

1779

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI

**SICAKLIĞIN Schizosaccharomyces pombe' NİN
PURİN SALGILAYAN ade2 MUTANTINDA
ÜREME VE SALGILAMA ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Yüksek Lisans Tezi
Ayşegül TOPAL

Tez danışmanı : Doç. Dr. Güler ORALER

Eylül - 1985
İstanbul

TEŞEKKÜR

Biyoteknoloji Yüksek Lisans programında çalışmaya yönlendirici fikirlerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Gönül BARA'ya, çalışmamdaki değerli katkılarından dolayı danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Güler ORALER'e Yard. Doç. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya ve çalışmam sırasında karşılaştığım sorunlarla yakından ilgilenen Prof. Dr. Ayhan ULUBELEN'e, Doç. Dr. Avni KURU'ya, Dr. Atok OLGUN'a Biyolog Semihan KARAER'e, çalışmamdaki fotoğraf ve çizim işleri ile ilgilenen Celal DAR ve Ahmet VATANSEVER'e ayrıca tezimin basımını sağlayan İ.Ü. Fen Fakültesi Matbaasına çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ.....	1
II. MATERYAL METOD.....	7
1. Mikroorganizma.....	7
2. Besiyerleri.....	7
3. Metod.....	9
A. Suşun saflığının kontrolü.....	9
B. Organizmanın kesikli kültürünün elde edilmesi.....	10
C. Üremenin izlenmesi.....	10
a. Hücre sayısının ölçülmesi.....	10
1. Mikroskopik sayım yöntemi.....	11
2. Koloni sayımı yöntemi.....	11
b. Hücre kitlesinin ölçülmesi.....	11
D. Üreme eğrisinin saptanması.....	12
E. Morfolojik gözlemler.....	13
F. Generasyon süresinin, generasyon sayısının ve özel üreme hızının hesaplanması.....	13
G. Salgılanan ürünün saptanması.....	14
III. BULGULAR.....	16
1. Sıcaklığın üreme üzerine etkileri.....	16
2. Sıcaklığın generasyon süresi, generasyon sayısı ve özel üreme hızına etkileri.....	17
3. Sıcaklığın hücre morfolojisi üzerine etkileri.....	21
4. Sıcaklığın purin salgılaması üzerine etkileri.....	22
IV. TARTIŞMA.....	24
V. ÖZET.....	30
VI. LİTERATÜR.....	31

I. G İ R İ Ş

Mayalar hücre bileşenleri ve salgılama ürünleri bakımından endüstride kullanılan mikroorganizmaların en önemli gruplarından birini oluştururlar (ROSE ve HARRISON, 1970).

Tüm mikroorganizmalarda olduğu gibi mayaların üremeleri de çeşitli fiziksel ve kimyasal ortam koşullarından önemli derecede etkilenir. Endüstriyel düzeyde maksimum ürün eldesi, çeşitli ortam koşullarının optimum değerinde olmasına bağlıdır (ELMER ve GADEN, 1981).

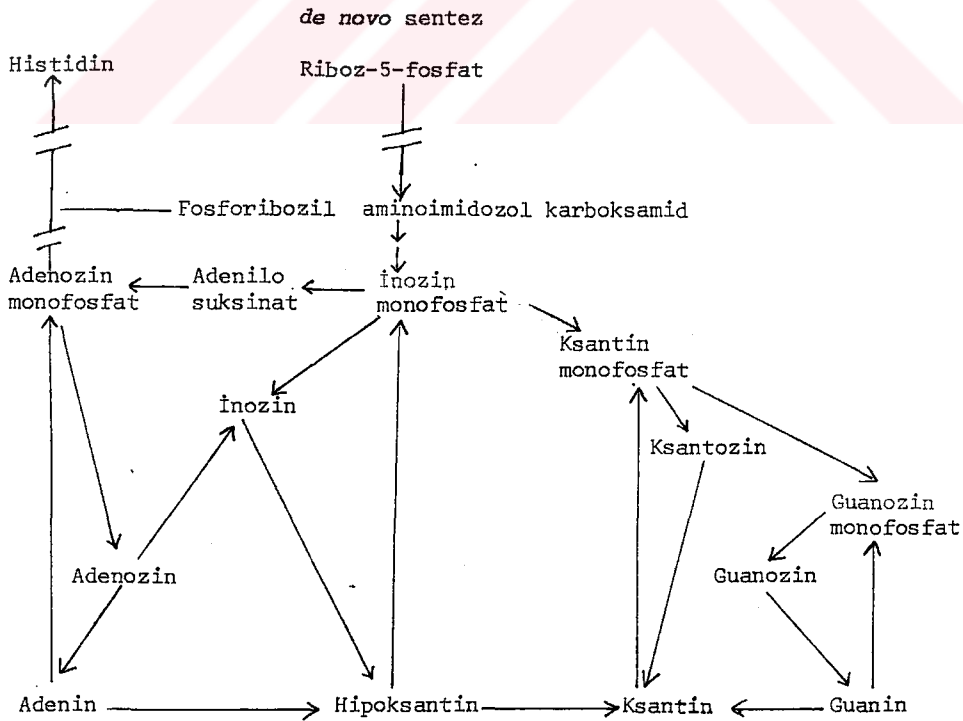
Fiziksel ortam koşullarından olan sıcaklığın, mayaların üremesi ve metabolizmaları üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalarla sıcaklığın enzim sentez ve aktivitesi, hücre zarının geçirgenliği dolayısıyla substrat alınımı, hücre çeperi oluşumu, hücre bileşenlerinin sentezi (DNA, RNA protein ve diğer moleküller), hücre siklusu, hücre morfolojisi ve hücre bölünmesi üzerine etkili olduğu buna bağlı olarak üremeyi etkilediği saptanmıştır. (INGRAHAM ve MAALQE, 1967; STOKES, 1967; FARRELL ve ROSE, 1967; HARTWEL, 1967; BROWN ve ROSE 1969 - STOKES'dan 1971; MITCHISON, 1971; NURSE, 1975; MOAT, 1979; COONEY, 1981; ITOH ve TAKAHASHI, 1983; PARADA ve ACEVEDO, 1983; BOYD, 1984).

Sıcaklığın mayaların üremesi üzerine etkileri JOHNSON, (1968); MITCHISON, (1971); BROWN ve ROSE (1969) - STOKES'dan, (1971); NURSE (1975); JOHNSON ve McDONALD, (1983); ITOH ve TAKAHASKI, (1983); PARADA ve ACEVEDO (1983)) tarafından araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre üredikleri sıcaklık sınırları bakımından mayalar genellikle mesofiliktir. *Candida* ve *Saccharomyces* cinslerinin psikrofilik tipleri bilinmekle beraber termofilik mayalara rastlanmamıştır (STOKES, 1971). Mesofilik sınırların (20°C-40°C) üstündeki sıcaklıklarda üretilen mayalarda hücresel fonksiyonlar olumsuz yönde etkilenmektedir (FARRELL ve ROSE 1967, MORITA 1968 - STOKES'dan 1971). *Saccharomyces cerevisiae*'nin sıcaklığa duyarlı mutantlarında DNA, RNA, protein sentezinin, hücre bölünmesinin ve hücre çeperi oluşumunu (HARTWELL, 1967 - STOKES'dan, 1971) *Schizosaccharomyces pombe*'nin hücre boyunu etkilediği bilinmektedir (MITCHISON, 1971; JOHNSON ve McDONALD, 1983).

