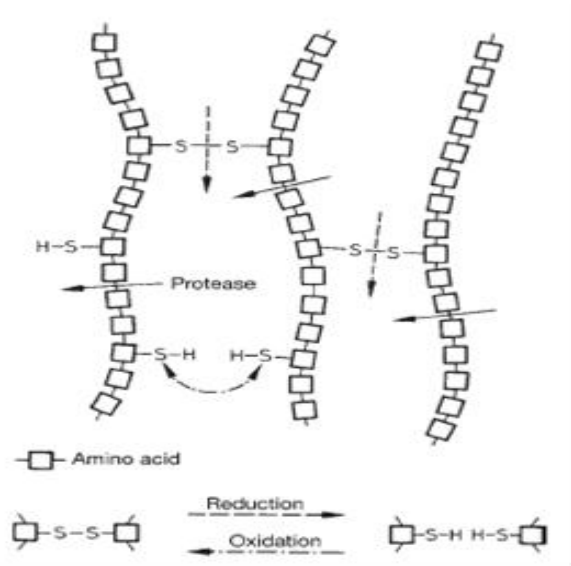
Enzimlerin uygulama alanlarının her geçen gün artması enzimlerin daha ekonomik, daha etkin tekniklerle üretilmesini daha da önemli kılmıştır. Potansiyel enzim kaynakları olarak da mikroorganizmalar çok caziptir. Bu çekiciliğin sebebi,

Çevresel etkiler ve genetik manip lasyonlarla enzim miktarlarının arttırılabilmesidir. Kuşkusuz yüksek enzim aktivitesi enzim izolasyonunu da kolaylaştıracaktır (Telefoncu, 1997; Akpınar, 2008).

Endüstriyel uygulama alanı bulmuş enzimlerin çoğu hidrolaz sınıfındadır ve büyük ölçüde mikrobiyal kaynaklıdır (Telefoncu, 1997). Hidrolazlar enzimlerin farklı ve büyük bir grubunu oluşturur ve 1500'den fazla hidrolaz karakterize edilmiştir. Hidrolazlar basit bir substratdaki spesifik bir bağın kırılmasından çeşitli makromolek llerdeki birçok bağ arasında değişen geniş bir substrat molekül grubunu hidrolizlemektedirler (Telefoncu, 1997; Akpınar, 2008).

2.5.1 Proteaz enzimi

Proteazlar hem fizyolojik hem de ticari alanlardaki uygulamaları bakımından enzim sınıfı içinde merkezi bir yer teşkil etmektedir. Proteolitik enzimler diğer proteinlerde bulunan peptid bağlarını hidrolizlerler. Analitik tekniklerdeki ilerlemeler sayesinde proteazların oldukça spesifik ve seçici aktivite gösterdikleri belirtilmiştir. 1998 yılında dünya çapında endüstriyel enzim satışının yaklaşık 1 milyar \$ tahmin edilirken 2010 yılında bu rakam 3,3 milyara \$ kadar yükselmiştir (Rao et al., 1998; Abidi et al., 2011). Endüstriyel enzimlerin % 75' ini hidrolitik enzimler oluştururken; endüstriyel enzimlerin en büyük grubunu oluşturan proteazlar bütün enzim satışının % 60' ını kapsamaktadır. Proteazlar hücresel seviyeden organ ya da organizma seviyesine kadar birçok proste görev almaktadırlar. Proteaz enzimi bitki, hayvan ve mikroorganizmalarında olduğu birçok canlıda üretilmektedir (Rao et al., 1998). Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması şekil 2.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2 Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması (Aehle, 2007; Akpınar, 2008).

2.5.1.1 Proteazların sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği' nin Nomenklatur Komitesine göre, proteazlar hidrolaz (grup 3) sınıfında 4. alt grupta sınıflandırılmaktadırlar. Bununla birlikte, proteazların enzim sınıflandırmasında genel sisteme kolayca yerleştirilememektedir. Çünkü proteazlar hem etki hem de yapısal olarak geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Son zamanlarda proteazlar, (i) kaynağına; (ii) aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına ve (iii) katalitik bölgedeki işlevlerine göre üç ana kritere göre sınıflandırılmaktadır (Rao et al., 1998) (Çizelge 2.5).

Proteazlar etki ettikleri alana bağlı olarak da ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere 2 büyük gruba ayrılırlar. Ekzopeptidazlar substrattaki peptid bağıını amino (N-) ya da karboksil (-C) ucundan keserlerken, endopeptidazlar substrattaki peptid bağıını N- ve -C uçlarından farklı bölgelerden keserler. Ekzopeptidazlar N ya da C ucundaki işlev bölgesine göre iki gruba ayrılırlar. Ekzopeptidazlar katalitik mekanizma temeline göre de sınıflandırılabilirler (Rao et al., 1998).

Çizelge 2.5 Proteazların sınıflandırılması.

1. Kaynağına göre proteazlar
1.1. Bitkisel proteazlar
1.2. Hayvansal proteazlar
1.3. Mikrobiyal proteazlar
2. Aktif Bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar
2.1. Serin proteazlar
2.2. Sistein proteazlar
2.3. Aspartil proteazlar
2.4. Metalo proteazlar
3. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar
3.1. Ekzo peptidazlar
3.1.1. Aminopeptidazlar
3.1.2. Karboksi peptidazlar
3.1.2.1 Serin tipi
3.1.2.2. Sistein tipi
3.1.2.3. Metalo tipi
3.2. Endo peptidazlar
3.2.1 Serin proteazlar
3.2.2 Sistein proteazlar
3.2.3 Aspartil proteazlar
3.2.4. Metalo proteazlar

Ekzopeptidazlar sadece polipeptid zincirinin uçlarına etki ederler. Etki ettikleri uç baz alınarak N-terminal yada C-terminal sırası ile amino- ve karboksi peptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Amino peptidazlar polipeptid zincirinin serbest bir N ucunda işlevseldir ve tek bir amino asit rezidüsünü bir dipeptidi ya da bir tripeptidi ayırır. Amino peptidazların N-terminal metiyonini uzaklaştırdığı bilinir. Bakteri ve fungusları içeren mikrobiyal türlerin geniş bir çeşidinde bulunurlar. Genellikle hücre içi enzimlerdir fakat *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen aminopeptidaz hücre dışı enzimdir. Bakteri ve fungustan üretilen aminopeptidazların substrat spesifisiteleri hidroliz ürünlerinin yapıları temel alındığında farklı olabilir. Karboksi peptidazlar polipeptid zincirinin C ucunda işlevseldir ve tek bir amino asit ya da bir dipeptidi ayırırlar. Karboksi peptidazlar enzimlerin aktif bölgesindeki amino asit kalıntılarının yapısına göre üç gruba ayrılırlar. *Penicillium*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus* cinslerinin türlerinden izole edilen serin karboksipeptidazların substrat spesifisiteleri aynıdır fakat

optimum pH, stabilite, moleküler ağırlık ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikleri farklıdır (Rao et al., 1998).

Endopeptidazlar peptid zincirinin N- ve -C terminal uçları dışında zincirin iç bölgelerindeki peptid bağlarına etki etmeleri ile karakterize edilirler. Serbest amino ya da karboksil grubunun varlığı enzimatik aktivite üzerine negatif etki yaratır. Katalitik etki mekanizmalarını göz önüne alınarak serin, sistein, aspartil ve metalo proteaz olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Ayrıca endopeptidazlar substrat tercihlerine göre tripsin, kimotripsin ve elastaz benzeri serin proteazlar olmak üzere üç sınıfta toplanırlar. Tripsin benzeri serin proteazlar pozitif yüklü kalıntıdan sonraki peptid bağı, kimotripsin benzeri serin proteazlar büyük hidrofobik kalıntıdan sonraki peptid bağı, elastaz benzeri serin proteazlar ise küçük hidrofobik kalıntıdan sonraki peptid bağı hidrolizlerler (Rao et al., 1998).

Serin endopeptidazlar katalitik işlemde aktif bölge merkezinde serin, sistein tip peptidazlar ise aktif merkezinde sistein içerirler. Aspartik endopeptidazlar katalitik aktiviteleri için katalitik bölgelerinde iki aspartik asit kalıntısına ihtiyaç duyarlarken metalo endopeptidazlar sahip oldukları katalitik mekanizmalarında yaygın olarak çinko veya metal iyonlarını kullanırlar (Rao et al., 1998).

2.5.1.2 Katalitik mekanizmalarına göre proteazlar

Proteolitik enzimler katalitik bölgenin kimyasal yapısına ya da aktif bölgede yer alan zorunlu amino asit kalıntısı dikkate alınarak; serin, aspartik (asit), sistein ve metallo-proteazlar olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar (Rao et al., 1998).

Serin proteazlar

Serin proteazlar, aktif bölgelerindeki zorunlu serin kalıntısı varlığı ile karakterize edilirler. Proteazların en sıklıkla rastlanan sınıfını oluştururlar ve arkealar, bakteriler, ökaryotlar ve virüslerden izole edilebilirler. Serin proteazlar; ekzopeptidaz, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omegapeptidazlar olmak üzere de gruplara ayrılırlar. Dört grupta evrimsel olarak aynı kökenden gelmektedir. İstisnalar dışında birçok serin proteazın moleküler ağırlığı 18 ile 35 kDa arasında

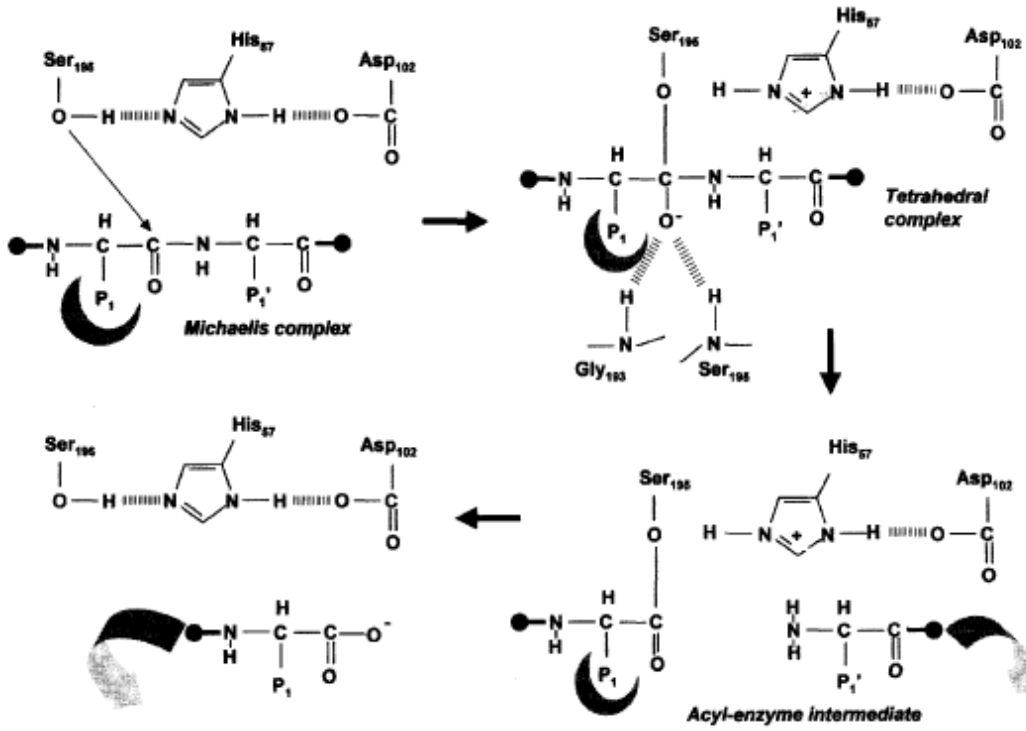
değişir ve maksimum aktivite gösterdikleri pH aralığı 7–11 arasındadır. Bu grup üyelerinin yapısal benzerlikleri göz önüne alınarak kendi aralarında da alt gruplara ayrılabilirler. Serin proteazların alt grubunda yer alan subtilizinler uygulama açısından bakıldığında çok büyük endüstriyel öneme sahiptirler. Bu grup enzimler *Bacillus* cinsi bakterilerden üretilirler ve deterjan katkı maddesi olarak geniş bir uygulama alanına sahiptirler (Rao et al., 1998).

Serin proteazların en tipik inhibitörü fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) olmakla birlikte, di-izopropilflorofosfat (DFP), tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK), 3,4-dikloroizokumarin (3,4-DCI) gibi inhibitörler tarafından da dönüşümsüz inhibisyona uğratılırlar. Serin proteazların bazıları p-kloromerküribenzoat (PCMB) gibi tiyol ayraçları tarafından da inhibe edilirler. Genellikle nötral ve alkali pH değerlerinde aktiftirler ve pH 7-11 arasında optimum aktivite gösterirler. İzoelektrik noktaları genellikle pH 4-7 arasındadır (Rao et al., 1998).

Bakteriler, funguslar ve mayalar tarafından üretilen ve serin proteazların alt grubunda yer alan serin alkali proteazlar serin proteazların en geniş alt grubunu temsil ederler ve yüksek alkali pH'da aktiftirler. Bu enzimler DFP ya da bir patates bitkisinden elde edilen proteaz inhibitörü tarafından inhibe olurlar fakat tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) ya da TLCK tarafından inhibisyona uğratılmazlar. Substrat spesifisiteleri aynıdır peptid bağıcı tirozin, fenilalanin ya da lösin' in karboksil ucundan hidrolizlerler. Optimum pH değerleri 10,0; izoelektrik noktaları da pH 9,0 civarındadır. Moleküler ağırlıkları 15-30 kDa arasında değişir. *Arthrobacter*, *Streptomyces* ve *Flavobacterium* cinslerine ait bazı bakteri türleri tarafından da üretilirler (Rao et al., 1998).

Serin proteazlar (EC 3.4.21) kimotripsin, tripsin ve elastaz gibi enzimleri içeren kimotripsin tip ve subtilisin gibi bakteriyel enzimleri içeren subtilisin tip olmak üzere iki farklı grupta da incelenebilir. Bu iki grubun katalitik mekanizmaları ve aktif bölge yapıları aynı olmasına rağmen genelde 3 boyutlu yapıları farklıdır. Katalitik bölgede katalizden sorumlu olan ve katalitik triad olarak da bilinen amino asitler Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ ve Asp¹⁰², dir (Rao et al., 1998). Serin proteazların en önemli özelliği, ilk ürün olarak substratın amino grubunun

ayrılmasına neden olan aktif bölgede yer alan Ser¹⁹⁵ kalıntısının oksijeni ile substratın açıl ayrılması arasında bir ester oluşturmaktadır. Serin peptidazlar tarafından peptit bağlarının parçalanmasında önemli olan diğer etmen ise peptit bağlarına atak yapan karbonil gruplarından oluşan oksijen anyonunun hidrojene bağlanmasını sağlayan iki ana –NH– gruplarının varlığıdır. –NH– gruplarının protein yapısal bütünlüğünde de görev aldığından bu etkinin kantitatif değerlendirmesi zordur (Beynon and Bond, 2001). Serin peptidaz mekanizması Şekil 2.3’ de özetlenmiştir.



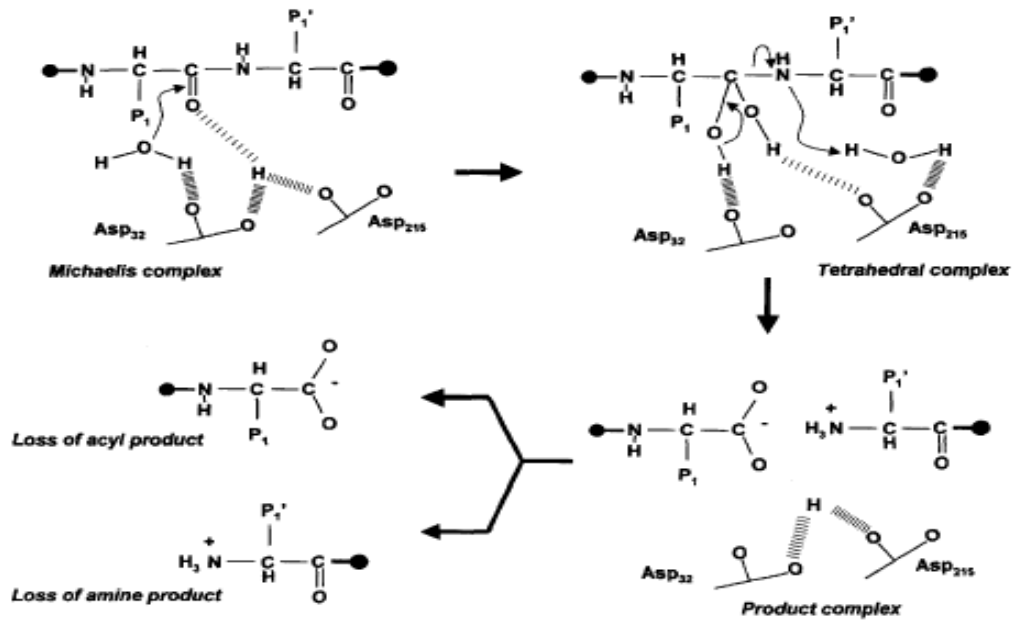
Şekil 2.3 Serin tip peptidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonların şematik gösterimi (Beynon and Bond, 2001).

Aspartik (asit) proteazlar

Aspartik proteazlar genel olarak asidik proteazlar olarak bilinir ve katalitik aktiviteleri için aspartik asit kalıntısına gereksinim duymaktadırlar. Asidik proteazlar üç gruba ayrılırlar: pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirusların enzimleri (A3) ve (A13) dür. A1 ve A2 aile üyeleri enzimler birbiri ile yakın ilişkili olup A3 ailesi ise A1 ve A2 aileleri ile çok benzerlik göstermektedir. Birçok aspartik proteaz düşük pH’ da (pH 3–4) en yüksek aktivite göstermektedir.

Ayrıca moleküler ağırlıkları 30 ila 45 kDa arasında olup izoelektrik noktaları pH 3–4,5 aralığında değişmektedir. Aspartik proteazlar özellikle pepstatin tarafından inhibe edilmekte; bakır iyonları varlığında diazoasetil-DL-norlösün metil ester (DAN) ve 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan (EPNP) gibi diazoketon bileşiklere karşı da duyarlıdırlar. Mikrobiyal aspartik proteazlar iki büyük gruba ayrılırlar: (i) *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* tarafından üretilen pepsin-benzeri enzimler ve (ii) *Endothia* ve *Mucor* spp. tarafından üretilen rennin-benzeri enzimlerdir (Rao et al., 1998).

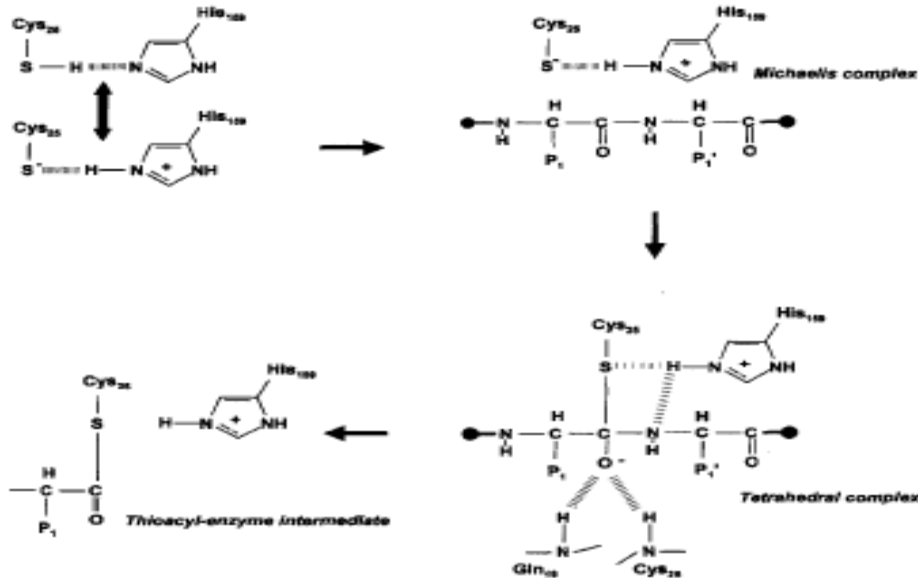
Aspartik proteazlar, peptit bağlarının parçalanmasında nükleofilik atak gerçekleştirmeden peptit bağlarının parçalanmasını katalizlemektedir. Dolayısıyla, enzim ve substratın bir parçası arasında herhangi bir kovalent ara bileşik oluşmamaktadır. Aspartik peptidazların katalitik biriminde iki aspartik asit zincirinden meydana gelmektedir. Aspartik proteazların karboksil gruplarında potansiyel bir nükleofil içermediğinden nükleofilik atak gerçekleştirememesi şaşırtıcı değildir. Bu grup enzimin optimum pH'sının düşük olması katalitik bölgede karboksil gruplarının doğal olarak içerilmesine yol açmaktadır (Beynon and Bond, 2001). Aspartik peptidaz mekanizması Şekil 2.4' de özetlenmiştir.



Şekil 2.4 Aspartik tip peptidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonların şematik gösterimi (Beynon and Bond, 2001).

Sistein (thiol) proteazlar

Sistein proteazlar hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunmaktadır. Sistein proteazların yaklaşık 20 ailesi tanımlanmıştır. Bütün sistein proteazların aktivitesi, onun katalitik diad' ını oluşturan sistein ve histidin' e bağlıdır. Sistein ve histidin sırası (Cys-His veya His-Cys) aileler arasında farklılık göstermektedir. Genel olarak sistein proteazlar sadece HCN veya sistein gibi indirgeyici ajanların varlığında aktiftirler. Sistein proteazlar genel olarak 4 gruba ayrılırlar: (i) papain-benzeri, (ii) arjinin kalıntısında kırılmaya neden olan tripsin-benzeri, (iii) glutamik aside özgü ve (iv) diğer tipleridir. Bilinen en iyi sistein proteaz papaindir. Sistein proteazların optimum pH' ı nötr olup PCMB gibi sülfidril ajanlarına duyarlı olup DFP ve metal şelatlayıcı ajanlardan etkilenmemektedirler (Rao et al., 1998). Sistein peptidazlar kovalent bir ara bileşik oluşturdıklarından dolayı serin tip peptidazlarla çok büyük benzerlik göstermektedirler. Ancak nükleofil atak, bir sistein yan zincirinden sülfür atomuna doğru gerçekleşir. Keza, bir histidin yan zinciri hidrojen alıcısı olarak tekrar tekrar görev almaktadır (Beynon and Bond, 2001). Sistein peptidaz mekanizması Şekil 2.5' de özetlenmiştir.



Şekil 2.5 Sistein tip peptidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonların şematik gösterimi (Beynon and Bond, 2001).

Metallo-proteazlar

Metallo-proteazlar proteazların katalitik tipleri arasında en fazla farklılık gösteren gruptur. Bu grup proteazlar aktiviteleri için bir divalent metal iyonu gereksinimi ile karakterize edilmektedirler. Bütün canlılarda bulunan metallo-proteazların yaklaşık 30 ailesi tanılanmıştır. Bu ailelerden 17' si endopeptidazlarda, 12' si ekzopeptidazlarda, 1' i de hem endo- hem de ekzopeptidazlarda yer almaktadır. Metallo-proteaz aileleri metal bağlama bölgeleri gibi karakteristiklerine bağlı olarak farklı gruplara ayrılmaktadırlar. Bunun dışında, kendi etki mekanizmalarına bağlı olarak nötral, alkali, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II olmak üzere dört gruba ayrılabilirler. Nötral proteazlar hidrofobik amino asitlere spesifik iken alkali proteazlar geniş bir spesifiteye sahiptirler. Bütün metallo-proteazlar EDTA gibi şelatlayıcı ajan tarafından inhibi edilirken DFP veya sülfidril ajanları tarafından inhibe edilememektedirler. Metalloproteazların etki mekanizması aspartik ve sistein proteazın etki mekanizmasından keskin farklılıklar gösterir. Bu grup enzimler aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarının varlığına ihtiyaç gösterirler ki bu enzimler etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) gibi şelat yapıcı ajanlar ile muamele edildiklerinde metal iyonlarının taşınması dolayısıyla kolayca inaktive olmaları sebebiyle diğer sınıf proteazlardan kolayca ayırt edilebilirler (Rao et al., 1998).

2.5.1.3 Proteazların fizyolojik işlevleri

Yaşayan bütün hücreler proteinlerin sentezi ve degradasyonunun sürekliliği ile belirli bir protein dönüşüm oranını korur. Proteinlerin katabolizması protein sentezinin öncülleri için hazır bir havuz sunarken, hücre içi proteazlar hücre için gerekli protein dönüşümünü gerçekleştirmektedirler. *E. coli*' de *lon* geni tarafından üretilen ATP-bağlı proteazlar anormal proteinlerin hidrolizinden sorumludur (Rao et al., 1998).

Bakterilerde sporların, mayalarda asko sporların, cıvık mantarlarda spor yapıların oluşumu ve funguslarda konidial boşalım olaylarının hepsi güçlü protein dönüşümünü gerektirir. Sporlanma için proteaz gereksinimi proteaz

inhibitörlerinin kullanımıyla kanıtlanmıştır. Maya diploidlerinde askospor oluşumunun proteaz A aktivitesindeki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir (Rao et al., 1998).

Enzimlerin proteolitik inaktivasyonu hücre içi katalitik aktivitenin dönüşümsüz olarak kaybına neden olur ve fizyolojik olarak önemli bir olaydır. Proteazlar büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve amino asitlere hidrolizine yardımcı olurlar böylelikle onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışı enzimler onların depolimerleşme aktivitesinden dolayı beslenmede büyük bir rol oynar (Rao et al., 1998).

2.5.1.4 Proteaz kaynakları

Proteazlar yaşayan organizmalar için fizyolojik olarak gerekli olduklarından bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan geniş bir dağılım ile elde edilebilirler. Proteaz kaynakları; bitkisel (papain, bromelain, keratinaz, fisin), hayvansal (tripsin, kimotripsin, pepsin) ve mikrobiyal (bakteri, mantar, virüs) kaynak olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Proteazların bitki ve hayvansal kaynakların birçoğunda elde edilmesi mümkün olmakla birlikte gelişen teknolojiye paralel olarak gelişen mikrobiyal fermentasyon prosesinin daha ekonomik olması nedeniyle mikrobiyal kaynaklı enzimlere talep artmıştır. Üçüncü grup proteaz kaynağı bakteri, fungus, maya ve virüs orijinli olan mikrobiyal proteazlardır. Bitkisel ve hayvansal proteazlara dünya çapında oluşan talep nedeni ile ihtiyacın karşılanması için mikrobiyal proteazlara olan ilgi artmıştır. Mikroorganizmalar sahip oldukları geniş biyokimyasal çeşitlilik ve genetik manipülasyonlara duyarlılıkları nedeni ile mükemmel enzim kaynakları haline gelmişlerdir. Mikrobiyal proteazlar dünya çapındaki enzim satışının yaklaşık %40'ını karşılarlar. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için hemen hemen tüm karakteristiklerinin istenilen yönde değiştirilebilmesi mümkün olduğundan mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvansal kaynaklı proteazlara tercih edilmektedirler (Rao et al., 1998).

Bakteriyel kaynaklı proteazlar arasında en çok kullanılan ticari nötral ve alkali proteazlar *Bacillus* cinsi organizmalar tarafından üretilirler. Bakteriyel

nötral proteazlar pH 5-8 aralığında aktiftirler ve bağıl olarak düşük termotoleransa sahiptirler. Gıdaları hidrolizlediklerinde hidrolizatlarında daha az acı tat oluşturdıklarından gıda endüstrisinde hayvansal proteazlara tercih edilirler. Nötraz olarak da bilinen nötral proteazlar doğal bitki proteaz inhibitörlerine karşı duyarsızdırlar ve bu sebeple de fırıncılık endüstrisinde kullanılırlar. Bakteriyel nötral proteazlar hidrofobik amino asit çiftlerine karşı sahip oldukları yüksek afinite ile karakterize edilirler. Sahip oldukları düşük termotoleransları gıda hidrolizatlarının üretimi sırasında reaktivitelerinin kontrolü için avantajlıdır. Bazı nötral proteazlar metalloproteazlar grubuna üyedirler ve aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyarlarken serin proteazlar şelat yapıcı ajanlardan etkilenmezler. Bakteriyel alkali proteazlar pH 10 gibi yüksek alkali pH değerlerinde sahip oldukları yüksek aktiviteleri ile karakterize edilirler ve geniş bir substrat spesifitesine sahiptirler. Optimal sıcaklıkları 60°C civarındadır. Bakteriyel alkali proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisi tarafından kullanılmaları için uygun kılar (Rao et al., 1998).

Funguslar bakterilerden daha geniş kapsamlı enzim üreticileridirler. Örneğin; *Aspergillus oryzae* asit, nötral ve alkali proteazları birlikte üretir. Ayrıca fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bakteriyel kaynaklı enzimler ile karşılaştırıldıklarında bakteriyel enzimlerden daha düşük reaksiyon hızına ve daha kötü bir termotoleransa sahiptirler. Fungal enzimler katı-hal fermentasyon süreci ile üretilirler. Fungal asit proteazlar pH 4-4,5 arasında optimal pH'ya sahip olmalarına rağmen pH 2,5-6,0 arasında stabildirler. Bu enzimler özellikle peynir üretim endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifiteleri nedeni ile tercih edilirler. Fungal nötral proteazlar ya da metalloproteazlar pH 7,0'de aktiftirler ve şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe edilirler. Besin protein hidrolizatlarının acılığının azaltılmasında kullanılırlar. Fungal alkali proteazlar ise genellikle gıda proteinleri modifikasyonlarında kullanılırlar. *Aspergillus* türleri ise özellikle detaylı olarak çalışılan fungal proteaz üreticisidirler. Alkali proteaz üreticisi mayalar *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica* ve *Aureobasidium pullulans*'dır (Rao et al., 1998).

2.5.1.5 Alkalın proteazların endüstride kullanımları

Alkalın proteazlar, deterjan, deri işlenmesi, gümüş geri kazanımı, medikal amaçlar, gıda işleme ve çöp geri kazanımı gibi kimya endüstrisinde potensiyeli olan stabil enzimdir. Bu enzimler, enzim yardımcı (kısmi) parçalamayı kullanarak yüksek değerli ilave uygulamalara ve ürünlere neden olmaktadır. Günümüzde, alkalın proteazın kullanıldığı çeşitli endüstriyel uygulamalar aşağıda sıralanmıştır (Akpınar, 2008).

Mikrobiyal alkalın proteazlar, çamaşır deterjanı uygulamaları için *Bacillus spp.*'den elde edilen subtilizin ve/veya alkelen proteazların pazar payı ticari uygulamalarda önemli yer tutmaktadır (Kumar and Takagi, 1999). Alkalın proteazlar, lekelerden proteinik materyalin uzaklaştırılmasını gerçekleştirmek için çamaşır deterjanlarına ilave edilmektedir (Kumar and Takagi, 1999). Deterjan katkı maddesi olarak bu proteazların artan kullanımı, çevre açısından uygun, fosfatsız deterjanlarda bu enzimlerin temizleme kapasitesi çok yüksek olduğundan kullanılmaktadır. Yıkama verimliliğinin gelişmesine ek olarak, enzimlerin kullanımı, özellikle ilk ısıtma periyodundan sonra, düşük sıcaklıkta yıkamaya ve daha az karıştırma periyoduna da izin vermektedir (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

İdeal olarak, deterjanlarda kullanılan proteazlar ve diğer enzimler yüksek aktiviteye sahip olmalı ve geniş pH ve sıcaklık aralığında stabil olmalıdır. Enzimler, düşük seviyede (% 0,4–0,8) etkili olmalı, okside edici ve diğer ajanlarla da uyumlu olmalıdır. Keza, enzimler uzun raf ömrüne sahip olmalıdır (Kumar and Takagi, 1999). Çok az sayıda yayınlanmış makalelerde, deterjanlarla uyumlu alkalın proteazlar bulunmaktadır (Kumar and Takagi, 1999). Bazı temizleme uygulamaları diğerlerinden daha az ayrı tutulmaktadır. Örneğin, ön sabun formülasyonları ve kontakt lens temizleme solüsyonları sıcak çamaşır deterjanlarında aynı enzimin termal stabilitesine gerek yoktur (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Otomatik çamaşır makinesi deterjanında alkalın proteaz enziminin kullanımı son yıllarda artmaktadır. Ultrasantrifüj (UF) ve ters ozmos (RO) membranlarının

yerinde temizlenmesi, modern süt ürünlerinin ve gıda endüstrisinin en önemli kısmını oluşturmaktadır. UF ve RO membranları, süt, peynir atık suyu, yumurta beyazı, meyve suları, şaraplar ve diğer içecekler gibi sıvı besinlerin konsantrasyonu, fraksiyonunu, klarifikasyonu ve/veya sterilizasyonunu içeren çeşitli kullanım alanlarında kendilerine yer edinmiştir (Kumar and Takagi, 1999). Membran sistemlerinin temizlenmesi için günümüzde kullanım alanı yaygın olan enzim deterjan preparasyonları Alkazym (Novodan A/S, Copenhagen, Denmark), Terg-a-zyme (Alconox, Inc, New York, USA), Ultrasil 53 (Henkel KGaA, Dusseldorf, Germany) and P3-paradigm (Henkel-Ecolab GmbH, Dusseldorf, Germany)'dir. Bu enzim temelli temizleyiciler, protein foulantlarını parçalayan ve çözen proteazlara dayanmaktadır. Protein ve yağ floulantlarını degradasyonunu ve çözünmesini sağlayan proteaz ve lipazların karıştırılarak kullanılması oldukça yararlıdır. Ek olarak, bir deniz bakterisinden elde edilen alkalın proteazın kullanıldığı kontakt lens temizleme solüsyonları düşük sıcaklıkta kontakt lensleri temizlemektedir (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Elastolitik ve keratinolitik aktiviteye sahip alkalın proteazlar etkili bir biyouygulama teklif etmektedir. Kıl köklerinin şişmesine neden olan alkalın şartlar ve kıl folikül proteinleri üzerine proteazların atakları, kılların uzaklaştırmasını kolaylaştırmaktadır. Güçlü alkalın şartlara rağmen, bu proses sodyum sülfid uygulaması gibi geleneksel yöntemlerden daha iyi ve daha güvenlidir. Sodyum sülfid uygulaması, sülfüdin hepsinin ve süspanse sıvının da %80'den fazlası deri atık suyu ile atılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Deri kıllarının giderilmesinin prosesinin ardından elastin ve keratin degradasyonu, kıl residülleri uzaklaştırılması gerekmektedir ve bu, deri giyiminde ve deri eşyaları yapmak için kullanılan daha iyi ve daha yumuşak deriyi üretmeyi sağlamaktadır. Ek olarak, farklı çalışanlar tarafından kullanılan çalışmalarda *Aspergillus flavus*, *Streptomyces sp.*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis*'den deri tabaklamada alkalın proteazların kullanımı başarılı olduğu gösterilmiştir (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Gümüş kazanımı için kullanılan X-ışını filmlerinin biyo-işlenmesinde alkalın proteazlar potansiyel uygulama sağlamaktadır. Kullanılan X-ışını filminin jelatin tabakaları yaklaşık olarak %1,5–2,0 gümüş (ağırlık olarak) içermektedir. Filmin yakılması ile konvensiyonel gümüş kazanımının uygulaması büyük bir çevresel soruna neden olmaktadır. Dolayısıyla, X-ışını filmi üzerindeki jelatin tabakaların enzimatik hidrolizi sadece gümüşün geri kazanımını sağlamayıp ayrıca poliestere film tabanında geri kazanımını sağlamaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Alkalın proteaz aktivitesine sahip kollagenazlar terapötik uygulamalar için artan kullanım alanı bulunmaktadır. Yüksek kollogenaz aktivitesine sahip yeni bir yarı-alkalin proteaz, *Aspergillus niger* LCF9 tarafından üretilmektedir. Amino asitsiz kollagen tiplerini hidrolizleyen enzimler, potansiyel terapötik amaçla kullanılan düşük moleküler ağırlıklı peptidler serbest bırakılır (Kumar and Takagi, 1999). Benzer şekilde, elastoterez, *Bacillus subtilis* 316M'den elde edilen yüksek elastolitik aktiviteli bir preparasyon, yanıklar, irinli yaralar, çıbanlar, kanlı çıbanlar ve derin abselerin tedavisinde terapötik uygulama için bir bandaj üzerine immobilize edilmiştir (Kumar and Takagi, 1999). Ayrıca, *Bacillus* spp. insanlara faydalı olduğu bilinmektedir ve fibrinolitik aktiviteye sahip bir alkalın proteaz trombolitik ajan olarak kullanılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Alkalın proteazlar bitkiler, balıklar veya hayvanlardan elde edilen proteinleri hidrolize edebilirler ve iyi tanımlanmış peptid profillerinin hidrolizatlarını üretmektedir. Ticari bir alkalın proteaz olan Alkalaz, terminal hidrofobik amino asit için tercih edilen geniş spesifiteye sahiptir. Bu enzimin kullanılarak daha küçük hidrolizatlar elde edilmektedir. Ek olarak, elde edilen hidrolizatlar, molekül ağırlığı 100 kDa'ı geçmeyen iki ila altı amino asit residüsü büyüklüktedir (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Çok yakın zamanlarda, *B. amyloliquefaciens*'ten elde edilen diğer bir alkalın proteaz, nohut proteininden elde edilen metionince zengin protein hidrolizatının üretilmektedir. Protein hidrolizatları genel olarak kazein, peynir altı suyu ve soya proteininden üretilmektedir. Ayrıca, bu enzimler üretilen proteince zengin

terapötik yiyecekler, meyve suları ve yumuşak içeceklerin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Proteazlar özellikle sığır eti gibi etin yumuşatılmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bir alkalın elastaz ve termofilik alkalın proteaz, etin yumuşatılmasında başarılı olmuş enzimlerdir ve bu enzimler kas proteinleri gibi bağ doku proteinlerini hidrolizleme yeteneğine sahiptir. Yumuşatma prosesi toz enzim preparasyonunun az miktarı ile veya enzim solüsyonunun immersiyonu ve/veya etin içine konsantre proteaz preparasyonu enjekte edilerek başarılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Çözülebilir et hidrolizatı, et atıklarından ve mekanik kemiklerin ayıklanmasından sonra kemik residüllerinden proteolitik enzimli solüsyon ile oluşturulabilmektedir. Bununla birlikte, hidroliz derecesi %10'dan fazla olduğu zaman genel olarak hidrolizatlar etkili çözülme için kullanılmaktadır. Alkalaz maliyet, çözülme ve diğer konuyla ilgili faktörlerde en uygun enzim olmaktadır. pH 8,5 ve 55–60°C' de Alkalazlı optimum bir proseste % 94 oranında bir çözülebilirlik sağlanmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Alkalın proteaz çeşitli gıda işleme endüstrisi ve evde yapılan aktivitelerde atıkların kullanılması için potansiyel sağlamaktadır. Bu proteazlar, çok aşamalı bir proses ile atıklardaki proteinleri çözebilirler ve balık veya çiftlik hayvanları için besinsel değerli kuru katılar veya sıvılar uzaklaştırılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Birçok keratinolitik alkalın proteaz beslenme teknolojisinde kullanılmaktadır. Bunlar arasında amino asitlerin ve peptidlerin üretimi, atık keratinöz materyallerin degrades edilmesi ve kıl dökücü ajan olarak banyo ve kanalizasyonlarda meydana gelen tıkanıklıkları açmak için kullanılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008).

Conidiobolus sp.'den elde edilen alkalın proteazlar hayvan hücre kültürlerinin hazırlanmasında kullanılan tripsin yerine kullanılmaktadır. Ayrıca, *Vibrio metschnikovii* RH530'dan elde edilen alkalın proteaz, DNA izolasyonunda

ticari olarak *Tritirachium album*' dan elde edilen Protainaz K yerine kullanılmaktadır (Kumar and Takagi, 1999; Akpınar, 2008). Benzer şekilde, *Y. lipolytica*' dan elde edilen alkalın proteaz *Tritirachium album* proteinaz K'ı ile %42,6 amino asit homoloji gösterdiğinden benzer şekilde Protainaz K yerine kullanılabileceği düşünülmektedir (Davidow et al., 1987).

2.5.2 Ribonükleaz (RNaz) Enzimi

Nükleazlar, insanlarında içinde bulunduğu bütün organizmalarda nükleik asitlerin (DNA, RNA) hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Nükleazların önemli biyolojik rollerine ek olarak, son zamanlarda laboratuvar çalışmalarında kullanışlı bir araç olmaktadır ve rekombinant DNA teknolojisi, moleküler klonlama ve genomik gibi bazı alanların gelişimine yol göstermektedir (Mishra, 2002). Genel olarak, nükleazlar ya deoksiribonükleik asitlere (deoksiribonükleazlara) ya da ribonükleik asitlere (ribonükleazlar) spesifiktir (Beintema and Zhao, 2003; Akpınar, 2008).

Ribonükleazlar (RNaz) nükleotid residülleri arasındaki fosforik diester bağlarını parçalamasıyla ribonükleik asidi (RNA) depolimerize ederler. Yani ribonükleazlar, fosfotransferazlar veya fosforik diester hidrolazları olarak özelleşmiştir. Daha ileri özellikleri bu enzimlerin hem endonükleaz hem de ekzonükleaz olmasıdır. Parçalanma reaksiyonu, ribozun 3'-oksijeni ile fosfat arasında meydana gelirse 5'-fosfomonoester (E.C. 3.1.26) oluşmaktadır ya da ribozun 5'-oksijeni ile fosfat arasında meydana gelerek 3'-fosfomonoester (E.C. 3.1.27) oluşmaktadır (Beintema and Zhao, 2003; Akpınar, 2008).

Hem prokaryotik hem de ökaryotik hücreler çok sayıda ribonükleaz (RNaz) enzimine sahip olup bu enzim DNA replikasyonundan, gen ifadesinin kontrolüne ve hatta mikroorganizmalara karşı savunmada görev almaktadır. Bunlar arasında bir grup RNaz hücre dışına salgılanmakta veya salgılama yolizinde görev alan vakuol ya da lizozom gibi organellerde lokalize olmaktadır. Dolayısıyla normalde RNA' ın varlığı ile ilişkide olmayan bir alanda bulunabilmektedirler. Bu RNaz' lar RNA molekülünü 2'-3'-siklik fosfat aracılığıyla parçalayarak oligo ve mononükleotit ürünlerin oluşumu gerçekleşmektedir (MacIntosh, 2011).

2.5.2.1 Ribonükleazların sınıflandırılması

Tarihsel süreçte, ribonükleaz enzimi 2'-3'-siklik fosfat aracılığıyla RNA' dan 3'-fosfomonoester oluşturmaktadır ve bu özelliğinden dolayı deoksiribonükleik asit üzerinde aktivite gösterememektedir (Beintema and Zhao, 2003). 2'-3'-siklik fosfat aracılığıyla faaliyet gösteren RNaz' lar molekül ağırlıkları, baz spesifitesi, pH seçimi ve orijinine göre üç grupta incelenmektedir: RNaz A, RNaz T1 ve RNaz T2 aileleri (Beintema and Zhao, 2003; MacIntosh, 2011).

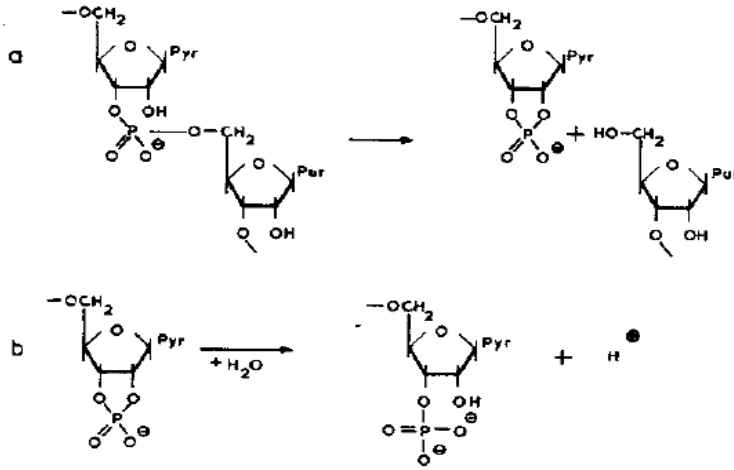
RNaz A Ailesi

Filogenetik çalışmalar RNaz A' ın amfibilerden sürüngenlere, kuşlara ve memelilere kadar birçok canlı türünde hem yapısal hem de fonksiyonel olarak bulunduğunu göstermiştir (MacIntosh, 2011). Pirimidin spesifik ribonükleaz A süperailesi iyi karakterize edilmiş ve dizisi çıkartılmış çok sayıda homolog proteinden meydana gelmektedir Sığır pankreatik ve sperm RNaz' ları, insan angiogenin ve *Rana pipiens* oosit RNaz' larının üç boyutlu yapıları çalışılmış ve bu enzimlerin moleküler yapıları çok benzediği bulunmuştur. Ayrıca proteinlerin aktif bölge yapıları ile hidrofobik yığınlar oldukça korunmuş olduğu bildirilmiştir (Beintema et al., 1997).

Farklı RNaz ailelerine ait ribonükleazlar arasında substrat spesifitesinde ve enzimatik özelliklerinde farklılıklar bulunmaktadır. Farklı ailelere ait ribonükleazlar arasındaki karakteristik farklardan birisi poly(C) ya da poly(U) gibi polimerik substratları parçalama gibi nispi tercihleridir. RNaz A süper ailesi üyeleri maya RNA' sı kullanılan standart testlerde çok düşük aktivite göstermektedir. RNaz A süperailesi üyelerinden olan sığır pankreatik ribonükleazında ya 66 ya da 122 pozisyonunda bulunan bir bazik aminoasit eksikliğinden dolayı maya RNA' sı üzerinde çok düşük aktivite gösterdiği bulunmuştur (Beintema et al., 1997).

Memeli (pankreatik-tip) RNaz 1 iki aşamalı reaksiyonu katalizlemektedir: 2'-3' siklik nükleotit fosfatların oluşumunu sağlayan bir transfosforilasyon ve

bunu takiben bu siklik bileşiklerin hidrolizidir. Aktif bölgede yer alan iki histidin kalıntısı hem hidrojen alıcısı hem de vericisi olacak şekilde simetrik olarak yer almaktadır. Hidroliz reaksiyonu transfosforilasyondan çok daha yavaş gerçekleşmektedir (Beintema et al., 1997). Şekil 2.6' da sığır pankreatik ribonükleaz (ribonükleaz A süperfamilya üyesi) tarafından katalizlenen iki etkin reaksiyon gösterilmiştir (Beintema and Zhao, 2003; Akpınar, 2008).



Şekil 2.6 Bovin pankreatik ribonükleaz tarafından katalizlenen iki etkin reaksiyon gösterilmiştir (Beintema and Zhao, 2003; Akpınar, 2008).

