

1775


İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI

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

Yüksek Lisans Tezi
Şule EKMEKÇİLER

Tez danışmanı : Yard. Doç. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Eylül - 1985
İstanbul


Yükseköğretim Kurulu
Değerlendirme Merkezi

TEŞEKKÜR

Biyoteknoloji alanında ilk kez Yüksek Lisans düzeyinde bir eğitimin gerçekleştirilmesi için yoğun çabalar harcamasıyla bu alanda bu tür bir eğitim yapabilme olanağını elde ettiğim Hocam, Prof. Dr. Gönül BARA'ya çok teşekkür etmek isterim.

Tez çalışmamın seçimi ve sürdürülmesi aşamalarında deneyimlerinden ve yönlendirici fikirlerinden yararlandığım tez danışmanım Yard. Doç. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya ve Doç. Dr. Güler ORALER'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, Prof. Dr. Ayfer BAPÇUM'a, Prof. Dr. Ayhan ULUBELEN'e, Doç. Dr. Avni KURU'ya ve Dr. Atok OLGUN ile çizim işlerindeki yardımlarından dolayı Celal DAR ve Ahmet VATANSEVER'e, tezin ciltlenmesini gerçekleştiren İ.Ü. Fen Fakültesi Matbaası'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ	1
II. MATERYEL ve METOD.....	9
1. Kullanılan Organizma.....	9
2. Kullanılan Besiyerleri.....	9
3. pH Ayarlamaları.....	11
4. Metod.....	12
4.1. Suşun Saflığının Kontrolü.....	12
4.2. Organizmanın Kesikli Kültürünün Elde Edilmesi.....	12
4.3. Üremenin İzlenmesi.....	13
4.3.1. Hücre Sayısının Ölçülmesi... ..	13
4.3.1.1. Direkt Mikroskopik Hücre Sayımı Yöntemi.....	13
4.3.1.2. Koloni Sayımı Yöntemi	14
4.3.2. Hücre Kitesinin Ölçülmesi.. ..	14
4.4. Üreme Eğrisinin Saptanması.....	15
4.5. Generasyon Süresi, Generasyon Sayısı ve Özel Üreme Hızının Hesaplanması.....	16
4.6. Salgılanan Ürünün Saptanması.....	17
III. BULGULAR.....	19
1. pH'nın <i>Schizosaccharomyces pombe ade2</i> Mutantı'nın Üremesi Üzerindeki Etkileri.. ..	19
2. pH'nın Generasyon Süresi, Generasyon Sayısı ve Özel Üreme Hızı Üzerindeki Etkileri.....	23

3. pH'nın <i>Schizosaccharomyces Pombe ade2</i> Mutantı'nın Purin Salgılaması Üzerindeki Etkileri.....	24
IV. TARTIŞMA.....	26
V. ÖZET.....	32
VI. LİTERATÜR.....	33



I. G İ R İ Ş

Mikroorganizmalar, çeşitli biyolojik molekülleri üretebilmeleri ve bazılarını salgılayabilmeleri bakımından büyük bir potansiyele sahiptirler. Bu nedenle milattan önceki yıllardan bu yana, çeşitli amaçlar için kullanılmaktadırlar (Demain ve Solomon, 1981). Günümüzde de mikroorganizmalardan endüstriyel boyutlarda maksimum ürün elde edebilmek amacıyla, çeşitli araştırmalar yoğun bir biçimde sürdürülmektedir.

Mikroorganizmaların üreme hızları ve metabolik aktiviteleri, çevre koşullarından önemli derecede etkilenir. Bu nedenle üreme ve metabolik ürün oluşumunun artırılması, fiziksel ve kimyasal dış koşullar ile mikroorganizma metabolizmasının regülasyonu arasındaki ilişkinin anlaşılmasına bağlıdır. Ozmotik basınç, sıcaklık, ışık, manyetik alan, su, hidrostatik basınç fiziksel koşullar; pH, C ve N kaynakları ile diğer kimyasal maddeler de kimyasal çevre koşulları olarak sıralanabilir (Rehm ve Reed, 1981).