Ayrıca sıcaklığın diğer mikroorganizmaların üremesi üzerine etkilerine ait son yıllardaki çalışmalara örnek olarak *Byssochlamys nivea* küfünde (ROLAND ve BEUCHAT, 1983), bazı *Basidiomycetes* türlerinde (BODDY, 1983), *Lactobacillus viridescens*, *Brochothrix thermosphacta* ve *Lactobacillus* sp strain 173'de (BLICKSTAD, 1983) verilebilir.

Günümüzde endüstride kullanım alanları bulunan purinler hücrede DNA, RNA, yüksek enerjili adenozin trifosfat (ATP), guanozin trifosfat (GTP), bazı ko-enzimlerin (NAD⁺, NADP) ve vitaminlerin (folik asid, tiamin, riboflavin) yapısında bulunurlar (HENDERSON ve PATERSON, 1973).

Purin nukleotidleri biyosentezinin *de novo* olarak veya bir baz ya da nukleositten tek aşamalı olarak yapılabildiği; *de novo* biyosentezin araştırılmış organizmaların hepsinde aynı şekilde olduğu ayrıca purinlerin hücre içerisinde birbirine dönüşebildiği bilinmektedir (HENDERSON ve PATERSON, 1973; MOAT, 1979)



Şekil 1, Purinlerin biyosentez ve dönüşümlerinin genel tablosu [POURQUIE ve HESLOT (1971)'dan].

Inozin, guanin, ksantin, inozin monofosfat, guanozin monofosfat, nikotinamid adenin dinukleotid, flavin adenin dinukleotid gibi çeşitli purinlerin ve türevlerinin fermentasyon yoluyla üretilmeleri (PEKİN, 1979; KIMURA ve ark., 1982) ve bunlar arasında özellikle inozin monofosfat ve guanozin monofosfatın besin endüstrisinde tadlandırıcı olarak kullanılmaları purin metabolizması ve regülasyonu ile ilgili araştırmalara yeni bir hız kazandırmıştır (POURQUIE ve HESLOT, 1971; KIMURA ve ark. 1982; FRUYA ve KYOKAISHI, 1978 - TESHIBA ve FRUYA'dan 1983). *Bacillus ammoniagenes*'te 5-inozin monofosfatın endüstriyel boyutta üretimi için fermentasyon metodları NAKAO (1979) (BUSHELL'den, 1983) tarafından açıklanmıştır.

Ayrıca purin nukleotidlerinin bazı antibiyotiklerin yapısında bulunmaları (MARTIN ve LIRAS, 1981), bazı purin antimetabolitlerin kanser tedavisinde kullanılmaları nedeniyle purin türevlerinin farmakolojik alanda da önemli rolleri vardır (HENDERSON ve PATERSON, 1973).

Purin üretiminde purin metabolizmasının çeşitli kademelerinde bloke edilmiş mutantlar kullanılmaktadır. Bu mutantlardan bazıları ortama purin metabolizmasına ait ürünler salgırlar. Bunlar arasında purin nukleotidleri *de novo* biyosentezinde inozin monofosfatın (IMP) adenilosuksinata

(s-AMP) dönüşümünü katalizleyen adenilosuksinat sentetaz (s-AMP sentetaz) enzimi bulunmayan *Neurospora crassa ad8* mutantının (PARTRIDGE ve GILES, 1957; PENDYALA ve WELLMAN, 1975, SABINA ve ark., 1976 - SABINA ve ark.'dan 1979). *Saccharomyces cerevisiae ad12* mutantının (DORFMAN, 1969; ARMITT ve WOODS, 1970) üredikleri ortama inozin ve hipoksantin; *S. pombe ade2* mutantının (POURQUIE ve HESLOT, 1971) inozin salgıladıkları; *Aspergillus nidulans adB* mutantının (BAL ve PIENIAZEK, 1979) ve *Bacillus subtilis*'in RDA 16 mutantının inozin biriktirdiği saptanmıştır. (MOMOSE ve SHIIO 1969-ISHII ve SHIIO'dan, (1972). Ayrıca *Schizosaccharomyces pombe*'nin *de novo* purin biyosentezinin ilk kademesinden sorumlu ve 8-azaguanine dirençli *aza1* mutantı ürettiği ortama hipoksantin ve inozin (HESLOT ve ark., 1966) *Brevibacterium ammoniagenes* adenin mutantlarının IMP salgıladıkları bilinmektedir (FRUYA ve KYOKAISHI, 1978 - TESHIBA ve FRUYA'dan, 1983).

Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz enzimi (HGPRT ase) olmayan *Escherichia coli*'nin adenin ilaveli besiyerinde adenini inozin yoluyla hipoksantine çevirip ortama salgıladığı (MANS ve KOCH, 1960-SABINA ve ark.'dan 1979) aynı enzimi eksik *S. pombe*'nin *pur 1* mutantının ürettiği ortama hipoksantin ve inozin salgıladığı saptanmıştır (POURQUIE ve HESLOT, 1971; REICHERT ve WINTER, 1974-SABINA ve ark.'dan 1979).

Maya tipinde bir mikroorganizma olan *Schizosaccharomyces pombe* uzun yıllardan beri Amerika'nın doğu eyaletlerinde, Afrika'nın çeşitli bölgelerinde, Doğu ve Batı Hint Adalarında rom yapımında kullanılmaktadır (HARRISON ve GRAHAM, 1970). Ayrıca şarap yapımında yararlanılabileceği düşünülmektedir (ROSE ve HARRISON'dan - 1970).

25-30 yıldan beri yoğun biçimde gerçekleştirilen çalışmalarla hücre biyolojisi ve genetiği hakkında geniş bilgiler saptanmış olan bu organizmanın endüstriyel boyutta fermentasyon çalışmalarında kullanılabilmesi amacıyla son yıllarda sürekli kültürlerdeki üreme kinetiği de araştırılmaktadır (VRANA, 1983).

Bu çalışmada *Schizosaccharomyces pombe*'nin adeniloksuksinat sentetaz enzimi eksik olan *ade2* mutantında üreme ve purin salgılaması üzerine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır.

II. MATERYAL METOD

1. Mikroorganizma

Bu araştırmada mantarların *Ascomycetes* sınıfından maya tipinde bir mikroorganizma olan *Schizosaccharomyces pombe* Linder str *Liquafaciens*'in *ade2-739h⁻* mutanı kullanıldı. Bir adenin oksotrofu olan bu suş 5'-inozin monofosfattan (5'-IMP) adenilosuksinatın (s-AMP) sentezini katalizleyen adenilosuksinat sentetaz (s-AMP sentetaz) enzimi eksikliği göstermektedir (WANNER 1955, NAGY ve ark., 1973). Üremesi için kesinlikle adenine gereksinim duyan bu mutant aynı organizmanın beyaz renkli kolonilere sahip yabani tipinden farklı olarak katı besiyerinde pembe renkli koloniler oluşturmakta ve ürediği ortama purin nukleotidleri biyosentezi yoluna ait ara ürünler salgılamaktadır.

Bu suş İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim dalındaki Maya kültür koleksiyonundan elde edildi.

2. Besiyerleri

S. pombe ade2-739h⁻ suşunun üretilmesinde GUTZ ve ark., (1974) tarafından önerilen besiyerleri kullanıldı. Aşağıda içerikleri verilen bu besiyerleri distile su kulla-

nılarak hazırlandı. Tüm besiyerleri otoklavda 121°C'da (1 atmosferde) 20 dakika tutularak steril edildi.