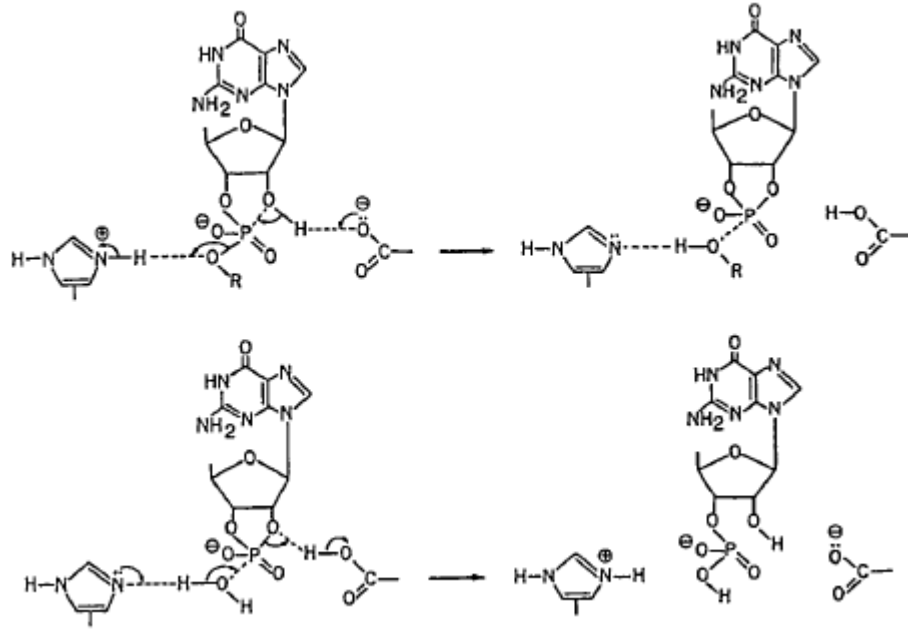
RNaz T1 Ailesi

Birçok RNaz moleküler boyutu ve spesifitesinden dolayı RNaz T1 ailesine dahildir. RNaz T1, bir guanilik asit spesifik RNaz olup molekül ağırlığı 11 kDa civarındadır. RNaz T1 ailesi protein dizisine bağlı olarak iki alt aileye ayrılmaktadır: RNaz T1 alt ailesi ve barnaz alt ailesi. RNaz T1 alt ailesine mensup ribonükleazlar sahip oldukları disülfid bağına göre gruplara ayrılmaktadır (Irie, 1997).

RNaz T1 ailesinin enzim aktivitesinden sorumlu aminosit kalıntıları iki histidin, bir glutamik asit ve bir arjinin olabileceği düşünülmektedir. RNaz T1 ailesine ait ribonükleazların X-ray ve NMR' dan elde edilen üç boyutlu yapısının bir α -heliks (Ser-13–Glu-28) ve dört antiparalel β -kırıklı β 1 (Pro-39–Tyr-42), β 2 (Pro-55–Pro-60), β 3 (Asn-76–Phe-80) ve β 4 (Leu-86–Tyr-91) yapıdan

oluşmaktadır. α -heliks hemen hemen β -kırıklılara dik olarak yer almaktadır. Enzimin aktif bölgedeki komponentleri $\beta 1$ ve $\beta 4$ kırıklı yapılarında bulunmaktadır (Irie, 1997).

RNaz T1 ailesine ait ribonükleaz enziminin katalitik mekanizmasında Glu-58 ve His-40 ya da His-92 iki histidin kalıntısından birisi iş görmektedir. Reaksiyonun ilk basamağında, Glu-58 genel bir baz olarak iş görmekte ve guanilik asidin 2'-OH' den protonları almaktadır. His-40 ya da His-92' ye transfer edilen proton nükleotidin salınmasını sağlamaktadır. İkinci aşamada, histidin bir baz olarak çalışmakta ve su molekülünü aktif hale getirir ve de Glu bir proton vericisi olarak çalışmaktadır (Irie, 1997).



Şekil 2.7 RNaz T1 için önerilen mekanizma (Irie, 1997).

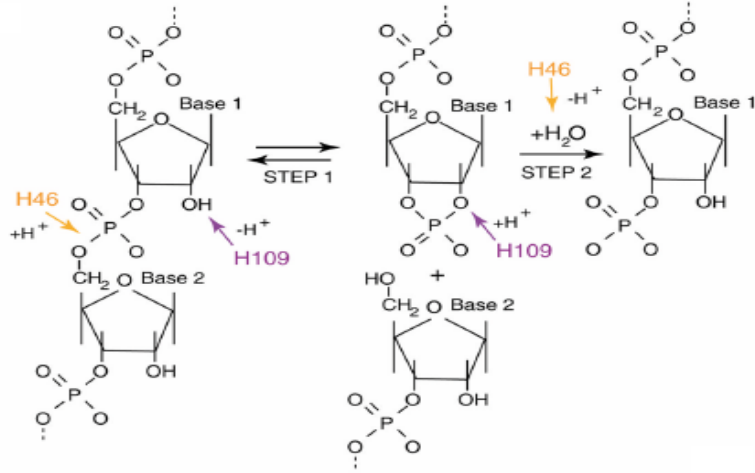
RNaz T2 Ailesi

RNaz T2 ailesinin ismi *Aspergillus oryzae* RNaz' ından gelmektedir. RNaz T2 enzimi bir adenilik asit spesifik RNaz olarak tanımlanmıştır. Bu enzim ile yapılan çalışmalarda maya RNA' sından 3'-adenilik asitleri açığa çıkartan bir 36kDa' dan daha büyük bir glikoprotein olduğunu gösterilmiştir. RNaz T2' in optimum pH' sı pH 4,5 civarındır (Irie, 1997).

RNaz T2 benzeri enzimler, RNaz A (bir pirimidin baz spesifik RNaz) ve RNaz T1 (bir guanidin baz spesifik RNaz)' e benzemeyecek şekilde bütün dört bazı da parçalayabilmektedir. Keza, 24 kDa' dan daha büyük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve bir asit RNaz olmalarıyla da karakterize edilirler. RNaz T2' in asidik aktivite göstermesi vakuol ve lizozomda yer alarak hücrenin kendi işe yaramayan RNA' larının parçalanmasında da iş gördüğü düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, fungal RNaz' ların primer yapısı RNaz T2 ile büyük benzerlikler göstermektedir. Bunların dışında, diğer iki RNaz ailesinden protozoonlar, bitkiler, bakteriler, hayvanlar ve virüslerde de yer alarak daha fazla organizmada yayılım göstermektedirler (Irie, 1997; Luhtala and Parker, 2010).

RNaz T2 ailesi üyeleri tipik olarak hücre dışına salgılanmakta veya lizozom ya da vakuol gibi organellerde lokalize olmaktadır. Bu proteinler salgılama yolizine girdiklerinde, ökaryotik hücrelerde genel olarak glikozillenmektedirler. Ancak, *S. cerevisiae*' da Rny1 proteini oksidatif stres altında vakuollerden sitozole bırakılmaktadır. Bunun dışında, daha özel durumlarda ise salgılanmış T2 tip ribonükleazlar diğer hücrelerin içine geçerek hedef hücreye sitotoksik etki göstermektedir (Luhtala and Parker, 2010).

RNaz T2 enzimi tarafından RNA parçalama mekanizması ve yapısı çok çalışılmıştır. Bakteri, bitki ve fungal elde edilen RNaz T2 ailesine ait enzimler kristalize edilmiş ve korunmuş bir α/β merkez yapısının bulunduğu gösterilmiştir. Substrat bağlama bölgeleri de kristalize edilmiş ve B1 ve B2 olarak isimlendirilen iki korunmuş bölgenin sırasıyla 5'- ve 3'- bölgelerinden nükleotitlere hücum ederek fosfat bağının kırılmasını gerçekleştirmektedirler. Enzim tarafından katalizlenen reaksiyon bir veya üç histidin grubu tarafından yapılmaktadır ve enzimin aktif bölgesinde korunmuş olarak bulunmaktadır. Çeşitli proteinlerde bu histidinler DNA mutasyonları veya kimyasal modifikasyonlarla değiştirilerek hem in vitro hem de in vivo' da RNaz aktivitesi inaktif hale getirilmiştir. Diğer taraftan, diğer transferaz ribonükleaz enzimlere benzer şekilde, RNaz T2 ailesi üyeleri tarafından gerçekleşen RNA parçalanması iki aşamada gerçekleşmektedir: transfosforilasyon ve hidroliz. Bu aşamaların her birinde iki histidin grubu asit-baz katalizini gerçekleştirmektedir (Luhtala and Parker, 2010). Çizelge 2.5' te üç RNaz ailesinin farklılıkları gösterilmektedir.



Şekil 2.8 RNaz T2 ailesine ait ribonükleazlar tarafından katalizlenen iki etkin reaksiyon gösterilmiştir (Luhtala and Parker, 2010).

Çizelge 2.6 Temel üç RNaz ailesinin farklılıkları (Luhtala and Parker, 2010)

Aile	Organizma Dağılımı	Optimum Aktivite gösterdiği pH	Substrat Spesifitesi
RNaz A	Genellikle hayvanlarda	Zayıf asidik (pH 6,5-7) ya da alkali aktivite (pH 7-8)	Pirimidin baz spesifitesi
RNaz T1	Bazı fungus ve bakterilerde	Alkalin (pH 7-8)	Guanilik asit spesifitesi
RNaz T2	Canlılar aleminde geniş yayılım	Asidik (pH 4-5)	Substrat spesifitesi düşük

2.5.2.2 Ribonükleazların fizyolojik işlevleri

Bütün canlılarda bulunan RNaz enzimi farklı organizmalarda belirli fonksiyonları gerçekleştirmektedir. Bu fonksiyonlarından ilki beslenme için ekstrasellüler nükleik asitlerin parçalamasıdır. Bitkilerde çeşitli ribonükleazlar fosfat açlığı esnasında nükleik asitlerden fosfatları almaktadırlar. Örneğin, domates hücrelerinde ribonükleaz LE fosfat açlığı esnasında indüklenmekte ve bu enzimin aktivitesi bu şartlar altında artmaktadır. Fosfat açlığı esnasında artan sentez ve salgılama ile birlikte bir fosfodiesteraz aktivitesi saptanmış ve bu

aktivite fosfat açlığı esnasında ekstrasellüler RNA substratlarının parçalanması modelini desteklemektedir (Luhtala and Parker, 2010).

Keza lizozom ve vakuollerde RNaz' ın varlığı, sitoplazmik RNA' ın otofaj esnasında geri dönüşümünde görev almaktadır. asidik bölümler içinde otofajik parçalanma için RNA substratların olası bir kaynağını RNA granülleri oluşturmaktadır. Örneğin, kümelenmiş proteinler ubikuitin ve ubikuitin benzeri modifikasyonları tanıyan spesifik reseptör moleküllerini içeren otofajın bir seçici formu ile uzaklaştırılırlar. Bu proteinlerin bazı sitoplazmik kümeleri RNA' da içermektedir ve otofaj için hedef olmaktadır (Luhtala and Parker, 2010).

Yapılan son çalışmalar, insan RNASET2 proteinin bağışıklık sistemi üzerine etkili olan nöro-gelişimde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. *RNASET2* geninde meydana getirilen mutasyonlar, sistik lökoansefalopatiye neden olan bir otozomal resesif hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Keza, kongenital sitomegalovirusuyla (CMV) enfekteli insanlarda bu genin kaybolduğu gösterilmiştir. CMV enfeksiyonlarını bir konakçı koruması mekanizmasında görev alan RNaz L enzimi tarafından inaktive edilmektedir. Dolayısıyla, insanlarda RNaz L inaktivasyonu veya RNASET2 proteinin kaybı ekstrasellüler ya da hücre içindeki tek iplikli RNA' ların parçayamamasına sebep olur ve CMV enfeksiyonlarının sonucunda insan gelişiminde immun sistem yetersizliği görülmektedir RNASET2 çalışmalarından sağlanan diğer bir bilgide, çeşitli rahim tümörleri ve kanser hücre hatlarının bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir. Dahası, hücre içine RNASET2' in girmesi kültüre edilmiş rahim kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği, tümörogenesis, metastazik potansiyelini azaltığı bulunmuştur. *A. niger* küfünden elde edilen ACTIBIND olarak isimlendirilen bir RNaz T2 hücre iskeletinde bulunana aktinlere bağlanarak fare modellerinde çeşitli tümörlerin büyümesini ve yayılmasını engellediği bulunmuştur (Luhtala and Parker, 2010).

Birçok durumda, RNaz T2 aile üyeleri sitotoksik ajan olarak da görev almaktadır. RNaz T2 proteinlerinin sitotoksiste özelliğine bir örnek olarak klasik domuz ateşi virüsü (CSFV) ve sığır viral diare virüsü (BVDV) verilebilir. Bu viruslar E^{ms} adı verilen bir glikoprotein kılıfa sahip olup bir RNaz T2 domainine

sahiptir. Hücre kültür çalışmalarında, limfositlere karşı sitotoksik etki gösteren bu enzim epitel ve diğer konakçı hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermemektedir (Luhtala and Parker, 2010).

2.5.2.3 Ribonükleazların kaynakları

Ribonükleazlar bütün canlılarda bulunan enzimlerdir. Genel olarak, RNaz A ailesine mensup ribonükleazlar özellikle insanlarında olduğu yüksek ökaryotlarda bulunmaktadır. RNaz T1 aile üyeleri sadece belirli bakteri ve funguslarda bulunmaktadır. Canlılar arasında en fazla dağılım gösteren ribonükleaz enzim ailesi olan RNaz T2 arkea üyeleri hariç protozoonlar, bitkiler, bakteriler, hayvanlar, funguslar ve virüslerde bulunmaktadır (Beintema et al., 1997; Irie, 1997; Beintema and Zhao, 2003; Luhtala and Parker, 2010; MacIntosh, 2011).

2.5.2.4 Ribonükleazların endüstride kullanımları

Ribonükleazlar (RNaz) moleküler biyoloji ve kozmetik endüstrisinde geniş kullanımından dolayı ticari öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Önemli bir analitik araç olarak düşünüldüğünde, RNazlar, RNA'nın yapı ve fonksiyonu üzerine çok önemli rolleri bulunmaktadır. Tek hücre üretiminde, biyomasstan RNA'ı uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Keza RNaz ticari olarak klinik amaçlı veya gıda endüstrisi için nükleotid üretmekte de kullanılmaktadır. Bazı RNazlar terapötik amaçlar için potansiyeli olduğundan geliştirilmiştir. Son yıllarda, yapılan bir seri çalışmalar, tümör oluşumunun kontrolünde, tümör hücrelerinin öldürülmesinde ve HIV-1 virüs replikasyonunun inhibisyonunda önemli biyolojik fonksiyonları olduğunu göstermiştir (Xiong et al., 2003; Akpınar, 2008).

2.6 Maya Hücrelerinden Enzim Saflaştırması

2.6.1 Genel protein saflaştırma yöntemleri

Proteinlerin ve dolayısıyla enzimlerin saflaştırılmasında plan ve strateji belirlenirken öncelikle birkaç anahtar soruya yanıt aranmalıdır. Proteinlerin saflaştırılması çoğunlukla kendisi için bir son nokta değildir, saflaştırılmış protein

eldesi daha sonraki çalışmalar için gereklidir. Bu çalışmaların gereksinimleri, ne kadar saflaştırılmış protein gerektiği, aktivite kaybının tolere edilebilirliği, nasıl bir saflıkta olabilirliği ve de proteinin saflaştırma ve maaliyeti üzerinde belirleyici olurlar. Örneğin, yapısal çalışmalarda çok miktarda ileri derecede saflaştırılmış proteine gereksinim vardır. Maliyet ve zaman ikincil öneme sahiptir. Yapı-işlev ilişkileri çalışmalarında ise aktivite gerekli olduğundan hız gerekli olabilmektedir. Endüstriyel uygulamalar söz konusu olduğunda, örneğin gıda endüstrisinde nişastanın hidrolizi gibi bir proste büyük miktarlarda proteine gereksinim vardır ve saflık derecesi maliyet için tali önemdedir. Töröpötik uygulamalar söz konusu olduğü zaman saflık en üst düzeyde önemlidir ve çok küçük miktarlarda kullanım söz konusudur. Saflaştırılmış proteininin miktarı sadece başlangıç materyalinin miktarına bağı değildir, aynı zamanda saflaştırma verimine de bağıdır. Protein saflaştırma işlemlerinin her bir adımında bir miktar kayba uğrar. Bu nedenle, saflaştırma verimini arttırmak için en az sayıda saflaştırma adımı kullanılmalıdır. Buna karşılık saflaştırma adımları en aza indirildiğinde ise proteininin saflaştırma derecesi azalacaktır (Erarslan, 2011a).

2.6.2 Protein saflaştırılmasında kullanılan temel kromatografik teknikler

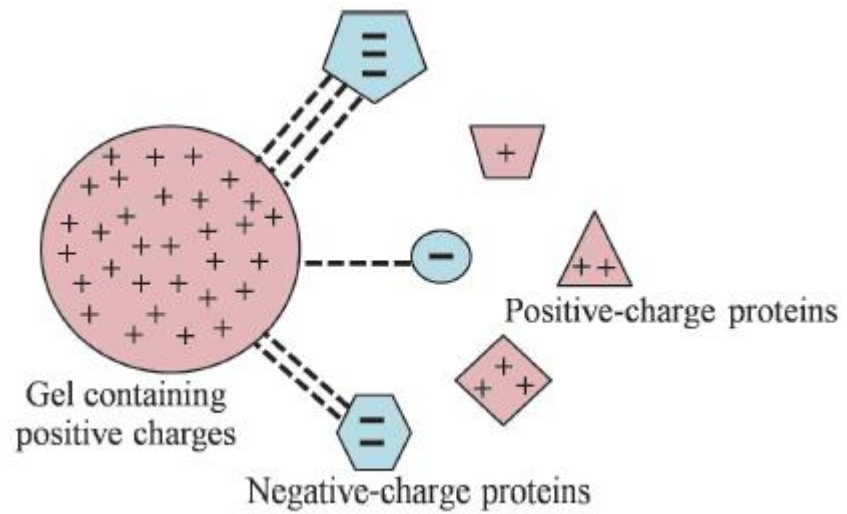
Kramotografi bir numune içindeki komponentlerin hareketli ve durgun fazlar arasında yapılan diferansiyel bir ayırma işlemidir. Uygulamaların çoğunda durgun faz bir kolon içine doldurulan küresel partiküllerden oluşur. Ayrılacak proteinlerin bir karışımı hareketli faza verilir ve bu fazın içinde kolon boyunca göç etmesi sağlanır. Katı fazla daha fazla etkileşimi olan proteinler hareketli fazla daha fazla etkileşimi olan proteinlerden daha yavaş olacak şekilde göç ederler ve bunun sonucu ayırma gerçekleşir. (Erarslan, 2011b).

2.6.2.1 İyon değıştirme kromatografisi

Proteinler yapılarındaki asidik ya da bazik amino asitlerin yan zincirlerinde bulunan ve yüzeylerine doğru yer alan pozitif ya da negatif yüklü gruplar taşırlar. Pozitif yükleri histidin, lizin, arginin ve daha az derecede N-terminal aminler sağlarlar. Negatif yüklü gruplar ise aspartik ve glutamik asitler, C-terminal karboksi grupları ve daha az derecede sistein gruplarından ileri gelir. Bir proteinin net elektrik yükü üzerindeki negatif ve pozitif yüklü grupların bağıl sayısına bağı

olup pH ile değişir. Pozitif ve negatif yükleri eşit olduğu durumdaki pH değerine izo-elektrik nokta (pI) denir. Proteinlerin büyük çoğunluğu pH' sı 5–9 arasında değişen bir pI değerine sahiptir. pI değerlerinin üzerinde proteinler negatif elektrik yüküne altındadır ise pozitif elektrik yüküne sahiptirler (Erarslan, 2011b).

İyon değiştirme proteinleri elektrik yüküne bağlı olarak ayırmayı esas ve sadece elektrik yüklü gruplarındaki marjinal değişikliklerle tekrar çözünmelerini hedefler. Proteinlerin ayrılması onların tamponlu mobil faz ve inorganik elektrik yüklü grupların iliştiirildiği bir matriksten ibaret olan durgun faz arasındaki denge dağılımlarında olan farklılıktan yararlanılarak başariılır. İyon değiştirmenin protein saflaştırmasında etkin olarak kullanılabilmesi için durgun faz pozitif yüklü ya da negatif yüklü proteinleri bağlamaya muktedir olmalıdır. Bu amaçla iyon değiştirici matrisler anyonik proteinlerin adsorpsiyonu için pozitif yüklü gruplarıyla modifiye edilirler. Proteinin yüklü grupları ve durgun fazın yüklü grupları birbirleriyle ilişkilerinde karşıt iyonlar basit, düşük molekül ağırlıklı iyonlardır. Proteinlerin durgun faza bağlanabilmesi için her iki gruptaki karşıt iyonlar elektronik olarak dissosiyeye olmuş durumdadırlar. Karşıt iyonlar bir protein ile bağlanmalarını önlemek için değiştirici grupları tararlar. Na^+ ve H^+ katyon değiştiriciler için, Cl^- ve OH^- de anyon değiştiriciler için kullanılan karşıt iyonlardır (Erarslan, 2011b). İyon değiştirme kromatografisinin temel adımları Şekil 2.9' da gösterilmiştir.



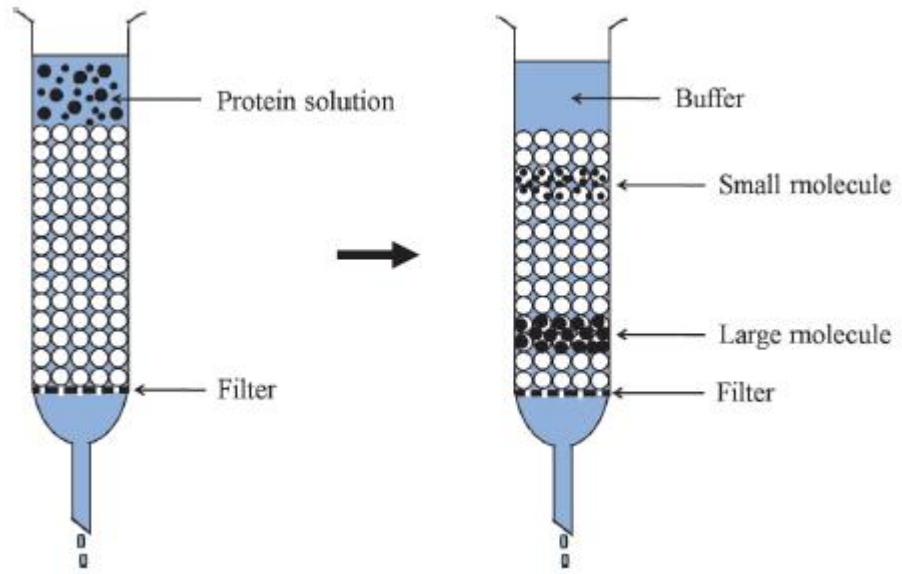
Şekil 2.9 İyon değiştirme kromatografisinin temel adımlarının şematik gösterimi (Sattayasai, 2012).

2.6.2.2 Jel geçirgenlik kromatografisi

Jel geçirgenlik kromatografisi farklı molekül büyüklüklerindeki proteinlerin ayrımını esas alan bir partitasyon kromatografisi şeklindedir. Bu kromatografi aynı zamanda jel filtrasyonu, jel eksklüzyon kromatografisi, moleküler elek kromatografisi ya da daha basit olarak jel kromatografisi gibi isimler de alır (Erarslan, 2011b).

Jel geçirgenlik kromatografisinin temelinde yatan moleküllerin solvent ve belirli bir porozitedeki durgun faz arasında ayrılması yatar. Ayırma prosesi kürecik şeklinde olan poröz matriksin çözücü ile çevrelenmiş olarak bir kolona doldurulması ve üzerinden örneklerin geçirilmesi ile sağlanır. Durgun fazdaki matriksin gözeneklerinden daha küçük olan moleküller matriksin gözenekleri içine girerler ve kolon boyunca daha yavaş hareket ederler. Gözenek büyüklüğünden daha büyük olan moleküller ise durgun faz tarafından dışarıda bırakılırlar ve dolayısıyla kolonu ilk önce terk ederler. Ara büyüklükteki moleküller matriks içerisine girebilirler fakat kolon içinde küçük moleküllerinkinden daha kısa süre kalırlar. Böylelikle moleküllerin hepsi kolondan azalan büyüklük sırasına göre elüe olurlar (Erarslan, 2011b).

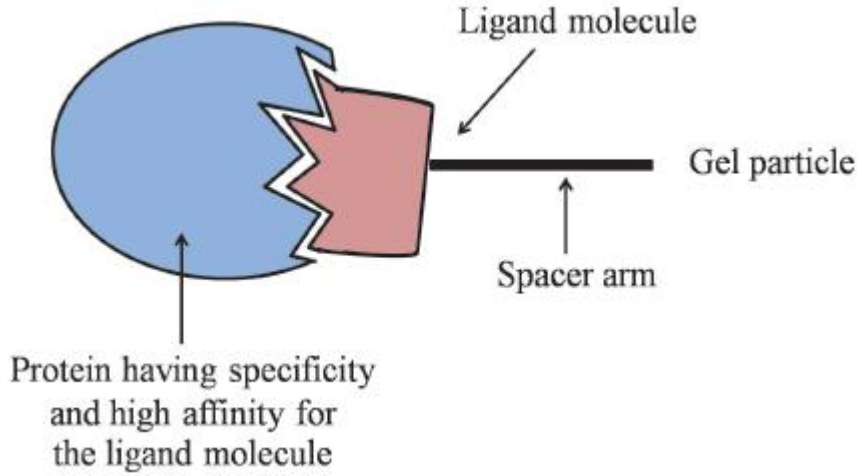
Bazı proteinler jel geçirgenlik kromatografisinde anormal davranışlar gösterirler, bunlar globüler biçiminde olmayan proteinlerdir. Genellikle aynı molekül büyüklüğünde olan fakat uzun ince proteinler daha erken elüe olurlar. Üre ve guanidin HCl gibi denatüre edici maddeler tersiyer ve kuaterner yapıdaki protein strüktürlerini tesadüfi kıvrım konfigürasyonuna dönüştürerek moleküler ağırlıklarına karşı daha duyarlı bir konuma gelmelerine neden olurlar. Jel geçirgenlik kromatografisinin ayırma mekanizması her iki moleküler biçim ve kütle için olacak şekilde olup; jel filtrasyon kromatografisinin çözeltideki molekül biçimini belirlemede kullanılmasına olanak verir. Dolayısıyla jel geçirgenlik kromatografisi denetürasyonun gözlemlenmesinde kullanılabilir (Erarslan, 2011b). Jel geçirgenlik kromatografisinin temel adımları Şekil 2.10' da gösterilmiştir.



Şekil 2.10 Jel geçirgenlik kromatografisini kullanılarak iki farklı proteinin ayrımı (Sattayasai, 2012).

2.6.2.3 Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi bir biyolojik ligand (substrat, koenzim, hormon, antikor ya da nükleik asit) ya da onun sentetik bir analogu ile protein molekülü üzerindeki komplementer bağlanma bölgesi arasında olan özgün etkileşimi esas olan güçlü bir protein saflaştırma tekniğidir. Afinite kromatografisinde proteinler spesifik bir liganda bağlanır fakat daha sonra çözeltiye geri döner. Bir başka deyişle ligand molekülün immobilize olduğu solid destek matriksi ile protein molekülü arasındaki biyolojik afiniteye dayanan geri dönüşümlü bir bağlanma söz konusudur. Hedef protein ile matriks arasındaki etkileşim adsorpsiyon kromatografisinde genellikle yararlanılan izoelektrik nokta ya da hidrofobisite gibi özellikleri temel almamaktadır. Burada söz konusu olan etkileşim antikorların antijenlerle, enzimlerin substrat analoglarıyla, nükleik asitlerin bağlanma proteinleriyle ve de hormonların reseptörleriyle olan etkileşimleri türündendir. Bir afinite kromatografi işlemi aşağıdaki adımlar içerir: (i) uygun bir ligandın seçimi, (ii) taşıyıcı matriks üzerine ligand immobilizasyonu, (iii) protein karışımının matriks ile temas ettirilmesi, (iv) non-spesifik olarak bağlanmış proteinlerin uzaklaştırılması, (v) ilgilenen proteinin saf olarak elüsyonu (Erarslan 2011b). Afinite kromatografisinin temel adımları Şekil 2.11’ da gösterilmiştir.



Şekil 2.11 Afinite kromatografisinin temel adımlarının şematik gösterimi (Sattayasai, 2012).

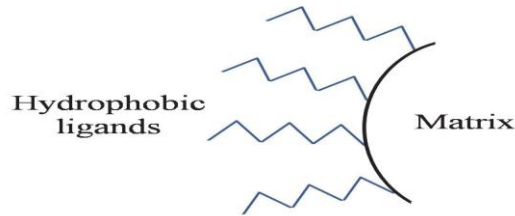
2.6.2.4 Hidrofobik etkileşim kromatografisi

Proteinler çok sayıda ve farklı miktarlarda amino asitlere sahiptirler ve hidrofobik özellik gösteren amino asitler sudan uzaklaşmayı tercih ederken etmektedir: izolösin (I), lösin (L), valin (V), alanin (A), metionin (M) gibi alifatik amino asitler; fenilalanin (F), tirozin (Y) ve triptofan (W) gibi aromatik amino asitler. Bu amino asitler bir çoğu suyla teması engellemek için proteinin tersiyer yapısının merkezine gömülmektedirler. Su ile teması en aza çekmek için yüzeyde bulunan hidrofobik amino asitlerin çevresi çok sayıda hidrofilik amino asitlerce çevrelenmektedir. Bu hidrofobik yüzeyler bir proteinin biyolojik rolünde görev alabilir, örneğin, kalmodulin kalsiyuma bağlandığında konformasyonu değişmektedir (Bonner, 2007).

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ters faz kromatografisi ile benzerlikler göstermektedir: her iki kromatografide hidrofobik ligandlı bir protein üzerindeki hidrofobik amino asitlerin etkileşimi içermektedir. Ters faz kromatografisi için resinler hidrofobik etkileşim kromatografisinde yer alan resinlerden çok resinlere bağlı daha fazla liganda sahiptir. Dolayısıyla proteinler kuvvetli bir şekilde ters faz kromatografisi resinlerine kuvvetli bir şekilde bağlanmaktadır. Sonuç olarak, bir ters faz kromatografisi resinine bağlı proteinler etkili bir elüsyon için organik solventlere gereksinim duymakta ancak bu da proteinin biyolojik aktivitesinin kaybıyla sonuçlanmaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi resinleri üzerinde

daha düşük ligand yoğunluğu resinlerin protein bağlama kapasitesini açıklayamamakta (tipik olarak 10-30 mg protein / ml resin) fakat biyolojik aktivitenin iyi geri kazanımını daha iyi sağlamaktadır (Bonner, 2007).

Bir kromatografik ortamın bir protein ve hidrofobik yüzey arasında geri dönüşümlü etkileşime bağlı bir ayrımdır. Bu etkileşim yüksek iyonik şiddet tamponu ile gerçekleştirilir ve amonyum sülfat çöktürmesinden sonra ideal bir aşama sağlamaktadır. Yüksek iyonik şiddetli solüsyonlardaki numuneler kolono bağlanmaktadır. Daha sonra bağlı substratlar differansiyel yollarla elüe edilmektedir. Elüsyon için genellikle tuz konsantrasyonunda azalma ile gerçekleştirilmektedir (Bonner, 2007). Hidrofobik etkileşim kromatografisinin temel adımları Şekil 2.12’ da gösterilmiştir.



Şekil 2.12 Hidrofobik etkileşim kromatografisinin temel adımlarının şematik gösterimi (Sattayasai, 2012).

2.6.3 Proteom projelerinde proteinlerin tanılanması

Proteom, organizma ya da hücre tarafından ifade edilen tüm proteinlerin tanımlanması olarak ifade edilebilir. Dolayısıyla ifade edilen tüm proteinleri tanılama proteom çalışmalarının ana merkezidir. En basit anlamda, tanılama, bir proteine ya da jel üzerinde elde edilen her bir noktaya veri tabanında bir erişim numarası (accession number) vermektedir. Böylece proteinin amino asit dizisi ile genin DNA dizisi arasındaki ilişki birleştirilir (Kazan, 2011).

2.6.3.1 Protein fragmentasyonu

Ya bir jelden saflaştırılmış protein ya da protein karışımının kütle spektrometreden (MS) önce proteinler tripsin kullanılarak yapıtaşlarını oluşturan peptitlere parçalanmaktadır. Tripsin protein fragmentasyonu için seçilmiş bir

enzim olup ya bir lizin ya da arjinin C-terminal ucunda spesifik olarak parçalayarak birçok peptit oluşmaktadır. Sonuçta her bir peptit sonunda pozitif yüklü amino asit kalıntısı bulunmaktadır. Bu pozitif yükün varlığı “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF ya da MALDI MS)” esnasında peptit göçünün anahtarıdır. Dahası, 500-2500 Da aralığındaki kütlelere sahip peptitlerin birçoğu, çeşitli MS araçları ile saptanabilmektedir. Herhangi bir proteaz kontaminasyonu ile parçalama içermeyen yüksek nitelikli tripsin ile parçalandığında ve endojenik kimotriptik aktivitesinden dolayı inhibe olduğundan sıklıkla kullanılmaktadır. Bu girişimlerin herhangi birisi, MS tarafından ardışık peptitlerin saptanma duyarlılığını ve etkinliğini düşürmektedir (Kavanagh, 2011).

2.6.3.2 MALDI-ToF MS

Protein kütle spektrometresinin bu tipinde, saflaştırılmış bir proteinden türevlenmiş bir peptit parçası bir enerji-absorblayan matriks materyali (α -siyano-4-hidroksisinnamik asit – HCCA) ile karıştırılıp ve metal bir hedef plağa spotlanmaktadır. Kurutma aşamasından sonra, bu örnek, yüksek voltaj ve vakum altında lazer ışığı (337 nm) ile iyonizasyonu sağlayacak bir MALDI-ToF kütle spektrometresinin vakum haznesine yerleştiriyor. HCCA lazer enerjisini peptitlere transfer etmesini kolaylaştırmaktadır ve bu peptitleri uymasını sağlamaktadır. Bu peptitler pozitif yüklendiğinden time-of-flight algılayıcısında elektrostatik olarak “uçan” peptitleri saptamaktadır. Dolayısıyla, peptit iyonları kütle / yüklerine (m/z ya da MS spektrumu) bağlı olarak ayrılmaktadır. Bu, proteinin içinde mevcut tüm peptidler algılanacağı anlamına gelmemekte ancak diğer biyomoleküller (nükleik asitler, karbohidratlar) ve bozulmamış proteinlerin analizi için uygundur. Bununla birlikte, 2'-5'-dihidroksibenzoik asit veya sinapsik asit gibi alternatif matriks materyaller bazı analizlerde kullanılabilir. MALDI-ToF MS hızlı ve otomatize bir teknik olmasına rağmen çoklu örnekler çalışıldığında ardışık olarak analizlenmektedir ancak tek örneklerinin çalışıldığı protein kütle spektrometre çalışmalarına göre daha az duyarlı olabilmektedir (Kavanagh, 2011).

2.6.3.3 Elektrospray kütle spektrometresi

MALDI-ToF MS analizine benzemeyecek şekilde, elektrospray veya nanoelektrospray iyonizasyonu teknikleri (ESI veya nanoESI) direkt olarak sıvı bir fazdan gaz şeklinde iyonize edilmiş moleküler peptitler oluşturulmaktadır. Peptit kütesinin ve sekansının analizi için kütle spektrometresinin bu tipi son on yıllık süreçte peptitlerin ilk LC seperasyonların gerçekleştirilmesiyle popüler hale gelmiştir. Uygulamada, saf veya kısmen saf bir proteinden bir peptit karışımı ilk olarak ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ayrıştırılıyor. LC kolonundan peptitler elüe edilirken nanoESI veya ESI ile iyonize edilirler. Daha sonra, protein tanılamasına olanak sağlayan *in silico* veritabanlarına karşı sorgulamadan önce yüksek doğruluklu kütle tayini gerçekleştirilmektedir. ‘LC-MS yaklaşımı’ başlangıç materyalin oldukça az miktarlarını kullanarak oldukça yüksek protein tanılamasına olanak sağladığından MALDI-ToF MS yönteminden üstündür. Dahası, peptit saflaştırılması LC aşaması esnasında meydana geldiğinden, örnek saflığı MALDI kullanılmasından daha fazladır. Hem MALDI-ToF hem de LC-MS tekniklerinde saptanan peptitler ayrıca daha küçük peptit fragmentlerinin oluşmasını sağlayan tekrarlayan iyonizasyonuna MS/MS ya da MS yoluyla maruz kalmaktadır (Kavanagh, 2011).

2.6.3.4 Shotgun proteomiks

Peptitlerin ayrımı için LC fraksiyonunda ilerlemelerden daha da önemli olan bir veritabanında yer alan proteine denk gelen peptitlerin saptanmasını sağlayacak algoritmaların varlığıdır. Protein kütle spektrometre ile kompleks bir karışımda bulunan birçok proteinin eş zamanlı tanınması olasıdır. Bu yaklaşım ‘shotgun proteomiks’ olarak bilinir ve de tripsinizasyon ve MS analizinden önce ilgili proteinin saflığına ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır. Tripsin kesiminden sonra sonuçlanan karışım, yüzlerce protein ve binlerce peptit içeren başlangıç örneğinde bulunan bütün proteinlerden türevlenen peptitleri içermektedir. LC-MS/MS tarafından bu karışımın fraksiyonlanması ve taranmasından sonra bit protein listesi elde edilir ve uygun bir *in silico* veri tabanına karşılaştırılmaktadır. Bazı proteinler tek bir peptit ile tanılanabilirken çoğu durumda diğer proteinler her

protein için iki peptidin taranması ya da % 5–10' lik sekans kapsamı, proteinin doğru identifikasyonu için gereklidir (Kavanagh, 2011).

2.6.3.5 Kantitatif proteomiks

Proteomiks stratejilerinde kullanılan protein tanılanması temel olarak kalitatif bir durum olarak nitelendirilirdi. Başka bir deyişle, biz bir proteinin varlığını saptarız ancak genel olarak bu proteinin ya da farklı şartlar altında özel bir proteinin miktarının gerçekte onun ne kadar olduğunu kantitatif olarak bilemeyiz. Kantitatif proteomiks diferansiyel protein ifadelerini saptayan görüntüleme analizlerini takiben iki deneysel şartın 2D-PAGE analizinin karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bu işlem genel olarak tripsin kesimi ve LC–MS/MS analizini takiben ya sistein spesifik ya da lizin spesifik kimyasal olarak işaretlenmiş proteinler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Daha sonra, protein miktarının ölçülmesi, karşılaştırılmalı kütle spektrumlarında farklı işaretlenmiş peptit çiftlerinin iyon sinyal yoğunluğunun ölçülmesi ile başarılmaktadır. Fungal proteomikte bu teknik: (i) protein ifadesinin kapsamı üzerine kültür şartlarının etkisini araştırmak (ii) gen delesyonunu takiben global veya spesifik protein ifadesinin değiştirme çalışmaları ve (iii) enfeksiyon esnasında virulans faktör ifadesinin değiştirilmesini anlamayı sağladığında önemlidir (Kavanagh, 2011).

2.7 Mayalarla İlgili Türkiye’ de Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde gıdalarda ve çevrede bulunan mayaların fenotipik ve genotipik olarak tanılanması ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Fenotipik tanılama ile ilgili bir çalışmada Çorbacı (2008) tarafından gerçekleştirilen bir yüksek lisans çalışmasında, yüksek sıcaklık ve ekstrem pH’ da *D. hansenii* strainlerinin büyümesi üzerine sodyumun etkisi adlı çalışmasında 60 izolatın 36’sı fenotipik olarak *D. hansenii* olarak tanılanmıştır. Fenotipik tanılama ile ilgili diğer bir çalışmada Gözütok (2013) tarafından yapılan bir yüksek lisans çalışmasında, ev tipi ve endüstriyel turşu örneklerinden maya izolasyonu gerçekleştirmiş ve elde edilen 12 maya izolatı API ID 32C biyokimyasal kit sistemi kullanılarak *Candida*

aff. sorboxylosa, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania exigua*, *Pichia barkeri*, *Pichia fermentans*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia kluyveri* ve *Pichia membranifaciens* olarak tanılanmıştır. Fenotipik ve genotipik tanılama ile yapılan bir çalışmada Yalçın (2007) tarafından gerçekleştirilen doktora çalışmasında, beyaz peynirlerde bozunmaya yol açan 92 adet maya izolatu izole etmiş ve çalışma sonucunda en yaygın olarak bulunan türleri; *D. hansenii*, *Y. lipolytica* ve *K. marxianus* olarak tanılanmıştır. Hem fenotipik hem de genotipik olarak tanılama yapılan başka bir çalışmada, Öztürk (2013) tarafından yapılan yüksek lisans çalışmasında, geleneksel Türk sucuklarından maya izolasyonu gerçekleştirilmiş, bunların fenotipik ve genotipik olarak tanımlanması gerçekleştirilerek bu mayaların sucuk üretiminde kullanılması ve sucuğun karakteristik özelliklerine uygun olanların starter kültür olarak belirlenmesi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen saf maya izolatları API ID 32C kitleri kullanılarak mini API sisteminde fenotipik olarak tanılanmış ve tanılama sonucunda en fazla sayıda strainin *Candida* genusuna ait olduğu olduğu, bunun dışında *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* ve *Zygosaccharomyces* genusuna ait mayaların da bulunduğu saptanmıştır. Bu maya strainleri Rep-PCR, RAPD-PCR ve 26S rDNA dizi analizi gibi genotipik tanılama sonucunda, *Candida*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Torulaspora*, *Clavispora*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Kazachstania*, *Issatchenkia*, *Filobasidium* ve *Wickerhamomyces* gibi maya cinslerinin bazı türleri de saptanmıştır. Güngör (2009) tarafından yapılan bir yüksek lisans çalışmasında, ağır metallerle kirlenmiş çevrelerden maya izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen 20 maya izolatu hem Barnett et al. (2000) tarafından önerilen fenotipik hem de ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesi PCR ile çoğaltılmış ve bu bölgenin sekansı saptanarak genotipik olarak tanılanmıştır. Tanılamalar sonucunda en fazla maya straininin *Y. lipolytica* olduğu bulunmuştur. Türkiye’de *Y. lipolytica* ile ilgili bir çalışma Karasu-Yalçın (2007) tarafından yapılan doktora çalışmasında yapılmıştır ve ilgili çalışmada *Y. lipolytica* ile sitrik asit üretiminde üzüm şirasının kullanılmasının etkileri araştırılmıştır. Diğer bir çalışmada ise Çelik (2012) tarafından yapılan yüksek lisans tezi kapsamında, iki *Y. lipolytica* straininin hem sitrik asit hem de izositrik asit üretimlerini farklı karbon kaynaklarında araştırmış ve her iki maya straininde sitrik asidi en fazla glukoz ve gliserol içeren ortamlarda ürettiğini bulurken, izositrik asit üretiminin

en fazla ayçiçek yağında üretildiğini saptamıştır. Türkel ve Arık (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, *S. cerevisiae*' da *Pho85* geninde bir mutasyon meydana getirilmiş ve SUC2 geninden invertaz biyosentezinin kontrol edilmesi ve yüksek oranda glukoz alımı için gerekli olduğu gösterilmiştir. Mayalarla ilgili olarak enzim üretimi çalışmaları çok olmakla birlikte, enzim saflaştırma çalışmaları çok sınırlıdır. Türkel ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, yüksek ozmotik stres ve azot açlığı altında *K. lactis* ve *K. marxianus* mayalarında β -galaktosidaz enzim sentezi üzerine etkilerini araştırmışlar ve azot açlığının *K. lactis*' de β -galaktozidaz biyosentezinde önemli seviyede azalmaya neden olurken, *K. marxianus*' da β -galaktozidaz biyosentezi 2 kat arttığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda, bu çalışmada, yüksek seviyede sükrozun yerine NaCl' ün *K. lactis* ve *K. marxianus* da üremeyi inhibe ettiği saptanmıştır. Yavuz (2013) tarafından yapılan yüksek lisans çalışmada yoğurttan izole edilen bir *Saccharomyces cerevisiae* mayasından proteaz enzimi üretilmiş ve sırasıyla etanol çöktürmesi ve afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Bu enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE' de 43 kDa, optimum sıcaklığının 105°C, optimum pH' ın 7, EDTA ile tamamen inhibe olduğundan bir metalloproteaz olduğu saptanmıştır. Ülkemizde *Y. lipolytica*'nın hem alkalik ekstraselüler proteaz hem de ribonükleaz enzimleri hakkında çok fazla yayına rastlanmamıştır. Akpınar (2008) tarafından yapılan yüksek lisans çalışmasında, *Y. lipolytica*' da alkalik ekstraselüler proteaz ve ribonükleaz üretimi üzerine farklı karbon kaynakları, farklı azot kaynakları ve değişen pH' ın etkileri araştırılmış ve her iki enzimin nötr pH' da, glukoz ve düşük molekül ağırlıklı azot kaynakları eksikliğinde en iyi ürettiği saptanmıştır. Bu çalışma dışında mayalardan ribonükleaz enzimi üretimi ve saflaştırılması ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan 22 adet *Yarrowia lipolytica* straininden 10 tanesi Akpınar (2008), diğer 10 tanesi Güngör (2009), 1 tanesi Öztürk (2000) ve 1 tanesi Yalçın (2007) tarafından yapılan yüksek lisans ve doktora tezlerinde elde edilen örneklerdir.

3.1.2 Kullanılan besiyerleri

Besiyeri 1: Malt Yeast Glukoz Pepton Broth/Agar

Malt ekstrakt	3 g
Yeast ekstrakt	3 g
D-glukoz	10 g
Peptone	5 g
(Agar)	20 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri, distile suda çözülerek otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri, DNA izolasyonunda mayaların çoğaltılmasında kullanılmıştır (Atlas, 2004).

Besiyeri 2: Yeast Pepton Glukoz Agar (YPD)

Yeast Ekstrakt	10 g
Pepton	20 g
D-Glukoz	20 g
Agar	20 g
Distile Su	1000 ml

Besiyeri, distile suda çözülerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri, mayaların stok kültür halinde saklanması için kullanılmıştır (Atlas, 2004).

Besiyeri 3: Skim Milk Agar

Skim Milk petripleri hazırlanırken aşağıdaki sıra takip edilir ve 15 ml besiyeri içeren bir petride sırasıyla %10'luk Skim Milk solüsyonundan 1,5 ml, KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 karışımından 1,5 ml ve diğer bileşenlerden 12 ml gelecek şekilde aseptik şartlarda skim milk agar oluşturulmaktadır.

- 50 mM fosfat tamponunda %10'luk Skim Milk (Difco) solüsyonunun 60 ml'si hazırlanır ve 105 °C' de, 3 dakika steril edilir. Aseptik şartlarda her petriye 1,5 ml gelecek şekilde ilave edilir.