Kimyasal çevre koşullarından H^+ aktivitesinin bir ölçümü olan pH, çeşitli biyolojik olaylar üzerinde etkilidir. Bunlar arasında; enzimler ve metabolitlerin oluşması, hücrenin permeabilitesinin (geçirgenliğinin) değişimi, çeşitli bileşenlerin eriyebilirliği, proteinlerin izoelektrik

noktalarına göre presipite (çökmesi) ve koagüle olması, bunların sonucu olarak morfolojik yapı, üreme ve dolayısı ile biyomas oluşumu, metabolitlerin salgılanması sayılabilir (Moat, 1979; Rehm ve Reed, 1981; Swada, 1981; Greenman ve ark., 1983; Olivero ve ark., 1982; Therion ve ark., 1982; Blickstad, 1983; Johnson ve McDonald, 1983; Read ve Seviour, 1984; Montville ve ark., 1985).

pH'nin mikroorganizmaların üremeleri üzerindeki etkileri, bugüne kadar çeşitli araştırmacılar tarafından değişik mikroorganizmalarda gösterilmiştir. Bu konuyla ilişkili olarak son yıllarda yapılan araştırmalar arasında; *Saccharomyces cerevisiae*'nin solunum eksikliği gösteren bir mutantında (Swada, 1981), *Propionibacterium acnes*, *P. avidum* ve *P. granulosum*'da (Greenman ve ark., 1982), *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Selemonas ruminatum* subsp. *lactilytica*, *Megasphaera elsdenii*, *Veillonella alcalescens* ve *Propionibacterium acnes* bakterilerinde (Therion ve ark., 1982), maltoz fermente eden *Saccharomyces cerevisiae*'de (Olivero ve ark., 1982), *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus*. sp. strain 173 ve *Brochotrix thermosphacta*'da (Blickstad, 1983), *Acremonium diospyri* mayasında (Read ve Seviour, 1984) ve *Clostridium sporogenes*'deki (Montville ve ark., 1985) çalışmalar sayılabilir. Birçok mikroorganizmanın pH=3-4, mayaların ise pH=4-5 arasında optimum olarak üredikleri bilinmektedir. Ancak verilen bu pH alanları geniş sı-

nırlar olup, her mikroorganizma türüne özgü belli bir optimum pH değeri vardır (Rehm ve Reed, 1981).

Hücrede oluşan pekçok metabolik reaksiyon arasında, primer metabolitlerin önemli bir grubu olan purin ve pirimidin nukleotidlerinin biyosentezi yer almaktadır. Nukleotidlerin; DNA, RNA ve bazı vitaminlerde yapısal birimler olarak yer almalarının yanı sıra, adenozin trifosfat (ATP), guanozin trifosfat (GTP) ve koenzimlerin yapılarına girerek enerji metabolizmasında, bazı metabolik olayların da regülasyonunda fonksiyonları vardır. Metabolizmalarındaki bazı aksaklıklar, çeşitli hastalıklara (gut, orotik asidüri, Lesch-Nyhan sendromu) neden olabilir. Ayrıca adenozin analoglarının antitümör aktivitesi gösterdikleri (Henderson ve Paterson, 1973), bazı purin ve pirimidin bazlarının antibiyotiklerin yapılarında buldukları bilinmektedir (Suhaldonik, 1970-Rehm ve Reed'den, 1981).

Çeşitli mikroorganizmalar ve bu arada bazı mayalar tarafından fazla miktarda üretilen ve salgılanan nukleotidler ve onların türevleri, tatlandırıcı olarak besin endüstrisinde kullanılmaktadır. Günümüzde inozin, guanin, ksantin, nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), flavin adenin dinukleotid (FAD), guanilik-, ksantilik-, ribonukleotid asitler, inozin monofosfat (IMP), guanin monofosfat (GMP) gibi purin ve pirimidin nukleosit 5'-monofosfatları fermentas-

yonla üretilen önemli bileşiklerdir (Pekin, 1979; Kimura ve ark., 1982).

Purin ve pirimidin metabolizmasındaki primer metabolitlerden olan 5'-GMP'nin tatlandırıcı özelliğinden, Japon besin endüstrisinde büyük ölçüde yararlanılmaktadır (Nakao, 1979-Wiseman'dan, 1983; Teshiba ve Furuya, 1984). 5'-UMP ve 5'-CMP'nin yararsız ürünler olarak düşünülmesine karşın, yüksek oranda sitidin türevlerine ve şeker nukleotidlerine çevrilmeleri, mikroorganizma olarak *Hansenula jadinii* kullanılan çalışma ile gösterilmiştir (Kimura, 1975, 1978; Kimura ve ark.'dan, 1982). 5'-IMP'nin *Brevibacterium ammoniagenes* IV mutantlarından (Teshiba ve Furuya, 1984) ve *Bacillus ammoniagenes*'in bir adenin oksotrofundan bol miktarda elde edilmesine ilişkin tanımlamalar yapılmıştır (Nakao, 1979-Wiseman'dan, 1983) ve 5'-IMP Japon besin endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Nakao, 1979-Wiseman'dan, 1983).