Maya ekstrelı sıvı besiyeri (YEL)

Glukoz (Merck).....	30g/l
Maya ekstresi (Yeast extract-Difco).....	5g/l

Maya ekstrelı katı besiyeri (YEA)

YEL ile aynı içeriğe sahiptir. Sadece 20g/l agar (Gibco) ilave edilerek hazırlandı.

Minimal katı besiyeri (MMA)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1g/l
KH_2PO_4	1g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500mg/l
NaCl.....	100mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5g/l
H_3BO_3	500µg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40µg/l
KI.....	100µg/l
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200µg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	400µg/l
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	160µg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400µg/l
Glukoz.....	10g/l

Biotin.....	10µg/l
Kalsiyum pantotenat.....	1mg/l
Nikotinik asid.....	1mg/l
Meso-inositol.....	10mg/l
Agar.....	20g/l

Adenin ilaveli minimal katı besiyeri (MMA + adenin)

MMA için kullanılan bileşime sterilizasyondan sonra 50 mg/l adenin çözeltisi eklendi.

YEL ve YEA besiyerleri süşun üretilmesinde MMA ve MMA + adenin besiyerleri ise süşun saflığının kontrolünde kullanıldı.

3. Metod

A. Süşun saflığının kontrolü.

Araştırmada kullanılan organizma silika jel (Çap: 0,2-0,5 mm-Merck) içinde ve +4°C'de saklanan (GUTZ ve ark. 1974) ştoklardan alındı. YEA'ya ekilerek 30°C'de aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı; 3 günlük kültürlerden azaltma yöntemi ile YEA besiyeri içeren petrilere ekim yapıldı. Bu petrilere 3-5 gün sonra gözlenen pembe renkli kolonilerin bir kaç tanesinden MMA ve MMA + adenin besiyeri içeren petrilere ekim yapıldı. MMA + adenin besiyerlerinde üreyen fakat MMA'da üremeyen kolonilerden biri seçildi. Bu kolonilerden alı-

nan örnek eğri YEA besiyerine ekilerek 3 gün 30°C'de üretil-
di. Kültür daha sonra +4°C'de saklandı. Susun çalışma süre-
since ayda bir kere pasajları yapıldı ve zaman zaman saflığı
kontrol edildi.

B. Organizmanın kesikli kültürünün elde edilmesi:

3 günlük eğri YEA kültürleri 5 ml distile su eklene-
rek süspansiyon haline getirildi. İçerisinde yaklaşık 10^8
hücre/ml bulunan süspansiyondan erlen hacminin (250 ml) 1/5'i
kadar steril YEL (50 ml) bulunan erlenlere 0,5 ml örnek kul-
lanarak ekim yapıldı. Bu kültürlerin dairesel dönümlü (100
devir/ dak.) bir çalkalayıcıda (BRAUN, Lab-Shaker) 3 gün
süreyle üremesi izlendi. Ön deneylerde 20°C-40°C arasında
çeşitli aralıklardaki sıcaklık dereceleri denendi. Çalışma-
da daha sonra elde edilen bulgulara göre üremede belirgin
farklılıklar oluşturan 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 39°C, 40°C'
ler denendi.

C. Üremenin izlenmesi:

3 gün süreyle izlenen üreme, hücre sayısının veya
hücre kitlesinin ölçülmesi yoluyla değerlendirildi.

a. Hücre sayısının ölçülmesi

Üremedeki artış mililitredeki hücre sayısının hesap-
lanmasıyla değerlendirildi. Bu çalışmada mililitredeki hücre

sayısı mikroskopik sayım yöntemi ve koloni sayımı yöntemi ile bulundu.

1. Mikroskopik sayım yöntemi: Belli zaman aralıklarında alınan örnekler uygun oranlarda sulandırıldıktan sonra Thoma lamında (derinlik 0,01 mm; alan 0,0025 mm²) hücreler sayıldı. Elde edilen değerler,

Hücre sayısı x sulandırım oranı

Lam sabitesi

formülüne uygulanarak sonuçta kültürün mililitresindeki hücre sayısı bulundu.

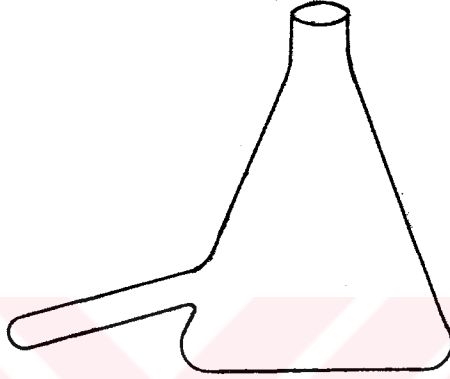
2. Koloni sayımı yöntemi: Bu yöntemde steril koşullarda belirli zaman aralıklarında alınan ve uygun oranlarda sulandırılan örnekler YEA besiyeri içeren petrilere ekildi ve 30°C'de tutuldu. 4-5 gün sonra petrillerdeki koloniler sayıldı. Aşağıda verilen formül ile kültürün mililitresindeki hücre sayısı hesaplandı.

$$\frac{\text{koloni sayısı}}{\text{sulandırım oranı}} \times \text{petriye yayılan örnek miktarı}$$

b. Hücre kitlesinin ölçülmesi:

Bu yöntemde üremenin değerlendirilmesi hücre kitlesindeki artışın ölçülmesiyle yapıldı. Hücre kitlesindeki artış optik dansitenin (OD) ölçülmesiyle nefelometrik olarak

saptandı. Ölçümler sırasında sterilitenin bozulmaması ve besiyeri hacminin azalmaması için cam tüpler eklenmiş olan özel erlenler kullanıldı (Şekil 2). Kültürlerdeki üreme belirli zaman aralıklarında bir fotoelektrik kolorimetrede



Şekil: 2. Özel üretim erleni

(ERMA) 530 nm dalga boyundaki ışık kullanarak bulanıklığın ölçülmesiyle saptandı. (OD) cinsinden elde edilen değerleri hücre/ml cinsine çevirmek için, aynı suşa ait kültürün mililitresindeki hücre sayısı bilinen çeşitli sulandırılmalarının kolorimetre 530 nm'de ölçülen OD değerleri ve bu değerlere karşılık gelen hücre/ml bulguları ile çizilen standart grafikten yararlanıldı.

D. Üreme eğrisinin saptanması:

Üremenin ölçülmesi bölümünde verilen yöntemlerle belirli zaman aralıklarındaki üreme değerlerinin yarı-logaritmik kağıt üzerinde zamana karşı hücre/ml cinsinden gösteril-

mesiyle, uygulanan farklı sıcaklık derecelerindeki üreme eğrileri elde edildi. Ön deneylerde mikroskopik sayım, koloni sayımı ve nefelometrik olarak hesaplanan hücre sayısı değerleri birbirleriyle paralellik gösterdiğinden çalışmanın sonraki aşamalarında üreme eğrileri sadece nefelometrik yöntemle saptanarak çizildi. Deneyler değişik sıcaklık derecelerinde elde edilen üreme bulguları ile optimum sıcaklık derecesinde elde edilen bulgular arasındaki farkların istatistik bakımdan önemli olup olmadıkları t-testi kullanılarak araştırıldı.

E. Morfolojik gözlemler:

Farklı sıcaklık derecelerinde üretilen deney materyalinin logaritmik üreme fazı sonunda kültürlerindeki hücreler ışık mikroskopunda incelendi ve morfolojik farklılıklar mikrofotoğraflar halinde verildi.