- 24 g/l KH_2PO_4 ve 35,5 g/l Na_2HPO_4 karışımının 60 ml'si hazırlanır ve 121°C' de, 15 dakika steril edilir. Aseptik şartlarda her petriye 1,5 ml gelecek şekilde ilave edilir.

- Yeast nitrogen base

(amino asitsiz amonyum sülfatsız)	1 g
-----------------------------------	-----

Adenin	15 mg
--------	-------

Agar	12 g
------	------

Distile su	480ml
------------	-------

121°C' de, 15 dakika otoklavda steril edilir ve aseptik şartlarda her petriye 12 ml gelecek şekilde ilave edilir.

Bu besiyeri ekstrasellüler alkalın proteaz enzim aktivitesinin tarandığı besiyeridir. İnkübasyon sonunda, proteolitik aktiviteye sahip *Y. lipolytica* strainleri opak besiyerinde açılma zonu oluşturmaktadır. Açılma zonu gerçekleştirilen maya strainlerinin proteaz enzimini salgıladığı belirtilmektedir (Cheng and Ogrydziak, 1987; Ogrydziak, 2003; Akpınar et al., 2011).

Besiyeri 4: RNA Agar

Glukoz	10 g
Proteoz-pepton (Difco)	4 g
RNA (Torula yeast type VI)	2 g
KH ₂ PO ₄	0,145 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,4 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,15 g
NaCl	0,1 g
Tiamin	1 mg
Adenin	25 mg
Agar	20 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri, distile suda çözülerek otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri, ekstrasellüler ribonükleaz enzim aktivitesinin tarandığı besiyeridir. İnkübasyon sonunda, petrilerin üzerine Toluidine Blue O solüsyonu spreylenecek birkaç dakika sonra petrilerde koyu mavi zona karşı oluşan pembe zonun ekstrasellüler ribonükleaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (Cheng and Ogrydziak, 1987; Ogrydziak, 2003; Akpınar et al., 2011).

Besiyeri 5: Gliserol Proteoz Pepton (GPP) (pH 6,8)

Gliserol	6,7 g
Proteoz pepton (Difco)	1,6 g
Yeast nitrogen base (amino asitsiz amonyum sülfatsız)	1,7 g
Adenin	30 mg
100 mM fosfat tamponu (pH 6,8)	1000 ml

Besiyeri, distile suda çözülerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri, mikroorganizmaların ekstrasellüler olarak ürettikleri enzimlerini salgıladığı ortamdır. Bu besiyerinde organizmaların ürettikleri ekstrasellüler alkalın proteaz enzimin üretildiği besiyeridir (Cheng and Ogrydziak, 1987; Ogrydziak, 2003).

Besiyeri 6: Gliserol Proteoz Pepton-Sitrat (GPP-sitrat) (pH 5,0)

Gliserol	20 g
Proteoz pepton (Difco)	6 g
Yeast nitrogen base (amino asitsiz amonyum sülfatsız)	5 g
Adenin	60 mg
100 mM sitrat tamponu (pH 5,0)	1000 ml

Besiyeri, distile suda çözülerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri mikroorganizmaların ekstraselüler olarak ürettikleri enzimlerini salgıladığı ortamdır. Bu besiyerinde organizmaların ürettikleri ekstrasellüler ribonükleaz enzimin üretildiği besiyeridir (Cheng and Ogrydziak, 1986; Cheng and Ogrydziak, 1987; Ogrydziak, 2003).

3.1.3 Kullanılan çözelti, tampon ve bileşikler

3.1.3.1 Moleküler tanılama çalışmalarında kullanılan materyaller

Lizis tamponu

EDTA (Sigma) pH 8,0	60 mM
NaCl (Sigma)	150 mM
SDS (Sigma)	% 1
Tris-HCl (Sigma) pH 8,0	400 mM

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu et al., 2000).

Potasyum asetat tamponu

5 M Potasyum-asetat (Sigma)	60 ml
Glisial asetik asit (Sigma)	11,5 ml
Distile Su	28,5 ml

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu et al., 2000).

Tris-borat-EDTA tamponu (TBE) (5x/L)

Trisma base (Sigma)	54,0 g
Borik asit (Sigma)	27,5 g
0.5 M EDTA (Sigma) pH 8.0	20,0 ml

Bu tampon, agaroz jel elektroforezinde DNA ve PCR ürünlerinin yürütölmesinde kullanılmıştır (Liu et al., 2000).

İzopropil alkol (soğuk)**%70'lik etanol (soğuk)****Ultra saf su****Agaroz (Prona)****dNTP karışımı (100 mM, Fermentas)****Safeview (Nükleik asit jel boyası, NBC Biologicals)****GelRed (Nükleik asit jel boyası, Biotium)**

**Marker DNA (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas;
GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)**

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem)

3.1.3.2 AEP ve RNaz enzimlerinin üretimi, taranması ve saflaştırma çalışmalarında kullanılan çözeltiler

Toluidine Blue O (Sigma type O) çözeltisi

% 50' lik etanolde % 0,1' lik toluidine blue O eklenerek solüsyon hazırlanır. Bu solüsyon RNA agar petrilerinde inkübasyon sonucunda besiyerine spraylenir ve koyu lacivert zemine karşı pembe zon oluşumu RNaz aktivitesini taranmasında kullanılmaktadır (Cheng and Ogrydziak, 1987; Ogrydziak, 2003).

100 mM Fosfat Tamponu (pH 6,8)

Bu tampon alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin GPP sıvı besiyerinde üretilmesinde kullanılmaktadır. 51 ml 0,2 M NaH_2PO_4 çözeltisi ile 49 ml 0,2 M Na_2HPO_4 çözeltisi karıştırılır ve pH 6,8' e ayarlanır. Daha sonra, son hacim saf su ile 200 ml' ye tamamlanır (Atlas, 2004).

100 mM Sitrat Tamponu (pH 5,0)

Bu tampon ekstrasellüler ribonükleaz enziminin GPP-sitrat sıvı besiyerinde üretilmesinde kullanılmaktadır. 20,5 ml 0,1 M sitrik asit çözeltisi ile 29,5 ml 0,1 M sodyum sitrat ile karıştırılır ve pH 5,0' a ayarlanır. Daha sonra, son hacim saf su ile 100 ml' ye tamamlanır (Atlas, 2004).

Bradford (Coomassie Blue reaktif) Çözeltisi

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanol içerisinde çözülür ve daha sonra, 100 ml %85'lik (w/v) fosforik asit ile karıştırılır. Son olarak, solüsyon distile su ile bir litreye tamamlanmış ve Whatman #1 filtre kağıdı ile filtrelenir. Bradford reaktifi, protein konsantrasyonunun saptanmasında kullanılmıştır (Bradford, 1976).

AEP enziminin aktivite tayininde kullanılan çözeltiler**50 mM Glisin-NaOH tamponu (pH 10,5)**

Glisin	3,75 g
NaOH	2 g
dH ₂ O	1000 ml

1 L distile suda, glisin ve sodyum hidroksit ayrı ayrı çözülmüş ve bu iki çözelti pH 10,5 olana dek birbiriyle karıştırılmıştır.

Kazein çözeltisi

50 mM Glisin-NaOH tampon çözeltisinde % 0,6 g olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

Trikloroasetikasit (TCA) çözeltisi (0,44 M)

7,19 g (0,44 M) TCA 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Sodyum karbonat çözeltisi (0,5 M)

5,3 g (0,5 M) Na₂CO₃ 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Folin-Ciocalteu reaktifi (yarı yarıya seyreltilmiş)

Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, distile su ile 1:1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

AEP enziminin saflaştırmasında kullanılan tamponlar

30 mM Fosfat Tamponu (pH 6,4)

278 ml 0,3 M K_2HPO_4 çözeltisi ile 722 ml 0,3 M KH_2PO_4 çözeltisi karıştırılır ve son hacim saf su ile 2000 ml' ye tamamlanır. Daha sonra pH 6,4' e ayarlanır.

10 mM Tris Tamponu (pH 8,4)

0,1 M Tris-base ile 80 ml 0,1 M HCl çözeltisi karıştırılır ve pH 8,4' e ayarlanır.

0,5 M NaCl içen 10 mM Tris Tamponu (pH 8,4)

10 mM Tris tampon solüsyonuna 0,5 M NaCl ilave edilmesi ile hazırlanır.

AEP enziminin saflaştırmasında kullanılan kromatografi kolonlarının hazırlanması

Sephadex G-75 jel filtrasyon kolonunun hazırlanması

6 g Sephadex G-75 100 ml 30 mM Fosfat Tamponu (pH 6,4) ile karıştırıldı ve gece boyunca şişmeye bırakıldı. Jel bir huni yardımıyla kromatografi kolonuna dolduruldu. Hazırlanan jel peristaltik pompa yardımıyla kolona paketlenildi. Kolon aynı tampon çözelti ile dengelendi. Kolonunun dengelendiği üstten alınan sıvı ile alttan alınan sıvının absorbanslarının aynı olması ile anlaşıldı (Erarslan, 2011b).

DEAE-selüloz iyon değişim kolonunun hazırlanması

20 g DEAE-selüloz 200 ml 0,5 N HCl ile aktifleştirildi. Kullanılan HCl iyon değişim uçlarını dışarı çıkmasını sağladı. 0,5 N NaOH ile yıkanarak ortam nötralize edildi. Jel 10 mM (pH 8,4) Tris tamponu içine alındı. Kromatografi kolonuna bir huni yardımıyla tampon çözelti dolduruldu. Hazırlanan jel peristaltik pompa yardımıyla kolona paketlenildi. Kolon aynı tampon çözelti ile dengelendi. Kolonunun dengelendiği üstten alınan sıvı ile alttan alınan sıvının absorbanslarının aynı olması ile anlaşıldı (Erarslan, 2011b).

Ekstrasellüler RNaz enziminin aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

100 mM Sitrat tamponu (pH 5,0)

20,5 ml 0,2 M sitrik asit çözeltisi ile 29,5 ml 0,2 M sodyum sitrat ile karıştırılır ve son hacim saf su ile 100 ml' ye tamamlanır. Daha sonra, pH 5,0' a ayarlanır.

RNA çözeltisi

100 mM sitrat tampon çözeltisinin 100 ml'sinde 1,5 g RNA (Torula yeast type VI) olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

Perklorik asit çözeltisi

Perklorik asit % 12

Uranil asetat % 0,4

Ekstrasellüler RNaz enziminin saflaştırmasında kullanılan tamponlar

33 mM Fosfat Tamponu (pH 6,8)

497 ml 0,33 M K_2HPO_4 çözeltisi ile 503 ml 0,33 M KH_2PO_4 çözeltisi karıştırılır ve pH 6,8' e ayarlanır. Daha sonra, son hacim saf su ile 2000 ml' ye tamamlanır.

20 mM Tris Tamponu (pH 7,0)

2,42 g Tris-base ile 150 ml 0,02 M HCl çözeltisi karıştırılır ve pH 7,0' e ayarlanır. Daha sonra, son hacim saf su ile 500 ml' ye tamamlanır.

1 M NaCl için 20 mM Tris Tamponu (pH 7,0)

20 mM Tris tamponuna (pH 7,0) 1 M NaCl ilave edilmesi ile hazırlanır.

Ekstrasellüler RNaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan kromatografi kolonlarının hazırlanması

Sephadex G-75 jel filtrasyon kolonunun hazırlanması

6 g Sephadex G-75 100 ml 33 mM Fosfat Tamponu (pH 6,8) ile karıştırıldı ve gece boyunca şişmeye bırakıldı. Jel bir huni yardımıyla kromatografi kolonuna dolduruldu. Hazırlanan jel peristaltik pompa yardımıyla kolona paketlenildi. Kolon aynı tampon çözelti ile dengelendi. Kolonunun dengelendiği üstten alınan sıvı ile alttan alınan sıvının absorbanlarının aynı olması ile anlaşıldı (Erarslan, 2011b).

DEAE-selüloz iyon değişim kolonunun hazırlanması

20 g DEAE-selüloz 200 ml 0,5 N HCl ile aktifleştirildi. Kullanılan HCl iyon değişim uçlarını dışarı çıkmasını sağladı. 0,5 N NaOH ile yıkanarak ortam nötralize edildi. Jel 20 mM (pH 7,0) Tris tamponu içine alındı. Kromatografi kolonuna bir huni yardımıyla tampon çözelti dolduruldu. Hazırlanan jel peristaltik pompa yardımıyla kolona paketlenildi. Kolon aynı tampon çözelti ile dengelendi. Kolonunun dengelendiği üstten alınan sıvı ile alttan alınan sıvının absorbanlarının aynı olması ile anlaşıldı (Erarslan, 2011b).

3.1.3.3 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (SDS-PAGE) kullanılan çözeltiler

% 12 Ayırma Jeli (Resolving Gel) Hazırlama (pH 8,8)

Ultrasaf su	3,4 ml
%30 akrilamid, %0,8 bisakrilamid	4,0 ml
Resolving Jel Tamponu (pH 8,8) (1,5 M)	2,50 ml
%10 SDS	0,1 ml
Amonyum persülfat (APS) (%10)	50 µl
N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin (TEMED) (%1,5)	5 µl

Homojen olarak karıştırılır (Laemmli, 1970).

% 4 Yükleme Jeli (Stacking Gel) Hazırlama (pH 6,8)

Ultrasaf su	5,7 ml
% 30 akrilamid, % 0,8 bisakrilamid	1,7 ml
Stacking Jel Tamponu (pH 6,8) (0,5 M)	2,50 ml
% 10 SDS	0,1 ml
Amonyum persülfat (APS) (% 10)	50 µl
N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin (TEMED) (% 1,5)	10 µl

Homojen olarak karıştırılır (Laemmli, 1970).

Akrilamid/bis akrilamid çözeltisi (%30 T, %2,67 C)

Akrilamid (Sigma)	87,6 g
N'N'-bis-metilen-akrilamid (Sigma)	2,4 g

Yukarıdaki bileşenler, ultra saf su ile çözündürülüp 300 ml'ye tamamlandıktan sonra filtre edildikten sonra 4°C' de saklanır (Laemmli, 1970).

%10 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS)

SDS (Sigma)	10 g
-------------	------

Ultra saf su ile çözündürülüp 100 ml'ye tamamlanır (Laemmli, 1970).

% 10 (w/v) Amonyum persülfat (APS)

APS	100 mg
Deiyonize su	1 ml

%10 APS taze olarak hazırlanmalıdır (Laemmli, 1970).

1,5 M Tris-HCl “Ayrırma Jeli (Resolving Gel) Tamponu” (pH 8,8)

Tris (Sigma)	27,23 g
--------------	---------

80 ml ultra saf su eklenip 6 N HCl ile pH 8,8' e ayarlanır. Son hacim ultra saf su ile 150 ml' ye tamamlanır (Laemmli, 1970).

0,5 M Tris-HCl “Yükleme Jeli (Stacking Gel) Tamponu” (pH 6,8)

Tris (Sigma)	6 g
--------------	-----

60 ml ultra saf su eklenip 6 N HCl ile pH 6,8' e ayarlanır ve son hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır (Laemmli, 1970).

10x Elektroforez (Running) Tamponu (pH 8,3)

Tris Base	30,3 g
Glisin	144 g
SDS	10 g
Distile su	1000 ml

Kullanım esnasında 150 ml 10x stok solüsyonu 1,5 litre ultra saf su ile seyreltilir (Laemmli, 1970).

Örnek Tamponu (SDS İndirgeyici Tampon)

Ultra saf su	3,55 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
Gliserol	2,5 ml
% 10 (w/v) SDS	2,0 ml
% 0,5 (w/v) Bromofenol Blue	0,2 ml

Homojen olana kadar karıştırılır (Laemmli, 1970).

3.1.3.4 SDS-PAGE jellerinin boyanması

Coomassie Boyama Çözeltileri

Fiksasyon Çözeltisi

Trikloroasetik asit	20 g
Ultra saf su	100 ml

Coomassie Çözeltisi

Coomassie Blue R-250	1 g
Metanol	450 ml
Asetik asit	100 ml
Ultra saf su	450ml

Yıkama (Destain) Çözeltisi

Metanol	100 ml
Asetik asit	250 g
Ultra saf su	1650 ml

Stok Solüsyon

Asetik asit	50 g
Ultra saf su	1000 ml

Gümüş Boyama Çözeltileri

Fiksasyon tamponu

Metanol	150 ml
Asetik asit	36 ml

% 37 Formaldehid	150 µl
------------------	--------

Son hacim ultra saf su ile 300 ml' ye tamamlanır.

Yıkama

Etanol	1000 ml
Ultra saf su	1000 ml

Ön muamele

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 g
Ultra saf su	400 ml

Gümüş Nitrat Solüsyonu

AgNO_3	0,8 g
% 37 Formaldehid	300 µl
Ultra saf su	400 ml

Geliştirme Solüsyonu

Ultra saf su	400 ml
Potasyum karbonat	9 g
Ön muamele solüsyonu	8 ml
% 37 Formaldehid	300 µl

Stop Solüsyonu

Metanol	200 ml
Asetik asit	48 ml

Son hacim ultra saf su ile 400 ml' ye tamamlanır.

3.1.3.5 Saflaştırılan AEP enziminin karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tampon ve materyaller

AEP enziminin optimum pH ve pH stabilitesi için kullanılan tamponlar

Fosfat tamponu: 0,1 M KH_2PO_4 çözeltisi ve 0,1 M K_2HPO_4 çözeltileri belli oranlarda karıştırılarak 50 mM'lık pH 6,0 – 7,0 – 8,0 tamponları hazırlanmıştır. AEP enziminin karakterizasyonunda optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Atlas, 2004).

Glisin-NaOH tamponu: 0,2 M glisin çözeltisi ve 0,2 M NaOH çözeltisi belli oranlarda karıştırılarak 50 mM'lık pH 9,0 – 9,5 – 10,0 – 10,5 – 11,0 tamponları hazırlanmıştır. AEP enziminin karakterizasyonunda optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Atlas, 2004).

KCl – NaOH tamponu: 0,2 M KCl çözeltisi ve 0,2 M NaOH çözeltisi belli oranlarda karıştırılarak 100 mM'lık pH 12,0 ve pH 13,0 tamponları hazırlanmıştır. AEP enziminin karakterizasyonunda optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Atlas, 2004).

AEP enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

50 mM Glisin-NaOH tampon (pH 10,5) çözeltisinin 100 ml'inde 0,6 g kazein, süt tozu, jelatin, kollojen, bovine serum albümin olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır (Kazan et al., 2005).

AEP enzim aktivitesi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

1 mM ve 10 mM konsantrasyondaki inhibitör maddeler için çözücü olarak; PMSF için etanol, EDTA ve EGTA için 50 mM pH 10,5 glisin-NaOH tampon kullanılmıştır (Kazan et al., 2005; Thumar and Singh, 2007; Öztürk et al., 2009).

AEP enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

5 mM konsantrasyondaki Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Mg^{+2} gibi 2 değerlikli metal iyonları ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} gibi tek değerlikli iyonlar için 50 mM pH 10,5 glisin-NaOH tampon olarak kullanılmıştır (Kazan et al., 2005; Öztürk et al., 2009).

AEP enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve hidrojen peroksitin etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

% 0,5-1 SDS (w/v), % 1-2 Tween 20 (v/v), % 1-2 Tween 40 (v/v), % 1-2 Tween 60 (v/v), % 1-2 Tween 80 (v/v), % 1-2 Triton X-100 (v/v) ve % 5-10-15 H_2O_2 konsantrasyonundaki yüzey aktif maddeler ve hidrojen peroksit için 50 mM pH 10,5 glisin-NaOH tampon olarak kullanılmıştır (Kazan et al., 2005; Öztürk et al., 2009).

3.1.3.6 Saflaştırılan ekstrasellüler RNaz enziminin karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tampon ve materyaller

Ekstrasellüler RNaz enziminin optimum pH ve pH stabilitesi için kullanılan tamponlar

KCl – HCl tamponu: 0,2 M KCl çözeltisi ve 0,2 M HCl çözeltisi belli oranlarda karıştırılarak 100 mM'lık pH 2,0 ve pH 2,5 tamponları hazırlanmıştır. RNaz enziminin karakterizasyonunda optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Atlas, 2004).

Sitrat tamponu: 0,1 M sitrik asit çözeltisi ve 0,1 M sodyum sitrat çözeltisi belli oranlarda karıştırılarak 100 mM'lık pH 3,0 – 3,5 – 4,0 – 4,5 – 5,0 – 5,5 – 6,0 tamponları hazırlanmıştır. RNaz enziminin karakterizasyonunda optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Atlas, 2004).

Fosfat tamponu: 0,2 M NaH_2PO_4 çözeltisi ve 0,2 M Na_2HPO_4 çözeltisi belli oranlarda karıştırılarak 100 mM'lık pH 6,5 – 7,0 – 7,5 – 8,0 tamponları

hazırlanmıştır. RNaz enziminin karakterizasyonunda optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Atlas, 2004).

RNaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

1 ve 10 mM konsantrasyondaki Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} ve Cd^{+2} gibi 2 değerlikli metal iyonları ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} gibi tek değerlikli iyonlar için 100 mM pH 5,00 sitrat tamponu kullanılmıştır (Wang and Ng, 2001; Gundampati et al., 2011).

RNaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör maddelerin etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

5 mM konsantrasyonundaki sitrik asit, EDTA, okzalik asit, sülfanilik asit, sodyum azid ve askorbik asit kimyasalları için 100 mM pH 5,00 sitrat tamponu kullanılmıştır (Gundampati et al., 2011).

RNaz enziminin Polihomoribonükleotidlere ve RNA Molekülüne olan özgünlüğünün belirlenmesi

100 μg poly (A), poly (C), poly (G) ve poly (U) polihomoribonükleotitleri ve RNA molekülleri için 100 mM pH 5,00 sitrat tamponu kullanılmıştır (Wang and Ng, 2001; 2003; 2004; Guan et al., 2007).

3.1.4 Kullanılan başlıca cihazlar

- Otoklav (Hirayama)
- Çalkalamalı inkübatör (Zhicheng Shaking Incubator)
- İnkübatör (Memmert)
- -80°C' lik derin dondurucu (New Brunswick Scientific)
- -20°C' lik derin dondurucu (Sanyo Medical Freezer)
- Mikro santrifüj (Hettich Zentrifigen Mikro 120)
- Spektrofotometre (Varian 50)

- DNA Sekans Cihazı (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer)
- SDS – PAGE sistemi (BIO-RAD)
- Ultrafiltrasyon (Sartorius Stedim Crossflow)
- Ultrafiltrasyon filtreleri (Sartocon Slice 200 polyethersulfone – 10 kDa)
- Terazı (Kern PFB)
- pH metre (Inolab)
- Vorteks (Heidolph Reax Top)
- PCR cihazı (Palm Cyclet, Corbett)
- Dikey elektroforez (BIO-RAD, MINIPROTEAN TETRA)
- Yatay elektroforez (Thermo Scientific)
- Güç kaynağı (Thermo Scientific)
- Jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat gel documentation system)
- Jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad VersaDoc gel documentation system)
- Çoklu blok ısı bloğu (Thermo Scientific)
- Orbital shaker (Thermo Scientific)
- Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)
- Düşük Basınçlı Likit kromatografi (LPLC)

Software: Peak Trak

Dedektör: Teledyne Isco UA-6 UV/vis detector (254 nm)

Kolon: Sigma-Aldrich, 2,5x20 cm

Fraksiyon toplayıcı: Foxy 200

Peristaltik Pompa: TRIS

Gradient Former: Teledyne ISCO Model 160

3.2 Metot

3.2.1 *Yarrowia lipolytica* strainlerinin aktifleştirilmesi

Bölüm 3.1.1’ de anlatılan *Y. lipolytica* strainlerinin moleküler biyolojik yöntemlerle tanısının kesinleştirilmesi için Akpınar (2008), GÜNGÖR (2009), ÖZTÜRK (2000) ve YALÇIN (2007) tarafından yapılan çalışmalarda izole edilip farklı yöntemlerle tanılanmış 22 adet *Yarrowia lipolytica* straini bu çalışmada kullanılacak organizmalardır. Yukarıda bahsedilen *Y. lipolytica* CBS6124 tip tür ve strainleri öncelikle korundukları -80°C’ lik derin dondurucudan alınarak YPD besiyerinde aktifleştirilmiş ve yine YPD besiyerinde stok kültürler halinde saklanmıştır.

3.2.2 *Y. lipolytica* strainlerinin moleküler biyolojik yöntemlerle tanılanması

3.2.2.1 DNA izolasyonu ve saflık kontrolü

22 adet *Y. lipolytica* straini ve *Y. lipolytica* CBS6124 tip türünden genomik DNA izolasyonu, Liu ve arkadaşları (2000) tarafından önerilen ve bazı noktaları modifiye edilmiş ve aşağıdaki sıra takip edilerek genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

1. Malt Yeast Glukoz Pepton Broth’da maya hücreleri 27°C’ de 1 gün inkübe edilmiştir.

2. Sıvı besiyerinde bir gece büyütülen kültür steril bir ependorf tüpüne aktarılmış, 7.000 rpm’ de 5 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüş ve daha sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır.

3. Pellet üzerine 500 µl lizis tamponu ilave edilmiş ve karışım homojen olana dek karıştırılmıştır.

4. 65°C’ lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra 150 µl potasyum-asetat ilave edilmiş ve karışım homojen olana dek karıştırılmıştır.

5. Karışım 12.000 rpm' de, 4°C' de, 5 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant yeni ve steril bir ependorf tüpüne aktarılmıştır.

6. Yeni tüpe aktarılan sıvının üzerine eşit hacimde izopropil alkol ilave edilmiş ve homojen karışım sağlana dek karıştırılmıştır.

7. Karışım 11.000 rpm' de, 4°C' de, 2 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

8. Daha sonra 300 µl %70'lik soğuk etanol ilave edilir ve 10.000 rpm' de, 4°C' de, 1 dakika santrifüjlenmiş ve etanol uçana kadar beklenilmiştir.

9. Etanol uçtuktan sonra örnekler 50 µl ultra saf suda tekrar süspansiyon edilmiş ve kullanılabilecek kadar -20°C' de saklanmıştır (Liu et al., 2000).

Elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezi, 5 µl/100 ml SafeView içeren %1 agaroz içeren mini jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde TBE tamponu kullanılmış, 5 µl DNA solüsyonu, 1.5 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 90 voltta 75 dakika süreyle yürütülmüştür. Elektroforezde marker olarak GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1997). Agaroz jel elektroforezinin yanı sıra nükleik asitlerin saflık kontrolleri ve miktarları Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) spektrofotometre kullanılarak A_{260}/A_{280} oranlarının ölçülmesi ile de kontrol edilmiştir. Elde edilen maya DNA' ları 3 farklı rDNA bölgesinin çoğaltılmasında kalıp olarak kullanılmıştır.

3.2.2.2 ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve restriksiyon fragment uzunluklu polimorfizm (RFLP) analizi

Tez çalışmasında kullanılmış 22 *Y. lipolytica* straininin daha önceki çalışmalarda ITS-bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Ancak bu tez çalışmasında mayaların kesin tanısı için ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR ile tekrar

çoğaltılmış ve bu bölgenin RFLP analizi gerçekleştirilmiştir. ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin amplifikasyonu için ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') ve ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primerleri kullanılmıştır. Fernandez ve arkadaşları (1999), Chen ve arkadaşları (2000) ve Petersen ve arkadaşları (2001) tarafından önerilen koşullar ve malzeme miktarlarından yararlanılarak, amplifikasyon koşulları ve amplifikasyonda kullanılacak malzemelerin miktarları belirlenmiştir. DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml'lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur.

— Ultra saf su	10,65 µl
— PCR reaksiyon tamponu	2,5 µl (10 mM)
— MgCl ₂	3,6 µl (2 mM)
— dNTP karışımı	1,0 µl (0,2 mM)
— Primer ITS 1	1,0 µl (100 ng)
— Primer ITS 4	1,0 µl (100 ng)
— Taq Polimeraz	0,25 µl (1 U)
— Kalıp DNA	5,0 µl (20–50 ng DNA)

Amplifikasyon programlanabilir bir Thermal Cycler'da (Palm Cycler, Corbett) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

— İlk denatürasyon 95°C' de 5 dakika

— 40 döngü, her döngüde;

I. 95°C' de 1 dakika

II. 58°C' de 2 dakika

III. 72°C' de 3 dakika

— PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C' de 10 dakika inkübe edilirler.

Tüpler, reaksiyon bittikten sonra 4°C' de saklanır. PCR ürünlerinin saflık kontrolleri, Bölüm 3.2.2.1' de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

PCR ürünlerinin RFLP analizinde *HaeIII*, *HinfI* ve *RsaI* fast digest restriksiyon endonükleaz enzimleri (Fermentas) kullanılmıştır. RFLP reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında üreticinin verdiği bilgilerden yararlanılmıştır.

***HaeIII* restriksiyon endonükleaz ile kesim**

- Ultra saf su (nükleaz içermeyen)	17 µl
- 10X <i>HaeIII</i> Tamponu	2 µl
- PCR Ürünü	10 µl
- <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi	1 µl

Karışım dikkatlice karıştırılır. 5 dakika 37°C'lik bir ısı bloğunda (Thermo Scientific) inkübe edilmiştir.

***HinfI* restriksiyon endonükleaz ile kesim**

- Ultra saf su (nükleaz içermeyen)	17 µl
- 10X <i>HinfI</i> Tamponu	2 µl
- PCR Ürünü	10 µl
- <i>HinfI</i> restriksiyon enzimi	1 µl

Karışım dikkatlice karıştırılır. 5 dakika 37°C'lik bir ısı bloğunda (Thermo Scientific)

***RsaI* restriksiyon endonükleaz ile kesim**

- Ultra saf su (nükleaz içermeyen)	17 µl
- 10X <i>RsaI</i> Tamponu	2 µl
- PCR Ürünü	10 µl
- <i>RsaI</i> restriksiyon enzimi	1 µl

Karışım dikkatlice karıştırılır. 10 dakika 37°C'lik bir ısı bloğunda (Thermo Scientific) inkübe edilmiştir.

Restriksiyon endonükleaz ile kesim sonrasında elde edilen ürünler, %2,5 agaroz içeren agaroz jel elektroforezinde Bölüm 3.2.2.1’ de bahsedildiği gibi 90 dakika süresince yürütülmüş ve Vilber Lourmat jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir.

3.2.2.3 18S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve RFLP analizi

18S rDNA amplifikasyonu için P108 (5’–ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT–3’) ve M3976 (5’–CTA CGG AAA CCT CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC T–3’) primerleri kullanılmıştır. 18S rDNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25 µl’lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml’lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur.

— Ultra saf su	10,65 µl
— PCR reaksiyon tamponu	2,5 µl (10 mM)
— MgCl ₂	3,6 µl (2 mM)
— dNTP karışımı	1,0 µl (0,2 mM)
— Primer P108	1,0 µl (100 ng)
— Primer M3989	1,0 µl (100 ng)
— Taq Polimeraz	0,25 µl (1 U)
— Kalıp DNA	5 µl (50 ng)

Amplifikasyon programlanabilir bir Thermal Cycler’da (Palm Cycler, Corbett) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

— İlk denatürasyon 95°C’ de 3 dakika

— 35 döngü, her döngüde;

- | | | |
|------|----------|-----------|
| I. | 95°C’ de | 40 saniye |
| II. | 59°C’ de | 40 saniye |
| III. | 72°C’ de | 2 dakika |

— PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C’ de 3 dakika inkübe edilirler.

— Tüpler, reaksiyon bittikten sonra 4°C’ de saklanır. PCR ürünlerinin saflık kontrolleri, Bölüm 3.2.2.1’ de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Andrade et al., 2006; Vasdinyei and Deak, 2003).

PCR ürünlerinin RFLP analizinde *HaeIII* ve *RsaI* fast digest ve *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimleri (Fermentas) kullanılmıştır. RFLP reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında üreticinin verdiği bilgilerden yararlanılmıştır.

***HaeIII* restriksiyon endonükleaz ile kesim**

- Ultra saf su (nükleaz içermeyen)	17 µl
- 10X <i>HaeIII</i> Tamponu	2 µl
- PCR Ürünü	10 µl
- <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi	1 µl

Karışım dikkatlice karıştırılır. 5 dakika 37°C’lik bir ısı bloğünde (Thermo Scientific) inkübe edilir.

***RsaI* restriksiyon endonükleaz ile kesim**

- Ultra saf su (nükleaz içermeyen)	17 µl
- 10X <i>RsaI</i> Tamponu	2 µl
- PCR Ürünü	10 µl
- <i>RsaI</i> restriksiyon enzimi	1 µl

Karışım dikkatlice karıştırılır. 5 dakika 37°C’lik bir ısı bloğünde (Thermo Scientific) inkübe edilir.

TaqI Restriksiyon Endonükleazı ile Kesim

- Ultra saf su (nükleaz içermeyen)	18 µl
- 10X TaqI Tamponu	2 µl
- PCR Ürünü	10 µl
- TaqI restriksiyon enzimi	1–2 µl

Karışım dikkatlice birkaç dakika karıştırılır. 1–16 saat 65°C’lik bir ısı bloğunda (Thermo Scientific) inkübe edilmiştir. Enzim inaktivasyonu için 80°C’de 20 dakika ayrıca inkübe edilmiştir.

Restriksiyon endonükleaz ile kesim sonrasında elde edilen ürünler, %2,5 agaroz içeren agaroz jel elektroforezinde Bölüm 3.2.2.1’ de bahsedildiği gibi 90 dakika süresince yürütülmüş ve Vilber Lourmat jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir.

3.2.2.4 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin PCR ile çoğaltılması ve sekans analizi

26S rDNA bölgesi D1/D2 domaininin amplifikasyonu için NL1 (5’ – GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG – 3’) ve NL4 (5’ – GGT CCG TGT TTC AAG ACG G – 3’) primerleri kullanılmıştır. DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25µl’lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml’lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur.

— Ultra saf su	10,65 µl
— PCR reaksiyon tamponu	2,5 µl (10 mM)
— MgCl ₂	3,6 µl (2 mM)
— dNTP karışımı	1,0 µl (0,2 mM)
— Primer P108	1,0 µl (100 ng)
— Primer M3989	1,0 µl (100 ng)

— Taq Polimeraz	0,25 µl (1 U)
— Kalıp DNA	5 µl (50 ng)

Amplifikasyon programlanabilir bir Thermal Cycler'da (Palm Cycler, Corbett) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

— İlk denatürasyon 94°C' de 5 dakika

— 35 döngü, her döngüde;

I. 94°C' de 1 dakika

II. 70°C' de 1 dakika

III. 72°C' de 2 dakika

— PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C' de 10 dakika inkübe edilirler.

— Tüpler, reaksiyon bittikten sonra 4°C' de saklanır. PCR ürünlerinin saflık kontrolleri, Bölüm 3.2.2' de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Arias et al., 2002; Lopandic et al., 2006).

Maya strainleri 26S rDNA bölgesi D1/D2 domaininin sekans analizi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (BİYOMER) gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi öncesi PCR ürünleri Sephadex G-50 ve spin kolonlar kullanılarak temizlenmiş ve BigDye Terminator v3.1 Cycle sekanslama kiti (Applied Biosystems) kullanılarak sekanslanmıştır. Sekansların temizlenmesinde sodyum asetat ve EtOH yöntemi kullanılmış ve sekans analizi, ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

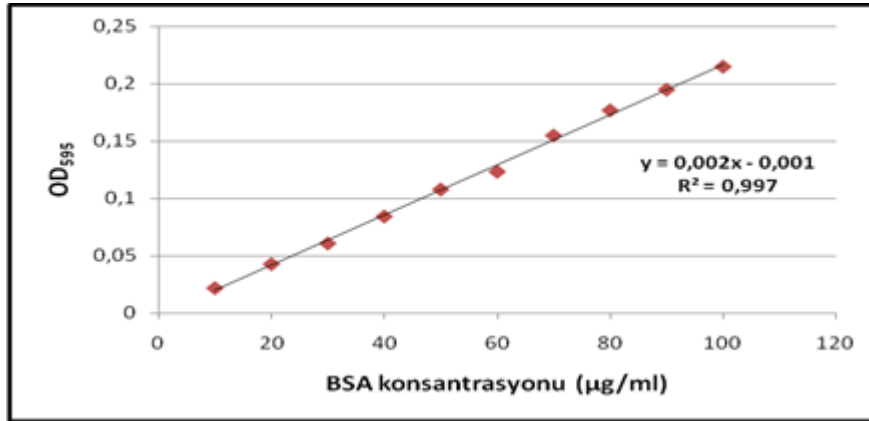
26S rDNA bölgesi D1/D2 domaininin sekans analizi için NL1 ve NL4 primerleri kullanılmıştır. Sekans karşılaştırmaları, GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çoklu hizalama programı olan Clustal W v2.0 yazılımı kullanılarak GenBank veri tabanından elde edilen yakın türlerin sekansları ile hizalanmıştır. Filogenetik ağaç, Mega v5.05 yazılımı ile Tamura-Nei neighbor

joining metodu kullanılarak oluşturulmuştur (Tamura et al., 2011). Ağacın güvenilirliği, 1000 tekrarlı parametrik olmayan bootstrap örnekleme ile değerlendirilmiştir (Limtong et al., 2012).

3.2.3 Toplam protein miktarının tayini

Protein miktarı sığır serum albumininin (BSA) standart olarak kullanıldığı, Bradford yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir (Bradford, 1976). Protein standart grafiğinin oluşturulması için, 10 mg BSA 10 ml distile suda çözölmüştür. 1 mg/ml BSA çözeltisine 9 ml distile su eklenerek seyreltme yapılmıştır. Konsantrasyonu duyarlılık içinde kalan standartlar (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µg BSA/ml olacak şekilde) uygun seyreltme yapılarak hazırlanmıştır. 0,05 ml örnek üzerine 1 ml Coomassie Blue reaktifi eklendikten sonra karışımın 595 nm'deki absorbans değeri (Cary 50, Varian) ölçölmüştür. Elde edilen verilerden aşğıdaki formöl yardımıyla protein miktarı hesaplanmıştır (Spector, 1978).

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{\text{OD}_{595} \times \text{Seyreltme Faktörü}}{\text{Eğim}}$$



Şekil 3.1 Protein standart grafiğı.

3.2.4 Tanısı kesinleştirilen *Y. lipolytica* strainlerinin alkalın ekstrasellüler proteaz enzimi aktivite taranması, üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu

Üç farklı moleküler biyolojik yöntemle tanısı kesinleştirilen 22 *Y. lipolytica* straini, alkalın ekstrasellüler proteaz (AEP) enzimi aktivite yönünden taranmış, semikantitatif olarak en fazla enzim üreten strain seçilmiş ve ilgili enzimin üretim, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.5 Alkalın ekstrasellüler proteaz (AEP) aktivite taranması

AEP aktivite taranmasında kullanılan *Y. lipolytica* maya kültürlerinin büyütülmesinde sıvı YPD besiyeri, maya strainlerinin AEP aktivite taramasında ise skim milk agar besiyeri kullanılmıştır (Ogrydziak, 2003; Akpınar et al., 2011).

27°C' de 24 saat boyunca sıvı YPD besiyerinde 10^7 hücre/ml mertebesinde büyütülmüş maya strainleri, daha önceden hazırlanmış olan skim milk agar petrilere her bir petriye 10 µl maya kültürü gelecek şekilde spotlanmıştır. Petriler, 27°C' de 72 saat inkübe edilmiştir. Skim milk agar petrilere azot kaynağı olarak kazein içermektedir. Belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda, skim milk agar petrilere meydana gelen kazeinin parçalanması sonucunda oluşan zon açıklıklarının çapları ölçülmüş ve toplam açılma zonundan hücre çapının çıkarılması ile semikantitatif olarak en fazla AEP aktivitesi gösteren maya saptanmıştır (Ogrydziak, 2003; Chitra et al., 2011).

3.2.6 Alkalın proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Proteaz aktivitesi Takami ve ark. (1989)'a göre modifiye yöntem kullanılarak ölçülmüştür. 0,5 ml enzim solüsyonu 50 mM glisin-NaOH tamponunda (pH 10,5) hazırlanan %0,6' lık kazein çözeltisinin 2,5 ml' si ile karıştırılarak 30°C' da 20 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon, ortama 2,5 ml 0,44 M trikloroasetik asit çözeltisi ilave edilerek durdurulmuş ve 10 dakika 30°C' de su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışım 10 dk süre ile 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir. 0,25 ml süpernatant, 1,25 ml 0,5 M Na₂CO₃ ve karışıma 2 kat seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifinden 0,25 ml ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dk

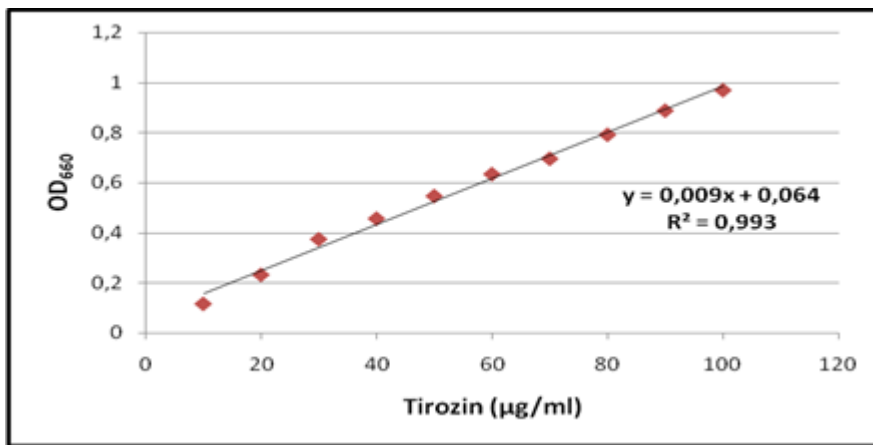
bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin 660 nm’ deki absorbans değerleri (Cary 50, Varian) ölçülmüştür. Enzim aktivitesi standart tirozin grafiği oluşturularak aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml/dak)} = \frac{(\text{OD} / \text{Eğim}) \times \text{Seyreltme Faktörü} \times \text{Toplam Hacim(ml)}}{\text{Enzim Hacmi(ml)} \times \text{İnkübasyon Süresi(dak)}}$$

Bir birim alkalın proteaz aktivitesi, kazeinin hidrolizi sonunda, 30°C’ de, pH 10,5’ da dakikada 1µg tirozin oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir (Kazan et al., 2005; Kazan et al., 2009).

3.2.6.1 Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Alkalın proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin çıkarılması için, 50 mM glisin-NaCl-NaOH tamponunda (pH: 10,5) 0-100 µg/ml tirozin içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonda tirozin içeren her bir çözeltiden 0,5 ml temiz tüplere aktararak üzerine 2,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ ve iki kez seyreltilmiş Folin reaktifi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek 660 nm’deki absorbans değerleri (Cary 50, Varian) okunmuştur. Tirozin miktarına bağlı olarak okunan 660 nm’deki absorbanslardan yararlanılarak, tirozin standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.2). Bu eğriden yararlanılarak örneklerdeki alkalın proteaz aktiviteleri hesaplanmıştır (Takami et al., 1989).



Şekil 3.2 Tirozin standart grafiği.

3.2.7 AEP enziminin üretimi

Skim milk agarda AEP aktivite taramasında semikantitatif olarak en yüksek alkalın proteaz enzim aktivitesi gösteren ve moleküler biyolojik olarak *Y. lipolytica* olarak tanımlanan *Y. lipolytica* TEM YL 5 strain seçimi gerçekleştirilmiş ve bu aşamadan sonra çalışmaya bu strain ile devam edilmiştir.

18 saatlik sıvı YPD kültürlerinden alınan 100 µl maya hücre süspansiyonları, 100 ml 100 mM fosfat tamponu ile tamponlanmış gliserol proteose pepton (GPP – pH 6,8) besiyerini içeren 500 ml' lik erlenlere inoküle edilmiş ve 27°C 150 rpm 'de 24–72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, ekstrasellüler enzimin olduğu düşünülen süpernatant, 4°C' de 8000 rpm 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra, süpernatant 0,45 ve 0,22 µm' lik milipor membranlar ile süpernatant filtre edilerek maya hücrelerinden tamamen arındırılmıştır. Elde edilen süpernatantlar steril bir ortam şişesinde toplanmış, toplam protein miktarı Bölüm 3.2.3' de ve alkali proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5' de belirtildiği şekilde ölçülmüştür.

3.2.8 AEP enziminin saflaştırılması

3.2.8.1 AEP enziminin konsantre edilmesi

Bölüm 3.2.7'de ham enzim üretimi gerçekleştirilen AEP enzimi, ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak konsantre edilmiştir. Membran por genişliği 10 kDa (Polyether sulphone, Sartocoon Slice 200) kasete sahip olan ultrafiltrasyon cihazı (Sartorius Stedim Crossflow) ile ham AEP süpernatantı konsantre edilmiştir. Tüm işlemler + 4°C' de yapılmıştır (Ogrydziak and Scharf, 1982).

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden üretilmiş AEP enzimini yüksek saflaştırma katsayısı ve yüksek verimle saflaştırmak için iki farklı kromatografi yöntemi kullanılmıştır.

3.2.8.2 İyon değişim kromatografisi

Konsantre edilmiş ultrafiltrat örneği bir iyon değişim kromatografisine (DEAE-selüloz) uygulanmıştır. Örnek kolona yüklenmeden önce kolon

dengeleme tamponu olan 10 mM Tris tamponu (pH 8,4) ile dengelenmiştir. Kolon 1,5 ml/dk akış hızı ile 1 saat dengelendikten sonra, protein derişimi yaklaşık 10 mg/ml olan konsantre örnekten 10 ml yüklenmiştir. Daha sonra elüsyon tamponu olan 0 – 1 M NaCl içeren 10 mM pH 8,4 Tris tamponu ile kolona 0 – 1 M gradient uygulanmıştır. Akış hızı 1,5 ml/dk olarak ayarlanan kolondan, her biri 1 ml örnek içeren 60 fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5’ de anlatılan yöntemle göre tayin edilmiştir. Yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar birleştirilmiştir (Ogrydziak and Scharf, 1982).

3.2.8.3 Jel filtrasyon kromatografisi

Konsantre edilmiş ultrafiltrat örneği bir jel filtrasyon kromatografisine (Sephadex G-75) uygulanmıştır. Örnek kolona yüklenmeden önce kolon dengeleme tamponu olan 30 mM fosfat tamponu (pH 6,4) ile dengelenmiştir. Kolon 1,5 ml/dk akış hızı ile 1 saat dengelendikten sonra, protein derişimi yaklaşık 10 mg/ml olan konsantre örnekten 10 ml yüklenmiştir ve 67 fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5’ de anlatılan yöntemle göre tayin edilmiştir. Yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar birleştirilmiştir (Ogrydziak and Scharf, 1982).