Ayrıca inozin, hipoksantin, ksantin, ürik asit, adenilosüksinik asit ve adenin biriktiren ve salgılayan çeşitli mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar vardır (Partridge ve Giles, 1957; Mans ve Koch, 1960-Sabina ve ark.'dan, 1979; Demain ve Hendlin, 1967; Pourquoi ve Heslot, 1971; Reichert ve Winter, 1974-Sabina ve ark.'dan, 1979; Pendyala ve Wellman, 1977-Sabina ve ark.'dan, 1979; Sabina ve ark., 1979). Bu

çalışmalardan, purin nukleotidleri *de novo* biyosentezine ait inozin monofosfat'ın (IMP) adenilosuksinat'a (s-AMP) dönüşümü aşamasında iş gören adenilosuksinat sentetaz enzimi eksik mikroorganizmalardan bazılarına örnek olarak şunlar verilebilir. *Neurospora crassa*'nın *ad-8* mutanti hipoksantin ve inozin (Partridge ve Giles, 1957; Sabina ve ark., 1976-Partridge ve Giles, 1959-Sabina ve ark.'dan, 1979), *Saccharomyces cerevisiae*'nin *ad-12* mutanti hipoksantin ve inozin (Dorfman, 1969; Armitt ve Woods, 1970), *Schizosaccharomyces pombe*'nin *ade2* mutanti'nin inozin salgıladığı saptanmıştır (Pourquie ve Heslot, 1971). *Aspergillus nidulans*'ın *adB* mutanti'nin hipoksantin (Bal ve Pieniazek, 1979) ve *Bacillus subtilis*'in RDA-16 mutantının ise inozin biriktirdiği bilinmektedir (Momose ve Shio, 1969-Ishii ve Shio'dan, 1972).

Purin nukleotidlerinin biyosentezi yollarından biri Şekil-I'de görülen, çok kademeli *de novo* sentezdir (Moat, 1979). *de novo* biyosentez yolu purin yapısında olmayan bir madde (Riboz-5-P) ile başlar, çeşitli enzimlerin katalizörlüğü ile AMP ve GMP ile sonlanır. *de novo* sentezin araştırılan tüm organizmalardan aynı şekilde olduğu saptanmıştır (Henderson ve Paterson, 1973; Holmes ve ark., 1976-Moat, 1979). Ayrıca Şekil-I'de purin nukleotidlerinin hücrede birbirlerine dönüşebildiği gösterilmiştir (Moat ve Friedman, 1960-Pourquie ve Heslot'dan, 1971).

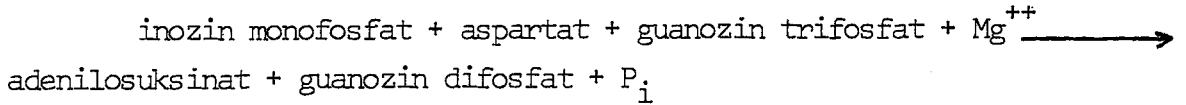
Fungusların *Ascomycetes* alt sınıfından olan *Schizosaccharomyces pombe*, hemen hemen sabit çaplı silindirik biçiminde hücrelere sahip maya tipinde bir mikroorganizmadır (Mitchison, 1970). Son 20-25 yıldan beri, birçok besiyerinde havalandırmaya gereksinim duymaksızın üreyebilmesi ve birçok mikroskop yöntemlerinin uygulanmasına elverişliliği gibi çeşitli özellikleri nedeniyle model bir ökar-yotik hücre olarak (Ino ve Yamamoto, 1985) hücre biyolojisi ve genetik çalışmalarda geniş çapta kullanılmaktadır. Ayrıca Vrana (1983) tarafından *S. pombe*'nin üreme kinetiğinin değerlendirilmesi için sürekli kültürü de yapılmıştır.

Schizosaccharomyces cinsinden, şarap ve rom gibi alkollü içkilerin yapımında yararlanılmaktadır (Rose ve Harrison, 1970), ve bu alanlarda kullanılmak üzere belli türleri belirlenmiştir. Bunlardan biri olan, *Schizosaccharomyces pombe*'nin şarap (Ribéreau-Gayon ve Peynaud, 1962-Mayer ve Temperli, 1963-Peynaud, 1964-Peynaud ve Sudraud, 1964-Benda ve Schmitt, 1966-Rose ve Harrison'dan, 1970) ve rom yapımıyla ilgili kullanım alanları vardır (Harrison ve Graham-Rose ve Harrison'dan, 1970).