F. Generasyon süresinin, generasyon sayısının ve özel üreme hızının hesaplanması:

Logaritmik üreme sırasında hücrelerin kaç bölünme geçirdiğinin ifadesi olan generasyon sayısının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı (MOAT, 1979; BOYD, 1984),

$$\text{Generasyon sayısı (n)} = \frac{\log N_2 - \log N_1}{\log 2}$$

N_2 : logaritmik üreme sonundaki hücre sayısı.

N_1 : Kültürde üremenin başlangıcındaki hücre sayısı.

Hücrelerin logaritmik üreme sırasında iki katına çık-
maları için gerekli süre olan generasyon süresinin (g_t) he-
saplanmasında $\frac{T_2 - T_1}{n}$ formülü kullanıldı (MOAT, 1979).

T_2 → Logaritmik üremenin bitiş zamanı

T_1 → Logaritmik üremenin başlama zamanı

Özel üreme hızı (μ_g) aşağıdaki formüle göre hesap-
landı (MOAT, 1979).

$$\mu_g t = \log_e X_t - \log_e X_0$$

X_0 = üreme başlangıcındaki popülasyondaki hücre sayısı

X_t = t zamanında popülasyondaki hücre sayısı

G. Salgılanan ürünün saptanması

Purin nukleotidleri salgılaması yapan *S. pombe ade2* mutantının salgı ürünlerini saptamak için ince tabaka kromo-
tografisinden (TLC) yararlanıldı. TLC'de UV'ye duyarlı si-
lika jel plaklar (Silika jel 60 F-254, kalınlık; 0,25 mm,
MERCK) kullanıldı. Değişik sıcaklık derecelerinde üretilen
ve logaritmik üreme fazı sonuna ulaşmış kültürler 2500 de-

vir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıdan alınan 10 µl'lik örnekler plağa uygulandı. Kontrol olarak Hipoksantin (Fluka) 1,2 N HCl (Merck indeksi) içerisinde eritilmiş 10 mg/ml çözeltisinden 1 µl, inozinin (Sigma) su-
da hazırlanmış 16 mg/ml'lik çözeltisinden 1 µl, YEL'den 10 µl kullanıldı. Plaklar 3;7 oranında karıştırılmış amonyak-izopropanol yürütücü sisteminde 3-4 saat tutuldu (BAL ve PIENI-AZEK-1979). Daha sonra oda sıcaklığında kurutuldu ve 244 nm'lik dalga boyundaki UV ışığı altında gözlenen lekelerin büyüklüğü ve cinsi kalitatif olarak incelendi.

III. BULGULAR

1. Sıcaklığın Üreme Üzerine Etkileri

Schizosaccharomyces pombe ade 2 739 h⁻ mutantının değişik sıcaklık derecelerinde (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 39°C, 40°C) üremesinin 3 gün boyunca izlenmesi sonucunda logaritmik üreme fazının sonuna yaklaşık 56 saatte ulaştığı saptandı. Bu süre içerisinde belirli zaman aralıklarında elde edilen değerler standart hataları ile birlikte Tablo 1 de verildi ve bu değerlere göre çizilen grafik Şekil 3'de gösterildi.

Suşun üremesinde, üremenin başlamadığı kısa bir lag fazdan sonra, 40°C hariç, diğer sıcaklık derecelerinde 2 farklı aşamadan oluşan bir logaritmik faz gözlemlendi. Logaritmik fazın I. aşamasındaki üreme hızının II. aşamadaki üreme hızına göre daha yüksek olduğu saptandı.

Şekil 3'de de görüldüğü gibi bu suş için optimum üreme derecesi 30°C olarak belirlendi. Sıcaklığın 35°C çıkması üremeyi önemli derecede etkilemedi. Buna karşılık 40°C de uzunca bir lag fazdan sonra kısa bir logaritmik fazı takiben durağan faza girdiği için bu suşun üremesinde önemli azalmaya yol açan sıcaklık derecesini saptamak üzere 35°C ile 40°C derece arasında sıcaklık dereceleri denendi ve üremeyi önemli derecede engelleyen sıcaklık sınırınının 39°C olduğu saptandı. 25°C de optimum üremeye yakın değerler elde edildi. 20°C de ise op-

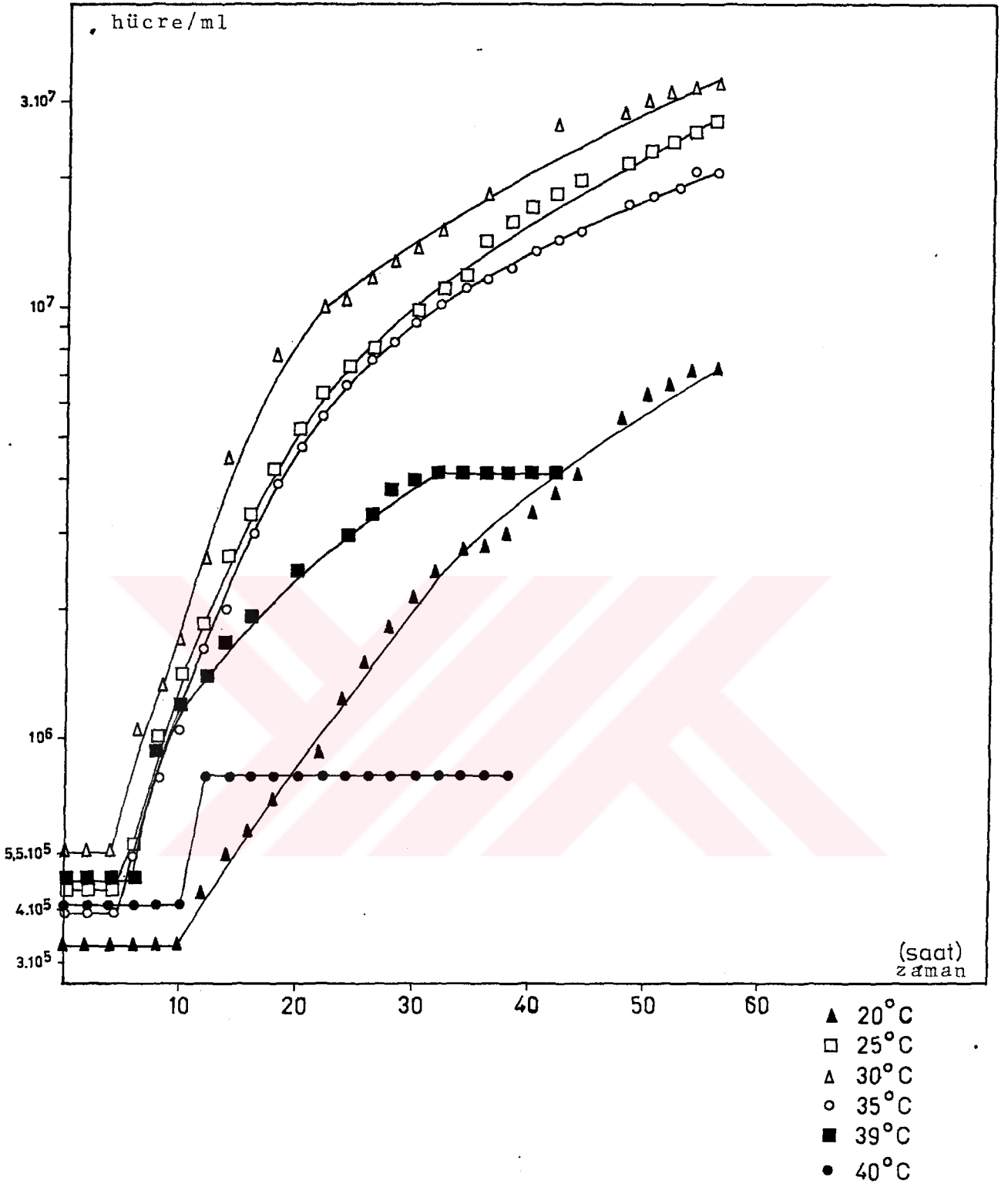
timum üremeye göre önemli bir düşüş meydana geldiği; 10 saat süren bir lag fazdan sonra süşun logaritmik üremeye başladığı ve 34. saatte logaritmik fazın II. aşamasına girerek üremeye devam ettiği izlendi. Optimum üreme (30°C) ile 20°C ve 39°C deki üremeler arasındaki farkın istatistik bakımından anlamlı, 35°C ve 25°C deki üremeler arasındaki farkın ise anlamsız olduğu saptandı.