3.2.9 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

3.2.9.1 SDS-PAGE ile AEP enziminin moleküler ağırlığının tayini

Saf AEP enziminin moleküler ağırlığının saptanması, Laemmli (1970) tarafından önerilen sürekli olmayan (discontinuous) tampon sistemi kullanılarak Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir SDS-PAGE için kalınlıkları 1,5 mm olan ve monomer oranı % 4 (w/v) örnek yükleme jeli ve % 12 (w/v) ayırma jeli kullanılarak Laemmli (1970) tarafından verilen metoda göre 100V’da 120 dakika Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell marka elektroforez sistemi kullanılarak örnekler yürütülmüştür. Protein standardı olarak, Fermentas Unstained Protein Molecular weight marker (SM0431 – 14,4, 18,4, 25, 35, 45, 66,2, 116 kDa) standardı kullanılmıştır. Elektroforez sonrası protein bantları Coomassie ve gümüş boyama yöntemleri ile boyanarak belirlenmiştir.

3.2.9.2 AEP enziminin zimogram analizi

Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılan AEP enziminin SDS-PAGE jelinde aktivite tayini (zimogram) için, SDS-PAGE jel elektroforezi kullanılmıştır. 5 X denatürasyon çözeltisi varlığında 2 dakika kaynatılarak inkübe edilmiş örnekler %5 (w/v) örnek yükleme jeli ve %1 süt tozu içeren %12 (w/v) ayırma jelinde Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell marka elektroforez sistemi Bölüm 3.2.9.1' de anlatılan yöntem kullanılarak yürütülmüştür.

Yürütülen jel 37°C' de 1 saat % 0,25'lik Triton-X100' de inkübe edilmiş sonra 1 saat, 100 mM, pH 10,5 glisin-NaOH tamponunda bekletilmiştir. Bir ileri aşamada jel Coomassie Brilliant Blue ile boyanmış ve yıkama (destain) çözeltisinde bir süre bekletilmiştir (Ferrero et al., 1996; Kazan et al., 2005).

3.2.9.3 SDS-PAGE jellerinin boyanması

Coomassie boyama

Coomassie boyama için Kazan ve ark. (2005) tarafından önerilen metoda göre gerçekleştirilmiştir.

1. SDS-PAGE sonucu elde edilen jel, 2 saat boyunca Bölüm 3.1.3.4' de bahsedilen % 20' lik TCA ile fiksasyon çözeltisi ile 30 dakika boyunca fiks edilmiştir.
2. Fiksasyon aşamasını takiben, jel ultra saf su ile birkaç kez yıkanmıştır.
3. Daha sonra, jel Coomassie çözeltisinde oda sıcaklığında 35 rpm çalkalama hızında 1 saat bekletilmiştir.
4. Jelleri temizlemek için 3 kere yıkama (destaining) çözeltisinde oda sıcaklığında 35 rpm çalkalama hızında 30 dakika bekletilmiştir.
5. Son olarak da jeller stok solüsyonda bekletilmiştir.

Coomassie boyama sonrası jeller, Bio-Rad VersaDoc jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenmiş ve ImageLab programı ile protein bandlarının moleküler ağırlıkları hesaplanmıştır.

Gümüş boyama

Gümüş boyama için Damerval ve ark. (1987), tarafından önerilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Solüsyonlar için her zaman ultra saf su kullanılmıştır. Keratin kontaminasyonundan kaçınmak için lateks içermeyen eldivenler kullanılmıştır. Gümüş boyama protokolüne başlamadan önce boyama kapları deterjan ve bolca ultra saf su ile yıkanmıştır.

1. SDS-PAGE sonucu elde edilen jel, 2 saat boyunca Bölüm 3.1.3.4' de bahsedilen fiksasyon çözeltisi ile fikse edilmiştir.
2. Fiksasyon aşamasının takiben jel, 3 defa ardışık 20 dakika boyunca %50 metanolde yıkanmıştır.
3. Daha sonra, jel ön muamele solüsyonu ile 1 dakika muamele edilmiştir.
4. Jel ultra saf su ile 3 kez 20 saniye aralıklarla yıkanmıştır.
5. Yıkama sonrasında, jel gümüş nitrat çözeltisi ile 20 dakika inkübe edilmiştir.
6. Jel, 2 kez 20 saniye boyunca ultra saf su ile yıkanmıştır.
7. Jel, geliştirme solüsyonunda 10 dakika boyunca geliştirilmiş ve protein bandları görünür hale geldikten sonra bu işlem sonlandırılmıştır.
8. Jel ultra saf su ile 2 kez 2 dakika yıkanmıştır.
9. Boyama durdurma solüsyonu eklenerek sonlandırılmış ve solüsyon birkaç kez değiştirilmiştir.
10. Jel, %1 asetik asit içeren ultra saf su içerisinde +4°C'de saklanmıştır.

Gümüş boyama sonrası jeller, Bio-Rad VersaDoc jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenmiş ve ImageLab programı ile protein bandlarının moleküler ağırlıkları hesaplanmıştır.

3.2.10 Saflaştırılan AEP enziminin karakterizasyonu

3.2.10.1 AEP enziminin optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılmış AEP enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için, 500 µl enzim çözeltisi (38,18 U/mg spesifik aktivite,

0,697 mg/ml protein) ile 2500 µl farklı sıcaklıklarda (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) inkübe edilmiş ve proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5' de belirtilen yöntemle göre tayin edilmiştir. Aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır (Kazan et al., 2005; Hames-Kocabas and Uzel, 2007; Kazan et al., 2009; Öztürk et al., 2009).

Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılmış alkalın proteaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için, 500 µl enzim çözeltisi (38,18 U/mg spesifik aktivite, 0,697 mg/ml protein) ile 2500 µl farklı sıcaklıklarda (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) 1 ve 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5' de belirtilen yöntemle göre tayin edilmiştir. Aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır (Kazan et al., 2005; Hames-Kocabas and Uzel, 2007; Kazan et al., 2009; Öztürk et al., 2009).

3.2.10.2 AEP enziminin optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılmış AEP enziminin optimum pH' sını belirlemek için, 500 µl enzim çözeltisi (38,18 U/mg spesifik aktivite, 0,697 mg/ml protein) ile 2500 µl farklı pH' larda hazırlanmış kazein çözeltileri (pH 6,0-8,0 aralığında 50 mM fosfat tamponu, pH 9,0-11,0 aralığında 50 mM glisin-NaOH tamponu ve pH 12,0-13,0 aralığında 100 mM KCl-NaOH tamponu) karıştırılmış ve proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5' de belirtilen yöntemle göre tayin edilmiştir. Aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır (Kazan et al., 2005; Hames-Kocabas and Uzel, 2007; Kazan et al., 2009; Öztürk et al., 2009).

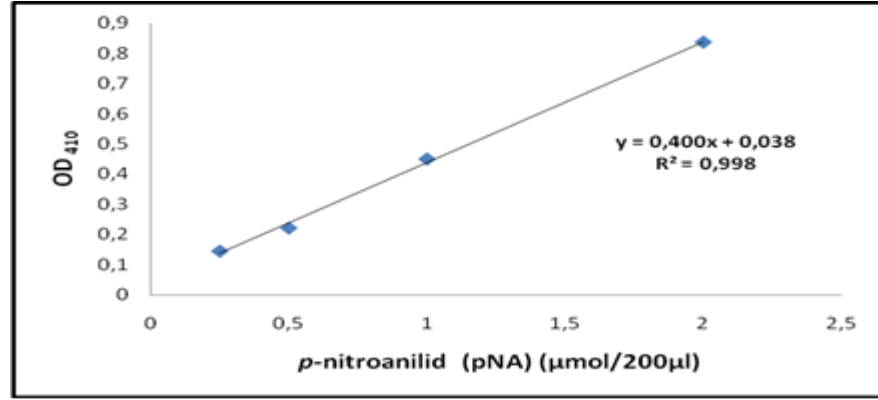
Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılmış alkalın proteaz enziminin pH stabilitesini belirlemek için, 500 µl enzim çözeltisi (38,18 U/mg spesifik aktivite, 0,697 mg/ml protein) ile 2500 µl farklı pH' larda hazırlanmış tamponlar (pH 6,0-8,0 aralığında 50 mM fosfat tamponu, pH 9,0-11,0 aralığında 50 mM glisin-NaOH tamponu ve pH 12,0-13,0 aralığında 100 mM KCl-NaOH tamponu) karıştırılmış ve 1 ve 2 saat 30°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5' de belirtilen yöntemle göre tayin edilmiştir.

Aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzim bağlı aktivitesi hesaplanmıştır (Kazan et al., 2005; Hames-Kocabas and Uzel, 2007; Kazan et al., 2009;  zt rk et al., 2009).

3.2.10.3 AEP enziminin sentetik substrat se ciliğinin belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılmış alkaline proteaz enzimi, *p*-nitroanilin (pNA) ile konjuge olmuş sentetik peptitleri hidrolizleme yeteneği açısından test edilmiştir. N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substrat olarak kullanılmış ve stok  z ltleri 5mM dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanmıştır. 25  l substrat  z lti, 465  l 50mM pH 10,5 glisin-NaOH tampon  z lti ile karıştırılmış ve 30 C' de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası karışıma 10  l enzim  z lti (38,18 U/mg spesifik aktivite, 0,697 mg/ml protein) eklenmiş ve tekrar 30 C' de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon 100  l %2' lik asetik asit  z lti ile durdurulmuş ve spektrofotometrede (Cary 50, Varian) 410 nm'de absorbans değerleri  l  lm şt r. Bu deney için 1 ünite enzim aktivitesi, 30 C' de pH 10,5'de dakikada 1 mmol *p*-nitroanilin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Bressollier et al., 1999; Joo and Chang, 2005).

50 mM derişimde stok *p*-nitroanilid  z lti hazırlanmıştır. Stok pNA  z ltisinden mikropalakaya son hacim 200  l olacak şekilde sırası ile 0.25  mol, 0,5  mol, 1  mol ve 2  mol'l k seyreltmeler yapılmıştır. K r olarak 200  l deney tamponu olan 50 mM glisin-NaOH (pH 10,5) kullanılmıştır. Mikropalaka okuyucu ile 410 nm'de köre karşı okuma yapılarak absorbans değerleri elde edilmiştir. Derişim değerlerinin karşılık geldiği absorbans değerleri göz önünde bulundurulularak pNa standart grafiği çizilmiştir (şekil 3.3) (Bressollier et al., 1999; Joo and Chang, 2005).



Şekil 3.3 pNa standart grafiği

3.2.10.4 AEP enzim aktivitesi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılmış AEP enziminin aktif bölgesinde katalizden sorumlu aminoasitlerin varlığını belirlemek amacı ile aminoasit inhibitörlerinden serin spesifik inhibitörü fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) ve enzimin Ca^{+2} bağlama bölgesine sahip olduğunu belirten etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve etilen glükol tetra asetik asit (EGTA) kullanılmıştır (Kazan et al., 2005; Thumar and Singh, 2007; Öztürk et al., 2009).

Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisini belirlemek amacı ile 50 μl enzim çözeltisi (38,18 U/mg spesifik aktivite, 0,697 mg/ml protein), 1 mM ve 10 mM inhibitör içeren 450 μl 50mM pH 10,5 glisin-NaOH tampon çözeltisi ile karıştırılmış ve 30°C' de, 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında alkalın proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5' de belirtilen yöntemle göre tayin edilmiştir. Aynı koşullarda inhibitörsüz olarak inkübe edilen kontrol örneğinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edilmiş ve inkübasyon sonrası aktiviteler kalan aktivite olarak kabul edilmiştir (Kazan et al., 2005; Öztürk et al., 2009).

3.2.10.5 AEP enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Mg^{+2} gibi 2 değerlikli metal iyonlarının ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} gibi tek değerlikli iyonların *Y. lipolytica* TEM YL

5' den saflaştırılmış AEP enziminin aktivitesine etkisini incelemek için 0,5 ml enzim çözeltisi (38,18 U/mg spesifik aktivite, 0,697 mg/ml protein), içerisinde 5 mM metal iyonu içeren 50 mM pH 10,5 glisin-NaOH tamponda hazırlanan % 0,6' lık hammarsten kazeinin 2,5 ml' si ile karıştırılmış ve Bölüm 3.2.5' de anlatılan proteaz aktivite yöntemine göre aktivite tayini yapılmıştır. Metal iyonları içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edilmiş ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplanmıştır (Kazan et al., 2005; Öztürk et al., 2009).

3.2.10.6 AEP enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin ve hidrojen peroksitin etkilerinin belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılmış AEP enziminin aktivitesi üzerine çeşitli yüzey aktif maddelerin ve hidrojen peroksitin etkisini incelemek için 0,5 ml enzim çözeltisi (38,18 U/mg spesifik aktivite, 0,697 mg/ml protein) % 0,5-1 SDS (w/v), % 1-2 Tween 20 (v/v), % 1-2 Tween 40 (v/v), % 1-2 Tween 60 (v/v), % 1-2 Tween 80 (v/v), % 1-2 Triton X-100 (v/v) ve % 5-10-15 H₂O₂ içeren ve 50 mM pH 10,5 glisin-NaOH tampon içerisinde hazırlanan % 0,6' lık hammarsten kazeinin 2,5 ml' si ile karıştırılmış ve Bölüm 3.2.5' de anlatılan proteaz aktivite yöntemine göre aktivite tayini yapılmıştır. Yüzey aktif maddeleri ve hidrojen peroksiti içermeyen enzim çözeltisi kontrol olarak kullanılmış ve aktivite miktarı 100 olarak kabul edilmiştir (Kazan et al., 2005; Öztürk et al., 2009).

3.2.10.7 AEP enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 5' den saflaştırılmış AEP enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesi için 0,5 ml enzim çözeltisi (796.045 U/mg spesifik aktivite, 0.0177 mg/ml protein), ile 2,5 ml substrat çözeltisi temiz deney tüpünde karıştırılmış ve Bölüm 3.2.5' de anlatılan proteaz aktivite yöntemine göre aktivite tayini yapılmıştır. Substrat çözeltisi olarak 50 mM pH 10,5 glisin-NaOH tamponda hazırlanan % 0,6' lık hammarsten kazein, süt tozu, jelatin, kollajen ve bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır (Kazan et al., 2005).

3.2.11 Tanısı kesinleştirilen *Y. lipolytica* strainlerinin ekstrasellüler ribonükleaz enzimi aktivite taranması, üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu

Üç farklı moleküler biyolojik yöntemle tanısı kesinleştirilen 22 *Y. lipolytica* straini, ekstrasellüler ribonükleaz (RNaz) enzimi aktivite yönünden taranmış, semikantitatif olarak en fazla enzim üreten strain seçilmiş ve ilgili enzimin üretim, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.12 Ekstrasellüler ribonükleaz (RNaz) aktivite taranması

Ekstrasellüler RNaz aktivite taramasında kullanılan *Y. lipolytica* maya kültürlerinin büyütülmesinde sıvı YPD besiyeri, maya strainlerinin RNaz aktivite taramasında ise RNA agar besiyeri kullanılmıştır (Ogrydziak, 2003; Akpınar et al., 2011).

27°C’ de 24 saat boyunca sıvı YPD besiyerinde 10^7 hücre/ml mertebesinde büyütülmüş maya strainleri, daha önceden hazırlanmış olan RNA agar petrilere her bir petriye 10 µl maya kültürü gelecek şekilde spotlanmıştır. Petriler, 27°C’ de 24–48 saat inkübe edilmiştir. Belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda, her RNA agar petrisine daha önceden hazırlanmış Toluidine Blue O solüsyonu spreyleneş ve birkaç dakika sonucunda RNA agar petrilinde koyu lacivert zemine karşı hücrelerin etrafında oluşan pembe zon çapları ölçülmüştür. Toplam açılma zonundan hücre çaplarının çıkarılması ile semikantitatif olarak en fazla ekstrasellüler RNaz aktivitesi gösteren maya saptanmıştır (Ogrydziak, 2003).

3.2.13 RNaz aktivitesinin belirlenmesi

Ribonükleaz (RNaz) aktivitesi, Cheng ve Ogrydziak (1986) tarafından belirtilen RNA hidroliz yöntemi kullanılarak saptanmıştır. 50 µl enzim solüsyonu, 100 µl 100 mM sodyum sitrat tamponu (pH 5,0), 300 µl ultra saf su ve 50 µl sodyum sitrat tamponunda hazırlanmış % 1,5’ lik RNA (Torula Tip VI) ile karıştırılarak 30°C’de 45 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon, ortama 500 µl % 0,4 uranil asetat içeren % 12 perklorik asit (v/v) ilave edilerek durdurulmuş ve karışım buz içinde soğutularak

santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonucunda örnekler uygun oranda seyreltilerek 260 nm’ deki absorbans değerleri (Cary 50, Varian) ölçülmüştür.

Bir birim ribonükleaz (RNaz) aktivitesi, RNA hidrolizi sonucunda 30°C’de 1 dakikada 260 nm absorbansdaki 0,1’ lik değer artışına sebep olan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir (Cheng and Ogrydziak, 1986).

3.2.14 Ekstrasellüler RNaz enziminin üretimi

RNA agarda ekstrasellüler RNaz enzim aktivite taramasında semikantitatif olarak en yüksek ekstrasellüler RNaz enzim aktivitesi gösteren ve moleküler biyolojik olarak *Y. lipolytica* olarak tanımlanan *Y. lipolytica* TEM YL 21 strain seçimi gerçekleştirilmiş ve bu aşamadan sonra çalışmaya bu strain ile devam edilmiştir.

18 saatlik sıvı YPD kültürlerinden alınan 100 µl maya hücre süspansiyonları, 100 ml 100 mM sitrat tamponu ile tamponlanmış gliserol proteose pepton sitrat (GPP-sitrat – pH 5,0) besiyerini içeren 500 ml’ lik erlenlere inoküle edilmiş ve 27°C 150 rpm ’de 24–72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, ekstrasellüler enzimin olduğu düşünülen süpernatant, 4°C’ de 8000 rpm 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra, süpernatant 0,45 ve 0,22 µm’ lik milipor membranlar ile süpernatant filtre edilerek maya hücrelerinden tamamen arındırılmıştır. Elde edilen süpernatantlar steril bir ortam şişesinde toplanmış, protein miktarı Bölüm 3.2.3’ de ve RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13’ te belirtildiği şekilde ölçülmüştür.

3.2.15 Ekstrasellüler RNaz enziminin saflaştırılması

3.2.15.1 RNaz enziminin konsantre edilmesi

Bölüm 3.2.14’te ham enzim üretimi gerçekleştirilen ekstrasellüler RNaz enzimi, ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak konsantre edilmiştir. Membran por genişliği 10 kDa (Polyether sulphone, Sartocoon Slice 200) kasete sahip olan ultrafiltrasyon cihazı (Sartorius Stedim Crossflow) ile ham RNaz süpernatantı konsantre edilmiştir. Tüm işlemler + 4°C’ de yapılmıştır (Cheng and Ogrydziak, 1986).

Y. lipolytica TEM YL 21 straininden üretilmiş RNaz enzimini yüksek saflaştırma katsayısı ve yüksek verimle saflaştırmak için iki farklı kromatografi yöntemi kullanılmıştır.

3.2.15.2 İyon değişim kromatografisi

Konsantre edilmiş ultrafiltrat örneği bir iyon değişim kromatografisine (DEAE-selüloz) uygulanmıştır. Örnek kolona yüklenmeden önce kolon dengeleme tamponu olan 20 mM Tris tamponu (pH 7,0) ile dengelenmiştir. Kolon 1,5 ml/dk akış hızı ile 1 saat dengelendikten sonra, protein derişimi yaklaşık 10 mg/ml olan konsantre örnekten 10 ml yüklenmiştir. Daha sonra elüsyon tamponu olan 0-1 M NaCl içeren 20 mM pH 7,0 Tris tamponu ile kolona 0 - 1,0 M gradient uygulanmıştır. Akış hızı 1,5 ml/dk olarak ayarlanan kolondan, her biri 1 ml örnek içeren 104 fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te anlatılan yöntemle göre tayin edilmiştir. Yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar birleştirilmiştir (Cheng and Ogrydziak, 1986).

3.2.15.3 Jel filtrasyon kromatografisi

Konsantre edilmiş ultrafiltrat örneği bir jel filtrasyon kromatografisine (Sephadex G-75) uygulanmıştır. Örnek kolona yüklenmeden önce kolon dengeleme tamponu olan 33 mM fosfat tamponu (pH 6,8) ile dengelenmiştir. Kolon 1,5 ml/dk akış hızı ile 1 saat dengelendikten sonra, protein derişimi yaklaşık 10 mg/ml olan konsantre örnekten 10 ml yüklenmiştir ve 37 fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te anlatılan yöntemle göre tayin edilmiştir. Yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar birleştirilmiştir (Cheng and Ogrydziak, 1986).

Her bir kromatografi kolonundan saflaştırılmış RNaz enziminin moleköl ağırlığı Bölüm 3.2.9.1' de anlatılan yöntemle saptanmıştır. SDS-PAGE jelleri Bölüm 3.2.9.3' de anlatılan yöntemlerle boyanmıştır.

3.2.16 Saflaştırılan ekstrasellüler RNaz enziminin karakterizasyonu

3.2.16.1 RNaz enziminin optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 21' den saflaştırılmış RNaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için, 50 µl enzim çözeltisi (39,90 U/mg spesifik aktivite, 0,49 mg/ml protein) ile 50 µl % 1,5' lik RNA solüsyonunu farklı sıcaklıklarda (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 60°C) 45 dakika inkübe edilmiş ve RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te anlatılan yöntemle göre tayin edilmiş ve RNaz aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık saptanmıştır. Aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır (Ye and Ng, 2002; Gundampati et al., 2011).

Y. lipolytica TEM YL 21' den saflaştırılmış RNaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için, 50 µl enzim çözeltisi (39,90 U/mg spesifik aktivite, 0,49 mg/ml protein) ile 50 µl % 1,5' lik RNA solüsyonunu farklı sıcaklıklarda (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 60°C) 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te anlatılan yöntemle göre tayin edilmiştir. Aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır (Ye and Ng, 2002; Gundampati et al., 2011).

3.2.16.2 RNaz enziminin optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 21' den saflaştırılmış RNaz enziminin optimum pH' sını belirlemek için, 50 µl enzim çözeltisi (39,90 U/mg spesifik aktivite, 0,49 mg/ml protein) ile farklı pH' larda (pH 2,0-2,5 aralığında 100 mM KCl-HCl tamponu, pH 3,0-6,0 aralığında 100 mM sitrat tamponu ve pH 6,5-8,0 aralığında fosfat tamponu) hazırlanmış 50 µl % 1,5' lik RNA solüsyonunu 45 dakika inkübe edilmiş ve RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te anlatılan yöntemle göre tayin edilmiş ve RNaz aktivitesinin en yüksek olduğu pH saptanmıştır. Aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır (Ye and Ng, 2002; Gundampati et al., 2011).

Y. lipolytica TEM YL 21' den izole edilen ekstrasellüler RNaz enziminin pH stabilitesini belirlemek için, 50 µl enzim çözeltisi (39,90 U/mg spesifik aktivite, 0,49 mg/ml protein) ile farklı pH' larda (pH 2,0-2,5 aralığında 100 mM KCl-HCl tamponu, pH 3,0-6,0 aralığında 100 mM sitrat tamponu ve pH 6,5-8,0 aralığında fosfat tamponu) hazırlanmış 50 µl % 1,5' lik RNA solüsyonları ile karıştırılmış ve 30°C' de 1 saat inkübe edilmiş, RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te anlatılan yöntemle göre tayin edilmiş ve RNaz aktivitesinin en yüksek olduğu pH saptanmıştır. Aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edilerek elde edilen sonuçlara göre enzimin bağlı aktivitesi hesaplanmıştır (Ye and Ng, 2002; Gundampati et al., 2011).

3.2.16.3 RNaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Mn⁺², Cu⁺², Ca⁺², Ba⁺², Zn⁺², Fe⁺², Mg⁺², Co⁺² ve Cd⁺² gibi 2 değerlikli metal iyonlarının ve NH₄⁺¹, K⁺¹, Na⁺¹ gibi tek değerlikli iyonların *Y. lipolytica* TEM YL 21' den saflaştırılmış RNaz enziminin aktivitesine etkisini incelemek için 50 µl enzim çözeltisi (39,90 U/mg spesifik aktivite, 0,49 mg/ml protein), içerisinde 1ve 10 mM metal iyonu içeren 100 mM pH 5,00 sitrat tamponunda hazırlanan % 1,5' lik RNA solüsyonunun 50 µl' si ile karıştırılmış, 45 dakika inkübe edilmiş ve RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te anlatılan yöntemle göre tayin edilmiştir. Metal iyonları içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edilmiş ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplanmıştır (Wang and Ng, 2001; Gundampati et al., 2011).

3.2.16.4 RNaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör maddelerin etkisinin belirlenmesi

Sitrik asit, EDTA, okzalik asit, sülfanilik asit, sodyum azid ve askorbik asit gibi inhibitör maddelerin *Y. lipolytica* TEM YL 21' den saflaştırılmış RNaz enziminin aktivitesine etkisini incelemek için 50 µl enzim çözeltisi (39,90 U/mg spesifik aktivite, 0,49 mg/ml protein), içerisinde 5 mM inhibitör madde içeren 100 mM pH 5,00 sitrat tamponunda hazırlanan % 1,5' lik RNA solüsyonunun 50 µl' si ile karıştırılmış, 45 dakika inkübe edilmiş ve RNaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te

anlatılan yöntemle göre tayin edilmiştir. İnhibitör maddeleri içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edilmiş ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplanmıştır (Gundampati et al., 2011).

3.2.16.5 RNaz enziminin polihomoribonükleotidlere ve RNA molekülüne olan özgünlüğünün belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 21' den saflaştırılmış RNaz enziminin polihomoribonükleotidlere ve RNA (Torula yeast type VI) molekülüne karşı aktivite miktarının belirlenmesi için 250 µl enzim çözeltisi (39,90 U/mg spesifik aktivite, 0,49 mg/ml protein), ile 100 µg RNA, poly (A), poly (C), poly (G) ve poly (U) polihomoribonükleotitlerin içeren substrat çözeltisinin 250 µl' si ile temiz deney tüpünde karıştırılmış ve 30°C' de, 30 ve 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, 500 µl %0,4 uranil asetat içeren %12 perklorik asit (v/v) ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve karışım buz içinde soğutularak santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonucunda örnekler uygun oranda seyreltilerek poly (A), poly (G), poly (U) polihomoribonükleotitleri ve RNA için 260 nm' de poly (C) homoribonükleotidi için 280 nm' deki absorbans değerleri (Cary 50, Varian) ölçülmüştür (Wang and Ng, 2001; 2003; 2004; Guan et al., 2007).

3.2.17 Saflaştırılan AEP ve RNaz enzimlerinin kütle spektrometre analizi

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzimi ve *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin kütle spektrometresiyle tanımlanması Almanya' da bulunan Proteome Factory AG şirketinden hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin analize hazırlanışı, kütle spektrofotometresiyle analizi ve protein tanımlama aşağıdaki prosedürlere göre yapılmıştır (Haçarız et al., 2012).

3.2.17.1 Örnek hazırlama

SDS-PAGE sonrası Coomassie Blue R-250 ile boyanmış olan jelden bantlar steril bir bistüri kullanılarak vakumlu bir kabin içerisinde kesilmiştir ve steril

tüplere aktarılarak analize gönderilmiştir. Bu örnekler kütle analizi öncesi Proteome Factory AG’ de uygulanan işlemler özetlenmiştir.

Kesilen jel parçaları 3 kez saf su ile yıkandıktan sonra boyanın giderimi amacı ile % 50 asetonitril içerisinde hazırlanan 50 mM NH_4HCO_3 ile iki kez yıkanmıştır. Disülfür bağlarının kırılması için 5 mM DTT ile 60°C’ de 15 dakika inkübe edilmiştir. Serbest tiyollerin alkilenmesi için ise 10 mM IAA (iyodoasetamid) ile karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Proteinlerin fragmentasyonu için 50 µl tripsin (20 ng/ µl, 50 mM NH_4HCO_3 içerisinde) eklenerek 37°C’ de gece boyunca inkübe edilmiştir. Örnekler analize kadar -80°C’ de saklanmıştır.

3.2.17.2 LC-MS/MS analizi

Kütle spektrometre analizleri nano-liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectra/mass spectra (nano LC–ES–MS/MS) sistemiyle gerçekleştirilmiştir. MS sistemi, bir Agilent 1100 nano–LC sistemi (Agilent, Boeblingen, Almanya), PicoTip emitter (New Objective, Woburn, A.B.D.), bir Esquire 3000 plus ion trap MS’ den (Bruker, Bremen, Almanya) oluşmaktadır. Peptitlerin tuz giderimi ve tutuklanması % 3 asetonitril - % 0,1 formik asit kullanılan bir zenginleştirme kolonu (Zorbax SB C18, 75µm x 150 mm kolon) ile gerçekleştirilmiştir. Üreticilerin önerdiği nano LC–ES–MS/MS analizine göre, MS spektrumları Esquire 3000 plus ile otomatik olarak alınmıştır. MS/MS spektrumları DataAnalysis 3.2 (Bruker, Bremen, Almanya) kullanılarak işlenmiştir. Peptitler Mascot search engine (Matrix Science, Londra, İngiltere) ve NCBI’ n protein veritabanı (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, A.B.D.) kullanılarak tanımlanmıştır. Peptitlerin tanımlanmasında aşağıdaki parametreler dikkate alınmıştır: tür: *Yarrowia lipolytica*; enzim: tripsin; enstrüman tipi: ESI-TRAP; peptit kütle toleransı: ± 3 ppm; fragment kütle toleransı: $\pm 0,6$ Da (Di Cagno et al., 2009; Rizzello et al., 2009).

4. BULGULAR

Bölüm 3.1.1’ de bahsedilen, Akpınar (2008), Güngör (2009), Öztürk (2000) ve Yalçın (2007) tarafından yapılan çalışmalarda izole edilip hem fenotipik hem de genotipik yöntemlerle tanılanmış 22 *Yarrowia lipolytica* straininin izole edildikleri kaynak, konvansiyonel, ITS-PCR ve ITS-PCR dizi analizi sonuçları Çizelge 4.1’ de görülmektedir.

Çizelge 4.1 Bu çalışmada kullanılan *Yarrowia lipolytica* strainlerinin daha önceden yapılan çalışma, izolasyon kaynağı ve tanısında kullanılan yöntemler.

Organizma	Alınan Çalışma	İzolasyon Kaynağı	Tanısında Kullanılan Yöntemler		
			Fenotipik Yöntemler	ITS-PCR	ITS-PCR Dizi Analizi
TEM YL 3	Akpınar, 2008	Peynir	+	+	+
TEM YL 5		Peynir	+	+	+
TEM YL 6		Peynir	+	+	+
TEM YL 9		Peynir	+	+	+
TEM YL 10		Peynir	+	+	+
TEM YL 17		Peynir	+	+	+
TEM YL 18		Peynir	+	+	+
TEM YL 19		Peynir	+	+	+
TEM YL 20		Peynir	+	+	+
TEM YL 21		Peynir	+	+	+
TEM ORC 2	Güngör, 2009	Toprak	+	+	+
TEM ORC 3		Atık Su	+	+	+
TEM ORC 4		Toprak	+	+	+
TEM ORC 9		Toprak	+	+	+
TEM ORC 10		Atık Su	+	+	+
TEM ORC 11		Atık Su	+	+	+
TEM ORC 12		Atık Su	+	+	+
TEM ORC 13		Atık Su	+	+	+
TEM ORC 17		Toprak	+	+	+
TEM ORC 20		Atık Su	+	+	+
TEM TAN 10	Öztürk, 2000	Peynir	+	+	-
TEM TAN 46	Yalçın, 2007	Peynir	+	+	-

4.1 *Yarrowia lipolytica* Strainlerinin Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Tanılarının Kesinleştirilmesi

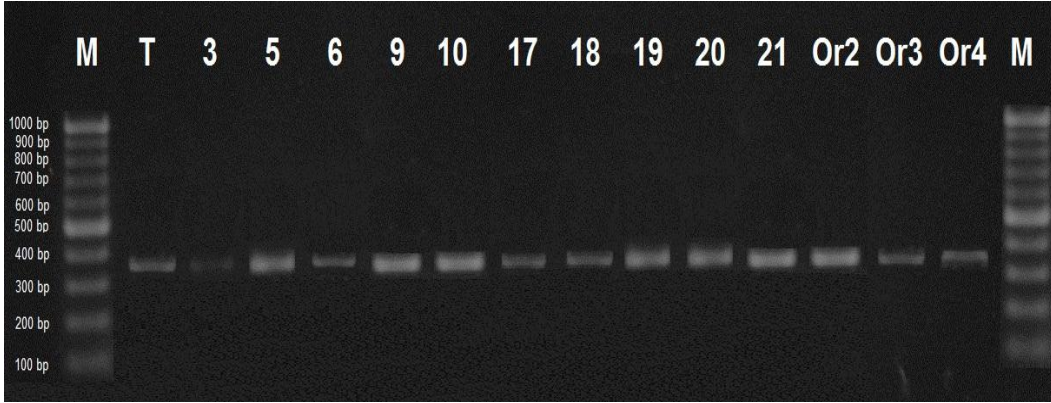
Daha önceden ITS-PCR' da genotipik tanısı yapılan 22 *Y. lipolytica* straininin ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesi ve 18S rDNA bölgesinin RFLP analizi ile 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekans analizi yöntemleri kullanılarak bu strainlerin tanısının kesinleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla önceki çalışmalarda yapılmış olan DNA izolasyonu ve ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR' da çoğaltılması, bu çalışmada ITS-RFLP çalışmalarının yapılabilmesi için tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.1' de belirtilen bütün maya strainleri moleküler biyolojik tanılama çalışmalarına dâhil edilmiştir. Bu strainlerden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen genomik DNA' ların saflıkları, hem agaroz jel elektroforezi hem de Nanodrop cihazında A_{260}/A_{280} oranlarının ölçülmesi ile kontrol edilmiştir.

4.1.1 ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve RFLP analizi

Daha önceki çalışmalarda 22 maya strainin ITS-PCR ile tanılması gerçekleşmesine rağmen bu çalışmada bu bölgenin RFLP analizi için aynı bölge PCR' da tekrar çoğaltılmıştır. 22 maya straininden elde edilen genomik DNA' lardan, ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak Bölüm 3.2.2.2'de belirtildiği gibi yeniden PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda, yaklaşık 360 bp uzunluğunda tek bir fragment elde edilmiştir. Fragmentin uzunluğu, DNA markerı baz alınarak Vilber Lourmat jel dökümantasyon sistemi ile saptanmıştır. ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen fragmentler Şekil 4.1 ve 4.2' de görülmektedir. ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR amplikonları, Bölüm 3.2.2.2'de belirtildiği gibi üç farklı restriksiyon enzimi (*HaeIII*, *HinfI* ve *RsaI*) ile kesilmiş ve her bir restriksiyon enzimi için farklı restriksiyon kesim profilleri elde edilmiştir (Çizelge 4.2). ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin *RsaI* enzimi RFLP analizi sonrasında elde edilen profiller, Şekil 4.3' te görülmektedir.

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve RFLP analizi sonucunda hem *Y. lipolytica* tip türü hem de 22 *Y. lipolytica* straini benzer bant profili göstermiştir. Elde edilen veriler daha önceden gerçekleştirilmiş çeşitli çalışmalardan (Deak et al., 2000; Petersen et al., 2001; Andrade et al., 2006; Polomska et al., 2007) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmış ve literatür ile benzer sonuçların elde edildiği gözlenmiştir.



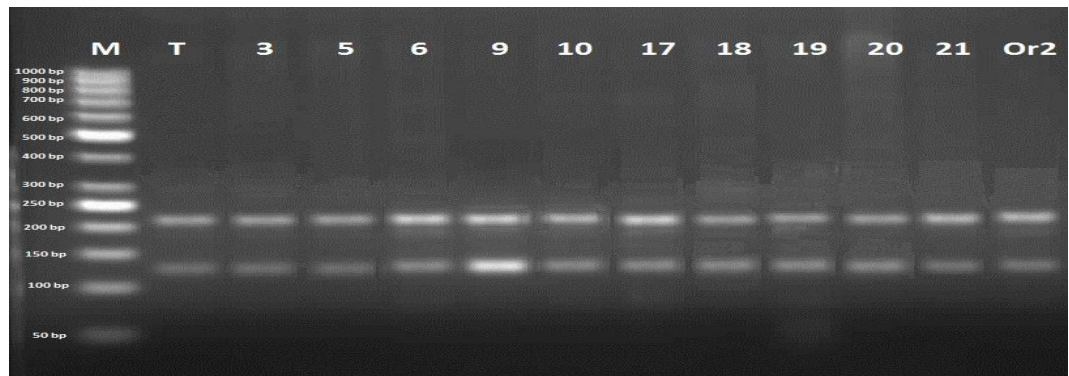
Şekil 4.1 *Yarrowia lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin ITS-PCR tanı sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; 3, 5, 6, 9, 10, 17, 18, 19, 20 ve 21; Akpınar (2008) strainleri, Or2, Or3 ve Or4; Güngör (2009) strainleri.



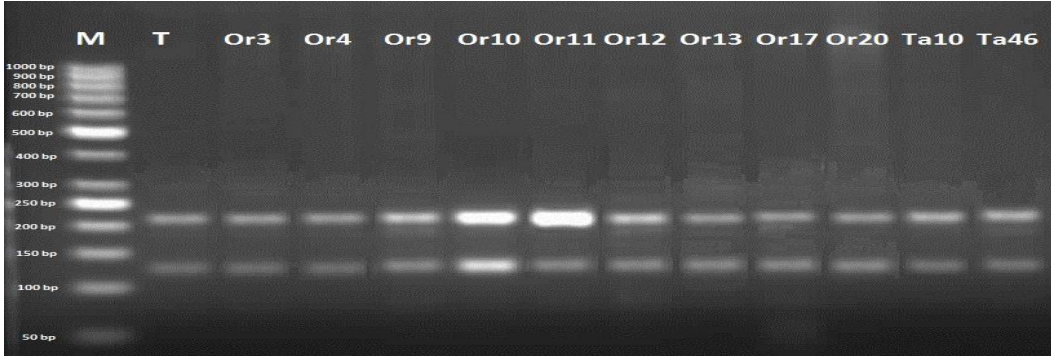
Şekil 4.2 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin ITS-PCR tanı sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü, Or9, Or10, Or11, Or12, Or13, Or 17 ve Or20; Güngör (2009) strainleri, Ta10; Yalçın (2000) straini; Ta46; Yalçın (2007) straini.

Çizelge 4.2 *Y. lipolytica* strainleri ve tip türün ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri.

Strain No	PCR Ürün Boyutu (bp)	Restriksiyon Enzimleri İle Kesim Profili		
		<i>HaeIII</i> (bp)	<i>HinfI</i> (bp)	<i>RsaI</i> (bp)
TEM YL 3	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 5	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 6	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 9	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 10	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 17	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 18	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 19	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 20	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM YL 21	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 2	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 3	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 4	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 9	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 10	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 11	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 12	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 13	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 17	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM ORC 20	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM TAN 10	360	360	180 + 180	220 + 140
TEM TAN 46	360	360	180 + 180	220 + 140
<i>Y. lipolytica</i> CBS-6124	360	360	180 + 180	220 + 140



Şekil 4.3 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin ITS bölgesinin *RsaI* RFLP analiz sonuçları. M; marker (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; 3, 5, 6, 9, 10, 17, 18, 19, 20 ve 21; Akpınar (2008) strainleri, Or2; Güngör (2009) straini.

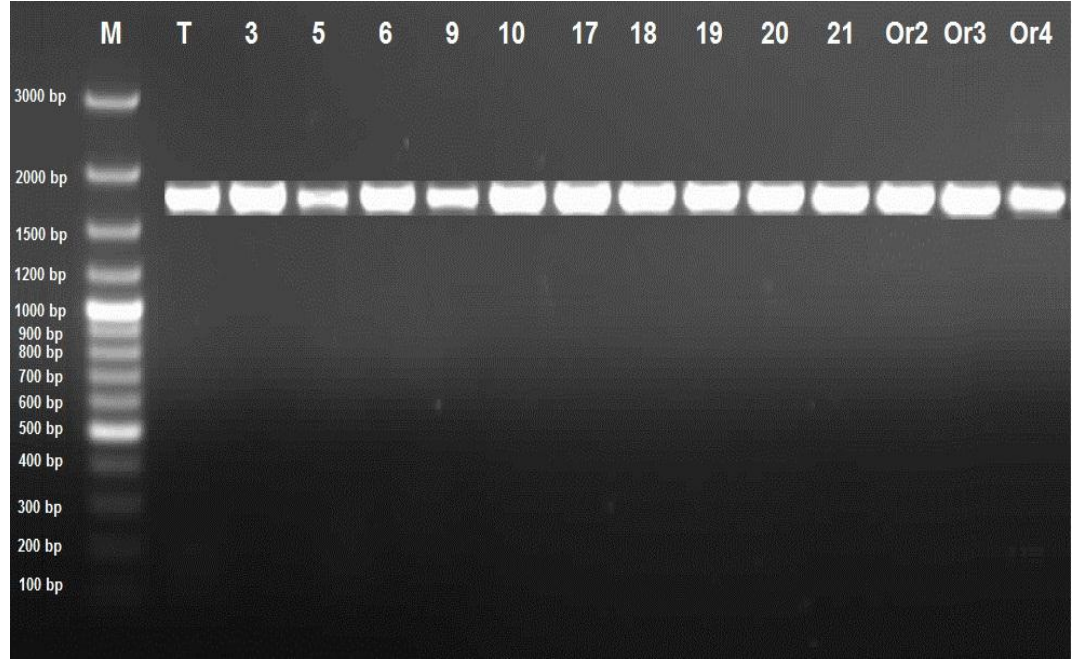


Şekil 4.4 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin ITS bölgesinin *RsaI* RFLP analiz sonuçları. M; marker (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü, Or3, Or4, Or9, Or10, Or11, Or12, Or13, Or 17 ve Or20; Güngör (2009) strainleri, Ta10; Yalçın (2000) straini; Ta46; Yalçın (2007) straini.

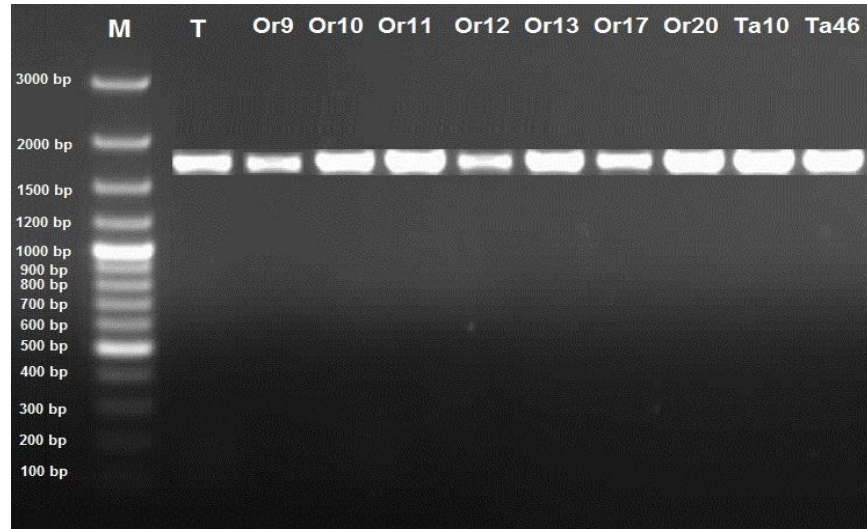
4.1.2 18S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve RFLP analizi

22 maya straininden elde edilen genomik DNA' lardan, P108 ve M3976 primerleri kullanılarak Bölüm 3.2.2.3.' te belirtildiği gibi PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda, yaklaşık olarak 1629 bp uzunluğunda tek bir fragment elde edilmiştir. Fragmentlerin uzunlukları, DNA markerı baz alınarak Vilber Lourmat jel dökümantasyon sistemi ile saptanmıştır. 18S rDNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen fragmentler Şekil 4.5 ve 4.6' da görülmektedir. 18S rDNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ampliconları, Bölüm 3.2.2.3' te belirtildiği gibi üç farklı restriksiyon enzimi (*HaeIII*, *RsaI* ve *TaqI*) ile kesilmiş ve her bir restriksiyon enzimi için farklı restriksiyon kesim profilleri elde edilmiştir (Çizelge 4.3). 18S rDNA bölgesinin *HaeIII* restriksiyon enzimi kesim profilleri Şekil 4.7 ve 4.8' de; *RsaI* restriksiyon enzimi kesim profilleri Şekil 4.9 ve 4.10' da ve *TaqI* restriksiyon enzimi kesim profilleri Şekil 4.11 ve 4.12' de görülmektedir.

18S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve RFLP analizi sonucunda hem *Y. lipolytica* tip türü hem de 22 *Y. lipolytica* straini benzer bant profili göstermiştir. Elde edilen veriler daha önceden gerçekleştirilmiş çeşitli çalışmalardan (Andrade et al., 2006) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmış ve literatür ile benzer sonuçların elde edildiği gözlenmiştir.



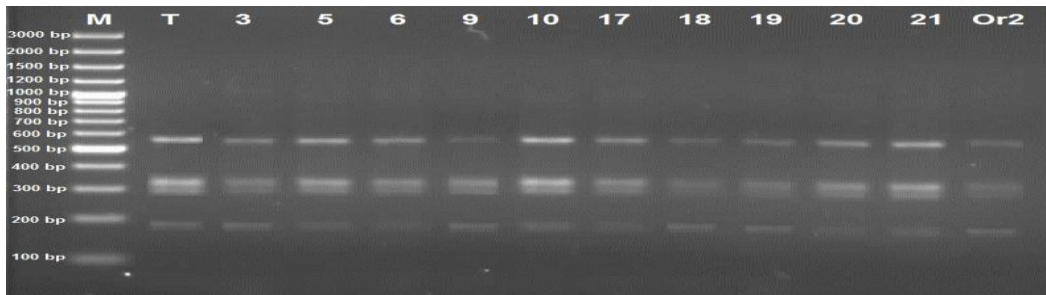
Şekil 4.5 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 18S rDNA-PCR tanı sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; 3, 5, 6, 9, 10, 17, 18, 19, 20 ve 21; Akpınar (2008) strainleri, Or2, Or3 ve Or4; Güngör (2009) strainleri.



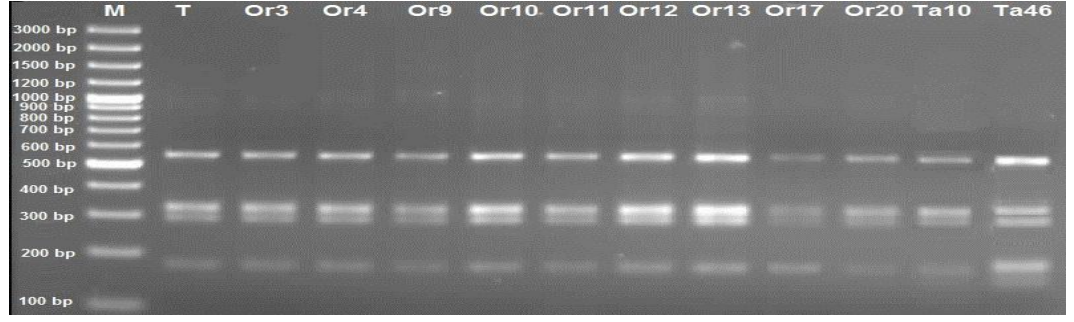
Şekil 4.6 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 18S rDNA-PCR tanı sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü, Or9, Or10, Or11, Or12, Or13, Or 17 ve Or20; Güngör (2009) strainleri, Ta10; Yalçın (2000) straini; Ta46; Yalçın (2007) straini.