2. Sıcaklığın Generasyon Süresi, Generasyon Sayısı ve Özel Üreme Hızına Etkileri

Çeşitli sıcaklıklarda üretilen *S. pombe ade 2 739h⁻* kültürlerinde hesaplanan generasyon süresi, generasyon sayısı ve özel üreme hızına ait değerler Tablo 2'de verildi. Bu tabloda görüldüğu gibi optimum üremenin gözlendiği 30°C 'de logaritmik üremenin I. aşamasında generasyon süresinin diğer sıcaklık derecelerine göre kısa, buna bağlı olarak generasyon sayısının ise fazla olduğu bulundu. Sadece 39°C de logaritmik fazın I. aşamasının kısa olması ve log fazın daha uzun olmasıyla ilgili olarak generasyon süresinin 30°C dekinden de kısa olduğu hesaplandı. Şekil 2'den de izleneceği gibi üreme eğrileri paralellik gösteren 35°C ve 25°C lerde generasyon süreleri ve generasyon sayılarının da birbirine çok yakın olduğu belirlendi.

Tablo 1: *Schizosaccharomyces pombe* ade 2 739 h⁻ mutantının farklı sıcaklıklarda YEL içinde üremesi

Zaman (saat)	Hücre sayısı (x10 ⁷ /ml)					
	20°C	25°C	30°C	35°C	39°C	40°C
2	0.03 ± 0.02	0.043 ± 0.02	0.055 ± 0.02	0.04 ± 0.014	0.046 ± 0.006	0.04 ± 0.006
4	0.03 ± 0.02	0.043 ± 0.02	0.055 ± 0.02	0.04 ± 0.014	0.046 ± 0.006	0.04 ± 0.006
6	0.03 ± 0.02	0.66 ± 0.017	0.106 ± 0.024	0.053 ± 0.017	0.046 ± 0.006	0.04 ± 0.006
8	0.03 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.133 ± 0.029	0.08 ± 0.02	0.093 ± 0.013	0.04 ± 0.006
10	0.03 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.113 ± 0.028	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.006
12	0.043 ± 0.02	0.17 ± 0.017	0.26 ± 0.053	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.082 ± 0.012
14	0.053 ± 0.01	0.26 ± 0.012	0.44 ± 0.03	0.2 ± 0.028	0.166 ± 0.006	
16	0.06 ± 0.01	0.32 ± 0.012	0.66 ± 0.04	0.3 ± 0.023	0.193 ± 0.006	
20	0.08 ± 0.02	0.51 ± 0.017	0.96 ± 0.06	0.48 ± 0.02	0.24 ± 0.006	
24	0.13 ± 0.028	0.7 ± 0.012	1.07 ± 0.1	0.62 ± 0.04	0.29 ± 0.017	
28	0.18 ± 0.042	0.83 ± 0.012	1.27 ± 0.11	0.83 ± 0.017	0.37 ± 0.028	
32	0.24 ± 0.05	1.07 ± 0.023	1.49 ± 0.12	1.02 ± 0.028	0.41 ± 0.028	
36	0.28 ± 0.037	1.48 ± 0.08	1.81 ± 0.15	1.18 ± 0.04	0.41 ± 0.028	
42	0.37 ± 0.034	1.79 ± 0.03	2.7 ± 0.13	1.46 ± 0.046	0.41 ± 0.028	
48	0.55 ± 0.037	2.16 ± 0.034	2.75 ± 0.25	1.8 ± 0.058		
52	0.65 ± 0.05	2.38 ± 0.05	3.06 ± 0.26	1.94 ± 0.058		
56	0.72 ± 0.06	2.63 ± 0.046	3.29 ± 0.37	2.07 ± 0.05		

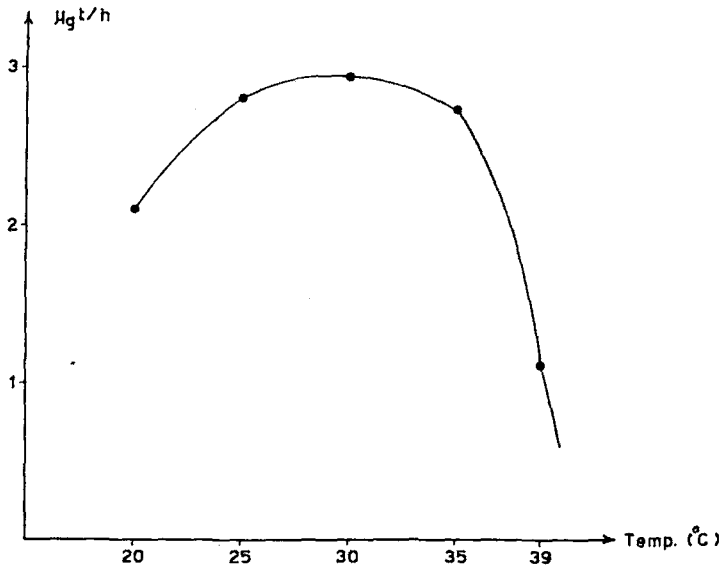


Şekil 3. *Schizosaccharomyces pombe ade 2 739h⁻* mutan-
tının farklı sıcaklıklardaki üreme eğrileri

Özel üreme hızlarının 30°C nin altında ve üstündeki sıcaklık derecelerinde azalmasının, (Tablo 2, Şekil 4) generasyon sayısı ve generasyon süresindeki değişimlerle uygunluk gösterdiği saptandı.

Tablo 2: Farklı sıcaklık derecelerinde *Schizosaccharomyces pombe ade2 739h⁻* mutantının logaritmik fazının I. aşamasındaki generasyon sayıları, generasyon süreleri ve özel üreme hızları

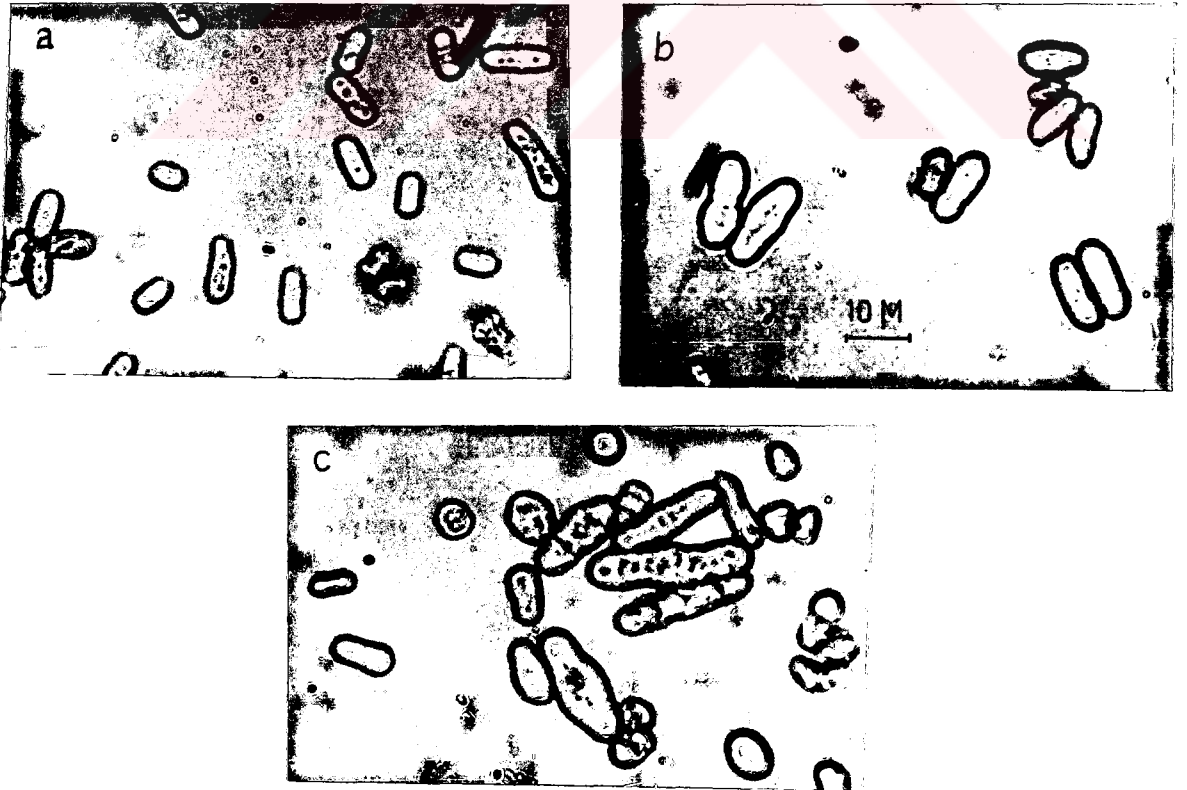
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Generasyon sayısı (n)	Generasyon süresi (gt) (saat)	Özel üreme hızı (Mgt) (h^{-1})
20	3.03	7.54	2.10
25	4.06	4.54	2.81
30	4.18	4.18	3
35	4.02	5	2.78
39	1.9	3.09	1.11



Şekil 4. Farklı sıcaklık derecelerinde *Schizosaccharomyces pombe ade2 739h⁻* mutantının özel üreme hızları (Mgt)

3. Sıcaklığın Hücre Morfolojisi Üzerine Etkileri

Farklı sıcaklık derecelerinin üreme üzerine yaptığı etkilerle ilgili olarak hücre morfolojisine etkileri ışık mikroskopuyla incelendiğinde üreme için optimum sıcaklık derecesinde (30°C) hücrelerin elipsoidal ve globular biçimde olduğu, bölünmede septumun hemen hemen ortada meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 5a). 25°C ve 35°C sıcaklıklarının hücrelerin morfolojisinde ve bölünmedeki normal septum oluşumunda bir farklılık meydana getirmediği, buna karşılık 39°C (Şekil 5b) ve 40°C (Şekil 5c) sıcaklıkta üretilen kültürlerdeki hücrelerin daha büyük olduğu ve bölünmede septum oluşumunda anormallikler meydana geldiği gözlemlendi.



Şekil 5. (a) 30°C de, (b) 39°C de, (c) 40°C de üretilen *Schizosaccharomyces pombe ade2 739h⁻* mutantının hücrelerinin morfolojisi

4. Sıcaklığın Purin Salgılaması Üzerine Etkileri

Schizosaccharomyces pombe ade 2 739h⁻ mutantının purin metabolizması ürünlerinden hipoksantini salgıladığı ince tabaka kromatografisi ile saptandı (Şekil 6). Bu suş için optimum üreme sıcaklığı olan 30°C de hipoksantin salgılamasının en fazla buna karşılık üremenin çok az olduğu 39°C de hipoksantin salgılamasının en az olduğu belirlendi. Optimuma yakın üreme görülen 25°C de hipoksantin salgılamasının 30°C ki salgılamaya yakın olduğu kalitatif olarak gözlemlendi. Buna göre, hipoksantin salgılanma derecesinin suşun üreme hızı ve sonuçta meydana gelen hücre sayısına bağlı olduğu sonucuna varıldı.

TLC plaklarında izlenen ve farklı sıcaklıklarda aynı büyüklükte olan inozine ait lekelerin ise besiyeri olarak kullanılan YEL'in içeriğinde bulunan inozinin karşılığı olduğu saptandı (Şekil 6).



Şekil 6. 30°C, 25°C ve 39°C de üretilen *Schizosaccharomyces pombe ade 2 739h⁻* mutantının purin salgılaması.

IV. TARTIŞMA

Sıcaklığın mikroorganizmaların yaşamsal fonksiyonlarında ve bu arada üreme ve çeşitli metabolik ürünlerin oluşum mekanizmasında etkili olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada *Schizosaccharomyces pombe ade2* mutantının 40°C hariç kullanılan diğer bütün sıcaklık derecelerindeki (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 39°C) üremesinde göze çarpıcı bir özellik logaritmik fazın hızları farklı 2 aşamadan oluşmasıdır. Logaritmik fazın I. aşamasında hız II. aşamaya göre daha yüksektir. Aynı bulgu NAGY ve ark. (1974) tarafından *S. Pombe*'nin yabani tipinin ve *ade 2* mutantının maya ekstrelili besiyerinde üretilmeleri sonucunda da gözlenmiştir ve araştırmacılar bunu logaritmik fazın I. aşamasında ortamdaki adenini hızlı bir biçimde kullanan hücrelerin II. aşamada adenin açlığından dolayı daha yavaş üremeleri ile açıklamışlardır.

Çalışmada kullanılan *S. pombe ade 2* suşu için optimum üreme sıcaklığının 30°C olduğu bulundu. Bu organizma türü için uygun sıcaklık GUTZ ve ark. (1974) tarafından 30°C önerilmektedir. Buna karşılık MITCHISON, (1971) optimum sıcaklık derecesi olarak 32°C-36°C saptamış çalışmalarında 32°C kullanmıştır. VRANA (1983) ise *S. pombe*'nin sürekli kültürlerini

28°C de elde etmiştir. *S. pombe* yabancı tipi ve çeşitli mutantlarıyla yapılan değişik çalışmalarda kullanılan sıcaklıklar 28-32°C arasında değişmektedir. *S. pombe*'de sıcaklığın hücre boyutu, morfolojisi ve üremesi ile ilişkili çalışmalarda JOHNSON, 1968; MITCHISON, 1971; JOHNSON ve McDONALD, 1983 uygun sıcaklık olarak 32°C yi kullanmışlardır.

Optimal olan 30°C'den aşağıya ve yukarıya doğru sıcaklık derecelerine gidildikçe üreme eğrisi ve buna bağlı olarak çeşitli üreme özelliklerinin (Generasyon sayısı, generasyon zamanı, özel üreme hızı) değiştiği bulundu. Organizmanın denenen optimalden düşük sıcaklıklarda (20°C) yavaş bile olsa üremesine devam ettiği bulundu. Aynı şekilde MITCHISON (1963) *S. pombe*'de 17°C'de üremenin çok yavaş da olsa meydana geldiğini belirtmiştir. Optimalden yüksek sıcaklıklarda üreme için 39°C'nin bir üst sınır oluşturduğu 40°C'de ise hemen hiç üremenin olmadığı gözlemlendi. 40°C de üremenin olmaması sıcaklığın etkisiyle enzimlerin veya diğer hücre yapıtaşlarının (DNA, RNA, proteinler, hücre membranları gibi) inaktive olmasıyla ilgilidir (STOKES, 1971).