Çizelge 4.3 *Y. lipolytica* strainleri ve tip türün 18S rDNA bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri.

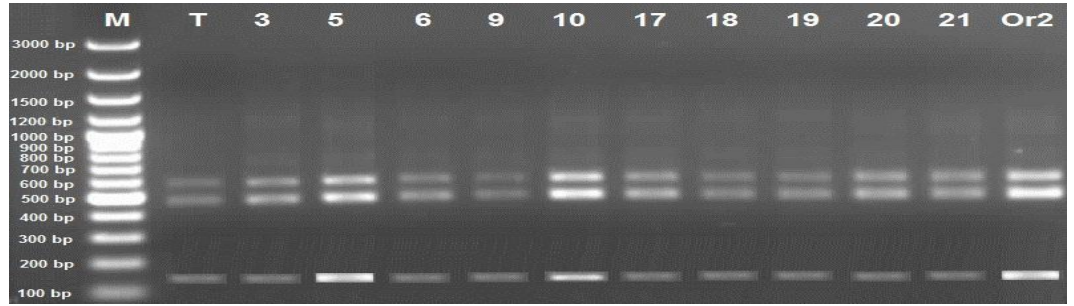
Strain No	PCR Ürün Boyutu (bp)	Restriksiyon Enzimleri İle Kesim Profili		
		<i>HaeIII</i> (bp)	<i>RsaI</i> (bp)	<i>TaqI</i> (bp)
TEM YL 3	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 5	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 6	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 9	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 10	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 17	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 18	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 19	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 20	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM YL 21	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM ORC 2	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM ORC 3	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM ORC 4	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM ORC 9	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM ORC 10	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM ORC 11	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM ORC 12	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM ORC 13	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM TAN 10	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
TEM TAN 46	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206
<i>Y. lipolytica</i> CBS-6124	1629	548+321+313+270+177	574+467+449+139	1022+267+206



Şekil 4.7 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 18S rDNA bölgesinin *HaeIII* restriksiyon enzimi kesim sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; 3, 5, 6, 9, 10, 17, 18, 19, 20 ve 21; Akpınar (2008) strainleri, Or2; Güngör (2009) straini.



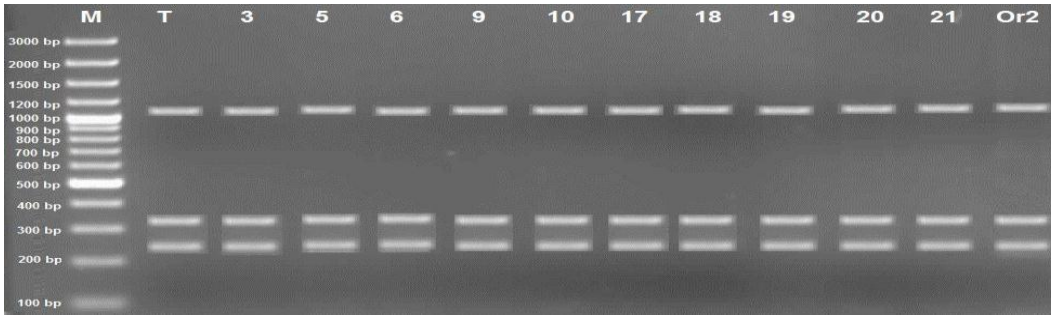
Şekil 4.8 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 18S rDNA bölgesinin *Hae*III restriksiyon enzimi kesim sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; Or3, Or4, Or9, Or10, Or11, Or12, Or13, Or 17 ve Or20; Güngör (2009) strainleri, Ta10; Yalçın (2000) straini; Ta46; Yalçın (2007) straini.



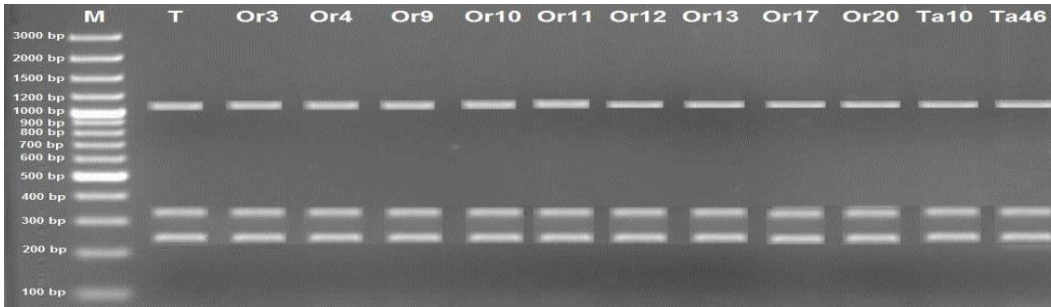
Şekil 4.9 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 18S rDNA bölgesinin *Rsa*I restriksiyon enzimi kesim sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; 3, 5, 6, 9, 10, 17, 18, 19, 20 ve 21; Akpınar (2008) strainleri, Or2; Güngör (2009) straini.



Şekil 4.10 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 18S rDNA bölgesinin *Rsa*I restriksiyon enzimi kesim sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; Or3, Or4, Or9, Or10, Or11, Or12, Or13, Or 17 ve Or20; Güngör (2009) strainleri, Ta10; Yalçın (2000) straini; Ta46; Yalçın (2007) straini.



Şekil 4.11 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 18S rDNA bölgesinin *TaqI* restriksiyon enzimi kesim sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; 3, 5, 6, 9, 10, 17, 18, 19, 20 ve 21; Akpınar (2008) strainleri, Or2; Güngör (2009) straini.

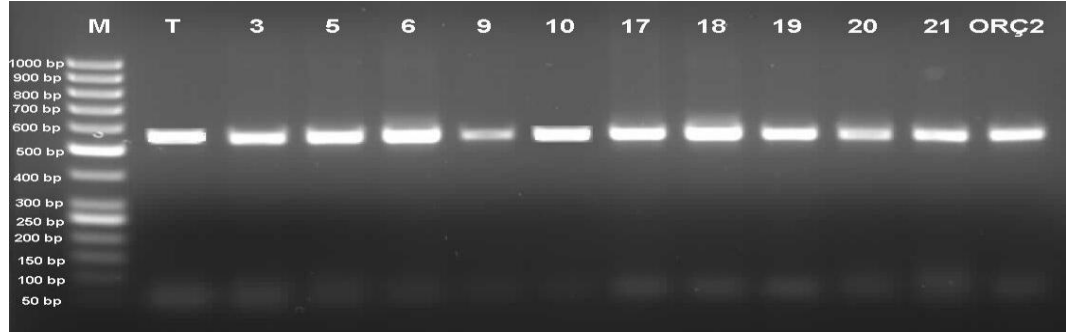


Şekil 4.12 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 18S rDNA bölgesinin *TaqI* restriksiyon enzimi kesim sonuçları. M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; Or3, Or4, Or9, Or10, Or11, Or12, Or13, Or 17 ve Or20; Güngör (2009) strainleri, Ta10; Yalçın (2000) straini; Ta46; Yalçın (2007) straini.

4.1.3 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin PCR ile çoğaltılması ve sekans analizi

Hem ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin RFLP analizi hem de 18S rDNA bölgesinin RFLP analizi *Y. lipolytica* strainlerinin literatür ile benzer sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte, 26S rRNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekansı, maya taksonomisi için ana araç olarak yaygın bir şekilde kabul görmektedir ve günümüzde tanımlanan bütün maya türleri için mevcut veri tabanları bulunmaktadır. Bu nedenle *Y. lipolytica* strainlerinin tanısını kesinleştirmek için 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domain sekansıda saptanmıştır. 22 maya straininden elde edilen genomik DNA' lardan, NL1 ve NL4 primerleri kullanılarak Bölüm 3.2.2.4'te belirtildiği gibi PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda, yaklaşık olarak 550 bp uzunluğunda tek bir fragment

elde edilmiştir. Fragmentlerin uzunlukları, DNA markerı baz alınarak Vilber Lourmat jel dökümantasyon sistemi ile saptanmıştır. 26S rDNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen fragmentler Şekil 4.13 ve 4.14’ de görülmektedir.



Şekil 4.13 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domainin - PCR tanı sonuçları. M; marker (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü; 3, 5, 6, 9, 10, 17, 18, 19, 20 ve 21; Akpınar (2008) strainleri, ORÇ2; Güngör (2009) straini.



Şekil 4.14 *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ile *Y. lipolytica* strainlerinin 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domainin – PCR tanı sonuçları. M; marker (GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder), T; *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü, Orç3, Orç4, Orç9, Orç10, Orç11, Orç12, Orç13, Orç 17 ve Orç20; Güngör (2009) strainleri, Tan10; Yalçın (2000) straini; Tan46; Yalçın (2007) straini.

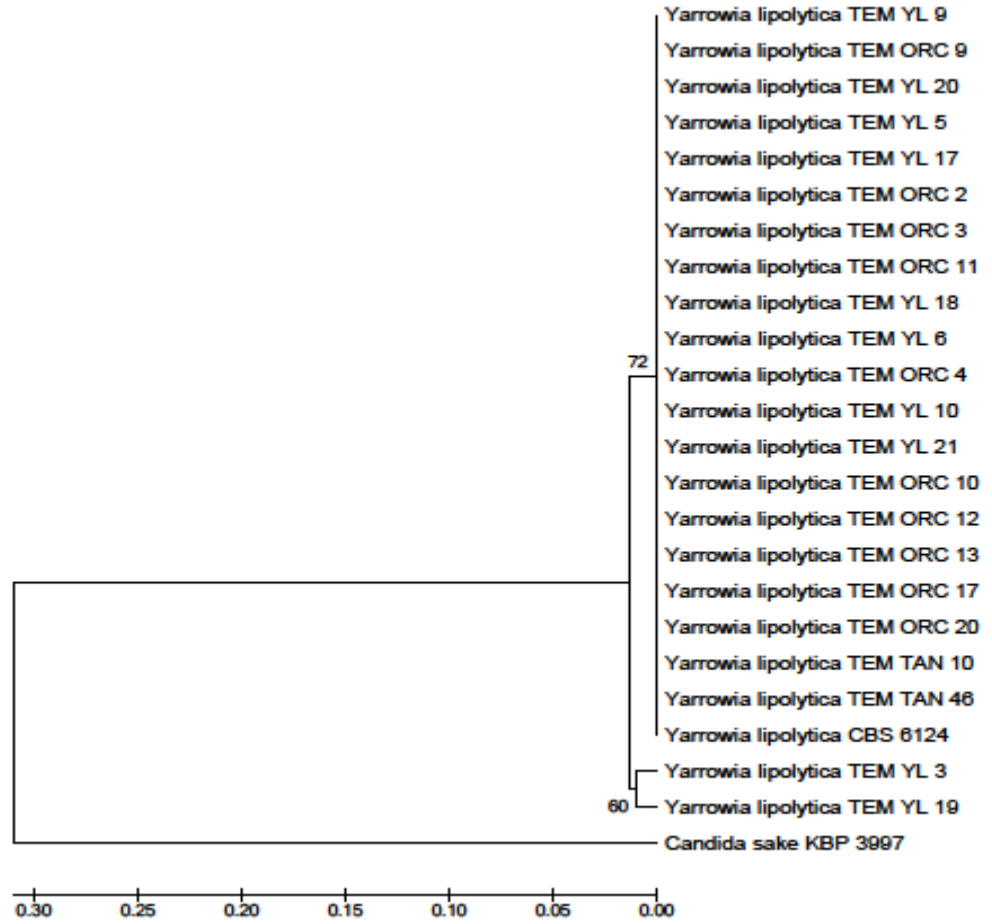
Maya strainleri 26S rDNA bölgesi D1/D2 domaininin sekans analizi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (BİYOMER) Bölüm 3.2.2.4’te belirtildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonucunda elde edilen ham veriler önce temizlenmiş, daha sonra da NCBI GenBank veri tabanında bulunan Basic Local

Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak veri tabanında bulunan organizmalar ile eşleştirilmiştir. Eşleşme sonucunda elde edilen sekans analizi sonuçları Çizelge 4.4’ te görülmektedir.

Çizelge 4.4 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekans analizi sonucunda elde edilen tanılama sonuçları.

Strain No	PCR Ürün Boyutu (bp)	Homoloji (%)	Sekans Sonucu	GenBank Accession No.
TEM YL 3	550	99	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112343
TEM YL 5	550	99	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112344
TEM YL 6	550	99	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112345
TEM YL 9	550	99	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112346
TEM YL 10	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112347
TEM YL 17	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112348
TEM YL 18	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112349
TEM YL 19	550	99	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112350
TEM YL 20	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112351
TEM YL 21	550	99	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112352
TEM ORC 2	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112353
TEM ORC 3	550	99	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112354
TEM ORC 4	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112355
TEM ORC 9	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112356
TEM ORC 10	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112357
TEM ORC 11	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112358
TEM ORC 12	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112359
TEM ORC 13	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112360
TEM ORC 17	500	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112361
TEM ORC 20	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112362
TEM TAN 10	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112363
TEM TAN 46	550	100	<i>Yarrowia lipolytica</i>	JN112364

Elde edilen maya sekansları, çoklu hizalama programı olan Clustal W v2.0 yazılımı kullanılarak hizalanmış ve filogenetik ağaç, Mega v5.05 yazılımı ile Tamura-Nei neighbor joining metodu kullanılarak oluşturulmuştur. Filogenetik ağacın güvenilirliği, 1000 tekrarlı parametrik olmayan bootstrap örnekleme ile değerlendirilmiştir. Filogenetik ağaç Şekil 4.15’ te görülmektedir.



Şekil 4.15 Tamura-Nei neighbor joining metodu kullanılarak oluşturulmuş 22 *Y. lipolytica* straini, *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türü ve *Candida sake* KBP 3997 (out-grup) arasındaki filogenetik uzaklığı gösteren filogenetik ağaç. *Y. lipolytica* CBS 6124 ve *C. sake* KBP 3997 tip türleri 26S rRNA D1/D2 domainlerinin sekansları NCBI GenBank veritabanından alınmıştır.

4.2 Tanısı Kesinleştirilen *Y. lipolytica* Strainlerinin Alkalın Ekstrasellüler Proteaz (AEP) Enzimi Aktivite Taranması, Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Üç farklı moleküler biyolojik yöntemle *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanan 22 maya straini, alkalın ekstrasellüler proteaz (AEP) enziminin aktivite taraması, üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu denemelerine alınmıştır.

4.2.1 AEP enzim aktivite taranması

Bölüm 3.2.5’de belirtildiği gibi, toplam 22 *Y. lipolytica* maya straininin AEP enzimini üretilip üretilmediği, skim milk agar besiyerinde inkübasyon sonucunda meydana getirdiği açılma zonlarından saptanmıştır. Denemeye alınan 22 *Y. lipolytica* straininden sadece 6 strainin skim milk agar besiyerinde aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininin AEP üreticisi 6 strain içerisinde semikantitatif olarak en fazla miktarda AEP enzimini salgıladığı saptanmış ve AEP enzimi ile ilgili bundan sonraki çalışmalarda bu strain kullanılmıştır. *Y. lipolytica* strainleri tarafından skim milk besiyerinde oluşturulan açılma zonları Çizelge 4.5’ te ve *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininin skim milk agarda meydana getirdiği açılma zonu Şekil 4.16’ da görülmektedir.

Çizelge 4.5 *Y. lipolytica* strainlerinin alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin tarama sonuçları [(toplam zon - koloni çapından farkı)].

Strain No	Skim milk agardaki açılma zonları (mm)		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün
TEM YL 3	18 – 10 = 8	24 – 11 = 13	29 – 13 = 16
TEM YL 5	16 – 9 = 7	24 – 9 = 15	28 – 9 = 19
TEM YL 6	16 – 9 = 7	22 – 10 = 12	27 – 10 = 17
TEM YL 9	18 – 10 = 8	25 – 12 = 13	31 – 13 = 18
TEM YL 10	17 – 10 = 7	24 – 11 = 13	28 – 12 = 16
TEM YL 17	–	–	–
TEM YL 18	–	–	–
TEM YL 19	–	–	–
TEM YL 20	–	–	–
TEM YL 21	–	–	–
TEM ORÇ 2	–	–	–
TEM ORÇ 3	17 – 10 = 7	24 – 10 = 14	29 – 11 = 18
TEM ORÇ 4	–	–	–
TEM ORÇ 9	–	–	–
TEM ORÇ 10	–	–	–

Çizelge 4.5 (Devam)

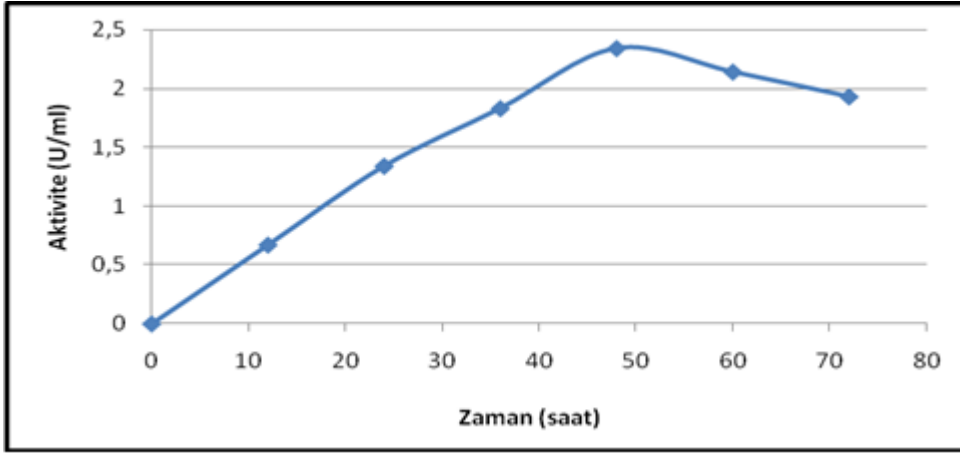
Strain No	Skim milk agardaki açılma zonları (mm)		
	1. Gün	2. Gün	3. Gün
TEM ORÇ 11	–	–	–
TEM ORÇ 12	–	–	–
TEM ORÇ 13	–	–	–
TEM ORÇ 17	–	–	–
TEM ORÇ 20	–	–	–
TEM TAN 10	–	–	–
TEM TAN 46	–	–	–
<i>Y. lipolytica</i> CBS 6124	16 – 11 = 5	23 – 12 = 11	28 – 15 = 13



Şekil 4.16 AEP enzim aktivitesi taranması sonrası *Y. lipolytica* TEM YL 5 straini tarafından skim milk agarda 27°C 48 saat inkübasyon sonucunda oluşan açılma zonu.

4.2.2 AEP enziminin üretimi

Semikantitatif olarak en fazla AEP enzimi üreten *Y. lipolytica* straini seçildikten sonra, bu strainin daha önceki benzer bir araştırmamızda (Akpınar et al., 2011) AEP enzimini en fazla gliserol proteose pepton (GPP, pH 6,8) besiyerinde ürettiği saptandığından *Y. lipolytica* TEM YL 5 straini AEP enzim üretimi GPP besiyerinde yapılmış ve 48. saat inkübasyonu sonucunda en fazla miktarda AEP enzimini ürettiği ve bu saatten sonra enzim miktarının azaldığı, Bölüm 3.2.5’ te anlatılan alkalın proteaz aktivite tayini ile saptanmıştır (Şekil 4. 17).



Şekil 4.17 *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden AEP enziminin zamanla üretimi.

En fazla üretim şartlarının belirlenmesinden sonra, *Y. lipolytica* TEM YL 5 straini GPP besiyerinde (pH 6,8) 150 rpm’ de çalkalamalı olarak 27°C’ de 48 saat boyunca Bölüm 3.2.7’ de anlatıldığı şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, ekstrasellüler AEP enzimi olduğu düşünülen enzim solüsyonu, 4°C’ de 8000 rpm 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant elde edilmiş ve maya hücreleri uzaklaştırılmıştır. Santrifüjden sonra, süpernatant 0,45 ve 0,22 µm’ lik milipor membranlar ile filtre edilerek maya hücrelerinden tamamen uzaklaştırılmış ve 1665 ml ham AEP enzimi elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant steril bir ortam şişesinde toplanmış, süpernatantın toplam protein miktarı Bölüm 3.2.3’ te anlatıldığı şekilde ölçülmüş ve protein konsantrasyonu 1,01 mg/ml olarak bulunmuştur. Aynı süpernatantın alkali proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5’ te belirtildiği şekilde ölçülmüş ve aktivitesi 2,34 U/ml/dak bulunmuştur.

4.2.3 AEP enziminin saflaştırılması

4.2.3.1 AEP enzim süpernatantının konsantre edilmesi

Bölüm 3.2.7’ te anlatılan şekilde üretimi gerçekleştirilen 1665 ml ham AEP enzimi, 10 kDa MWCO (Molecular Weight Cut-off) membran por genişliğine sahip bir ultrafiltrasyon sistemi ile yaklaşık olarak 12,8 kat konsantre edilmiş ve hacmi 130 ml’ ye kadar deriştirilmiştir. Ultrafiltratın protein miktarı Bölüm 3.2.3’ te anlatıldığı şekilde ölçülmüş ve toplam protein konsantrasyonu olarak 3,60

mg/ml bulunmuştur. Aynı ultrafiltratın alkali proteaz aktivitesi Bölüm 3.2.5’ de belirtildiği şekilde ölçülmüş ve aktivitesi 27,81 U/ml/dak bulunmuştur.

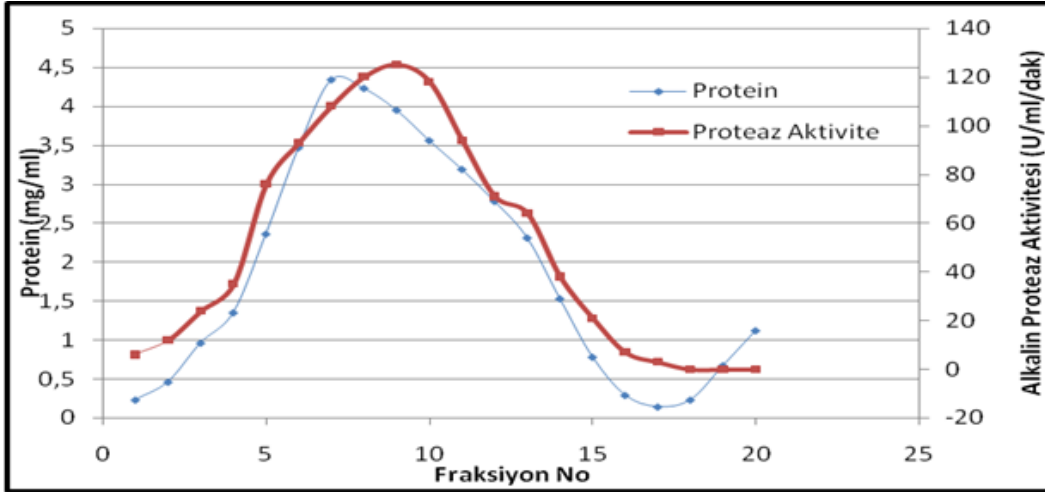
4.2.3.2 AEP ultrafiltratının iyon değişim kromatografisine uygulanması

AEP enziminin saflaştırılması, düşük basınçlı sıvı kromatografi (LPLC) sistemi kullanılarak sırasıyla iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon, 20°C’ de 254 nm UV absorbansta gerçekleştirilmiştir.

AEP enziminin kromatografik yöntemlerle saflaştırılmasındaki ilk aşama, Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-selüloz) kolonu kullanılarak iyon değişim kromatografisi ile gerçekleştirilmiş ve toplam 60 fraksiyon elde edilmiştir. Protein örnekleri, 0’dan 1000 mM NaCl lineer gradiyenti ile elüe edilmiştir. Elüe fraksiyonlar (1’er ml) toplanmış ve her bir fraksiyondan örnek alınarak Bölüm 3.2.5’ te belirtildiği şekilde alkalın proteaz aktivitesi ölçülmüş ve yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar (1–17 fraksiyonlar) birleştirilmiştir. Sonuç olarak, AEP enzimi DEAE-selüloz kolonu ile 29,05 verimle 16,46 kat saflaştırılmıştır. Çizelge 4.6 ve Şekil 4.18’ de *Y. lipolytica* TEM YL 5’ den üretilen AEP enziminin DEAE-selüloz kolonu ile saflaştırma profili görülmektedir.

Çizelge 4.6 *Y. lipolytica* TEM YL 5’ den üretilen AEP enziminin DEAE-selüloz kolonu ile saflaştırma profili.

Aşama	Total Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Kültür Süpernatantı	3896,1	1681,65	2,32	1	100
Ultrafiltrasyon	3615,3	468	7,725	3,33	92,79
DEAE-selüloz kolonundan toplanan fraksiyonlar (1-17. fraksiyonlar)	1131,78	29,64	38,18	16,46	29,05



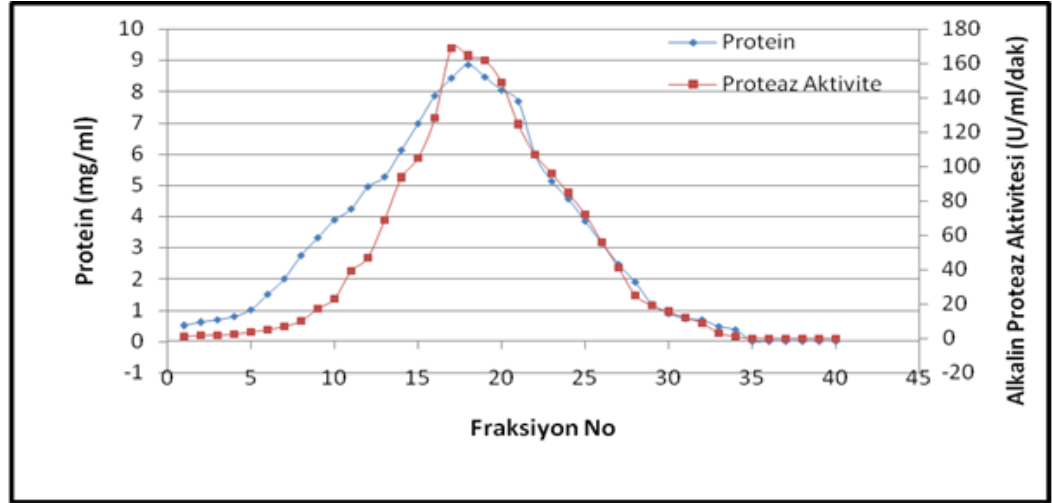
Şekil 4.18 *Y. lipolytica* TEM YL 5' den üretilen AEP enziminin DEAE-selüloz kromatografisi.

4.2.3.3 AEP ultrafiltratın jel filtrasyon kromatografisine uygulanması

AEP enziminin kromatografik yöntemlerle saflaştırılmasındaki diğer aşama, Sephadex G-75 kolonu kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi ile gerçekleştirilmiş ve 66 fraksiyon toplanmıştır. AEP ultrafiltrat örneği Sephadex G-75 kolonuna uygulanmış ve 67 fraksiyon toplanmıştır. Her bir fraksiyondan örnek alınarak Bölüm 3.2.5' te belirtildiği şekilde alkalın proteaz aktivitesi ölçülmüş ve yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar (1-34. fraksiyonlar) birleştirilmiştir. Sonuç olarak, AEP enzimi Sephadex G-75 kolonu ile 57,76 verimle 4,56 kat saflaştırılmıştır. Çizelge 4.7 ve Şekil 4.19' da *Y. lipolytica* TEM YL 5' den üretilen AEP enziminin Sephadex G-75 kolonu ile saflaştırma profili görülmektedir.

Çizelge 4.7 *Y. lipolytica* TEM YL 5' den üretilen AEP enziminin Sephadex G-75 kolonu ile saflaştırma profili.

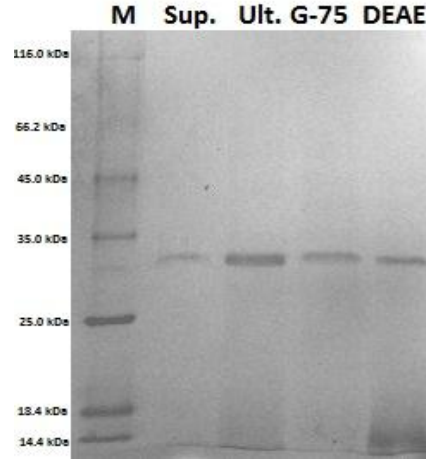
Aşama	Total Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Kültür Süpernatantı	3896,1	1681,65	2,32	1	100
Ultrafiltrasyon	3615,3	468	7,725	3,33	92,79
Sephadex G-75 kolonundan toplanan fraksiyonlar (1-34. fraksiyonlar)	2250,75	213	10,57	4,56	57,76



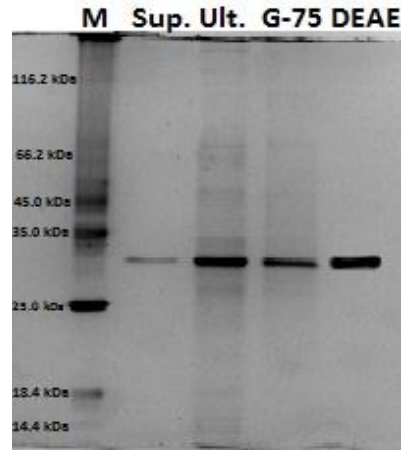
Şekil 4.19 *Y. lipolytica* TEM YL 5' den üretilen AEP enziminin Sephadex G-75 kromatografisi.

4.2.4 AEP enziminin moleküler ağırlığının SDS-PAGE ile belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 5' den üretilen ve hem DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi hem de Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılan alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla denatüre koşullar altında SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Yürütme sonrası jel hem Coomassie hem de gümüş boyama ile boyanmış, ve her iki boyama sonucunda tek bant olduğu gözlemlenmiştir. AEP enziminin moleküler ağırlığını saptamak için Fermentas Unstained Protein Molecular weight marker (SM0431 – 14,4, 18,4, 25, 35, 45, 66,2, 116 kDa) standardı kullanılmış ve AEP proteininin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 30,5 kDa olarak saptanmıştır. *Y. lipolytica* TEM YL 5' den üretilip saflaştırılan AEP enziminin Coomassie ve gümüş boyama sonuçları sırasıyla Şekil 4. 20 ve Şekil 4.21' de görülmektedir.



Şekil 4.20 *Y. lipolytica* TEM YL 5' den üretilip saflaştırılan alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin Coomassie boyama ile boyanmış SDS-PAGE jeli üzerindeki görünümü. M: marker; Sup: kültür süpernatantı; Ult: Ultrafiltrat; G-75: Sephadex G-75 kolonundan toplanan fraksiyonlar; DEAE: DEAE-selüloz kolonundan toplanan fraksiyonlar.



Şekil 4.21 *Y. lipolytica* TEM YL 5' den üretilip saflaştırılan alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin gümüş boyama ile boyanmış SDS-PAGE jeli üzerindeki görünümü. M: marker; Sup: kültür süpernatantı; Ult: Ultrafiltrat; G-75: Sephadex G-75 kolonundan toplanan fraksiyonlar; DEAE: DEAE-selüloz kolonundan toplanan fraksiyonlar.

4.2.5 AEP enziminin zimogram tayini

Saflaştırılan enzimin jelde aktivitesini belirlemek amacı ile zimogram yapılmıştır. Jelde, DEAE-selüloz kolon sonrasında elde edilen saf enzim çözeltisinin zimogram tayini için yapılan % 1' lik süt tozu içeren SDS-PAGE jelinde tek bant olarak aktivite gözlenmiştir (Şekil 4.22).

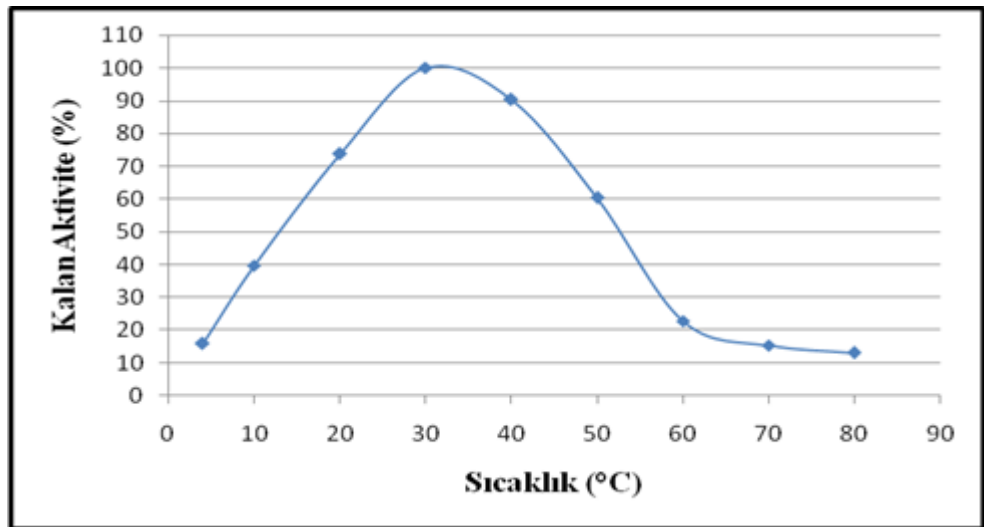


Şekil 4.22 DEAE-selüloz kolonundan elde edilen AEP enziminin SDS-PAGE zimogram analizi.

4.2.6 Saflaştırılmış AEP enziminin karakterizasyonu

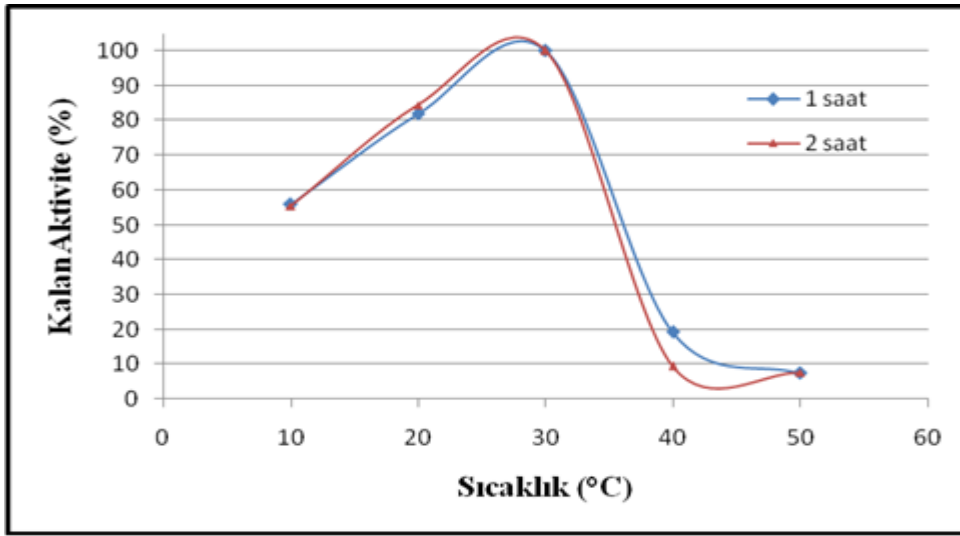
4.2.6.1 AEP enziminin optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan AEP enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için saf AEP enzim solüsyonunun, 10–80°C arasında değişen sıcaklıklarda Bölüm 3.2.5’ te anlatıldığı şekilde aktivitesi saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen alkalın proteaz aktivitesi standart kabul edilerek AEP aktivitesi, kalan aktivite yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Enzimin optimum sıcaklığının 30°C olduğu, 10°C’ in altında ve 60°C’ in üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 Saflaştırılmış AEP enziminin optimum sıcaklık profili.

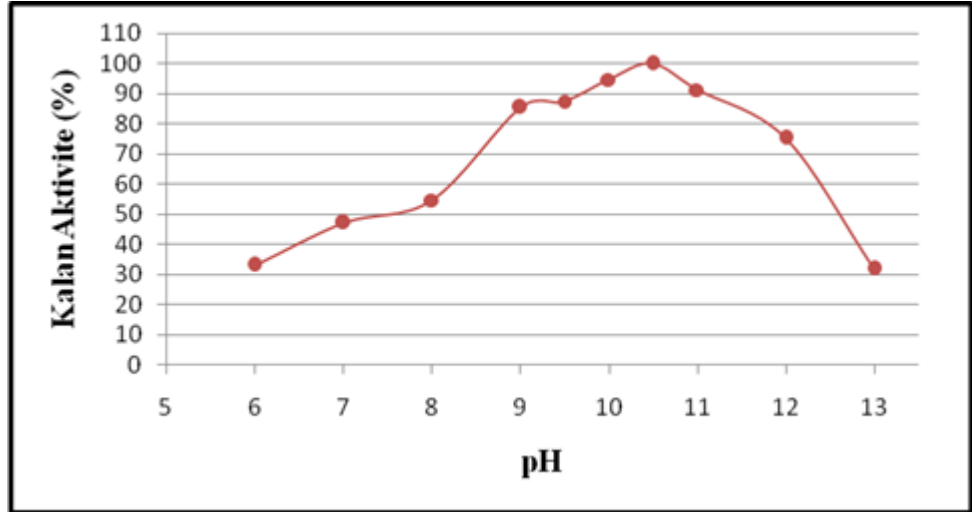
Saflaştırılan AEP enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için saf AEP enzim solüsyonu, 10–80°C arasında değişen sıcaklıklarda 1 veya 2 saat inkübe edildikten sonra Bölüm 3.2.5’ te anlatıldığı şekilde aktivitesi saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen alkalın proteaz aktivitesi standart kabul edilerek AEP aktivitesi kalan aktivite yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Enzimin termal stabilitesinin 30°C olduğu, 40°C’ in üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 Saflaştırılmış AEP enziminin sıcaklık stabilite profili.

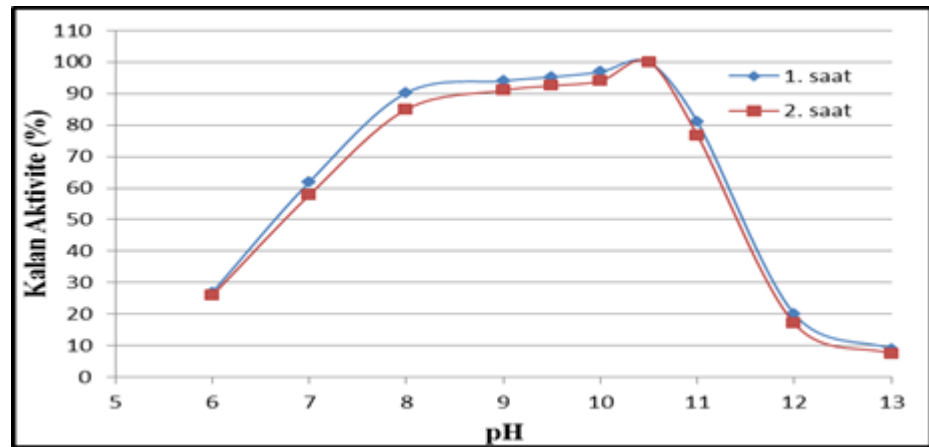
4.2.6.2 AEP enziminin optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan AEP enziminin optimum pH’ sını belirlemek için saf AEP enzim solüsyonunun, pH 6,0–13,0 arasında değişen pH’ larda Bölüm 3.2.5’ te anlatıldığı şekilde aktivitesi saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen alkalın proteaz aktivitesi standart kabul edilerek AEP aktivitesi kalan aktivite yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH’ sının 10,50 olduğu, pH 7,0’ ın altında ve pH 12’ in üzerindeki pH’ larda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 Saflaştırılmış AEP enziminin optimum pH profili.

Saflaştırılan AEP enziminin pH stabilitesini belirlemek için saf AEP enzim solüsyonu, pH 6,0–13,0 arasında değişen pH' larda 1 veya 2 saat inkübe edildikten sonra Bölüm 3.2.5' te anlatıldığı şekilde aktivitesi saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen alkalın proteaz aktivitesi standart kabul edilerek AEP aktivitesi kalan aktivite yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Enzimin pH stabilitesinin 10,50 olduğu, pH 7,0' ın altında ve pH 11' in üzerindeki pH' larda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Saflaştırılmış AEP enziminin pH stabilite profili.

4.2.6.3 AEP enziminin sentetik substrat seciciliğinin belirlenmesi

Saflaştırılan AEP enziminin hangi aminoasitten sonra kesim yaptığını yani substrat spesifitesini belirlemek amacı ile p-nitroanilid ile konjuge edilmiş sentetik peptid substratları reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde hazırlanmış ve N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sentetik substratları kullanılmıştır. AEP enziminin N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA peptidini hidrolizleyemediği ve en iyi kemotripsin spesifik substratı olan N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA peptidini hidrolizlediği tespit edilmiştir. AEP enziminin p-NA konjuge sentetik substratlara karşı spesifitesi Çizelge 4.8’ de verilmiştir.

Çizelge 4.8 *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin oligopeptidil-p-NA konjuge sentetik substratlarına karşı spesifitesi.

Substrat	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	0
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	12,93

4.2.6.4 AEP enziminin doğal protein substratlarına olan özgünlüğünün belirlenmesi

Saf AEP enziminin doğal protein substratlara karşı substrat spesifitesini belirlemek amacı ile hammarsten kazein, süt tozu, jelatin, kollajen ve bovine serum albumin (BSA) substratlarının % 0,6’ lık çözeltileri 50 mM pH 10,5 NaOH-glisin tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır. Saf AEP enziminin 30°C’de en iyi kazein varlığında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. AEP enziminin doğal protein substratlara karşı spesifitesi Çizelge 4.9’ da verilmiştir.

Çizelge 4.9 *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin doğal protein substratlara karşı spesifitesi.

Doğal Substratlar (%0,6 w/v)	Kalan Aktivite (%)
Kazein	100
Süt tozu	51,5
Jelatin	12
Kollajen	10,59
BSA	7,9

4.2.6.5 AEP enzim aktivitesi üzerine amino asit inhibitörlerinin etkisinin belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden elde edilen AEP enzimi, aktiviteden sorumlu amino asitlerin belirlenmesi amacı ile fenilmetilsülfonilflorid (PMSF), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetra asetik asit (EGTA) varlığında 30°C’ de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. AEP enziminin 1 mM PMSF varlığında aktivitesinin % 82 oranında, 10 mM PMSF varlığında ise aktivitesinin % 96 oranında; 1 mM EDTA varlığında aktivitesinin % 4 oranında ve 10 mM EDTA varlığında ise % 16 oranında kaybolduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, AEP enzim aktivitesi, 1 mM EGTA varlığında % 28 ve 10 mM EGTA varlığında ise % 87 oranında arttığı bulunmuş ve AEP enzimi için bir aktivatör olduğu bulunmuştur. *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzimi PMSF ile inhibe olduğundan bir serin proteaz olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10’ da verilmiştir.

Çizelge 4.10 *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine aktif bölge inhibitörlerinin etkisi.

Aktif Bölge İnhibitörü	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (%)
AEP (kontrol)	-	100
AEP + PMSF	1	18
	10	4
AEP + EDTA	1	96
	10	84
AEP + EGTA	1	128
	10	187

4.2.6.6 AEP enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının saf AEP aktivitesine etkisini incelemek için Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Mg^{+2} gibi 2 değerlikli metal iyonları ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} gibi tek değerlikli iyonlar kullanılarak proteaz aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlara göre, AEP enzim aktivitesinin 30°C’ de Mn^{+2} , Cu^{+2} , NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} ile arttığı,

Ca^{+2} ile değişmediği ve Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Mg^{+2} ile azaldığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar izelge 4.11' de verilmiştir.

Çizelge 4.11 *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi.

Metal İyonu	Kalan Aktivite (%)
AEP (kontrol)	100
AEP + Cu^{+2}	134
AEP + Ba^{+2}	90,9
AEP + Zn^{+2}	89,6
AEP + Mn^{+2}	151,3
AEP + Fe^{+2}	98,5
AEP + Mg^{+2}	76,5
AEP + Ca^{+2}	101
AEP + NH_4^{+1}	106
AEP + K^{+1}	105
AEP + Na^{+1}	104

4.2.6.7 AEP enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif madde ve hidrojen peroksitin etkilerinin belirlenmesi

Deterjan katkı maddelerinden SDS, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Triton X-100 ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) *Y. lipolytica* TEM YL 5' ten saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. AEP enziminin %1 SDS varlığında aktivitesinin yarısını kaybettiği; hidrojen peroksit ile yüksek oranda aktivitesini kaybettiği ve diğer yüzey aktif maddelerin varlığında ise aktivitesini yüksek oranda koruduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar izelge 4.12' de verilmiştir.

Çizelge 4.12 *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine çeşitli yüzey aktif maddelerin ve H₂O₂' in etkisi.

Yüzey Aktif Madde	Kalan Aktivite (%)
AEP (kontrol)	100
AEP + % 0,5 SDS (w/v)	52
AEP + % 1 SDS (w/v)	48
AEP + % 1 Tween 20 (v/v)	96
AEP + % 2 Tween 20 (v/v)	85
AEP + % 1 Tween 40 (v/v)	92
AEP + % 2 Tween 40 (v/v)	89
AEP + % 1 Tween 60 (v/v)	97
AEP + % 2 Tween 60 (v/v)	88
AEP + % 1 Tween 80 (v/v)	94
AEP + % 2 Tween 80 (v/v)	91
AEP + % 1 Triton X-100 (v/v)	88
AEP + % 2 Triton X-100 (v/v)	84
AEP + % 5 H ₂ O ₂ (v/v)	28
AEP + % 10 H ₂ O ₂ (v/v)	17
AEP + % 15 H ₂ O ₂ (v/v)	12

4.2.7 AEP enziminin LC-MS/MS analizi

DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan AEP enzimini tanılamak için, saf AEP enzim solüsyonu SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve Bölüm 3.2.17' de anlatıldığı şekilde kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen peptid fragmentlerinden molekül kütlesi 30,50 kDa olan band *Yarrowia lipolytica* alkalın ekstrasellüler proteaz (AEP) enzimi olarak tanılanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.27 ve Çizelge 4.13 – 4.21' de verilmiştir.