Mayaların yüksek sıcaklıkta üretilmeleri veya uzun sürelerle sıcakta tutulmalarının enzimlerinin yıkımına yol açtığı, hücre membranına zarar verdiği ve diğer hücre fonksiyonlarını engellediği saptanmıştır (STOKES, 1971).

BROWN ve ROSE (1969) (STOKES'den, 1971) *Candida utilis*'deki bulgularına göre özellikle hücre membranı yağ asitlerinin, bu mayaların üremesi için saptanan sınır sıcaklıklarda kontrol faktörü olabileceğini tahmin etmektedirler.

Çalışmada optimum üreme derecesinde (30°C) özel üreme hızının da en fazla olduğu saptandı. *Saccharomyces cerevisiae*'nin da optimum üreme sıcaklığında maksimum özel üreme hızına ulaştığını saptanmıştır. (PARADA ve ACEVEDO, 1983; ITOH ve TAKAHASHI, 1983).

Generasyon süresinin de optimum üreme derecesinde en kısa olduğu gözlemlendi. MITCHISON (1971) *S. pombe*'nin yabani tipinde generasyon süresini ortalama 2.4 saat bulmuştur. Ayrıca farklı sıcaklık derecelerinin generasyon süresini etkilediğini, 32°C'de yaklaşık 2,4 saat olarak saptarken 20°C'de 7 saat, 25°C'de yaklaşık 4 saat 38°C'de yaklaşık 2,7 saat olarak belirlemiştir. Bizim bulgularımızda da farklı sıcaklık derecelerinde üretilen kültürlerde özel üreme hızlarının generasyon süreleri ve generasyon sayılarıyla orantılı olduğu saptandı.

Bu çalışmada ortam sıcaklığındaki özellikle artışın hücre morfolojisini de etkilediği gözlemlendi. Şekil 5a,b,c de görüldüğü gibi optimum üreme sıcaklığında (30°C) hücre-

lerin globular ve elipsoidal şekilde olduğu saptanırken, 39°C ve 40°C'lerde hücre boyutlarında artış ve bölünmelerde anormal septum oluşumları belirlendi. 39°C ve 40°C'de hücre bölünmesi zorlaştığı için hücre boyutunun arttığı düşünülebilir. JOHNSON (1968) *S. pombe*'nin 32°C'deki kesikli kültürlerde hücre boyunun üreme siklusu sırasında değiştiğini, lag faz boyunca boyu artan hücrelerin logaritmik faza girdiklerini saptamıştır. Çalışmamızdaki bulgularımıza benzer şekilde MITCHISON (1971) 22°C-38°C arasındaki sıcaklıklarda *S. pombe*'de hücre boyunun hemen hemen sabit kaldığını, daha yüksek ve daha düşük sıcaklıklarda ise hücrelerin dallanma ve çeşitli anormallikler gösterdiğini gözlemiştir. JOHNSON ve McDONALD (1983) *S. pombe* sürekli kültürlerinde optimum üreme sıcaklığı olarak kullandıkları 32°C'de 72 saat sonra hücrelerin morfolojisinin kesikli kültürdeki gibi elipsoidal şekilde olduğunu hücrelerin yaklaşık orta noktasında oluşan septumla bölündüğünü saptamışlardır. Sıcaklık 20°C'ye düşürüldüğü zaman bölünmede önemli derecede bir azalma gözlerken aynı zamanda hücre boyunda dikkate değer bir artış saptamışlardır.

S. pombe ade 2 739h⁻ mutantının purin metabolizmasına ait ürünlerden hipoksantini salgıladığı ince tabaka kromatografisi yöntemiyle saptandı. Sıcaklığın salgılama ve üreme oranlarına etkisi arasında paralel ilişki gözlemlendi.

Purin nukleotidleri *de novo* biyosentezinde AMP'ye özgü yolun ilk aşamasını katalizleyen adenilosuksinat sentetaz enzimi eksik olan bu suшта biriken inozinatın, purinlerin birbirine dönüşüm mekanizmasına göre (HENDERSON ve PATERSON, 1973; MOAT, 1979) inozinatın inozine, inozinin de daha sonra hipoksantine dönüştüğü ve böylece hücre içinde biriken hipoksantin hücre dışına salgılandığı düşünüldü. POURQUETE ve HESLOT (1971) ise *S. pombe*'nin aynı suşunun inozin salgıladığını değişik analiz yöntemleriyle belirlemiştir. Bu tip farklı bulgular *Neurospora*'nın aynı enzimi eksik olan *ad 8* mutantında da saptanmıştır. PENDYALA ve WELLMAN (1975), SABINA ve ark. (1976) tarafından inozin salgılaması saptanırken PARTRIDGE ve GILES (1957), SABINA ve ark. (1976) tarafından da hipoksantin salgılaması gözlenmiştir. (SABINA ve ark.dan, 1979). Ayrıca s-AMP sentetazı bulunmayan *S. cerevisiae ad 12* mutantının hipoksantin ve inozin salgıladığı (DORFMAN, 1969; ARMITT ve WOODS, 1970) *Bacillus subtilis RDA-16* mutantının inozin (MOMOSE ve SHIIO, 1969-ISHII ve SHIIO'dan, 1971) *Aspergillus nidulans adB* mutantının hipoksantin biriktirdiği (BAL ve PIENIAZEK, 1979) saptanmıştır. BAL ve PIENIAZEK (1979) ürün birikiminin adenin oksotrofları seçiminde kriter olarak kullanılabileceğini de önermişlerdir.

Sonuç olarak ortam sıcaklığındaki değişmelerin *Schizosaccharomyces pombe ade 2 739h⁻* mutantının üremesi ve

bununla ilgili olarak hipoksantin salgılamasını etkilediği bulundu.

Bu bulguların, endüstriyel boyutlarda üretilme potansiyeline sahip bir mikroorganizma olan *S. pombe*'nin endüstriyel bakımdan önemli olabilecek bir ürün salgılayan *ade 2* mutantının sürekli kültürlerinde optimal koşulların belirlenmesi açısından yardımcı olabileceği düşünüldü.



V. Ö Z E T

Bu çalışmada ökaryotik bir mikroorganizma olan *Schizosaccharomyces pombe*'nin adenilosuksinat sentetaz enzimi eksik olan *ade2-739h⁻* mutantının üremesi ve purin salgılaması üzerine sıcaklığın etkisi araştırıldı.

Üremenin izlenmesinde mikroskopik sayım, koloni sayımı ve nefelometrik yöntemler kullanılmış; purin salgılanması ince tabaka kromatografisi ile gözlenmiştir.

Çeşitli sıcaklık derecelerinde (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 39°C, 40°C) üremesi izlenen *S.pombe ade2* suşunun 40°C hariç diğer sıcaklıklarda logaritmik üreme fazının hızları farklı iki aşamadan meydana geldiği; 30°C'nin bu mutantın üremesinde optimum sıcaklık olduğu saptanmıştır. Sıcaklık derecelerindeki değişmelerin üremenin çeşitli özelliklerini (Generasyon sayısı, generasyon süresi ve özel üreme hızı) ve hücre morfolojisini değiştirdiği gözlenmiştir.