1 MKLATAFTIL TAVLAAPLAA PAPAPDAAPA AVPEGPAAAA YSSILSVVAK
 51 QSKKFKHHKR DLDEKDQFIV VFDSSATVDQ IASEIQKLDS LVDEDSSNGI
 101 TSALDLPVYT DGSGFLGFVG KFNSTIVDKL KESSVLTVEP DTIVSLPEIP
 151 ASSNAKRAIQ **TTPTVTQWGLS** RISHK**KAQTG** NYAYVRETVG **KHPTVSIVVD**
 201 **SGIR**TTTHSEF GGR**AVWGANF** **ADTQ**NADLLG **HGTHVAGTVG** **GKTYGVDANT**
 251 KLVAVKVFAG **RSAALS**VINQ **GFTWALNDYI** **SKRDTLPRGV** **LNFSGGGPKS**
 301 **ASQDALWSRA** TQEGLLVAIA AGNDAVDACN DSPGNIGGST SGIITVGSID
 351 SSDKISVWSG GQGSNYGTCV DVFAPGSDII SASYQSDSGT LVYSGTSMAC
 401 PHVAGLASYY LSINDEVLTQ AQVEALITES NTGVLPTTNL **KGSPNAVAYN**
 451 **GVGI**

Şekil 4.27 *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin fragmentleri ile protein veritabanındaki *Y. lipolytica* AEP enziminin eşleşen bölgeleri. Eşleşen bölgeler koyu ve kırmızı renkle gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 AIQTTPVTQWGLSR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	158-171	P09230	100	454
<i>Vitis vinifera</i> (Üzüm) Putative uncharacterized protein	1249-1258	F6HPX6	90	1437
<i>Gallibacterium anatis</i> arginine transporter permease subunit	111-130	F4HDQ8	55	223

Çizelge 4.14 KAQTGNYAYVR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	176-186	P09230	100	454
<i>Bacteroides massiliensis</i> hypothetical protein	308-316	WP_018452069.1	89	848
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> hypothetical protein	79-91	WP_018280390.1	69	331

Çizelge 4.15 GVLNFSGGGPK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	289-299	P09230	100	454
<i>Halorubrum litoreum</i> alpha/beta hydrolase fold protein	101-110	WP_008366767.1	90	273
<i>Ajellomyces dermatitidis</i> hypothetical protein, variant	54-63	EQL32683.1	80	396

Çizelge 4.16 SASQDALWSR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	300-309	P09230	100	454
<i>Thiomonas intermedia</i> chorismate lyase	155-163	YP_003644 605.1	89	183
<i>Streptomyces acidiscabies</i> hypothetical protein	128-134	WP_010356 513.1	50	211

Çizelge 4.17 AQTGNYAYVR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	117-186	P09230	100	454
<i>Blumeria graminis</i> DEAH family helicase	386-393	EPQ64114.1	70	1075
<i>Streptomyces somaliensis</i> ABC transporter permease	87-94	WP_010469 209.1	70	310

Çizelge 4.18 GSPNAVAYNGVGI peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	442-454	P09230	100	454
<i>Fusarium fujikuroi</i> endopeptidase K	402-411	embCCT746 91.1	90	414
<i>Aspergillus versicolor</i> extracellular alkaline protease	392-401	gbADE7497 5.1	90	403

Çizelge 4.19 HPTVSYVVD SGIR peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	192-204	P09230	100	454
<i>Mycobacterium smegmatis</i> PII uridylyl-transferase	298-308	YP_886767. 1	91	824
<i>Streptococcus</i> sp. S1 RNA-binding protein	391-403	WP_009754 254.1	69	710

Çizelge 4.20 SAALSVINQGFTWALNDYISK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	262-282	P09230	100	454
<i>Colletotrichum orbiculare</i> alkaline serine protease	232-249	ENH80855.1	70	416
<i>Aureobasidium pullulans</i> subtilase	44-60	AF413108_1	70	190

Çizelge 4.21 AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> alkalın ekstrasellüler proteaz	214-242	P09230	100	454
<i>Acanthamoeba healyi</i> subtilisin-like serine proteinase	173-201	AF221523_1	79	410
<i>Trichophyton rubrum</i> subtilase	183-208	XP_003235936.1	77	412

4.3 Tanısı Kesinleştirilen *Y. lipolytica* Strainlerinin Ekstrasellüler Ribonükleaz (RNaz) Enzimi Aktivite Taranması, Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Üç farklı moleküler biyolojik yöntemle *Yarrowia lipolytica* olarak tanılanan 22 maya straini, ekstrasellüler ribonükleaz (RNaz) enziminin aktivite taranması, üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu denemelerine alınmıştır.

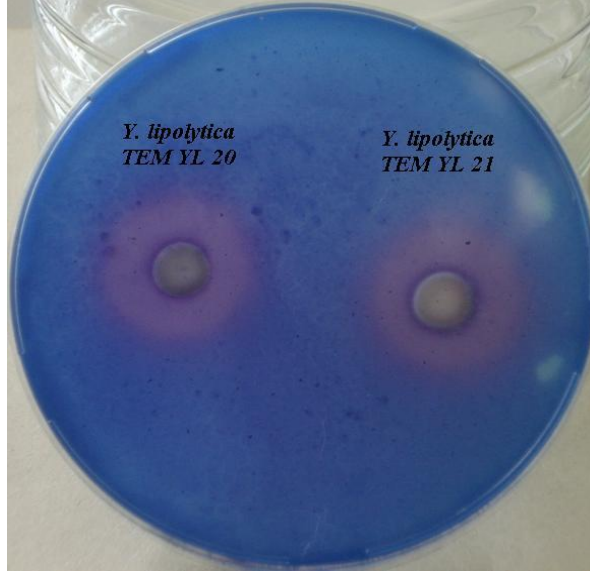
4.3.1 RNaz enzim aktivite taranması

Bölüm 3.2.12' de belirtildiği gibi, toplam 22 *Y. lipolytica* maya straininin ekstrasellüler RNaz enzimini üretilip üretilmediği RNA agar besiyerinde inkübasyonu sonucunda Toluidine Blue O solüsyonu spreyleneşmesinden sonra meydana gelen koyu lacivert zemine karşı oluşan pembe açılma zonlarından saptanmıştır. Denemeye alınan 22 *Y. lipolytica* straininin hepsinin RNA agar besiyerinde aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininin RNaz üreticisi diğer strainler içerisinde semikantitatif olarak en fazla miktarda RNaz enzimini salgıladığı saptanmış ve RNaz enzimi ile ilgili bundan

sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. *Y. lipolytica* strainleri tarafından RNA agar besiyerinde oluşturulan açılma zonları Çizelge 4.22’ de ve *Y. lipolytica* TEM YL 20 ve TEM YL 21 strainlerinin RNA agarda meydana getirdiği açılma zonu Şekil 4.28’ de görülmektedir.

Çizelge 4.22 *Y. lipolytica* strainlerinin ekstrasellüler RNaz enziminin tarama sonuçları [(toplam zon - koloni çapından farkı)].

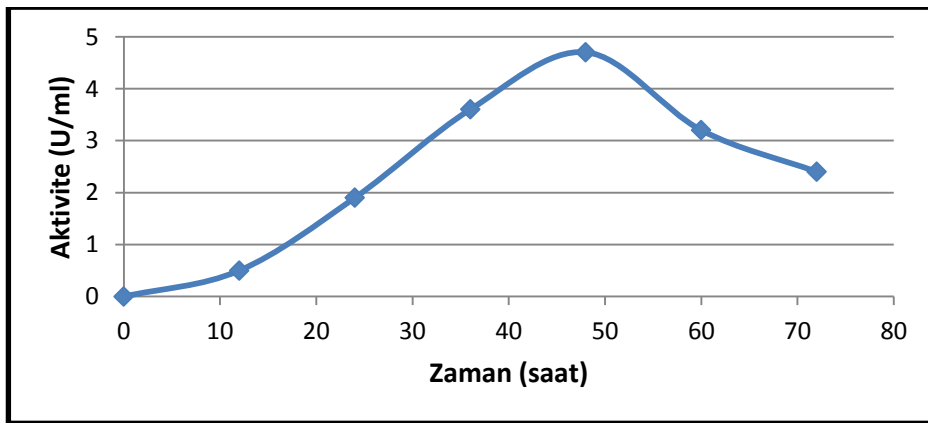
Strain No	RNA agardaki açılma zonları (mm)	
	1. Gün	2. Gün
TEM YL 3	9 – 7 = 2	16 – 8 = 8
TEM YL 5	9 – 8 = 1	15 – 8 = 7
TEM YL 6	8 – 6 = 2	18 – 9 = 9
TEM YL 9	11 – 8 = 3	18 – 11 = 7
TEM YL 10	10 – 8 = 2	15 – 8 = 7
TEM YL 17	10 – 8 = 2	20 – 10 = 10
TEM YL 18	12 – 8 = 4	16 – 8 = 8
TEM YL 19	12 – 8 = 4	17 – 8 = 9
TEM YL 20	11 – 7 = 4	18 – 8 = 10
TEM YL 21	10 – 6 = 4	18 – 7 = 11
TEM ORÇ 2	11 – 8 = 3	23 – 13 = 10
TEM ORÇ 3	9 – 8 = 1	18 – 8 = 10
TEM ORÇ 4	12 – 8 = 4	20 – 11 = 9
TEM ORÇ 9	10 – 8 = 2	20 – 10 = 10
TEM ORÇ 10	11 – 7 = 4	16 – 9 = 7
TEM ORÇ 11	10 – 8 = 2	18 – 10 = 8
TEM ORÇ 12	11 – 8 = 3	18 – 10 = 8
TEM ORÇ 13	11 – 8 = 3	21 – 12 = 9
TEM ORÇ 17	11 – 8 = 3	18 – 9 = 9
TEM ORÇ 20	10 – 8 = 2	19 – 9 = 10
TEM TAN 10	9 – 8 = 1	17 – 8 = 9
TEM TAN 46	9 – 8 = 1	18 – 8 = 10
<i>Y. lipolytica</i> CBS 6124	9 – 8 = 1	15 – 9 = 6



Şekil 4.28 RNaz enzim aktivitesi taraması sonrası *Y. lipolytica* TEM YL 20 vee TEM YL 21 strainleri tarafından RNA agarda 27°C 48 saat inkübasyonu sonucunda açılma zonunun görünümü.

4.3.2 RNaz enziminin üretimi

Semikantitatif olarak en fazla RNaz enzimi üreten *Y. lipolytica* straini seçildikten sonra, bu strainin daha önceki benzer bir araştırmamızda (Akpınar et al., 2011) RNaz enzimini en fazla gliserol proteose pepton sitrat (GPP-sitrat, pH 5,0) besiyerinde ürettiği saptandığından *Y. lipolytica* TEM YL 21 straini RNaz enzim üretimi GPP-sitrat besiyerinde (pH 5,0) yapılmış ve 48. saat inkübasyonu sonucunda en fazla miktarda RNaz enzimini ürettiği ve bu saatten sonra enzim miktarının azaldığı, Bölüm 3.2.13’ te anlatılan alkalın proteaz aktivite tayini ile saptanmıştır (Şekil 4. 29).



Şekil 4.29 *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden RNaz enziminin zamanla üretimi.

En fazla üretim şartlarının belirlenmesinden sonra, *Y. lipolytica* TEM YL 21 straini GPP-sitrat besiyerinde (pH 5,0) 150 rpm' de çalkalamalı olarak 27°C' de 48 saat boyunca Bölüm 3.2.14' te anlatıldığı şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, ekstrasellüler RNaz enzimi olduğu düşünülen enzim solüsyonu, 4°C' de 8000 rpm 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant elde edilmiş ve maya hücreleri uzaklaştırılmıştır. Santrifüjden sonra, süpernatant 0,45 ve 0,22 µm' lik milipor membranlar ile filtre edilerek maya hücrelerinden tamamen uzaklaştırılmış ve 1600 ml ham RNaz enzimi elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant steril bir ortam şişesinde toplanmış, süpernatantın toplam protein miktarı Bölüm 3.2.3' te anlatıldığı şekilde ölçülmüş ve protein konsantrasyonu 3,67 mg/ml olarak bulunmuştur. Aynı süpernatantın ribonükleaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te belirtildiği şekilde ölçülmüş ve aktivitesi 2,34 U/ml/dak bulunmuştur.

4.3.3 RNaz enziminin saflaştırılması

4.3.3.1 RNaz enzim süpernatantının konsantre edilmesi

Bölüm 3.2.15.1' de anlatılan şekilde üretimi gerçekleştirilen 1600 ml ham RNaz enzimi, 10 kDa MWCO membran por genişliğine sahip bir ultrafiltrasyon sistemi ile yaklaşık olarak 8 kat konsantre edilmiş ve hacmi 200 ml' ye kadar deriştirilmiştir. Ultrafiltratın toplam protein miktarı Bölüm 3.2.3' te anlatıldığı şekilde ölçülmüş ve protein konsantrasyonu olarak 11,43 mg/ml bulunmuştur. Aynı ultrafiltratın ribonükleaz aktivitesi Bölüm 3.2.13' te belirtildiği şekilde ölçülmüş ve aktivitesi 17,8 U/ml/dak bulunmuştur.

4.3.3.2 RNaz ultrafiltratının iyon değişim kromatografisine uygulanması

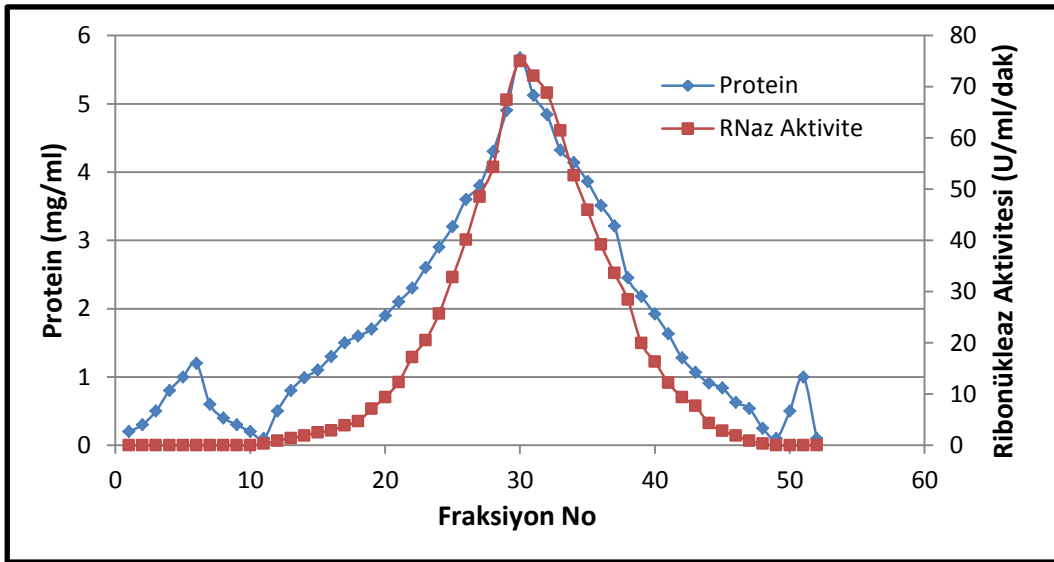
RNaz enziminin saflaştırılması, düşük basınçlı sıvı kromatografi (LPLC) sistemi kullanılarak sırasıyla iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon, 20°C' de 254 nm UV absorbansta gerçekleştirilmiştir.

RNaz enziminin kromatografik yöntemlerle saflaştırılmasındaki ilk aşama, Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-selüloz) kolonu kullanılarak iyon değişim kromatografisi ile gerçekleştirilmiş ve toplam 84 fraksiyon toplanmıştır. Protein

örnekleri, 0'dan 1 M NaCl lineer gradiyenti ile elüe edilmiştir. Elüe fraksiyonlar (1'er ml) toplanmış ve her bir fraksiyondan örnek alınarak Bölüm 3.2.13' te belirtildiği şekilde ribonükleaz aktivitesi ölçülmüş ve yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar (11–48 elüsyon fraksiyonları) birleştirilmiştir. Sonuç olarak, RNaz enzimi DEAE-selüloz kolonu ile 37,90 verimle 62,58 kat saflaştırılmıştır. Çizelge 4.23 ve Şekil 4.30' da *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin DEAE-selüloz kolonu ile saflaştırma profili görülmektedir.

Çizelge 4.23 *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin DEAE-selüloz kolonu ile saflaştırma profili.

Aşama	Total Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Kültür Süpernatantı	3744	5872	0,6376	1	100
Ultrafiltrasyon	3560	2286	1,5573	2,44	95,08
DEAE-selüloz kolonundan toplanan fraksiyonlar	1417,38	35,525	39,8981	62,58	37,90



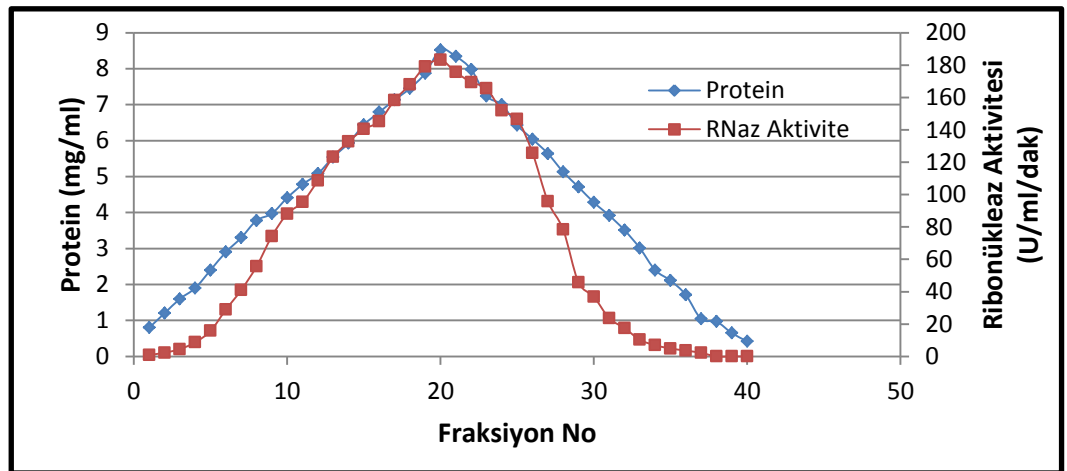
Şekil 4.30 *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin DEAE-selüloz kromatografisi.

4.3.3.3 RNaz ultrafiltratının jel filtrasyon kromatografisine uygulanması

RNaz enziminin kromatografik yöntemlerle saflaştırılmasındaki diğer aşama, Sephadex G-75 kolonu kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi ile gerçekleştirilmiş ve toplam 50 fraksiyon toplanmıştır. RNaz ultrafiltrat örneği Sephadex G-75 kolonuna uygulanmış ve 37 fraksiyon toplanmıştır. Her bir fraksiyondan örnek alınarak Bölüm 3.2.13' te belirtildiği şekilde ribonükleaz aktivitesi ölçülmüş ve yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar (1-37. fraksiyonlar) birleştirilmiştir. Sonuç olarak, RNaz enzimi Sephadex G-75 kolonu ile 66,10 verimle 27,23 kat saflaştırılmıştır. Çizelge 4.24 ve Şekil 4.31' de *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin Sephadex G-75 kolonu ile saflaştırma profili görülmektedir.

Çizelge 4.24 *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin Sephadex G-75 kolonu ile saflaştırma profili.

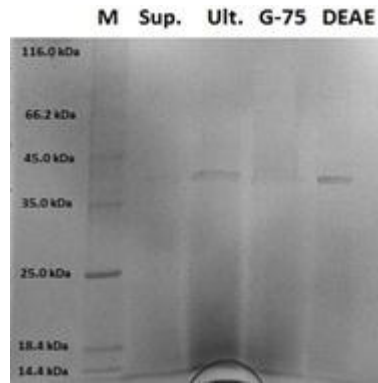
Aşama	Total Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Kültür Süpernatantı	3744	5872	0,6376	1	100
Ultrafiltrasyon	3560	2286	1,5573	2,44	95,08
Sephadex G-75 kolonundan toplanan fraksiyonlar	2474,5	142,1	17,3649	27,23	66,10



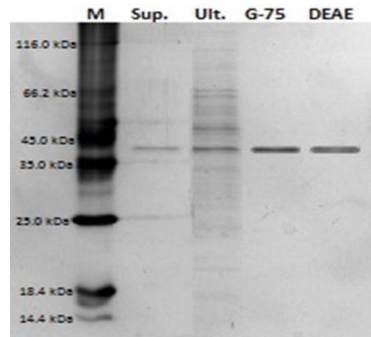
Şekil 4.31 *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilen RNaz enziminin Sephadex G-75 kromatografisi.

4.3.4 RNaz enziminin moleküler ağırlığının SDS-PAGE ile belirlenmesi

Y. lipolytica TEM YL 21' den üretilen ve hem DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi hem de Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılan ekstrasellüler ribonükleaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla denatüre koşullar altında SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Yürütme sonrası jel hem Coomassie hem de gümüş boyama ile boyanma yöntemi ile boyanmış ve her iki boyama sonucunda tek bant gözlemlenmiştir. RNaz enziminin moleküler ağırlığını saptamak için Fermentas Unstained Protein Molecular weight marker (SM0431 – 14,4, 18,4, 25, 35, 45, 66,2, 116 kDa) standardı kullanılmış ve RNaz proteininin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 40,97 kDa olarak saptanmıştır. *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilip saflaştırılan RNaz enziminin Coomassie ve gümüş boyama sonuçları sırasıyla Şekil 4. 32 ve Şekil 4.33' de görülmektedir.



Şekil 4.32 *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilip saflaştırılan ekstrasellüler ribonükleaz enziminin Coomassie boyama ile boyanmış SDS-PAGE jeli üzerindeki görünümü. M: marker; Sup: kültür süpernatantı; Ult: Ultrafiltrat; G-75: Sephadex G-75 kolonundan toplanan fraksiyonlar; DEAE: DEAE-selüloz kolonundan toplanan fraksiyonlar.

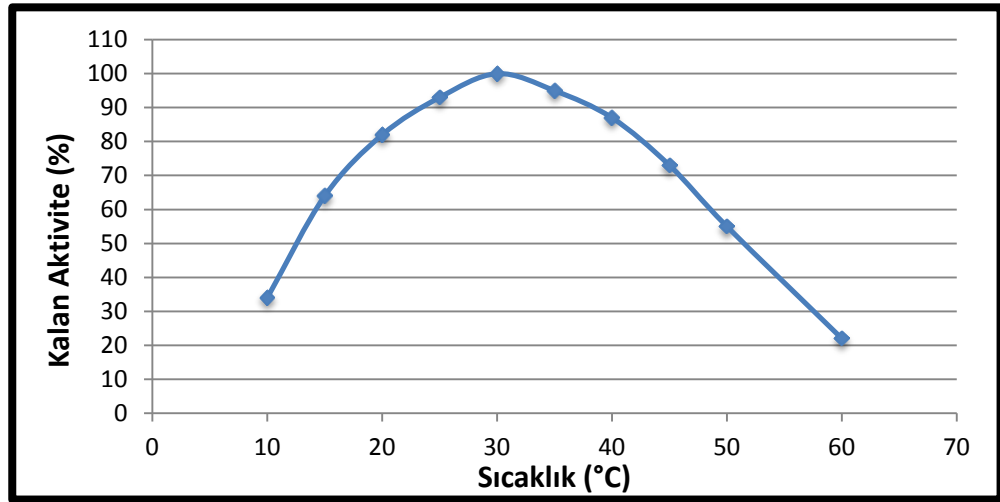


Şekil 4.33 *Y. lipolytica* TEM YL 21' den üretilip saflaştırılan ekstrasellüler ribonükleaz enziminin gümüş boyama ile boyanmış SDS-PAGE jeli üzerindeki görünümü. M: marker; Sup: kültür süpernatantı; Ult: Ultrafiltrat; G-75: Sephadex G-75 kolonundan toplanan fraksiyonlar; DEAE: DEAE-selüloz kolonundan toplanan fraksiyonlar.

4.3.5 Saflaştırılmış RNaz enziminin karakterizasyonu

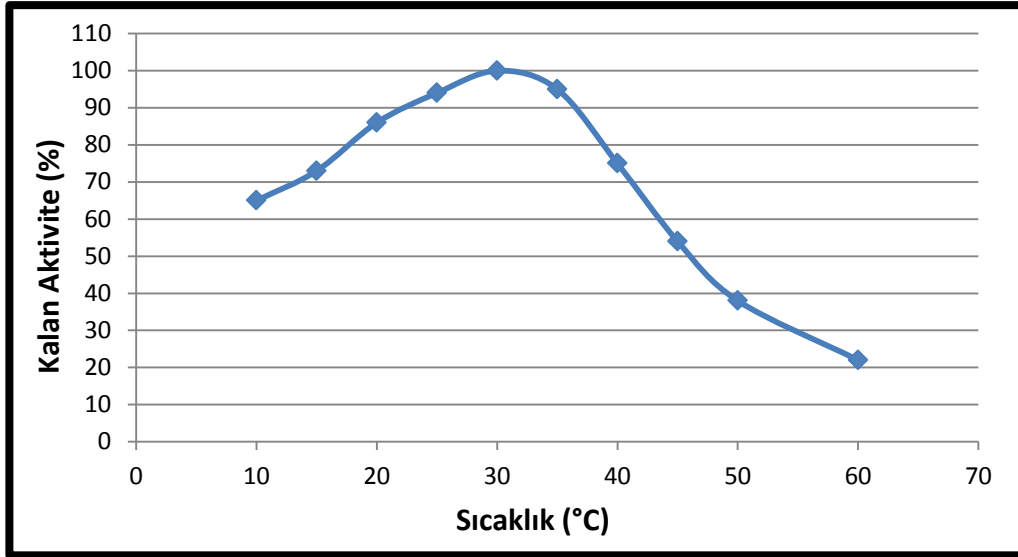
4.3.5.1 RNaz enziminin optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan RNaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için saf RNaz enzim solüsyonunun, 10–60°C arasında değişen sıcaklıklarda Bölüm 3.2.13’ te anlatıldığı şekilde aktivitesi saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen ribonükleaz aktivitesi standart kabul edilerek, RNaz aktivitesi, kalan aktivite yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Enzimin optimum sıcaklığının 30°C olduğu, 15°C’ in altında ve 50°C’ in üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34 Saflaştırılmış RNaz enziminin optimum sıcaklık profili.

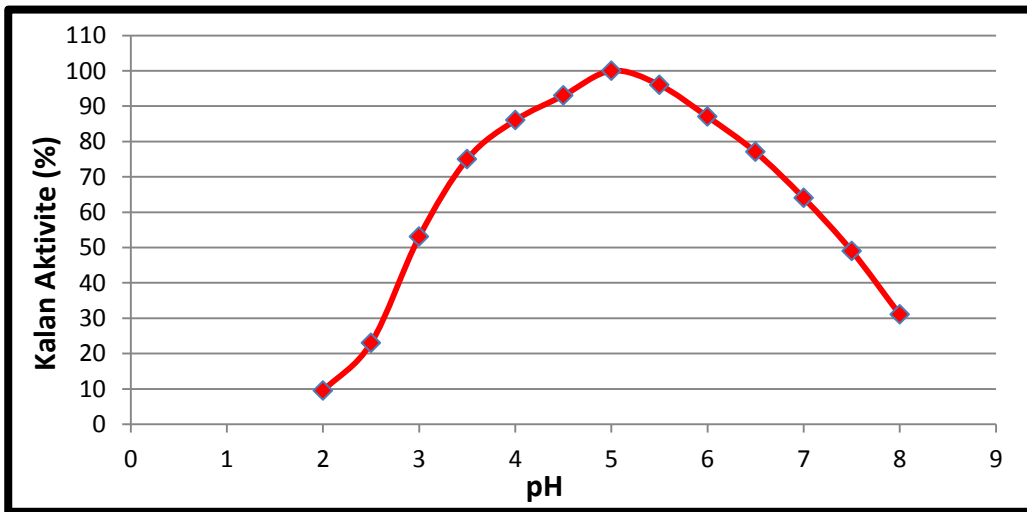
Saflaştırılan RNaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için saf RNaz enzim solüsyonu, 10–60°C arasında değişen sıcaklıklarda 1 saat inkübe edildikten sonra Bölüm 3.2.13’ te anlatıldığı şekilde aktivitesi saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen ribonükleaz aktivitesi standart kabul edilerek RNaz aktivitesi kalan aktivite yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Enzimin termal stabilitesinin 30°C olduğu, 50°C’ in üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Saflaştırılmış RNaz enziminin sıcaklık stabilite profili.

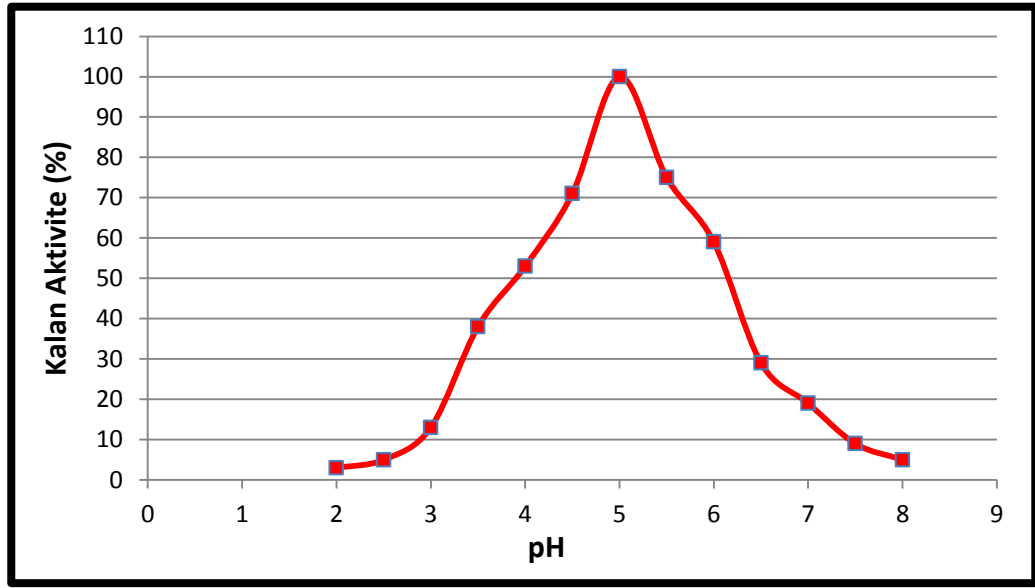
4.3.5.2 RNaz enziminin optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan RNaz enziminin optimum pH' sını belirlemek için saf RNaz enzim solüsyonu, pH 6,0–8,0 arasında değişen pH' larda Bölüm 3.2.13' te anlatıldığı şekilde aktivitesi saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen ribonükleaz aktivitesi standart kabul edilerek, RNaz aktivitesi kalan aktivite yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH' sının 5,0 olduğu, pH 2,5' in altında ve pH 7,5' in üzerindeki pH' larda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 Saflaştırılmış RNaz enziminin optimum pH profili.

Saflaştırılan RNaz enziminin pH stabilitesini belirlemek için saf RNaz enzim solüsyonu, pH 2,0–8,0 arasında değişen pH’ larda inkübe edildikten sonra Bölüm 3.2.14’te anlatıldığı şekilde aktivitesi saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen ribonükleaz aktivitesi standart kabul edilerek, RNaz aktivitesi kalan aktivite yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Enzimin pH stabilitesinin 5,0 olduğu, pH 3,5’ un altında ve pH 6,5’ in üzerindeki pH’ larda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.37 Saflaştırılmış RNaz enziminin pH stabilite profili.

4.3.5.3 RNaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının saf RNaz enzim aktivitesine etkisini incelemek için Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} ve Cd^{+2} gibi 2 değerlikli metal iyonları ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} gibi tek değerlikli iyonlar kullanılarak ribonükleaz aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlara göre, ribonükleaz enzim aktivitesinin 30°C’ de Mg^{+2} , Ca^{+2} , Na^{+1} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ile arttığı ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Zn^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} ve Fe^{+2} ile azaldığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.25’ te verilmiştir.

Çizelge 4.25 *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enzim aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi.

Metal İyonu	Kalan Aktivite (%)
RNaz (kontrol)	100
RNaz + 1 mM Na ⁺¹	114
RNaz + 10 mM Na ⁺¹	106
RNaz + 1 mM NH ₄ ⁺¹	98
RNaz + 10 mM NH ₄ ⁺¹	91
RNaz + 1 mM Mg ⁺²	122
RNaz + 10 mM Mg ⁺²	118
RNaz + 1 mM Zn ⁺²	99
RNaz + 10 mM Zn ⁺²	90
RNaz + 1 mM Ba ⁺²	97
RNaz + 10 mM Ba ⁺²	93
RNaz + 1 mM Ca ⁺²	105
RNaz + 10 mM Ca ⁺²	102
RNaz + 1 mM Co ⁺²	97
RNaz + 10 mM Co ⁺²	94
RNaz + 1 mM Cd ⁺²	88
RNaz + 10 mM Cd ⁺²	74
RNaz + 1 mM K ⁺¹	92
RNaz + 10 mM K ⁺¹	86
RNaz + 1 mM Fe ⁺²	89
RNaz + 10 mM Fe ⁺²	73
RNaz + 1 mM Cu ⁺²	104
RNaz + 10 mM Cu ⁺²	101
RNaz + 1 mM Mn ⁺²	110
RNaz + 10 mM Mn ⁺²	106

4.3.5.4 RNaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör maddelerin etkisinin belirlenmesi

Sitrik asit, EDTA, okzalik asit, sülfanilik asit, sodyum azid ve askorbik asit gibi inhibitör maddelerin *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden elde edilen RNaz

enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak için Bölüm 3.2.16.4' te anlatılan şekilde inhibitör maddelerle inkübasyona bırakılmıştır. RNaz enzim aktivitesinin 30°C' de okzalik asit ve sulfanilik asit ile aktivitesinin arttığı ve sitrik asit, EDTA, sodyum azid ve askorbik asit ile azaldığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.26' da verilmiştir.

Çizelge 4.26 *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enzim aktivitesi üzerine çeşitli inhibitörlerinin etkisi.

İnhibitör Madde	Kalan Aktivite (%)
RNaz (kontrol)	100
RNaz + 5 mM sitrik asit	91
RNaz + 5 mM EDTA	79
RNaz + 5 mM sodyum azid	68
RNaz + 5 mM askorbik asit	87
RNaz + 5 mM okzalik asit	113
RNaz + 5 mM sulfanilik asit	115

4.3.5.5 RNaz enziminin polihomorionükleotidlere ve RNA molükülüne karşı olan özgünlüğünün belirlenmesi

Saflaştırılan RNaz enziminin hangi rionükleotidin etkili parçaladığını yani substrat spesifitesini belirlemek amacı ile RNaz enzimi, poly(A), poly(C), poly(G) ve poly(U) polihomoribonükleotitleri ve RNA molekülleri ile Bölüm 3.2.16.5' te anlatıldığı şekilde 30°C' de, 30 ve 60 dakika inkübe edilmiştir. RNaz enziminin 30°C'de poly (A) homoribonükleotidine karşı en fazla aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin asidik karakteri ile birlikte poly(A) ribonükleotidini en fazla hidrolizleme kapasitesinde olmasından dolayı ribonükleazlarının T2 ailesine mensup olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.27' de verilmiştir.

Çizelge 4.27 *Y. lipolytica* TEM YL 21' den saflaştırılan RNaz'ın farklı polihomoribonükleotitlere ve RNA substratlarına karşı özgülüğü.

Substratlar	Spesifik Aktivite (U/mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)
	30 dak	60 dak
Poly (A)	87	94
Poly (C)	56	62
Poly (G)	44	45
Poly (U)	43	45
RNA	41	44

4.3.6 RNaz enziminin LC-MS/MS analizi

DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan RNaz enzimini tanılamak için SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve Bölüm 3.2.18' de anlatıldığı şekilde kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen peptid fragmentlerinden molekül kütlesi 40,97 kDa olan band *Yarrowia lipolytica* ekstrasellüler T2-benzeri ribonükleaz (RNaz) enzimi olarak tanılanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.38 ve Çizelge 4.28 – 4.34' de verilmiştir.

```

1 MQFSLATIAT VAAAVSALVC PYTKRDAVAA FTSPPLSSAD HKSCPADTPV
51 SCSSGAGSAD LCCTESPGGV LVLTQFWDWT PAIGPDDLFT LHGLWPDNCD
101 GSYAQFCDKS MEVQSVAAVL QQLGETELLD KMNKIWIIPNR GSTDSFWTHE
151 WNKHATCMST LKDKCYSSDA PQYQSLADWA HTVVMVFETV NTYKFLEAAG
201 ITPDSSKTYA KTDPLNALNS NFDGKQVHIS CKSGYISEVW YYFHLKGSVV
251 SGQYLPIDDI GSSSCPDQIK FPPKDGSGGT PPPTDPSDPP TGGSKGFINI
301 SGQSGCLISN GNWYTSGTCA TYTLGESQYG GVTLTSSKGP CDVVNGKFSC
351 ASGNAGQFT QDGSNIVYGG KSDWSAPSV PPSQQVGVSP GSAGGSVSFN
401 LVFAAK

```

Şekil 4.38 *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin fragmentleri ile protein veritabanındaki *Y. lipolytica* T2-benzeri ribonükleaz (RNaz) enziminin eşleşen bölgeleri. Eşleşen bölgeler koyu ve kırmızı renkle gösterilmiştir.

Çizelge 4.28 IWIPNR peptid fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> T-2 benzeri ribonükleaz	135-140	XP_502205.1	100	406
<i>Natrialba asiatica</i> beta-lactamase	186-191	WP_006110566.1	100	306
<i>Thiothrix nivea</i> FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	46-51	WP_002710542.1	100	376

Çizelge 4.29 FLEAAGITPDSSK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> T-2 benzeri ribonükleaz	195-207	XP_502205.1	100	406
<i>Aspergillus terreus</i> ribonuclease T2 precursor	177-188	XP_001214320.1	83	254
<i>Irpex lacteus</i> RNase Irp1=base non-specific acid ribonuclease	158-166	AAB35880.1	83	250

Çizelge 4.30 TDFLNALNSNFDGK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> T-2 benzeri ribonükleaz	212-225	XP_502205.1	100	406
<i>Cryptosporidium parvum</i> hypothetical protein	135-143	XP_625336.1	83	2757
<i>Microscilla marina</i> lipoprotein, putative	332-345	WP_002693888.1	71	412

Çizelge 4.31 GSTDSFWTHEWNK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> T-2 benzeri ribonükleaz	141-153	XP_502205.1	100	406
<i>Dionaera muscipula</i> S-like ribonuclease	103-116	BAH22709.1	79	225
<i>Drosera adelae</i> ribonuclease	106-119	BAE16663.1	79	227

Çizelge 4.32 DAVAAFTSPPLSSADHK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> T-2 benzeri ribonükleaz	26-42	XP_502205.1	100	406
<i>Solanum lycopersicum</i> F-box protein	141-153	XP_004247545.1	86	320
<i>Corallococcus coralloides</i> endonuclease/exonuclease	14-28	YP_005369367.1	67	224

Çizelge 4.33 SGYISEVWYYFHLK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> T-2 benzeri ribonükleaz	233-246	XP_502205.1	100	406
<i>Botryotinia fuckeliana</i> putative ribonuclease T-2 protein	272-284	EMR90781.1	77	34
<i>Marssonina brunnea</i> ribonuclease T2 family protein	351-363	EKD20156.1	69	406

Çizelge 4.34 DGSGGTTPPTDPSDPPTGGSK peptit fragmenti ile eşleşen proteinler ve protein eşleşme yüzdeleri.

Eşleşen protein	Eşleşen Sekans Bölgesi	Sorgulama Kodu	Eşleşme (%)	Sekans aminoasit sayısı
<i>Y. lipolytica</i> T-2 benzeri ribonükleaz	275-295	XP_502205.1	100	406
<i>Vibrio vulnificus</i> Spindolin	226-240	WP_017791435.1	87	401
<i>Aeromonas</i> sp chitinase	428-441	WP_019445124.1	86	487

5. TARTIŞMA

Mayalar çeşitli gıda ve içeceklerin üretiminde gerekli mikroorganizmalardır (Senses-Ergul et al. 2006). Çok geniş metabolik potansiyellerinden dolayı, mayalar, birçok gıda çeşidinin fermentasyonunda ve olgunlaşmasında önemli roller üstlenmekte ve gıdaların duysal gelişimine olumlu katkıda bulunmaktadır (Fleet, 1990; Jakobsen and Narvhus, 1996; van den Tempel and Jakobsen, 1998; Westall and Filtenborg, 1998; Cosentino et al., 2001; Fadda et al., 2004). Bununla birlikte, mayalar fermentasyon prosesi veya fermentasyon sonrasında bozunmalara da neden olabilirler. Son yıllarda gıda endüstrisinde mayaların neden olduğu bozunmalar ciddi bir problem oluşturmaktadır. Büyük hacimlerde üretim yapıldığında eğer ham madde önemli bir ekonomik değere sahipse, bozunma gıda endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bozunmayı engellemek için çeşitli stratejilerin dizayn edilmesi için, kontaminasyon kaynağını bilmek ve üründe bozulmaya neden olan mayalar arasındaki ilişkiyi saptamak oldukça önemlidir (Baleiras-Couto et al., 1994; Loureiro, 2000; Akpınar, 2008; Akpınar et al., 2011).

Mayalar, sıcaklık, su aktivitesi, pH, O₂, besin maddeleri ve inhibitörlerin varlığı gibi birçok çevresel faktörlerden etkilenen ve büyük çoğunluğu (%98) mezofil olarak dikkate alınan tek hücreli funguslardır (Yalçın, 2007). 50 yılı aşkın süredir mayalar, morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve üreme karakteristikleri göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır. Bu özelliklerine bağlı olarak mikroskopik, kültürel ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir (Loureiro and Querol, 1999; Hierro et al., 2004; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008). Bu testler arasında; hücre boyutu ve şekli, hif ya da pseudohif oluşturup oluşturulmaması, eşeysiz çoğalma tipi, DBB testi, sporların yapısı, yüzey özellikleri, sayısı ve şekli, besiyerindeki koloni morfolojisi, karbon kaynaklarının fermentasyonu, karbon ve azot kaynakları üzerinde büyüebilme, vitamin gereksinimi, çeşitli sıcaklıklar ile yüksek şeker ve tuz konsantrasyonlarında büyüebilme, üre hidrolizi ve antibiyotiklere dirençlilik gibi testler bulunmaktadır (Loureiro and Querol, 1999; Barnett et al., 1983, 2000; Cosentino et al., 2001; Kurtzman and Robnett, 2003; Vaughan-Martini, 2003; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008). Bir maya izolatını konvansiyonel yöntemlerle tanılamak için yukarıda bahsedilen 100'den fazla

testin gerçekleştirilmesi gerekmekte ve tanılama sonucuna en iyi ihtimalle bir ayda ulaşılabilir. Ayrıca, bir mikroorganizmanın kesin tanısında, konvansiyonel tanılamamanın tek başına yeterli olmadığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Deak and Beuchat, 1996; Prillinger et al., 1999; Arias et al., 2002; Hierro et al., 2004; Lopandic et al., 2006). Pek çok endüstriyel proseste, kullanılacak olan ya da kontaminasyona sebep olan mayaların hızlı ve doğru tanılanması arzu edilmektedir. Bu sebeple günümüzde, mikroorganizmaların tanısında hızlı ve güvenilir yöntemlere olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Moleküler biyolojideki son gelişmeler, mayaların tanılanması ve tiplendirilmesi için yeni tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır. Fenotipik özelliklerle kıyaslandığında, nükleik asit sekansında gözlenen genotip, büyüme esnasında çevresel etkilerle değişmediğinden dolayı daha stabildir. Bununla birlikte, DNA molekülleri çok yakın türler ve hatta aynı türe ait strainler arasında sekans rekombinasyonlarıyla ve mutasyonlarıyla farklılaşabilmektedir. Ayrıca, evölüsyonel süreç esnasında, genetik materyaldeki değişiklikler farklı bir taksonomik seviyedeki organizmanın ayırımını ve bu organizmaların filogenetik ilişkilerini kavramamızı sağlamaktadır (Deak, 2007; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008). Son yıllarda, moleküler teknikler, gerçekleştirilen araştırmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Ayrıca, mikrobiyolojinin bütün alanlarında ve özellikle de gıda mikrobiyolojisinde çok önemli yararlar sağlamaktadır. Bu nedenle organizmaların karakterizasyonu, tanısı ve sınıflandırılmasında moleküler tekniklerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır (Deak, 2007; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008; Kurtzman et al., 2011). Ancak, konvansiyonel tanı yöntemlerinde olduğu gibi, bir mikroorganizmanın kesin tanısında tek bir moleküler teknik kullanımının yanlış sonuçlara sebep olabileceğine dair çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Arias ve arkadaşları (2002) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, portakal suyu ile ilgili mayaların tanısında beş farklı identifikasyon yönteminin etkinliği incelenmiştir. Araştırmacılar, 7 maya tip türü ile birlikte toplamda 99 maya strainini, 26S rRNA geninin kısmi sekansı, ITS1-5,8SrDNA-ITS2 bölgesinin sekansı ve restriksiyon analizi, klasik yöntem, RapID maya identifikasyon sistemi ve API 20C identifikasyon kiti ile tanılamışlardır. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, 26S rRNA sekansı ile toplam 99 maya straininden 94'ü, ITS profilleri ile ise sadece 69 maya straini tür seviyesinde doğru bir şekilde tanımlanabilmiştir. Ayrıca, 26S rRNA sekansından sonra en

yüksek doğruluğun klasik yöntem ile elde edildiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar, doğru identifikasyon açısından en iyi sonucun 26S rRNA geni kısmi sekansı ile elde edildiğini ancak, mevcut veri tabanına yeni profillerin ilavesi ile birlikte ITS1-5,8SrDNA-ITS2 bölge sekansı kullanımının da, maya izolatlarının hızlı ve doğru identifikasyonu için en iyi araç olabileceğini belirtmişlerdir (Arias et al., 2002).

Yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı, sadece konvansiyonel karakteristiklere ya da moleküler biyolojik tekniklere dayanan maya identifikasyonu yanlış sonuçlara yönlendirdiğinden, son yıllarda mayaların doğru tanımlanmasında polifazik yaklaşım kullanılmaktadır. Polifazik yaklaşım, mayaların mikromorfolojik özellikleri, eşem uyumunun saptanması ve fizyolojik karakteristikleri gibi konvansiyonel tekniklerle birlikte PCR-parmakizi, rDNA sekans analizi, % G+C oranının saptanması ve DNA-DNA homoloji çalışmaları gibi moleküler biyolojik tekniklerin birlikte kullanılarak maya identifikasyonunun en doğru bir şekilde tanımlanmıştır (Sampaio et al., 2001). Polifazik yaklaşım maya tanılamasına girdiği günden beri özellikle de çevreden izole edilen mayaların tanımlanmasında sıklıkla kullanılmıştır (Sampaio et al., 2001; Arias et al., 2002; Villa-Carvajal et al., 2004).