Üremeye bağlı olarak 30°C'da hipoksantin salgılanmasının en fazla olduğu belirlendi. Sıcaklığın üreme üzerindeki etkilerine bağlı olarak hipoksantin salgılamasını da etkilediği saptanmıştır.

IV. LITERATUR

- ARMITT, S. and WOODS, R.A. (1970): Purine-excreting mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and Genetic analysis. Genet. Res., Camp. 15, 1970: 7-17.
- BAL, J. and PIENIAZEK, N.J. (1979): Detection of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide ribotide and hypoxanthine accumulation. A simple method for identification of some purine auxotrophs. Journal of Chromatography. 169,: 474-476.
- BLICKSTAD, E. (1983): Growth and end product formation of two Psychrotrophic *Lactobacillus* spp. and *Brochothricx thermosphacto* ATCC 11509^T at different pH values and temperatures. Applied and Enviromental Microbiology. Dec, 1983: 1345-1350.
- BODDY, L. (1983): Effect of temperature and water potential on growth rate of wood-rotting *Basidiomycetes*. Trans. Br. Mycol. Soc. 80, 1: 141-149.
- BOYD, R.F. (1984): General Microbiology, Phol, Witz, Virginia.
- BUSHELL, M.E. (1983): Application of the principles of industrial microbiology to biotechnology, in "Principles of Biotechnology" (edit-Wiseman, A.), *Surrey University*, Press, New York.
- COONEY, C.L. (1981: Growth of Microorganisms. in "Biotechnology, 1" (Edit: Rehm, H.J. and REED, G.) Verlag Chemie, Weinheim.
- DORFMAN, B.Z. (1969): The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. Genetics. 61, 1969: 377-389.

- ELMER, L. and GADEN, Jr. (1981): Production Methods in Industrial Microbiology. Scientific American. 245, 3: 181-196.
- GUTZ, H., HESLOT, H., LUPOLD, U. and LOPRIENO, N. (1974): *Schizosaccharomyces pombe*. In "Handbook of Genetics" 1: 395-446, Edit. KING, R.C. Plenum Press, New York.
- HARRISON, J.S. and Graham, J.C.J. (1970): Yeast in Distillery Practice, in "The Yeast, 3" (Edit. ROSE, H.A. and Harrison, J.S.) Academic Press, New York.
- HENDERSON, J.F. and PATERSON, A.R.P. (1973): Nucleotide Metabolism. Academic Press, New York.
- HESLOT, H., NAGY, M. and WHITEHEAD, E. (1966): Recherches génétiques et biochimiques sur la première de la biosynthèse des purines chez le *Schizosaccharomyces pombe*. C.R. Hebd. Seances, Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat. Paris 263: 57-58.
- HESLOT, H. (1972): Genetic control of the purine nucleotide pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today, 1972: 867-876.
- ISHII, K. and SHIIO, I. (1972): Improved inosine production and derepression of purine nucleotide biosynthetic enzymes in 8-azaguanine resistant mutant of *Bacillus subtilis*. Agr. Biol. Chem. 36, 1972: 1511-1522.
- ITOH, S. and TAKAHASHI, K. (1983): Calorimetric studies of Microbial Growth: Kinetic analysis of at various temperatures. Agric. Biol. Chem., 48, 2: 271-275.

- JOHNSON, B.F. (1968): Morphometric analysis of yeast cells II. Cell size of *Schizosaccharomyces pombe* during the growth cycle. *Experimental Cell Research*. 49, 1968: 59-68.
- JOHNSON, B.F. and MCDONALD I.J. (1983): Cell division: a Separable cellular Sub-cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of General Microbiology*. 129:3411-3419.
- KIMURA, A., MURATA, K., SHIMOSAKA, M. (1982): Proceedings of the IV th international Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Copyright 1983 by the Organizing Committee of GIM, 1982.
- MARTIN, J.F., LIRAS, P. (1981): Biosynthetic Pathways of Secondary Metabolites in Industrial Microorganisms in "Biotechnology" (Edit: Rehm, H.J., and REED, G.) Verlag Chemie, Weinheim.
- MITCHISON, J.M., KINGHORN, M.L., HAWKINS, G. (1963): The Growth of Single cells. IV. *Schizosaccharomyces pombe* at different temperatures. *Experimental Cell Research*, 30, 521-2527.
- MITCHISON, J.M. (1971): Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. In "Methods in cell physiology." Edit. PRESCOTT. D.M. 4:131165, Academic Press, New York.
- MOAT, A.G. (1979): Microbial physiology. John Wiley and Sons, New York.
- NAGY, M., DJEMBO-TATY, M. and HESLOT, H. (1973): Regulation of the biosynthesis of purine nucleotides in *Schizosaccharomyces pombe*. III. Kinetic studies of adenylosuccinate synthetase. *Biochim. Biophys. Acta* 309:1-10.

- NAGY, M ., REICHERT, U. and RIBET, A.-M.(1974): Regulation of purine metabolizm in *Schizosaccharomyces pombe*. IV. Variations in the stability and kinetic parameters of amido phoshoribosyl-transferase depending on growth phase and growth conditions. *Biochimica et Biophysica Acta.* 370:85-95.
- NURSE, P. (1975): Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, 256:547-551.
- PARADA, G. and ACEVEDO, F. (1983): On the relation of temperature and RNA content to the Specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering.* 15:2785-2788.
- PARTRIGDE, C.W.H. and GILES, N.H.(1957): Identification of major accumulalation products of adenine-specific mutants of *Neurospora*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 67, 1957:237-238.
- PEKİN, B. (1979): *Biokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)*, Birinci Kitap, Kısım: 1. Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir.
- POURQUITE, J. and HESLOT, H. (1971): Utilization and interconversions of purine derivatives in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genet. Res., Camp.* 18, 1971:33-44.
- ROLAND, J.O. and BEUCHAT, L.R. (1983): Infulence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssochlamys nivea* in Apple Juice. *Applied and Environmental Microbiology.* Jan., 1984: 205-207.
- ROSE, A.H. and HARRISON, J.S. (1970): *The yeasts*, Vol-3. Academic Press, New York.
- ROSE, A.H. (1981): The microbiological production of food and drink. *Scientific American.* 245, 3:127-138.

- SABINA, R.L., HANKS, A.R., MAGILL, J.M. and MAGIL, C.W.: (1979)
Role of purine base excretion in regulation of
purine pools. *Molec. gen. Genet.* 1973:31-38.
- STOKES, J.L. (1971): Influence of Temperature on the Growth
and Metabolism of Yeasts, in "The Yeast", 2 (Edit.
Rose, H.A. and HARRISON, J.S.) Academic Press,
New York.
- TESHIBA, S. and FURUYA, A. (1983): Mechanizms of 5`-inosinic
acid occumulation by permeabltly mutants of
Brevibacterium ammoniagenes. IV. Excretion
mechanizms of 5`-IMP. *Agric. Biol. Chem.* 48, 1984:
1311-1317.
- VRANA, D. (1983): The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*
in continuous culture. *Biotechnology and Bioengi-
neering.* 25 1989-1994.
- WANNER, H. (1955): Die Akkumulation von Hypoxanthin durch
adenin-abhägige Mutanten von *Schizosaccharomyces
pombe*. *Arch. Julius Klaus-Stigt. Vererbungsfarsch,
Sozianthropol. Rassenhyg.* 30:516-520.