Yukarıda belirtilen sebeplerle bu araştırmada, daha önceki çalışmalarda (Öztürk, 2000; Yalçın, 2007; Akpınar, 2008; Güngör, 2009) farklı kaynaklardan izole edilmiş, konvansiyonel yöntemlerle ve ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin sekans analizi ile tanımlanmış (*Y. lipolytica* TEM TAN 10 ve TEM TAN 46 strainleri ITS-PCR ile boyut yönünden tanımlanmış, bu bölgenin sekans analizi saptanmamıştır) olan 22 adet *Y. lipolytica* straini tek bir moleküler biyolojik yöntemle tanımlanamayacağından rDNA genlerine dayanan üç farklı moleküler biyolojik teknik uygulanmıştır. Moleküler biyolojik tanımlamanın ilk aşamasında, maya strainlerinden elde edilen DNA'ların ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesi PCR ile yeniden çoğaltılmış ve elde edilen PCR ürünleri daha önceki çalışmalardan farklı olarak üç farklı restriksiyon enzimi (*HaeIII*, *HinfI* ve *RsaI*) ile kesilerek RFLP analizleri gerçekleştirilmiştir. *HaeIII* ve *HinfI* restriksiyon enzimleri için elde edilen RFLP profilleri, daha önceden gerçekleştirilmiş çeşitli çalışmalardan (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Deak et al., 2000; Villa-Carvajal et al., 2004;

Andrade et al., 2006; Gardini et al., 2006; Senses-Ergul et al., 2006; Alvarez-Martin et al., 2007; Polomska et al., 2007; Akpınar et al., 2013; Yalçın et al., 2013) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmış ve literatür ile benzer sonuçların elde edildiği gözlenmiştir. ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin RFLP analizinin gerçekleştirildiği çalışmalardan birinde Deak ve arkadaşları (2000), ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgelerinin PCR-RFLP analizi ile ticari tavuk ve hindi ürünlerinden izole edilen maya türlerinin tanımlanmasını amaçlamışlardır. Araştırmacılar, *Y. lipolytica* olarak tanımlanan strainler için *HaeIII* ve *HinfI* restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunda sırasıyla “360” ve “180+180” baz çiftlik profilleri elde etmişlerdir. Bu profillere benzer şekilde çalışmamızda, *Y. lipolytica* straini olarak tanımlanan 22 maya straininden ve *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türünden sırasıyla “360” ve “180+180” baz çiftlik profiller elde edilmiştir. ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin bu iki restriksiyon enzimi ile RFLP analizine ilave olarak *RsaI* restriksiyon enzimi ile de üçüncü bir kesim profili saptanmıştır. *RsaI* restriksiyon enzimi için elde edilen RFLP profilleri, daha önceden gerçekleştirilmiş çeşitli çalışmalardan (Akpınar et al., 2013; Yalçın et al., 2013) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmış ve literatür ile benzer sonuçların elde edildiği gözlenmiştir. Yalçın ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin RFLP analizinde *HaeIII* ve *HinfI* restriksiyon enzimlerine ek olarak *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesim gerçekleştirilmiş ve *Y. lipolytica* strainleri için “220+140” baz çiftlik profiller elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bütün *Y. lipolytica* strainleri ve *Y. lipolytica* CBS 6124 tip türünün ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda “220+140” baz çiftlik profiller elde edilmiştir. Tüm bu sonuçların ışığında, ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin üç farklı restriksiyon enzimiyle kesim profilleri literatürdeki bilgilerle benzer sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte, Andrade ve arkadaşları (2006), ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin RFLP analizi ile birçok maya türünün, diğer türlerden ayırımında seçici olmadığı ancak *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* ve *Y. lipolytica* genus ve türlerinin diğer genus ve türlerden ayırımında başarılı sonuçlar alındığını bildirmişlerdir. *Y. lipolytica* türü, *Yarrowia* genusunun tek türüdür. Ancak son yıllarda fungal filogenideki gelişmelere bağlı olarak, birçok anaormof *Candida* türü *Yarrowia* genusuna eklenmeye başlamıştır (Kurtzman et al., 2011; Groenewald et al., 2013). Ancak, ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin RFLP analizi, *Y. lipolytica* strainlerinin

diğer genus ve türlerden ayrımını sağlamasına rağmen bütün mayalar için tanılamada yüksek çözünürlük sağlamadığı birçok kaynakta (Deak et al., 2000; Andrade et al., 2006) belirtilmiştir. Bu nedenle polifazik tanılama ile strainlerin identifikasyonlarını kesinleştirmek için bu çalışmada strainlerin 18S rDNA bölgesinin RFLP analizi ve 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaini sekans analizleri de gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, *Y. lipolytica* strainlerinin moleküler biyolojik karakterizasyonunun ikinci aşamasında ise 18S rRNA bölgelerinin PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürünleri, üç farklı restriksiyon enzimi (*Hae*III, *Rsa*I ve *Taq*I) ile kesilmiştir. *Hae*III, *Rsa*I ve *Taq*I restriksiyon enzimleri için elde edilen RFLP profilleri, daha önceden gerçekleştirilmiş çeşitli çalışmalardan (Capece et al., 2003; Andrade et al., 2006; Akpınar et al., 2013; Yalçın et al., 2013) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmış ve literatür ile benzer sonuçların elde edildiği gözlenmiştir. Andrade ve arkadaşları (2006), P108 ve M3976 primerleri kullanılarak 18S rDNA bölgesinin PCR-RFLP analizi ile et ürünlerinden izole edilen maya türlerinin tanılanmasını amaçlamışlar ve sonuç olarak, *Y. lipolytica* olarak tanılanan strainler için *Hae*III, *Rsa*I ve *Hinf*I restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunda sırasıyla “548+321+313+270+177”, “574+467+449+139” ve “1022+267+206” baz çiftlik profilleri elde etmişlerdir. Bu çalışmada, bu profillere benzer şekilde, *Y. lipolytica* straini olarak tanılanan 22 maya straininden aynı RFLP profilleri elde edilmiştir. Andrade ve arkadaşları (2006) ile Capece ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmalarda, 18S rDNA bölgesinin RFLP analizinin genel olarak mayaların sınıflandırılmasında çok ayırt edici olmadığı fakat *Y. lipolytica* mayasının diğer genus ve türlerden ayrımında olumlu sonuçlar verdiği bu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Moleküler karakterizasyonun son aşamasında çalışmamızda, 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaini PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürünleri, sekans analizine tabi tutulmuştur. Sekans analizinde yine aynı primer çifti kullanılmış ve analiz, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (BİYOMER) gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonucunda elde edilen ham

veriler önce temizlenmiş, daha sonra da NCBI GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak veri tabanında bulunan organizmalar ile eşleştirilmiştir. Eşleşme sonucunda, *Y. lipolytica* olarak tanılanmış TEM YL 3, TEM YL 5, TEM YL 9, TEM YL19, TEM YL 21 ve TEM ORC 3 numaralı maya strainleri, NCBI veri tabanında bulunan *Y. lipolytica* strainleri ile % 99, geri kalan maya strainleri ise % 100 oranında eşleşme göstermişlerdir. Eşleşme sonrasında maya strainlerinden elde edilen 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domain dizileri, veri tabanına kaydettirilmiş ve erişim numaraları (accession number JN112343-JN112364) alınmıştır. Ribozomun büyük alt biriminin D1/D2 domain sekansı ile ilgili yapılan çalışmalarda, bütün askomisetik funguslarda birkaç istisna haricinde aynı türün strainlerinde sadece % 0–1 arasında nükleotit farklılığı bulunduğu belirtilmiştir (Kurtzman et al., 1998; 2011). Dolayısıyla, 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domain sekansı, aynı türün strainleri arasında % 99–100 arasında olmalıdır. Birçok araştırmada, restriksiyon fragment uzunluk poliformizmi (RFLP), rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD) ve sekans analizini içeren moleküler karşılaştırmalara olan ilgi giderek artmakta ve sekans analizi yönteminin, diğer yöntemlere nazaran daha güçlü bir yöntem olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Kurtzman and Robnett, 1998; Fell et al., 2000; Deak et al., 2000; Lopandic et al., 2006; Knutsen et al., 2007). Örneğin, Kurtzman ve Robnett (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, *Candida* ve diğer anamorf genus üyelerinde olduğu yaklaşık 500 askomisetik mayanın 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domainindeki değişiklikler incelenmiştir. Araştırma sonucunda araştırmacılar, rDNA'ın büyük alt biriminin D1/D2 domainindeki nükleotit farkının, neredeyse tanılanmış bütün askomisetik mayalarda tek başına tanılamaya olanak sağlayabileceğini göstermişlerdir. Fell ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, basidiomisetik mayaların 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domainindeki değişiklikler incelenmiştir. Bu araştırma sonucunda, Kurtzman ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan çalışma sonuçlarına benzer olduğu ve neredeyse bütün basidiomisetik mayaların identifikasyonunun doğru bir şekilde yapılabildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekansı, maya taksonomisi için ana araç olarak yaygın bir şekilde kabul görmektedir ve günümüzde tanımlanan bütün maya türleri için mevcut veri tabanları bulunmaktadır. Son 15 yılda gerçekleştirilen yoğun çalışmalar

sonucunda, D1/D2 domaininin, mayaların hem türler arası hem de tür içi ayrımını sağlayacak yeterlilikte farklılıklara sahip olduğu görülmektedir (Kurtzman and Robnett, 1998; Fell et al., 2000). Ayrıca, günümüzde, mevcut veri tabanlarında 700'den fazla askomisetik ve basidiyomisetik mayanın D1/D2 sekansı bulunmaktadır ve bu sayı, yeni türlerin ilavesi ile sürekli bir şekilde artmaktadır. Daha önceki çalışmalarda konvansiyonel ve ITS-PCR sekanslama ile tanılanan *Y. lipolytica* olarak tanılanan maya strainlerinin, bu çalışma sonucunda 22 maya straininin *Y. lipolytica* olduğu kesinleştirilmiştir.

Y. lipolytica, *Dipodascacea* familyasında yer alan (Kurtzman and Fell, 1998) ve önceleri *Candida*, *Endomycopsis*, *Saccharomycopsis lipolytica* olarak bilinen bir askomisetik maya türüdür (Barth and Gaillardin, 1996). *Y. lipolytica* strainleri biyoteknolojik öneme sahiptir. (Knutsen et al., 2007). *Y. lipolytica* strainleri sıklıkla proteinik ya da alkan veya lipid gibi hidrofobik substratlardan izole edilmektedir. Ayrıca, Bu maya genel olarak peynir ve süt gibi süt ürünlerinden veya sucuklardan bir kontaminant olarak izole edilmektedir (Barth and Gaillardin, 1996; Fickers et al., 2005). *Y. lipolytica* alkalın ve asit proteaz, lipaz, ribonükleaz ve fosfotazları salgılama kapasitesine sahip olan dolayısıyla endüstriyel kullanım açısından önemli bir maya türüdür (Ogrydziak, 2003). Bu enzimlerin bazıları büyük miktarlarda salgılanmakta ve bu durum *Y. lipolytica*'yı rekombinant protein üretimi için iyi bir konukçu haline getirmektedir.

Yukarıda belirtilen nedenlerle, *Y. lipolytica* olarak tanılanan 22 strain, skim milk besiyerinde alkalın proteaz enzimi yönünden taranmış ve sadece altı *Y. lipolytica* straininin (TEM YL 3, TEM YL 5, TEM YL 6, TEM YL 9, TEM YL 10 ve TEM ORC 3) AEP enzim aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Bu altı maya straini arasından semikantitatif açıdan en fazla AEP üreten *Y. lipolytica* TEM YL 5 straini ile AEP enziminin üretim, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Farklı *Y. lipolytica* strainlerinde alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin üretimi 1970' li yıllarda başlamıştır (Mitsugi et al., 1971; Tobe et al., 1976; Ogrydziak et al., 1977; Ogrydziak and Mortimer, 1977). 1980' li yılların başlarında AEP enziminin saflaştırılması ile ilgili yayınlar bulunmaktadır (Simms and Ogrydziak, 1981; Ogrydziak and Scharf, 1982; Bae and Kang, 1987). 1980' li yılların sonuna doğru AEP enzimini kodlayan genler araştırılmış (Matoba et al.,

1988; Davidow et al., 1987) ve 1990' lı yıllardan itibaren AEP enziminin heterolog protein üretiminde konukçu olarak kullanılabilirliği araştırılmış (Madzak et al., 2004) ve günümüze kadar çalışmalar bu konu ile devam etmiştir. Ancak *Y. lipolytica* strainlerinden üretilen AEP enziminin endüstriyel uygulamaları hakkında bu kaynaklarda bilgi verilmemiştir. Daha önceki çalışmamızda, AEP enzim üretimi üzerine farklı karbon, azot kaynakları ve pH' ın etkisi araştırılmış ve AEP enziminin en iyi nötral pH' da, gliserol proteose pepton (GPP) besiyerinde üretildiği bulunmuştur (Akpınar et al., 2011).

Bu çalışmada, AEP enziminin optimum üretim koşulları önceki bir çalışmada belirlendiği için skim milk besiyerinde semikantitatif olarak en fazla AEP enzimi üreten *Y. lipolytica* TEM YL 5 straini ile büyük çapta AEP üretimine geçilmiş ve 100 mM fosfat tamponu ile tamponlanmış GPP besiyerinde (pH 6,8), 27°C' de inkübasyonun 48. saat sonunda en fazla miktarda AEP enzimi üretildiği saptanmıştır. İnkübasyondan sonra, hücre içermeyen kültür ortamı elde etmek için 4°C' de 8000 rpm' de 10 dakika santrifügasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve kültür filtratları sırasıyla 0,45 ve 0,22 µm'lik selüloz membran filtreler yardımıyla hücrelerden tamamen arındırılmıştır. Santrifügasyon ve membran filtrasyon işlemleri sonrasında *Y. lipolytica* TEM YL 5 straini için 1665 ml AEP süpernatantı (1,01 mg/ml protein ve 2,34 U/ml/dak proteaz aktivitesi) elde edilmiş ve ileri saflaştırma işlemlerinde kullanılmıştır.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden üretilen AEP enziminin laboratuvar koşullarında saflaştırılmasında öncelikle, elde edilen AEP süpernatantı 10 kDa' luk bir ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak % 92,79 verimle 12,8 kat konsantre edilmiştir (3,6 mg/ml protein ve 27,81 U/ml/dak proteaz aktivitesi). *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden üretilen AEP enziminin saflaştırılmasında LPLC sistemi kullanılarak sırasıyla iyon (anyon) değişim ve jel filtrasyon kromatografi yöntemleri kullanılmıştır. AEP ultrafiltratı, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisine uygulanmış; % 29,05 verimle ve 16,46 saflaştırma katsayısı ile saflaştırılmıştır. Daha sonra, ultrafiltrat, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisine uygulanmış; % 57,76 verimle ve 4,56 kat saflaştırılmıştır. Bu çalışmada, iki farklı kromatografi ile saflaştırılan AEP enziminin saflaştırma profilleri karşılaştırıldığında, iyon değişim kromatografisinden saflaştırılan AEP

enziminin jel filtrasyon kromatografisinden saflaştırılan AEP enzimine nazaran daha yüksek saflaştırma katsayısına sahip olduğu ve daha saf protein eldesinin gerçekleştiği bulunmuştur. Bununla birlikte, her iki kromatografinin saflaştırma verimi karşılaştırıldığında jel filtrasyon kromatografisinin daha yüksek olduğu yani iyon değişim kromatografisine kıyasla daha az protein kaybının gerçekleştiği saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar irdelenecek olursa, AEP enzimi, saflık derecesi önemli olmayan bir sanayide (deterjan ve deri endüstrisi) kullanılacaksa jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan AEP enziminin kaybı az olmasından dolayı tercih edilebilir. Aksi takdirde, AEP enzim saflığının çok önemli olduğu medikal ya da gıda gibi endüstrilerde kullanılacaksa iyon değişim kromatografisi yönteminden daha saf protein sağladığından dolayı tercih edilebilir.

AEP enziminin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile her iki kromatografiden alınan örnekler SDS-PAGE elektroforez sonrası Coomassie ve gümüş boyama yöntemleri ile boyanmış, sonuçta tek bant gözlenmiş ve protein molekülünün yaklaşık 30,50 kDa olduğu tespit edilmiştir. Matoba ve arkadaşları (1988) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, AEP enziminin moleküler ağırlığı 30524 Da olduğunu bulmuşlardır ve bizim çalışmamızdaki en yakın sonuç olduğu saptanmıştır. Ma ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, denizsel *Aureobasidium pullulans*-10 maya straininden alkalın proteaz enzimi, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE-Sepharose Fast Flow iyon değişim kromatografileri ile % 18,8 verimle ve 2,1 saflaştırma katsayısı ile saflaştırılmıştır. Bu çalışma, Ma ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, DEAE-Sepharose Fast Flow iyon değişim kromatografisinden elde edilen fraksiyonlara göre hem daha yüksek saflaştırma verimi hem de daha yüksek saflaştırma katsayısına sahip olduğu bulunmuştur.

Saflaştırılmış AEP enziminin SDS-PAGE sisteminde zimogram analizi de yapılmış ve tek bant halinde skim milk'in parçalandığı gözlemlendiğinden AEP enziminin dimer yapılı olmadığı ve tek bir polipeptitten meydana geldiği tespit edilmiştir. Yapılan literatür incelemesinde, *Y. lipolytica* türlerinden saflaştırılan AEP enzimi ile ilgili bir zimogram analizine rastlanmadığından bir karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak, Öztürk ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir

çalışmada *Bacillus licheniformis* BA17 bakteri straininden elde edilen alkalın serin proteaz enzimi ile yapılan bir çalışmada, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile % 58 verimle 5,4 saflaştırma katsayısı ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan alkalın serin proteaz enziminin zimogram analizi yapılmış ve tek bant halinde skim milk'in parçalandığı gözlenmiştir. Araştırmacıların çalışmalarında da zimogram analizi sonucunda alkali proteaz enziminin dimer yapılı olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 30°C olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan AEP enzimini 30°C' in altındaki ve üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Mitsugi ve arkadaşları (1971) ve Ogrydziak ve Scharf (1982) tarafından yapılan çalışmalarda farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan enzimlerin optimum sıcaklığı 40°C bulunmuştur. Bu araştırmada, saflaştırılan AEP enziminin önceki çalışmalara kıyasla optimum sıcaklığı daha düşük bulunmuştur. Ancak *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin 40°C' de aktivitesini % 90 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Ma ve arkadaşları (2007) tarafından *Aureobasidium pullulans* mayasından saflaştırılan alkalın proteaz enziminin optimum sıcaklığı 30°C; Öztürk ve arkadaşları (2009) tarafından *Bacillus licheniformis* bakterisinden saflaştırılan alkalın serin proteazın optimum sıcaklığının ise 60°C olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla bu araştırmadan saflaştırılmış AEP enziminin optimum sıcaklığı, bakterilerden izole edilmiş alkalın proteaz enzimlerinin optimum sıcaklığından daha düşük, ancak mayalardan izole edilen enzimlerle benzer özellikte olduğu bulunmuştur. Keza, *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin sıcaklık stabilitesinin ise farklı sıcaklıklarda 1 ve 2 saat inkübasyon sonucunda en fazla 30°C' de olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan AEP enziminin 40°C' in üzerindeki sıcaklıklarda termal stabilitesinin çok düşük olduğu bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan AEP enziminin termal inaktivasyonu ile ilgili bilgilere rastlanmamıştır. Ancak *Aureobasidium pullulans* mayasından saflaştırılan alkalın proteaz enziminin termal stabilitesinin 45°C' de azaldığı ve 50°C' de 30 dakikada tamamen inaktif olduğu bulunmuştur (Ma et al., 2007). *Bacillus licheniformis* bakterisinden izole edilen alkalın serin proteaz enziminin termal stabilitesinin 70°C' de 6 dakika korunduğu bulunmuştur (Öztürk

et al., 2009). Bu sonuçlar göze önüne alındığında çalışmamızdan saflaştırılan proteaz enziminin bakterilerden saflaştırılan alkalın proteaz enzimlerine kıyasla termal stabilitesinin daha düşük sıcaklıklarda korunurken mayalardan saflaştırılan enzimlerle benzer sonuçların olduğu tespit edilmiştir.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin optimum pH' sı 10,50 saptanmıştır. Saflaştırılan AEP enzimi pH 10,50' in altındaki ve üzerindeki pH' larda aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Mitsugi ve arkadaşları (1971) tarafından yapılan çalışmada *Y. lipolytica* straininden saflaştırılan AEP enziminin optimum pH' sı 9,0 olarak bulunmuştur. Ogrydziak ve Scharf (1982) tarafından yapılan çalışmada ise AEP enziminin optimum pH 9,0 – 10,0 arasında olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada saflaştırılan AEP enziminin, daha önceden *Y. lipolytica*' dan saflaştırılan AEP enzimlerine kıyasla optimum pH' sı yüksek bulunmuştur. Ma ve arkadaşları (2007) tarafından *Aureobasidium pullulans* mayasından saflaştırılan alkalın proteaz enziminin optimum pH 9,0 bulunmuştur. Öztürk ve arkadaşları (2009) tarafından *Bacillus licheniformis* bakterisinden saflaştırılan alkalın serin proteaz enziminin optimum pH' sı 10,0 bulunmuştur. Dolayısıyla bu çalışmadan saflaştırılmış AEP enziminin optimum pH' sı, bakteri ve mayalardan izole edilmiş alkalın proteaz enzimlerinin optimum pH özelliklerine yakın olduğu ve *Y. lipolytica*' dan saflaştırılan AEP enziminin alkali pH' da aktif olduğundan dolayı bir alkalın proteaz olduğu bulunmuştur. Keza, *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin pH stabilitesinin 1 ve 2 saat inkübasyon sonucunda pH 10,5' de en yüksek olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan AEP enziminin pH 7,0' in altında ve pH 11' in üzerindeki pH' larda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. İlgili literatürler tarandığında, farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan AEP enziminin pH stabilitesiyle ilgili bilgiler yok denecek kadar azdır. Ancak *Aureobasidium pullulans* mayasından saflaştırılan alkalın proteaz enziminin pH stabilitesinin pH 8,0 – 11,0 arasında olduğu bulunmuştur (Ma et al., 2007). *Bacillus licheniformis* bakterisinden izole edilen alkalın serin proteaz enziminin pH stabilitesinin pH 8,0 – 10,0 arasında 1 saatte korunduğu bulunmuştur (Öztürk et al., 2009). Bu sonuçlar göze önüne alındığında çalışmamızdan saflaştırılan proteaz enziminin hem bakterilerden hem de mayalardan saflaştırılan alkalın proteaz enzimlerine yakın pH stabilitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin aktivitesinden sorumlu amino asitlerinin belirlenmesi amacıyla PMSF, EDTA ve EGTA inhibitör maddeleri kullanılmıştır. Saflaştırılmış AEP enziminin 10 mM PMSF varlığında % 96 oranında; 10 mM EDTA varlığında % 16 oranında inhibe edildiği bulunmuştur. 10 mM EGTA varlığında ise % 87 oranında aktivitenin arttığı saptanmıştır. Saflaştırılmış AEP enziminin PMSF ile yüksek oranda inhibe edildiği için bir serin proteaz olduğu belirlenmiştir. Mitsugi ve arkadaşları (1971), *C. lipolytica*’ dan saflaştırılan AEP enziminin diizopropilflorofosfat (DFP) ile inhibe edildiğinden bir serin proteaz olduğunu bildirmişlerdir. Tobe ve arkadaşları (1976), Ogrydziak ve Scharf (1982) ise saflaştırdıkları AEP enziminin PMSF ile inaktif olduğu ve EDTA ile çok az oranda inhibe edildiği ve dithiothreitol, N-maleimid ile inhibe edilmediği bulunmuş ve bu özelliği nedeniyle AEP enziminin bir serin proteaz olduğu ve aktif bölgesinde ise metal iyonlarının rol aldığını belirtmişlerdir. *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin literatürdeki diğer AEP enzimleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin substrat spesifitesini belirlemek için 5 mM olacak şekilde hazırlanmış N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sentetik substratları kullanılmıştır. Saflaştırılmış AEP enziminin N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA sentetik substratını hidrolizleyemediği ve iyi bir kimotripsine spesifik substrat olan N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sentetik peptidini hidrolizlediği saptanmıştır. Kaynaklar tarandığında, farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan AEP enziminin sentetik substrat seçiciliği ile ilgili bilgilere rastlanmamıştır. Bununla birlikte, bakterilerle ilgili yapılan bazı çalışmalarda çeşitli sentetik proteaz substratlarına olan özgülük araştırılmıştır. Öztürk ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada, en iyi N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sentetik peptidine yüksek, N- α -Benzol-Leu-Arg-pNA ve N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA sentetik peptidlerini düşük hidrolizlerken, L-Leu-pNA peptidini hidrolizleyemediğini bulunmuştur. Bu araştırmada, saflaştırılan AEP enzimi, *Bacillus licheniformis* bakterisinden saflaştırılan alkalın serin proteaz enzimiyle benzer sentetik substratı hidrolizlemiştir. Dolayısıyla *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin serin tip proteazların ailesine mensup kimotripsin benzeri aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin doğal protein substratlarına karşı özęünüęünü belirlemek için % 0,6' lık kazein, süt tozu, jelatin, kollajen ve sığır serum albümin substratları kullanılmıştır. Saflaştırılmış AEP enziminin, en iyi kazeini parçaladığı ve kazeini takiben süt tozu, jelatin, kollajen ve sığır serum albüminini hidrolizlediği bulunmuştur. Farkında olunduğu kadarıyla, farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan AEP enziminin doğal protein substrat seğiciliği ile ilgili bir kaynağa rastlanmamıştır. Ancak, bakterilerle ilgili yapılan bazı çalışmalarda çeşitli doğal protein substratlarına olan özęünüę araştırılmıştır. Öztürk ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada, alkalın proteaz enziminin en fazla süt tozu ve kazeinde faaliyet gösterdiği bulunmuştur. Dolayısıyla *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzimi, bakterilerden saflaştırılan alkalın proteaz enziminin doğal substratlara olan özęünüęünün benzer olduğu bulunmuştur.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine etki eden metal iyonlarını saptamak için Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Mg^{+2} gibi 2 değerlikli metal iyonları ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} gibi tek değerlikli iyonlar kullanılmıştır. Saflaştırılmış AEP enzim aktivitesinin Mn^{+2} , Cu^{+2} , NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} ile arttığı, Ca^{+2} ile değişmediği ve Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Mg^{+2} ile azaldığı bulunmuştur. Tobe ve arkadaşları (1976), saflaştırdıkları AEP enziminin Ca^{+2} iyonu ile stabilize olduğunu saptamışlardır. Ma ve arkadaşları (2007), *Aureobasidium pullulans* mayasından saflaştırılan alkalın proteaz enziminin Mn^{+2} , Cu^{+2} gibi divalent katyonlar ile aktive olduğu belirtmişler ve *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin metal iyonları ile etkileşimi benzer sonuçlar gösterdiği saptanmıştır.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddeler ve hidrojen peroksitin etkilerini belirlemek için SDS, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Triton X-100 ve H_2O_2 kullanılmıştır. Saflaştırılmış AEP enziminin % 1 SDS varlığında aktivitesinin yarısını kaybettiği; hidrojen peroksit ile yüksek oranda aktivitesini kaybettiği ve diğer yüzey aktif maddeler ile aktivitesini yüksek oranda koruduğu bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan AEP enzimi aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin etkisi ile ilgili literatüre

rastlanmamıştır. Ancak, *Bacillus licheniformis* bakterisinden izole edilen alkalın serin proteaz enzim aktivitesi üzerine SDS, Tween 20 ve Triton X-100 araştırılmış ve % 5 SDS varlığında aktivitesi % 30 azalmış; Triton X-100 ile aktivitesinin değişmediği; Tween 20 ile % 23,5 oranında arttığı bulmuşlardır (Öztürk et al., 2009). Öztürk ve arkadaşları SDS, Tween 20 ve Triton X-100 maddelerine karşı olan etkileri sebebiyle ticari deterjanlara potansiyel bir aday olabileceğini söylemişlerdir. *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin, birçok yüzey aktif maddeye karşı kararlı olmasına rağmen, % 1 SDS varlığında aktivitesinin yarısını kaybetmesi dolayısıyla ticari deterjanlarda kullanılması için bu haliyle uygun olmadığı ancak daha detaylı çalışmalar ile uygun hale getirilebileceği düşünülmektedir.

Y. lipolytica TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin kütle spektrometresiyle tanınması Almanya’ da bulunan Proteome Factory AG şirketinden hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda, peptitler Mascot search engine (Matrix Science, Londra, İngiltere) ve NCBI’ n protein veritabanı (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, A.B.D.) kullanılarak tanınmıştır. Veritabanında yapılan araştırmalar sonucunda, peptitler *Yarrowia lipolytica* alkalın ekstrasellüler proteaz (AEP) enzimi ile eşleşmiştir. *Y. lipolytica* AEP enzimi ile AIQTTPVTQWGLSR (158-171), KAQTGNYAYVR (176-186), GVLNFSGGGPK (289-299), SASQDALWSR (300-309), AQTGNYAYVR (117-186), GSPNAVAYNGVGI (442-454), HPTVSYVVDGIR (192-204), SAALSVINQGFTWALNDYISK (262-282), AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK (214-242) peptitleri % 100 oranında eşleşmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada saflaştırılan AEP enziminin, *Y. lipolytica* alkalın ekstrasellüler proteazı olduğu LC-MS/MS peptid identifikasyonu ile tanınmıştır. Bununla birlikte, Davidow ve arkadaşları (1987) tarafından yapılan bir çalışmada, AEP enziminin sinyal peptit, propeptit ve olgun enzimin tüm sekansı saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, AEP enziminin serin proteazların subtilizin ailesine ait olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek benzerlikler *Aspergillus oryzae* alkalın proteazı ile % 43, *Tritirachium album* Proteinaz K’ sı ile % 38 oranında homoloji gösterdiği ve *Y. lipolytica* AEP enzimi ile *S. cerevisiae* proteinaz B ve Kex2 proteazlarının aktif bölgesinde bulunan serin₃₉₇, histidin₂₃₄ ve aspartat₂₀₀ amino asitlerinin yer aldığı saptanmıştır (Davidow et al.,

1987). Dujon ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışma sonucunda, veritabanında kayıtlı olan 454 amino asitten oluşan AEP pro-peptidinin ilk 22 amino asidinin sinyal peptit, 23-157 amino asitlerin ise pro-peptit sekansı ve 158-454 amino asitlerin ise olgun AEP sekansı olduğunu belirtmişler dolayısıyla % 43 ve % 38 homoloji oranı, sinyal peptit ile pro-peptidin çıkarılması ile daha da artacaktır.

Bu çalışmada, *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden üretilen, saflaştırılan ve karakterize edilen alkalın ekstrasellüler proteaz enziminin, filamentli funguslarla kıyaslandığında daha kısa sürede üretilmesinden dolayı avantajlı olduğu ve bakterilerle rekabet edebilecek durumda olduğu; enzimin geniş bir alkali pH' da aktivite göstermesi nedeniyle yine bakterilerden elde edilen ticari alkalın serin proteazlarla rekabet edebileceği, endüstriye bağlı substrat seçiciliğinin geniş olmasından ve kimotripsin tipte serin proteaz olarak aktivite göstermesi ve mezofilik sıcaklıklarda aktivite göstermesinden dolayı son yıllarda popüler hale gelen enerji tasarrufu açısından avantajlı olduğu ve bu sebeple SDS oranı düşük deterjanlarda, deri ve gıda endüstrileri için potansiyel vaad ettiğini düşünülmektedir. Ayrıca, bu çalışmada gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları sonucunda *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enzimi, ticari olarak *Tritirachium album* küfünden elde edilen Proteinaz K enziminin kullanıldığı alanlarda kullanılabileceğini göstermiştir. Çünkü Proteinaz K enziminin karakteristikleri ile *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin karakteristikleri birbirine benzemektedir: moleküler ağırlığı 28,9 kDa; optimum pH 9,0 ve pH 7,5-12,0 arasında aktivite gösteren; optimum sıcaklığı 37 °C olup 20-60 °C arasında aktif olan; Triton X-100 ile muamele edildiğinde aktif iken, % 0,5 SDS varlığında aktivitesinde azalan; PMSF ile tamamen inhibe olurken, EDTA ile kısmen inhibe olmaktadır. Dolayısıyla, bu özelliğiyle *Y. lipolytica* TEM YL 5 straininden saflaştırılan AEP enziminin ticari olan Proteinaz K enziminin bir alternatifi olabileceği düşünülmektedir.

Tanısı yapılmış 22 adet *Y. lipolytica* strainleri arasından, RNA agar besiyerinde ekstrasellüler RNaz enzimi yönünden taranmış ve bütün strainlerinin RNaz enzim aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. RNaz üreticisi bütün strainler arasından semikantitatif açıdan en fazla RNaz üreten *Y. lipolytica* TEM YL 21

straini ile RNaz enziminin üretim, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Cheng ve Ogrydziak (1986) tarafından yapılan çalışmada, RNA agar besiyeri *Y. lipolytica* CX161-1B straini tarafından üretilen RNaz enziminin taranmasında kullanılmış ve Toluidine blue O damlatılmasından sonra maya kolonilerinin etrafında pembe zonların oluştuğu ve RNaz enzim aktivitesinin gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Y. lipolytica' dan RNA enzimi ile ilgili kaynaklar literatürde sınırlıdır. Cheng ve Ogrydziak (1986), YM besiyerinde büyütülen *Y. lipolytica* CX161-1B straini hem GPP (pH 6,8) hem de GPP-sitrat (pH 5,0) besiyerlerinde RNaz enzimi üretmişler ve GPP besiyerinden ziyade GPP-sitrat besiyerinin daha iyi bir RNaz enzim üretim besiyeri olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda, bu araştırmacılar RNaz enziminin maya büyümesinin eksponansiyel safhasında üretildiğini de saptamışlardır. RNaz enzim üretimi üzerine farklı karbon, azot kaynakları ve pH' ın etkisi araştırılmış ve RNaz enzimi en iyi pH 5,0' da, gliserol proteose pepton-sitrat (GPP-sitrat) besiyerinde üretildiğini bulunmuştur (Akpınar et al., 2011).

Bu çalışmada, RNaz enziminin optimum üretim koşulları önceki çalışmamızda belirlendiğinden, RNA agar besiyerinde semikantitatif olarak en fazla RNaz enzimi üreten *Y. lipolytica* TEM YL 21 straini ile büyük çapta RNaz üretimine geçilmiş ve 100 mM sitrat tamponu ile tamponlanmış GPP-sitrat besiyerinde (pH 5,0), 27°C' de inkübasyonun 48. saat sonunda en fazla miktarda RNaz enzimi üretildiği saptanmıştır. İnkübasyondan sonra, hücre içermeyen kültür ortamı elde etmek için 4°C' de 8000 rpm' de 10 dakika santrifügasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve kültür filtratları sırasıyla 0,45 ve 0,22 µm'lik selüloz membran filtreler yardımıyla hücrelerden tamamen arındırılmıştır. Santrifügasyon ve membran filtrasyon işlemleri sonrasında *Y. lipolytica* TEM YL 21 straini için 1600 ml RNaz süpernatantı (3,67 mg/ml protein ve 2,34 U/ml/dak ribonükleaz aktivitesi) elde edilmiştir.

Bu çalışmada, *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden üretilen RNaz enziminin laboratuvar koşullarında saflaştırılmasında ilk aşamada, elde edilen RNaz süpernatantı 10 kDa' luk bir ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak % 95,08 verimle 8 kat konsantre edilmiştir (11,43 mg/ml protein ve 17,8 U/ml/dak

ribonülez aktivitesi). RNaz enziminin saflaştırılmasında, LPLC sistemi kullanılarak sırasıyla iyon (anyon) değişim ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılmıştır. *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden üretilen RNaz enziminin saflaştırılmasında LPLC sistemi kullanılarak sırasıyla iyon (anyon) değişim ve jel filtrasyon kromatografi yöntemleri kullanılmıştır. RNaz ultrafiltratı, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisine uygulanmış; % 37,90 verimle ve 62,58 saflaştırma katsayısı ile saflaştırılmıştır. Daha sonra, ultrafiltrat, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisine uygulanmış; % 66,10 verimle ve 27,23 kat saflaştırılmıştır. Bu çalışmada, iki farklı kromatografi ile saflaştırılan RNaz enziminin saflaştırma profilleri karşılaştırıldığında, iyon değişim kromatografisinden saflaştırılan RNaz enziminin jel filtrasyon kromatografisinden saflaştırılan RNaz enzime nazaran daha yüksek saflaştırma katsayısına sahip olduğu ve daha saf protein eldesinin gerçekleştiği bulunmuştur. Ribonükleaz enzimi daha çok moleküler biyoloji ve medikal amaçlarla kullanıldığı için endüstride saflık derecesi yüksek olması gereken enzimlerdendir. Dolayısıyla iyon değişim kromatografi yöntemi jel filtrasyon kromatografi yöntemine kıyasla daha saf protein sağladığından dolayı bu endüstrilerde tercih edilebilir.

RNaz enziminin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile her iki kromatografiden alınan örnekler SDS-PAGE elektroforez sonrası Coomassie ve gümüş boyama ile tek bant gözlenmiş ve protein molekülünün yaklaşık 40,97 kDa olduğu tespit edilmiştir. Literatürde *Y. lipolytica* mayasında RNaz enziminin saflaştırılmasına ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Cheng ve Ogrydziak (1986) tarafından yapılan bir çalışmada, *Y. lipolytica* CX161-1B straininden RNaz enzimini DEAE-Sepacel iyon değişim, UMP-agaroz afinite kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografileri ile % 22 verimle 136 saflaştırma katsayısı ile saflaştırmışlar ve RNaz enziminin molekül ağırlığını 43 kDa olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızla kıyaslandığında, RNaz enziminin ultrafiltratı bir afinite kromatografisi uygulandığından bu çalışmada elde edilen saflaştırma kat sayısı çok daha düşüktür. Lalioti ve arkadaşları (1997), *S. cerevisiae* mayasından ribonükleaz enzimini DEAE-Sepharose, Heparin-Sepharose ve CM-Sepharose kromatografileri ile % 15 verimle ve 9,4 saflaştırma katsayısı ile saflaştırmışlar ve saflaştırılan RNaz enziminin molekül ağırlığını 29 kDa olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamız, Lalioti ve arkadaşları (1997) tarafından

yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada ekstrasellüler RNaz enzimi daha yüksek verim ve saflaştırma katsayısı ile saflaştırılmıştır. Gundampati ve arkadaşları (2011), *Aspergillus niger* ATCC 26550 küf straininden saflaştırılan RNaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesini takiben DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile %71 verim ve 24,2 saflaştırma katsayısı ile saflaştırmışlardır. Çalışmamız, Gundampati ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, RNaz enzimi daha yüksek saflaştırma katsayısı ile saflaştırılırken daha düşük verime sahip olduğu bulunmuştur.

Y. lipolytica TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 30°C olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan AEP enzimi 30°C' in altındaki ve üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Cheng ve Ogrydziak (1986) tarafından yapılan çalışmalarda *Y. lipolytica* CX161-1B straininden saflaştırılan RNaz enziminin optimum sıcaklığı 30°C bulunmuş ve bizim çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Gundampati ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Aspergillus niger* ATCC 26550 küf straininden saflaştırılan RNaz enziminin optimum sıcaklığı 55°C bulunmuştur. Dolayısıyla çalışmamızdan saflaştırılmış RNaz enziminin optimum sıcaklığı, küflerden izole edilmiş RNaz enzimlerinin optimum sıcaklığından daha düşük, fakat mayalardan izole edilen enzimlerle benzerlik gösterdiği bulunmuştur. RNaz enzimi daha çok gıda, moleküler biyoloji ve medikal amaçlarla kullanıldığından bu çalışmadan elde edilen saflaştırılan RNaz enzimi daha uygun görünmektedir. Keza, *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin sıcaklık stabilitesinin ise farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübasyon sonucunda en fazla 30°C' de olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan RNaz enziminin 50°C' in üzerindeki sıcaklıklarda termal stabilitesinin çok düşük olduğu bulunmuştur. Cheng ve Ogrydziak (1986), *Y. lipolytica* CX161-1B straininden saflaştırılan RNaz enziminin termal stabilitesinin 30-40°C arasında olduğu saptanmış ve bizim çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Gundampati ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Aspergillus niger* ATCC 26550 küf straininden saflaştırılan RNaz enziminin termal stabilitesi 65°C bulunmuştur. Dolayısıyla çalışmamızdan saflaştırılmış RNaz enziminin termal stabilitesi, küflerden izole edilmiş RNaz enzimlerinin termal stabilitesi daha düşük, fakat mayalardan izole edilen enzimlerle benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Y. lipolytica TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH 5,0 bulunmuştur. Saflaştırılan RNaz enzimi pH 2,5' in altında ve pH 7,5'in üzerindeki pH'larda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Cheng ve Ogrydziak (1986) tarafından yapılan çalışmada, *Y. lipolytica* CX161-1B straininden saflaştırılan RNaz enziminin optimum pH 6,5-7,0 arasında olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda saflaştırılan RNaz enzimi, daha önceden *Y. lipolytica*' dan saflaştırılan RNaz enzime kıyasla optimum pH' sı daha düşük bulunmuştur. Laloti ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan çalışmada, *S. cerevisiae* mayasından saflaştırılan ribonükleaz enziminin optimum pH 5,5 saptanmış ve bizim çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Gundampati ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Aspergillus niger* ATCC 26550 küf straininden saflaştırılan RNaz enziminin optimum pH 3,5 bulunmuş ve bizim çalışmamızdaki sonuçtan daha düşük optimum pH saptanmıştır. Keza, *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin pH stabilitesinin ise farklı pH' larda 1 saat inkübasyon sonucunda pH 5,0' da en yüksek olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan RNaz enzimi pH 3,5' in altında ve pH 6,5' in üzerindeki pH' larda enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Daha önceki çalışmalarda farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan RNaz enziminin pH stabilitesiyle ilgili bilgilere rastlanmamıştır. Ancak Gundampati ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Aspergillus niger* ATCC 26550 küf straininden saflaştırılan RNaz enziminin pH stabilitesinin pH 3,0-6,0 arasında korunduğu bulunmuş ve bizim çalışmamızdaki sonuçlara yakın bir pH stabilitesi saptanmıştır.

Y. lipolytica TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enzim aktivitesi üzerine etkileyen metal iyonlarını saptamak için Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} ve Cd^{+2} gibi 2 değerlikli metal iyonları ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Na^{+1} gibi tek değerlikli iyonlar kullanılmıştır. Saflaştırılmış RNaz enzim aktivitesi Mg^{+2} , Ca^{+2} , Na^{+1} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ile arttığı ve NH_4^{+1} , K^{+1} , Zn^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} ve Fe^{+2} ile azaldığı bulunmuştur. Farkında olduğu kadarıyla, farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan RNaz enzimi aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi ile ilgili çalışmalar bulunamamıştır. Wang ve Ng (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, *Pleurotus tuber-regium* şapkalı mantarından saflaştırılan RNaz enzimi Zn^{+2} ve Cd^{+2} divalent katyonlarla inaktif olduğu ve Na^{+1} monovalet katyonla

aktive olduğu saptanmış ve bu çalışmadaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Gundampati ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Aspergillus niger* ATCC 26550 küf straininden saflaştırılan RNaz enzim aktivitesi Mg^{+2} , Ca^{+2} , Na^{+1} ile arttığı ve Ba^{+2} , Co^{+2} ve Fe^{+2} iyonları ile azaldığı ve genel olarak bu çalışmadaki sonuçlarla benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Y. lipolytica TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin aktivitesi üzerine inhibitör maddelerin etkisinin belirlenmesi amacıyla sitrik asit, EDTA, okzalik asit, sülfanilik asit, sodyum azid ve askorbik asit inhibitör maddeleri kullanılmıştır. Saflaştırılmış RNaz enziminin okzailik asit ve sülfanilik asit ile aktivitesinin arttığı, sitrik asit, EDTA, sodyum azid ve askorbik asit ile aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Daha önceki çalışmalarda farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan RNaz enzimi aktivitesi üzerine inhibitör maddelerin etkisi ile ilgili bilgilere rastlanmamıştır. Gundampati ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Aspergillus niger* ATCC 26550 küf straininden saflaştırılan RNaz enzimi üzerine sitrik asit, EDTA, sodyum azid ve askorbik asit inhibe edici özellik gösterdiği saptanmış ve bizim çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Y. lipolytica TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin substrat spesifitesini belirlemek için Poly(A), Poly(C), Poly(G), Poly(U) polihomoribonükleotitleri ve RNA molekülü substrat olarak kullanılmıştır. Saflaştırılmış RNaz enzimi Poly(A) polihomoribonükleotidine karşı en fazla aktivite gösterirken, Poly(A)' yı sırasıyla Poly(C), Poly(G), Poly(U) homoribonükleotitleri ve RNA molekülü izlemiştir. Daha önceki çalışmalarda farklı *Y. lipolytica* strainlerinden saflaştırılan RNaz enziminin polihomoribonükleotitlere karşı olan özgünlüğü ile ilgili bilgilere rastlanmamıştır. Bununla birlikte, funguslarla ilgili yapılan bazı çalışmalarda polihomoribonükleotitlere olan özgünlüğü araştırılmıştır. Wang ve Ng (2001) tarafından yapılan çalışmada, *Pleurotus tuber-regium* şapkalı mantarından saflaştırılan RNaz enzimi en fazla Poly(G) polihomoribonükleotidini parçaladığı, Poly(U), Poly(A) ve Poly(C) polihomoribonükleotitlerini zayıf hidrolizlediğini bulmuşlardır. Ye ve Ng (2002) tarafından yapılan çalışmada, *Pleurotus pulmonarius* şapkalı mantarından saflaştırılan RNaz enzimi en fazla Poly(C),

sonrasında Poly(A) ve Poly(G) polihomoribonükleotidini parçaladığı, Poly(U) polihomoribonükleotidine karşı aktivitesinin olmadığını tespit etmişlerdir. Wang ve Ng (2003) tarafından yapılan çalışmada, *Termitomyces globulus* şapkalı mantarından saflaştırılan RNaz enzimi en fazla Poly(A) ve Poly(C), sonrasında Poly(G) ve Poly(U) polihomoribonükleotidine karşı aktivitesinin olduğunu saptamışlardır. Wang ve Ng (2004) tarafından yapılan çalışmada, *Thelephora ganbajun* şapkalı mantarından saflaştırılan RNaz enzimi en fazla Poly(U) sonrasında Poly(A) ve Poly(C) polihomoribonükleotidine karşı aktivitesinin olduğunu ve Poly(G) polihomoribonükleotidine karşı aktivitesinin olmadığını bulunmuştur. Guan ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada, *Hypsizygus marmoreus* şapkalı mantarından saflaştırılan RNaz enzimi en fazla sırasıyla Poly(C), Poly(A), Poly(U) ve Poly(G) polihomoribonükleotidine karşı aktivitesinin olduğunu belirtilmiştir. Gundampati ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Aspergillus niger* küfünden saflaştırılan RNaz enzimi en fazla Poly(A)' yı hidrolizlediği ve bunu sırasıyla Poly(C), Poly(G), Poly(U) homoribonükleotitleri ve RNA molekülüne karşı aktivitesinin olduğunu saptanmış ve bizim çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak, *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin asidik karakteri ile birlikte poly(A) ribonükleotidini en fazla hidrolizleme kapasitesinde olmasından dolayı ribonükleazlarının T2 ailesine mensup olduğu saptanmıştır.

Y. lipolytica TEM YL 21 straininden saflaştırılan RNaz enziminin kütle spektrometresiyle tanınması Almanya' da bulunan Proteome Factory AG şirketinden hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda, peptitler Mascot search engine (Matrix Science, Londra, İngiltere) ve NCBI'nin protein veritabanı (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, A.B.D.) kullanılarak tanınmıştır. Veritabanında yapılan araştırmalar sonucunda, peptitler *Yarrowia lipolytica* T-2 benzeri ribonükleaz (RNaz) enzimi ile eşleşmiştir. *Y. lipolytica* RNaz enzimi ile IWIPNR (135-140), FLEAAGITPDSSK (195-207), TDFLNALNSNFDGK (212-225), GSTDSFWTHEWVK (141-153), DAVAAFTSPPLSSADHK (26-42), SGYISEVWYYFHLK (233-246), DGSGGTPPPTDPSDPPTGGSK (275-295) peptitleri % 100 oranında eşleşmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda kullanılan RNaz enzimi, *Y. lipolytica* ekstrasellüler ribonükleazı olduğu LC-MS/MS analizi ile tanınmıştır. Dujon ve arkadaşları

(2004), *Y. lipolytica* mayasının bütün amino asit dizisini veritabanına kaydetmişler ve bu enzimin yüksek miktardaki salgılanmasının AEP enzimine benzemesinden dolayı heterolog pretein üretiminde RNaz enziminin promotorunun kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Ribonükleazlar (RNaz), anti-mitojenik, immun-baskılayıcı, antibakteriyal, antifungal, tümör baskılayıcı, HIV-1 ters transkriptaz inhibitör aktivitelerinden dolayı son yıllarda moleküler biyoloji, gıda ve farmasötik endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar (Guan et al., 2007; Gundampati et al., 2011). *Yarrowia lipolytica* ekstrasellüler ribonükleaz (RNaz) enziminin üretimi, saflaştırılması ile ilgili literatürde sınırlı yayın bulunmuş ve karakterizasyonu ile ilgili literatürde araştırıldığı kadarıyla yayın bulunamamıştır. Bu çalışma ile saflaştırılan RNaz enziminin karakterizasyon çalışmaları ilk kez yapılmıştır. Bu çalışmada, *Y. lipolytica* TEM YL 21 straininden üretilen, saflaştırılan ve karakterize edilen ekstrasellüler ribonükleaz enziminin, filamentli fungus ve şapkalı mantarlarla kıyaslandığında daha kısa sürede üretildiğinden avantajlı olduğu ve bakterilerle rekabet edebilecek durumda olduğu; enzimin geniş bir asidik pH' da aktivite göstermesi nedeniyle yine ticari ribonükeazlarla rekabet edebileceği, bütün polihomoribonükleotitleri hidrolizleme kapasitesine sahip olduğundan ve mezofilik sıcaklıklarda aktivite göstermesinden dolayı moleküler biyoloji, gıda özellikle tümör hücrelerinin inaktivasyon çalışmalarında denenerek bu alanlara potansiyel bir yenilik sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abidi, F., Chobert, J-M., Haertlé, T., Marzouki, M.N.,** 2011, Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochemistry*, 46: 2301–2310.
- Acheamong, E.A.A.,** 2000, Some aspects of the taxonom, genetics, carotenogenesis and chemical composition of a red yeast *Rhodotorula rubra*, TPI, MSc Thesis, Memorial Universty of Newfoundland, 175p.
- Aehle, W.,** 2007, Enzymes in Industry Production and Applications, Edited by Wolfgang Aehle, Third Completely Revised Edition, 490 p.
- Akpınar O., Ucar F., Yalcın HT.,** 2011, Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of *Yarrowia lipolytica* strains isolated and identified from different cheeses in Turkey. *Annals of Microbiology*, 61: 907–915.
- Akpınar, O. and Uçar, F.B.,** 2013. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* strains isolated from different environments and lipase profiling, *Turkish Journal of Biology*, 37: 249-258.
- Akpınar, O.,** 2008, Süt ve Süt Ürünlerinden *Yarrowia lipolytica* İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Ürettikleri Alkalın Proteaz ve Ribonükleaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Araştırılması, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 263s.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwesh, M.,** 1996, Introductory Mycology, 4nd Ed., John Wiley and Sans, New York, 867p.
- Alvarez-Martin, P., Florez, A.B., Lopez-Diaz, T.M., Mayo, B.,** 2007, Phenotypic and molecular identification of yeast species associated Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*, 17: 961-967.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Andrade, M.J., Rodriguez, M., Sanchez, B., Aranda, E., and Cordoba, J.J.,** 2006, DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products, *International Journal of Food Microbiology*, 107: 48-58.
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., Lombardi, A.,** 2000, Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products, *Letter in Applied Microbiology*, 30: 5-9.
- Arias, C.R., Burns, J.K., Friedrich, L.M., Goodrich, R.M., Parish, M.E.,** 2002, Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Different Identification Methods, *Applied and Environmental Microbiology*, 1955-1961.
- Arvik, T., Henick-Kling, T., and Gafner, J.,** 2005, Automated genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* using the RiboPrinter®. *International Journal of Food Microbiology*, 104:35-41.
- Atlas, R.M.,** 2004, Handbook of Microbiological Media, 3th Ed., CRC Press, Boca Raton, 2051p.
- Ausubel, F. M., Brent, R., and Kingston, R. E.,** 1997, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 3rd ed., New York, 732p.
- Bae, I. H. and Kang, K. H.,** 1987, Studies on extracellular protease of *Saccharomycopsis lipolytica* (*Candida lipolytica*): purification and properties of enzyme, *Korean Journal of Application Microbiology and Bioengineering*, 15: 286-297.
- Baleiras Couto, M. M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J. H. J., and van der Vossen, J. M. B. M.,** 1996b, Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:41-46.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Baleiras Couto, M. M., Hartog, B. J., Huis in't Veld, J. H. J., Hofstra, H., and van derVossen, J. M. B. M.,** 1996a, Identification of spoilage yeasts in a food production chain by microsatellite PCR fingerprinting. *Food Microbiology*, 13:59–67.
- Bankar, A.V., Kumar, A.R., and Zinjarde, S.S.** 2009, Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84:847–865.
- Barnett, J.A.,** 2004, A history of research on yeasts taxonomy. *Yeast*, 21: 1141–1193.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D.,** 2000, Yeasts: Characteristics and Identification, 3th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1139p.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow,D.,** 1983, Yeasts: Characteristics and Identification, 1th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 811p.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow,D.,** 1990, Yeasts: Characteristics and Identification, 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1012p.
- Barth G., and Gaillardin C.,** 1997, Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19:219-237.
- Beintema J. J. and Zhao W.,** 2003, Ribonucleases (Chapter of 77), Handbook of food enzymology Edited by John R. Whitaker; Voragen; Wong, 459 pages.
- Beintema, J.J., Breukelman, H.J., Carsana, A., and Furia, A.,** 1997, Evolution of Vertebrate Ribonucleases: Ribonuclease A Superfamily (Chapter 8), Ribonucleases: Structures and Functions Edited by D'Alessio, G., and Riordan, J.F., Academic Press, New York pp. 245-265.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Belloch, C., Barrio, E., Garcia, D., and Querol, A.,** 1998, Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Yeast*, 14: 1341-1354.
- Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., Garcia, M.D., and Querol, A.,** 1997, Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 20: 397-408.
- Berbee, M. C., Carmean, D. A., and Winka, K.,** 2000, Ribosomal DNA resolution of branching order among the ascomycota: how many nucleotides are enough? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17:337–364.
- Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J.,** 1999, Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperatre on growth, *Food Control*, 10, 27-33.
- Beuchat, L.R.,** 1987, Food and Beverage Mycology, 2nd Ed. Van Nostrand, New York, 661p.
- Beynon, R., and Bond, J.S.,** 2001, Proteolytic Enzymes: A Practical Approach 2nd Ed., Oxford University Press, 340 p.
- Blanchin-Roland, S., Cordero Otero, R. and Gaillardin, C.,** 1994, Two upstream UAS contol expression of the XPR2 gene encoding an extracellular alkaline protease in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Molecular Cell Biology*, 14: 327-338.
- Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., and Torriani, S.,** 2003, Development of reverse transcription (RT)–PCR and real-time RT–PCR assay for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized foodproducts. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4116–4122.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Boekhout, T., Renting, M., Scheffers, W. A., and Bosboom, R.,** 1993, The use of karyotyping in the systematics of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63: 157–163.
- Boekhout, T., Robert, V., Phaff, H.,** 2003, Yeast in Food: Beneficial and Detrimental Aspects, CRC Pres, Boca Raton, p. 69-121.
- Bonner, P.L.R.,** 2007, Protein Purification. Taylor & Francis Group, New York, 190 p.
- Borst, A., Leverstein-Van Hall, M. A., Verhoef, J., and Fluit, A. C.,** 2001, Detection of *Candida* spp. in blood cultures using nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 39: 155–160.
- Borst, A., Theelen, B., Reinders, E., Boekhout, T., Fluit, A. C., and Savelkoul, P. H.,** 2003, Use of Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis To Identify Medically Important *Candida* spp., Including *C. dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:1357–1362.
- Bradford M.M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of protein using the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72:248-254.
- Bressollier, P. Letourneau, F., Urdaci, M., Verneuil, B.,** 1999, Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2570-2576.
- Brown, P. O. and Botstein, D.,** 1999, Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetic*, 21(Suppl):33–37.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bujdoso, G., Egli, C. M., and Henick-Kling, T.,** 2001, Inter- and intraspecific differentiation of natural wine strains of *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) by physiological and molecular methods. *Food Technology and Biotechnology*, 39:19–28.
- Cadez, N., Raspor, P., de Cock, A. W. A. M., Boekhout, T., and Smith, MTh.,** 2002, Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Research*, 1:279–289.
- Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A., Giudici, P.,** 2001, Identification of *Pichia anamola* isolated from yoghurt by RFLP of ITS region. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 71-73.
- Capece, A., Salzano, G. and Romano, P.,** 2003, Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species, *International Journal of Food Microbiology*, 84: 33-39.
- Caruso, M., Capece, A., Salzano, G., and Romano, P.,** 2002, Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 323–328.
- Casey, G. C. and Dobson, D. W.,** 2004, Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice: a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 327–335.
- Chen, Y.C., Eisner, J.D., Katar , M.M., Rassoulia-Barrett, S.L., Lofe, K., Yarfitz, S. L., Limaye, A.P., Cookson , B. T.,** 2000, Identification of Medically Important Yeasts Using PCR- Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the rRNA Genes, *Journal of Clinical Microbiology*, 2302-2310.
- Cheng, S.C. and Ogrydziak, D.M.,** 1986, Extracellular RNase Produced by *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Bacteriology*, 581-589.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Cheng, S.C. and Ogrydziak, D.M.,** 1987, Processing and secretion of the *Yarrowia lipolytica* RNase. *Journal of Bacteriology*, 169: 1433-1440.
- Chitra, M., Saravanan, D., Radhakrishnan, M., and Balagurunathan, R.,** 2011, Effect of Critical Medium Components on Protease and Agarase Production from Pigmented Marine *Pseudoalteromonas* species. *International Journal of ChemTech Research*, 3: 614-619.
- Cho, J.-C. and Tiedje, J. M.,** 2001, Bacterial species determination from DNA–DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3677–3682.
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cartoni, C. and Comi, G.,** 2002, An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 12:407–411.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., and Comi, G.,** 2004, Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:1347–1355.
- Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F., and Belo, I.,** 2010, *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. A. Mendez-Vilas (Ed.), Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, Badajoz: Formatex Research Center, 930–944.
- Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Mulargia, A.F. and Palmas, F.,** 2001, Yeasts associated with Sardinian ewe’s dairy products, *International Journal of Food Microbiology*, 69, 53-58.
- Çelik, G.,** 2012, Tanısı yapılmış olan *Yarrowia lipolytica* strainlerinin organik asit (sitrik asit, izositrik asit) üretim kapasitelerinin taranması, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 129s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Çorbacı, C.**, 2008, Yüksek sıcaklık ve ekstrem pH'da *Debaryomyces hansenii* strainlerinin büyümesi üzerine sodyumun etkisi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 186s.
- Damerval, C., Guilloux M., Blaisonneau, J. and Vienne, D.**, 1987, A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins, *Electrophoresis*, 8: 158–159.
- Davidow, L.S., Kaczmarek, F.S., De Zeeuw, J.R., Colon, S.W., Lauth, M.R., Pereira, D.A. and Franke, A.E.**, 1987, The *Yarrowia lipolytica* LEU2 gene. *Current Genetics*. 11: 377-383.
- de Barros Lopes, M., Raineri, S., Henschke, P., and Langridge, P.**, 1999, AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 915–924.
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P. A., and Langridge, P.**, 1996, PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice primers. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4514–4520.
- De Wulf, P., Brambilla, L., Vanoni, M., Porro, D., and Albergina, L.**, 2000, Real-time flow cytometric quantification of GFP expression and Gfp-fluorescence generation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 57–64.
- Deak, T.**, 1991, Foodborne yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 36: 179-278.
- Deak, T.**, 1995, Methods for the rapid detection and identification of yeast in food, *Trends in Food Science Technology*, 6: 287- 292.
- Deak, T.**, 2006, Safety and Quality of Fermented Foods: New Developments in Biopreservation, 195s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Deak, T.**, 2007, Handbook of food spoilage yeasts, New York, USA, CRC Pres, 325p.
- Deak, T., Beuchat, L.R.**, 1996, Handbook of food spoilage yeasts, New York, USA, CRC Pres, 315p.
- Deak, T., Chen, J., Beuchat, L.R.**, 2000, Molecular Characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from Poultry, *Applied and Environmental Microbiology*, 4340-4344.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Coda, R., Minervini, F., and Gobbetti, M.**, 2009, Molecular adaptation of sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400 under co-cultivation with other lactobacilli. *Research in Microbiology*, 160: 358-366.
- Diaz, M. R. and Fell, J. W.**, 2004, High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *Trichosporon*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3696–3706.
- Dickinson, J. H., Kroll, R. G., and Grant, K. A.**, 1995, The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 212–216.
- Dlauchy, D., Tornai-Lehocski, J., and Péter, G.**, 1999, Restriction enzyme analysis of PCR amplified rRNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic and Applied Microbiology*. 22: 445–453.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., et al.**, 2004, Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430: 35-44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Egli, C. M. and Henick-Kling, T.,** 2001, Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 241–247.
- Enderlin, C.S. and Ogrydziak, D.M.,** 1994, Cloning, nucleotide sequence and functions of XPR6, which codes for a dibasic processing endoprotease from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 10: 67-79.
- Erarslan, A.,** 2011a, Enzim Saflaştırmada Planlama ve Strateji, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler Notları, 1-17.
- Erarslan, A.,** 2011b, Protein Saflaştırmasında Kullanılan Temel Kromatografik Teknikler Notları, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler Notları, 1-64.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A.,** 1999, Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International of Journal Systematic Bacteriology*, 49: 329–337.
- Esteve-Zarzoso, B., Fernández-Espinar, M. T., and Querol, A.,** 2004, Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* “flor” yeast races involved in sherry ageing. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85: 151–158.
- Esteve-Zarzoso, B., Zorman, T., Belloch, C., and Querol, A.,** 2003, Molecular characterisation of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 404–411.
- Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Deplano, M., and Cosentino, S.,** 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 51–59.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Fell, J.W. and Blatt, G.,** 1999, Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorochus* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA, IGS and ITS sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21: 677–681.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., and Statzell-Tallman, A.,** 2000, Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rD1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic Microbiology*, 50: 1351–1371.
- Fernandez, M.T., Ubedo, J.F. and Briones, A.I.,** 1999, Comparative study of non- *Saccharomyces* microflora of musts in fermentation by physiological and molecular methods, *FEMS Microbiology Letters*, 173: 223-229.
- Fernández-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., and Querol, A.,** 2001, Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 70: 1–101.
- Fernández-Espinar, M. T., Martorell, P., de Llanos, R., and Querol, A.,** 2006, Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. *In: Yeasts in Food and Beverages* (eds. Querol, A. and Fell, G. H.). Springer, Berlin. pp. 55–82.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. and Barrio, E.,** 2000, RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5,8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 87-97.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ferrero, M.A., Gastro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Sineriz, F.,** 1996, Thermostable Alkaline Proteases of *Bacillus licheniformis* MIR29 Isolation, Production and Characterization, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45: 327-332.
- Fickers P., Nicaud, J.M., Gaillardin, C., Destain J. and Thonart P.,** 2004, Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Applied Microbiology*, 96(4): 742-749.
- Fickers, P., Bennetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauerberger, S., Smit, M.S., and Nicaud, J.M.,** 2005, Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research* 5: 527-543.
- Fleet, G.H.,** 1990, Yeast in dairy products, *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 199-211.
- Fleet, G.H.,** 1992, Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12: 1-44.
- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimota, T.,** 2001, Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 3617-3622.
- Gallego, F. J., Perez, M. A., Martinez, I., and Hidalgo, P.,** 1998, Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 350–351.
- Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Wang, L., Li, J., and Gong, F.,** 2007, Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes. *Microbial Ecology*, 54: 722-729.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R.,** 2006, Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese, *Food Microbiology*, 23: 641-648.
- Gente, S., Desmasures, N., Jacopin, C., Plessis, G., Beliard, M., Panoff, J.-M., and Guéguen, M.,** 2002, Intra-species chromosome-length polymorphism in *Geotrichum candidum* revealed by pulsed field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 76:127–134.
- Giesendorf, B. A. J., Quint, W. G. V., Vandamme, P., and van Belkum, A.,** 1996, Generation of DNA probes for detection of microorganisms by polymerase chain reaction fingerprinting. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasiten. Infektionskrankheiten. Orig.* 283: 417–430.
- Giménez-Jurado, G., Valderrama, M. J., Sá-Nogueira, I., and Spencer-Martins, I.,** 1995, Assessment of phenotypic and genetic diversity in the yeast genus *Metschnikowia*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68: 101–110.
- Gingeras, T. R. and Rosenow, C.,** 2000, Studying genomes with high density oligonucleotide arrays. *ASM News*, 66: 463–469.
- Gözütek, E.,** 2013, Geleneksel ve endüstriyel olarak üretilen turşularda maya mikroflorasının belirlenmesi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 76 s.
- Groenewald, M., Boekhout, T., Neugebäude, C., Gaillardin, C., van Dijck, P.W.M. and Wyss, M.,** 2013, *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, Early Online: 1-20.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Guan, G.P., Wang, H.X. and Ng, T.B.,** 2007, A novel ribonuclease with antiproliferative activity from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 1593-1597.
- Guevara-Olvera, L., Calvo-Mendez, C. and Ruiz-Herrera, J.,** 1993, The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of General Microbiology*, 193: 485-493.
- Guillamón, J. M., Barrio, E., and Querol, A.,** 1996, Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers. Relationships between genetic distance and geographic origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 122–132.
- Guillamón, J. M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., and Querol, A.,** 1998, Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer ITS region. *Archives of Microbiology*, 169: 387–392.
- Guillamón, J. M., Sanchez, I., and Huerta, T.,** 1997, Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. *FEMS Microbiology Letters*, 147: 267–272.
- Guiver, M., Levi, K., and Oppenheim, B. A.,** 2001, Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 362–366.
- Gundampati, R.K., Sharma, A., Kumari, M. Debnath, M.,** 2011, Extracellular poly (A) specific ribonuclease from *Aspergillus niger* ATCC 26550: Purification, biochemical, and spectroscopic studies, *Process Biochemistry*, 46: 135-141.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Güngör, O.**, 2009, Ağır metallerle kirlenmiş çevrelerden izole edilen askomisetik mayaların bakır ve nikel ağır metallerine karşı dirençlerinin araştırılması, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 228s.
- Haçarız, O., Sayers, G., and Baykal, A.T.**, 2012, A Proteomic Approach to Investigate the Distribution and Abundance of Surface and Internal *Fasciola hepatica* Proteins during the Chronic Stage of Natural Liver Fluke Infection in Cattle. *Journal of Proteome Research*, 11: 3592–3604.
- Hames-Kocabas E.E., Uzel A.**, 2007, Alkaline protease production by an Actinomycete MA1-1 isolated from marine sediments, *Annals of Microbiology*, 57: 71-75.
- Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J.M.**, 2004, New PCR based methods for yeast identification, *Journal of Applied Microbiology*, 97: 792-801.
- Holm, C., Meeks-Wagner, D.W., Fangman, W. L., and Botstein, D.**, 1986, A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene*, 42: 169–173.
- Hui, M., Ip, M., Chan, P. K. S., Chin, M. L., and Cheng, A. F. B.**, 2000, Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 38: 95–98.
- Ibeas, J. I., Lozano, I., Perdignes, F., and Jimenez, J.**, 1996, Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 998–1003.
- Irie, M.** 1997, RNase T1/RNase T2 Family RNases (Chapter 3), Ribonucleases: Structures and Functions Edited by D'Alessio, G., and Riordan, J.F., Academic Press, New York pp. 101-124.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jakobsen, M., Norvhus, J.,** 1996, Yeast and their possible beneficial and p. negative effects on the quality of dairy products, *International Dairy Journal*, 6: 755-768.
- Jespersen, L., van der Aa Kühle, A., and Petersen, K. M.,** 2000, Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 60: 43–53.
- Joo, H.S., Chang, C.S.,** 2005, Oxidant and SDS-Stable Alkaline Protease from a Halo-tolerant *Bacillus clausii* 1-52: Enhanced Production and Simple Purification, *Journal of Applied Microbiology*, 98: 491-497.
- Kamzolova, S.V., Chiglintseva, M.N., Lunina, J.N., Morgunov, I.G.,** 2012, α -ketoglutaric acid production by *Yarrowia lipolytica* and its regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 783-791.
- Kamzolova, S.V., Yusupova, A.I., Vinokurova, N.G.,** 2009, Chemically assisted microbial production of succinic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 1027-1034.
- Karasu Yalçın, S.,** 2007, *Yarrowia lipolytica* ile Sitrik Asit Üretimine Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi ve Bazı Endojen Maya Suşlarının Sitrik Asit Üretim Kapasitelerinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 273s.
- Kavanagh, K.,** 2011, Fungi: Biology and Applicaitons, 2nd Ed. Wiley-Blackwell, 361 p.
- Kazan, D.,** 2011, Proteomiğe Giriş, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler Notları, 93-104.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kazan, D., Bal, H., Denizci, A.A., Ozturk, N.C., Ozturk, H.U., Dilgimen, A.S., Ozturk, D.C., Erarslan, A.,** 2009, Studies on Alkaline Serine Protease Produced by *Bacillus clausii* GMBE 22, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 39: 289-307.
- Kazan, D., Denizci, A.A., Öner, M.N.K., Erarslan, A.,** 2005, Purification and Characterisation of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32: 335-344.
- Kerscher, S., Droese, S., Zwicker, K., Zickermann, V., Brandt, U.,** 2002, *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10;1555(1-3): 83-91.
- Knutsen, A.K., Robert, V., Poot, G.A. et al.,** 2007, Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. and *Candida hollandica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2426-2435.
- Kreger-van Rij, N.J. W.,** 1984, The Yeast a Taxonomic Study, Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, 1082p.
- Kreger-van Rij, N.J.W. and Veenhuis, M.,** 1973, Electron microscopy of septa in ascomycetous yeasts. *Mol. Antonie Van Leeuwenhoek*, 146: 101-106.
- Kumar C. G., and Takagi H.,** 1999, Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint, *Biotechnology Advances*, 17: 561–594.
- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.,** 1998, The yeasts: a taxonomic study. 4th Ed. Elsevier Amsterdam, The Nederland, 1076p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.,** 2006, Yeast systematics and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology. *In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (eds. Rosa, C. and Péter, G.). Springer, Berlin. pp. 11–30.
- Kurtzman, C. P. and Phaff, H. J.,** 1987, Molecular taxonomy. *In: The Yeasts*, Vol. 1, 2nd ed. (eds. Rose, A. H. and Harrison, J. S.). Academic Press, London. pp. 63–94.
- Kurtzman, C. P.,** 2000, *Yarrowia* van der Walt & von Arx, The Yeasts: A Taxonomic Study, Kurtzman C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam. pp. 420- 421.
- Kurtzman, C. P.,** 2005, New species and new combinations in the yeast genera *Kregenvanrija* gen. nov., *Saturnispora* and *Candida*. *FEMS Yeast Research*, 4: 233–245.
- Kurtzman, C. P.,** 2006, Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience*, 47: 65–71.
- Kurtzman, C.P.,** 1990, Classification of general properties of yeasts, Marcel Decker Inc., New York, p. 1-34.
- Kurtzman, C.P., Boekhout, T., Robert, V., Fell, J.W., and Deak, T.,** 2003, Methods to identify yeasts. *In: Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*, Behr's Verlag, Hamburg, pp. 69-121.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., and Boekhout, T.,** 2011, The yeasts: a taxonomic study. 5th Ed. Elsevier Amsterdam, The Nederland, 2354 p.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J.,** 1998, Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leewenhoek*, 73: 331-371.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J.**, 2003, Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses, *FEMS Yeast Research*, 3, 417-432.
- Laemmli, U.K.**, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Laloti, V.S., Ballesta, J.P.G., Fragoulis, E.G.**, 1997, Purification and characterization of a novel poly(U), poly(C) ribonuclease from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1342: 62-72.
- Li, S., Spear, R. N., and Andrews, J. H.**, 1997, Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscopic slides and leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3261–3267.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., Börner, T.**, 1993, Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting, *Journal of Basic Microbiology*, 33: 413-426.
- Limtong, S., Kaewwichian, R., Jindamorakot, S., Yongmanitchai, W., Nakase, T.**, 2012, *Candida wangnamkhiaoensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Hyphopichia* clade isolated in Thailand. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102: 23–28.
- Lischewski, A., Kretschmar, M., Hof, H., Amann, R., Hacker, J. and Morschäuser, J.**, 1997, Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA-specific fluorescent *in situ* hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2943–2948.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pedersen, J.**, 2000, Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 471.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lodder, J.**, 1970, *The Yeasts a Taxonomic Study*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385p.
- Lodder, J., Kreger-van Rij, N.J.W.**, 1952, *The Yeasts a Taxonomic Study*, North Holland Publishin Co., Amsterdam, 840p.
- Loeffler, J., Dom, C., Hebart, H., Cox, P., Magga, S., and Einsele, H.**, 2003, Development and evolution of the Nuclisens Basic Kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45: 217–220.
- Loeffler, J., Henke, N., Hebart, H., Schmidt, D., Hagmeyer, L., Schumacher, U., and Einsele, H.**, 2000, Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:586–590.
- Lopandic, K., Molnár, O., and Prillinger, H.**, 2005, Application of ITS sequence analysis, RAPD and AFLP fingerprinting in characterising the yeast genus *Fellomyces*. *Microbiological Research*, 160: 13–26.
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., and Prillinger, H.**, 2006, Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23: 341–350.
- Lopez, V., Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., Ramón, D., and Querol, A.**, 2003, A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 63–71.
- Lopez, V., Querol, A., Ramon, D., Fernández-Espinar, T.**, 2001, A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts, *International Journal of Food Microbiology*, 68: 75-81.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Loureiro, V., 2000.** Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control, *Food Research International*, 33: 247-256.
- Loureiro, V., Querol, A., 1999,** the prevalence an control of spoilage yeasts in foods and beverages, *Trends in Food Science and Technology*, 10: 356-365.
- Luhtala, N., and Parker, R., 2010,** T2 Family Ribonucleases: Ancient enzymes with diverse roles. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(5): 253–259.
- Ma, C., Ni, X., Chi, Z., Ma, L., Gao, L., 2007,** Purification and Characterization of an Alkaline Protease from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources, *Marine Biotechnology*, 9: 343–351.
- MacIntosh, G.C., 2011,** RNase T2 Family: Enzymatic Properties, Functional Diversity, and Evolution of Ancient Ribonucleases (Chapter 4), *Ribonucleases* Edited by Nicholson, A.W., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 89-114.
- Madzak, C., Gaillardin, C., Beckerich, J.M., 2004,** Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology*, 109: 63-81.
- Mann, W. and Jeffery, J., 1989,** Isolation of DNA from yeasts. *Analytical biochemistry*, 178: 82–87.
- Mannarelli, B. M. and Kurtzman, C. P., 1998,** Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1634–1641.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Manzano, M., Cocolin, L., Iacumin, L., Cantoni, C., and Comi, G.,** 2005, PCR-TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101: 333–339.
- Marsh, T.,** 1999. Terminal fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 323–327.
- Martini, A. and Phaf, H. J.,** 1973, The optical determination of DNA–DNA homology in yeasts. *Annals of Microbiology*, 23: 59–68.
- Martorell, P., Fernández-Espinar, M. T., and Querol, A.,** 2005a, Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *International Journal of Food Microbiology*, 101: 293–302.
- Martorell, P., Querol, A., and Fernández-Espinar, M. T.,** 2005b, Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6823–6830.
- Matoba, S. and Ogrydziak, D.M.,** 1989, A novel location for dipeptidyl aminopeptidase processing sites in the alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 6037-6043.
- Matoba, S., Fukuyama, J., Wing, R.A. and Ogrydziak, D.M.,** 1988, Intracellular precursors and secretion of alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. *Molecular Cell Biology*, 8: 4904-4916.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Meroth, C. B., Hammes, W. P. and Hertel, C.,** 2003, Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7453–7461.
- Mishra, N. C.,** 2002, Nucleases: Molecular Biology and Applications, Wiley-Interscience; 1th edition, 344 p.
- Mitchell, T. G., Sandin, R. L., Bowman, B. H., Meyer, W., and Merz, W. G.,** 1994, Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32 (Suppl 1): 351–366.
- Mitsugi, K., Takami, T., Tobe, S., Kimura, M., Nakase, T., and Komagata, K.,** 1971, Extracellular production of yeast protease, *Agricultural and Biological Chemistry*, 35: 1633.
- Moeller, L., Grunberg, M., Zenhsdorf, A. et al.,** 2011, Repeated fed-batch fermentation using biosensor online control for citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*. 153: 133-137.
- Montrocher, R., Verner, M.C., Briolay, J., Gautier, C., Marmeisse, R.,** 1998, Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 295-303.
- Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V. and Finogenova, T.V.,** 2006, Biotechnological potential of the yeast *Yarrowia lipolytica*, 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, 4-8 July 2006, Madrid, Spain, p.103.
- Muyzer, G.,** 1999, DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion of Microbiology*, 2: 317–322.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Nakase, T. and Komagata, K.,** 1968, Taxonomic significance of base composition of yeast DNA. *Journal of General and Applied Microbiology*, 14: 345–357.
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., and Korhola, M.,** 1995, Karyotypic relationships among species of *Saccharomyces sensu lato*: *S. castellii*, *S. dairensis*, *S. unisporus* and *S. servazzii*. *Systematic and Applied Microbiology*, 18: 103–108.
- Naumova, E. S., Korshonova, I. V., Jespersen, L., and Naumov, G. I.,** 2003, Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research*, 3: 177–184.
- Naumova, E., Naumov, G., Fournier, P., Nguyen, H.V. and Gaillardin, C.,** 1993, Chromosomal polymorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica* and related species: electrophoretic karyotyping and hybridization with cloned genes. *Current Genetics*, 23: 450-454.
- Nguyen, H.V., Lepingle, A., and Gaillardin, C.,** 2000, Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* and reveals the existence of hybrids between *S.uvarum* and *S. cerevisiae* including the *S. boyanus* type strain CBS 380. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 71-85.
- Nicaud, J.M., Fabre, E., Beckerich, J.M., Fournier, P. and Gaillardin, C.,** 1989, Cloning, sequencing and amplification of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 12: 285-298.
- Ogrydziak, D. and Mortimer, R.K.,** 1977, Genetics extracellular protease production in *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 87: 621-632.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ogrydziak, D. M., Demain, A. I., and Tannenbaum, S. R.,** 1977, Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 497, 525.
- Ogrydziak, D.M. and Scharf, S.J.,** 1982, Alkaline Extracellular Protease Produced by *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B, *J Gen. Microbiol*, 128: 1225-1234.
- Ogrydziak, D.M.,** 1988, Production of alkaline extracellular protease by *Yarrowia lipolytica*. *Critical Review of Biotechnology*, 8: 177-187.
- Ogrydziak, D.M.,** 1993, Yeast extracellular proteases. *Critical Review of Biotechnology*, 13: 1-55.
- Ogrydziak, D.,** 2003, Regulation of *Yarrowia lipolytica* Extracellular Ribonuclease and Alkaline Protease Production. Chapter 64, Ed. Wolf, K., Breunig, K., Barth, G., non-Conventional Yeasts in Genetics, *Biochemistry and Biotechnology*, 494p.
- Öztürk, İ.,** 2013, Geleneksel fermente sucuklardan izole edilen mayaların tanımlanması, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve sucuk üretimine uygun izolatların seçilmesi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 208s.
- Öztürk, S., Özeren-Morgan, M., Dilgimen, A.S., Denizci, A.A., Arıkan, B. and Kazan, D.,** 2009, Alkaline serine protease from halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. *Annals of Microbiology*, 59(1): 83-90.
- Öztürk, T.,** 2000, Çeşitli kaynaklardan ekstraselüler lipaz üreten mayaların izolasyonu ve identifikasyonu, Ege Ünivesitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 132s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Page, B. T. and Kurtzman, C. P.,** 2005, Rapid identification of *Candida* and other clinically important yeast species by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4507–4514.
- Perez, M.A., Gallego, F.J., Hidalgo, P.,** 2001, Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains, *FEMS Microbial Letters*, 205: 375-378.
- Perez-Ortin, J. E., Garcia-Martinez, J., and Alberola, T. M.,** 2002, DNA chips for yeast Biotechnology. The case of wine yeasts. *Journal of Biotechnology*, 98: 227–241.
- Perpète, P., Van Cutsem, P., Boutte, C., Colson-Corbiser, A.-M., and Collin, S.,** 2001, Amplified fragment length polymorphism, a new method for the analysis of brewer's yeast DNA polymorphism. *Journal - American Society of Brewing Chemists*, 59(4): 195–200.
- Petersen, K.M., Moller, P. L., Jespersen, L.,** 2001, DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 11-24.
- Phaff, H.J., Miller, M.W., Mrak, E.M.,** 1966, The Live of Yeasts, Harward University Press, Cambridge, 186p.
- Phister, T.G. and Mills, D. A.,** 2003, Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7430–7434.
- Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M. and Nicaud, J.M.,** 2000, Characterization of an extracellular lipase encoded by Lip2 in *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Bacteriology*, 182(10): 2802-2810.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Piskur, J., Mozina, S. S., Stenderup, J., and Pedersen, M. B.,** 1995, A mitochondrial molecular marker, ori-rep-tra, for differentiation of yeast species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2780–2782.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D.,** 1985, Fungi and Food Spoilage, Academic Press, London, 685p.
- Polomska, X., Juszczuk, P., Cadez, N., et al.,** 2007, Comparison of physiological and PCR-RFLP rDNA identification of yeast species commonly found in cheese. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 57: 221–226.
- Porro, D., Venturini, M., Brambilla, L., Arberghina, L., and Vanoni, M.,** 2000, Relating growth dynamics and glucoamylase excretion of individual *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 49–55.
- Price, C. W., Fuson, G. B., and Phaff, H. J.,** 1978, Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiological Review*, 42: 161–193.
- Prillinger, H., Molnar, O., Eliskoses L. F., Lapondic, K.,** 1999, Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese, *Antonie van Leeuwenhoek*, 75: 267-283.
- Querol, A. and Barrio, E.,** 1990, A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 18: 1657.
- Querol, A. and Ramón, D.,** 1996, The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Science and Technology*, 7: 73–78.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Querol, A., Barrio, E., and Ramón, D.,** 1992, A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 439–446.
- Ramos, J. P., Valente, P., Hagler, A. N., and Leoncini, O.,** 1998, Restriction analysis of ITS region for characterization of the *Debaryomyces* species. *Journal of General and Applied Microbiology*, 44: 399–404.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V.,** 1998, Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597–635.
- Redzepovic, S., Orlic, S., Sikora, S., Majdak, A., and Pretorius, I. S.,** 2002, Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croation vineyards. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 305–310.
- Rizzello, C.G., Coda, R., De Angelis, M., Di Cagno, R., Carnevali, P., and Gobbetti, M.,** 2009, Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 189–196.
- Rodriguez, C. and Dominguez, A.,** 1984, The growth characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 605-612.
- Rohm, E., Lechner, F.,** 1990, Evaluation and Reliability of a Simplified Method for Identification of Food-Borne Yeasts, *Applied and Environmental Microbiology*, 1290-1295.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Romano, A., Casaregola, S., Torre, P., and Gaillardin, C.,** 1996, Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 255–264.
- Romano, P., Capece, A., Jespersen, L.,** 2006, Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts: In: Querol, A., Fleet, G.H., (Eds.): Yeasts in Food and Beverages. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 13-53.
- Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Lopez-Gomez, A., and Weiss, J.,** 2005, Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. *Food Control*, 18: 33–39.
- Rywinska, A., Musial, I., Rymowicz, W. et al.,** 2012, Effect of agitation and aeration on the citric acid production by *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42: 279-291.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Schaf, S. J., Higuchi, R., Hoprn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A.,** 1988, Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Shuman, H.A.,** 1989, Molecular Clonning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sampaio, J.P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F.L., Pais, C., Fonseca, A., Fell, J.W.,** 2001, Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 687–697.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sattayasai, N.**, 2012, Protein Purification (Chapter 1), Chemical Biology Edited by Ekinici, D., InTech, Croatia, pp. 3-18.
- Schweitzer, B. and Kingsmore, S.**, 2001, Combining nucleic acid amplification and detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 21–27.
- Scorzetti, G., Fell, J. W., Fonseca, A., and Statzell-Tallman, A.**, 2002, Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 2: 495–517.
- Senses-Ergul, S., Agoston, R., Belak, A., Deak, T.**, 2006, Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests, *International Journal of Food Microbiology*, 1: 120-124.
- Shin, J. H., Nolte, F. S., Holloway, B. P., and Morrison, C. J.**, 1999, Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 165–170.
- Simms, P.C. and Ogrydziak, D.M.**, 1981, Structural gene for the alkaline extracellular protease of *Saccharomycopsis lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, 145: 404-409.
- Skvortsova, M.A., Bocharov, A.L., Yakovlev, G.I., and Znamenskaya, L.V.**, 2002, Novel Extracellular Ribonuclease from *Bacillus intermedius*-Binase II: Purification and Some Properties of the Enzyme, *Biochemistry*, 67(7): 802-806.
- Soll, D. R.**, 2000, The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 332–370.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Spector, T.**, 1978, Refinement of The Coomassie Blue Method of Protein Quantitation, *Analytical Biochemistry*, 86: 142-146.
- Stender, H., Fiandaca, M., Hyldig-Nielsen, J. J., and Coull, J.**, 2002, PNA for rapid microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 48: 1–17.
- Stubbs, S., Hutson, R., James, S., and Collins, M. D.**, 1994, Differentiation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* from other *Zygosaccharomyces* species using 18S rDNA as target for a non-radioactive ligase detection reaction. *Letters in Applied and Microbiology*, 19: 268–272.
- Takami H., Akiba T., Horikoshi A.**, 1989, Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH- 101, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 120-124.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.**, 2011, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739.
- Telefoncu, A.**, 1997, Enzimlerin Endüstriyel Kullanım Alanları, Enzimoloji, Ed. Azmi Telefoncu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, 446s.
- Theelen, B., Silvestri, M., Gueho, E., van Belkum, A., and Boekhout, T.**, 2001, Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Research*, 1: 79–86.
- Thumar, J. and Singh S.P.**, 2007, Two-step purification of a highly thermostable alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1, *Journal of Chromatography B*, 854: 198–203.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tobe, S., Takami, T., Ikeda, S., and Mitsugi, K.,** 1976, Production and some enzymatic properties of alkaline proteinase of *Candida lipolytica*. *Agricultural and Biological Chemistry.*, 40 (3): 1087–1092.
- Tornai-Lehoczki, J. and Dlauchy, D.,** 1996, An opportunity to distinguish species of *Saccharomyces sensu stricto* by electrophoretic separation of the larger chromosomes. *Letters in Applied Microbiology*, 23: 227–230.
- Tornai-Lehoczki, J. and Dlauchy, D.,** 2000, Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 62: 37–45.
- Török, T., King J.R., A.D.,** 1991, Comparative Study on the Identification of Food-Borne Yeasts, *Applied and Environmental Microbiology*, 1207-1212.
- Turenne, C. Y., Sanche, S. E., Hoban, D. J., Karlowsky, J. A., and Kabani, A. M.,** 1999, Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1846–1851.
- Türkel, S. and Arık, E.,** 2010, The Effects of Pho85 Signaling Pathway on the Invertase Biosynthesis and Glucose Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Turkish Journal of Biology*, 34: 103-108.
- Türkel, S., Arık, E. and Güzelvardar, S.,** 2008, Effect of Hyperosmotic Stress and Nitrogen Starvation on the Growth and the b-galactosidase Synthesis in *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Turkish Journal of Biology*, 32: 175-180.
- Valente, P., Gouveia, F. C., Lemos, G. A., Pimentel, D., van Elsas, J. D., Mendonca-Hagler, L. C., and Hagler, A. N.,** 1997, PCR amplified ITS length variation within the yeast genus *Metchnikowia*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 43: 179–181.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Valente, P., Ramos, J. P., and Leoncini, O.,** 1999, Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Canadian Journal of Microbiology*, 45: 949–958.
- Van den Tempel, T., Jakobsen, M.,** 1998, Yeasts Associated with Danablu, *International Dairy Journal*, 8: 25-31.
- Van der Vassen, J.M.B.M., Hofstra, H.,** 1996, DNA based typing identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementetion, *International Journal of Food Microbiology*, 33: 35-49.
- Vasdinyei, R. and Deak, T.,** 2003, Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy using traditional and molecular identification techniques, *International Journal of Food Microbiology*, 86: 123-130.
- Vaughan-Martini, A.,** 2003. Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine, *International Microbiology*, 6: 175-182.
- Vega, R. and Dominguez, A.,** 1986, Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 144: 124-130.
- Verachtert, H., De Mot, R.,** 1990, Biotechnology and Biocatalysis, Marcel Dekker. Inc., New York, 536p.
- Villa-Carvajal, M., Coque, J.J.R., Alvarez-Rodriguez, M.L., Uruburu, F., Belloch, C.,** 2004, Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers, *FEMS Yeast Research*, 4: 745-750.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Walsh, T. J., Francesconi, A., Kasai, M., and Chanock, S. J.,** 1995, PCR and single-stand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 3216-20.
- Wang, H.X. and Ng, T.B.,** 2001, Purification and characterization of a potent homodimeric guanine-specific ribonuclease from fresh mushroom (*Pleutorus tuber-regium*) sclerotia, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33: 483-490.
- Wang, H.X. and Ng, T.B.,** 2003, Isolation of a ribonuclease from fruiting bodies of the wild mushroom *Termitomyces globulus*, *Peptides*, 24: 973-977.
- Wang, H.X. and Ng, T.B.,** 2004, Purification of a novel ribonuclease from dried fruiting bodies of the edible wild mushroom *Thelophora ganbajun*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324: 855-859.
- Westall, S. and Filtenborg, O.,** 1998. Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology*, 15: 215–222.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.,** 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols: a guide to methods and applications* (eds. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. I., and White, T. J.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 315–322.
- Wickerham, L.J.,** 1970, *The Yeasts: a Taxonomic Study*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385p.
- Widjoatmodjo, M. N., Borst, A., Schukkink, R. A. F., Box, A. T. A., Tacke, N. M. M., Van Gemen, B., Verhoef, J., Top, B. and Fluit, A. C.,** 1999, Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection of medically important *Candida* species. *Journal of Microbiological Methods*, 38: 81–90.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Williams, R. M.**, 2002, The yeast lifecycle and DNA array technology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 186–191.
- Wolf, K.**, 1996, Nonconventional Yeast in Biotechnology, Springer Verlag, Berlin, 607p.
- Xiong, Y-H., Liu, J-Z., Song, H-Y., Weng, L-P. and Ji, L-N.**, 2003, Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* with enhanced extracellular ribonuclease production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 203-206.
- Yalçın, H.T., Çorbacı, C. and Uçar, F.B.**, 2013, Molecular characterization and lipase profiling of the yeasts isolated from environments contaminated with petroleum, *Journal of Basic Microbiology*, DOI 10.1002/jobm.201300029.
- Yalçın, Ö., 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.
- Yamagishi, H. and Ogata, T.**, 1999, Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 341–353.
- Yarrow, D.**, 1972, Four new combinations in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 38: 357-360.
- Yavuz, S.**, 2013, Bir maya izolatından proteaz üretimi, saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 76s.
- Ye, R. W., Wang, T., Bedzik, L., and Croker, K. M.**, 2001, Application of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods*, 47: 257–272.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ye, X.Y. and Ng, T.B.,** 2002, A novel and potent ribonuclease from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus pulmonarius*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293: 857-861.
- Ye, X.Y. and Ng, T.B.,** 2002, A novel and potent ribonuclease from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus pulmonarius*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292: 857-861.
- Zinjarde, S.S. and Pant, A.,** 2000, Crude oil degradation by free and immobilized cells of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Environmental Science. Health, Part A - Toxic / Haz. Sub. Environ. Engg.*, 35: 765-773.
- Zinjarde, S.S., Deshpande, M.V. and Pant, A.,** 1998, Dimorphic transition in by *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted seawater. *Mycological Research*, 102: 553-558.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı : AKPINAR
Adı : ONUR
E-mail : akpinar_onur@hotmail.com
Doğum tarihi : 07.10.1984
Doğum Yeri : Şişli/İSTANBUL

EĞİTİM

İlkokul : Hamit Süreyya Eremsel İlköğretim Okulu (1990 – 1995)
Ortaokul : Habipler Ortaokulu (1995 – 1998)
Lise : Habipler Lisesi (1998 – 2001)
Lisans : Ege Üni., Fen Fak., Biyoloji Böl., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. (2001 – 2006)
Yüksek Lisans : Ege Üni., Fen Fak., Biyoloji Böl., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. (2006 – 2008)
Doktora : Ege Üni., Fen Fak., Biyoloji Böl., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. (2008 – 2013)

Yüksek Lisans Tezi

“Süt ve Süt Ürünlerinden *Yarrowia lipolytica* Mayasının İzolasyonu ve İdentifikasyonu ve Alkalın Ekstrasellüler Proteaz ve Ribonükleaz Enzim Aktivitelerinin Araştırılması”

Doktora Tezi

“Konvansiyonel ve ITS-PCR Yöntemleriyle Tanısı Yapılan *Yarrowia lipolytica* Strainlerinin Diğer Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Tanısının Kesinleştirilmesi ve Ekstrasellüler Enzimlerinin Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”