S. pombe'de *ade2* diye tanımlanan lokusa ait mutantların, inozin monofosfat (IMP) ile adenilosuksinat (s-AMP) arasındaki kademede bloke olduklarını; Wanner (1955) karşılıklı beslenme (cross-feeding) yöntemi ile, Nagy ve ark.

(1974) da adenilosuksinat sentetaz (s-AMP sentetaz) enziminin aktivitesini ölçerek göstermişlerdir.

Purin nukleotidleri *de novo* biyosentezinde adenine özel kolun ilk kademesindeki reaksiyon;



şeklinde oluşur ve adenilosuksinat sentetaz enzimi tarafından katalizlenir (Henderson ve Patenson, 1973).

Bu çalışmada *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutant suşunun, üreme ve purin metabolizmasına ait ürün salgılaması üzerine pH'nın etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçların, salgıladığı ara ürünlerin kullanım alanından dolayı, bu suşun endüstriyel boyutlarda üretim koşullarının belirlenmesinde yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

II. MATERYEL VE METOD

1. Kullanılan organizma:

Bu çalışmada, *Schizosaccharomyces pombe* Linder str. *liquefaciens ade2-739h⁻* mutant suşu kullanıldı. Adenozin monofosfat (AMP) biyosentezi yapamayan bu oksotrofik mutant suş, besiyerine dışarıdan adenin eklenirse ürer. Katı besiyerinde pembe renkli koloniler oluşturur. Bu mutant, purin nukleotidleri biyosentezindeki kademelerden biri olan inozin monofosfat'ın (IMP) adenilosuksinat'a (s-AMP) dönüşümünü katalizleyen adenilosuksinat sentetaz enziminin kodlandığı lokusa aittir.

Suş, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki Maya Kültür Koleksiyonu'ndan sağlandı.

2. Kullanılan besiyerleri:

Çalışmada kullanılan besiyerleri, Gutz ve ark. (1974)'na göre hazırlandı. Bu besiyerleri; maya ekstrelili katı besiyeri (YEA) (Tablo-I), maya ekstrelili sıvı besiyeri (YEL) (Tablo-II), minimal katı besiyeri (MMA) (Tablo-III) ve adenin ilaveli minimal katı besiyeri (MMA + ade) dir. YEA ve YEL besiyerleri üretim, MMA ve MMA + ade besiyerleri ise saflaştırma amacıyla kullanıldı. YEA, YEL ve MMA besi-

yerlerinin içerikleri tartıldıktan sonra 1 litre destile suda eritildi. MMA + ade besiyeri hazırlanırken Tablo III'ün içeriğine, sterilizasyondan sonra 50 mg/litre adenin ilave edildi. Besiyerlerinin tümü otoklavda 121 °C'de (1 at. basınçta) 20 dakika tutularak steril edildi.

Tablo-I: Maya ekstrelili katı besiyeri (YEA)

Glukoz (Merck).....	30 g
Maya ekstresi (Yeast extract, Difco).....	5 g
Agar (Gibco).....	20 g

Tablo-II: Maya ekstrelili sıvı besiyeri (YEL)

Glukoz (Merck).....	30 g
Maya ekstresi (Yeast extract, Difco).....	5 g

Tablo-III: Minimal katı besiyeri (MMA)

Glukoz (Merck).....	10g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	1g/l
KH ₂ PO ₄	1g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	500mg/l
NaCl.....	100mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	100mg/l
H ₃ BO ₃	500µg/l

Tablo III'ün devamı

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40µg/l
Kl.....	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
Biotin.....	10µg/l
Nikotinik asit.....	1mg/l
Kalsiyum pantotenat.....	1mg/l
Meso-inositol.....	10mg/l
Agar (Gibco).....	20 g/l

3. pH ayarlamaları:

pH ayarlayıcı maddeler olarak bazik pH'lar için (6,5; 7,5) 0,5N NaOH, asit pH'lar için (2,5; 3,5; 4,5) 2N H_3PO_4 kullanıldı (Swada, 1981). Deneylerde kullanılan pH ayarlayıcılarının normaliteleri, besiyerine (YEL) eklenen miktarın, besiyeri hacminin en fazla % 2-4'ü kadar olmasını sağlamak amacıyla deneme yoluyla seçildi. pH ayarlanması, sadece kültürlemenin başlangıcında yapıldı. Steril YEL besiyerinde herhangi bir ayarlama yapılmadığı durumlarda, pH'sının 5,7 dolayında olduğu saptandı ve bu grup kontrol olarak alındı.

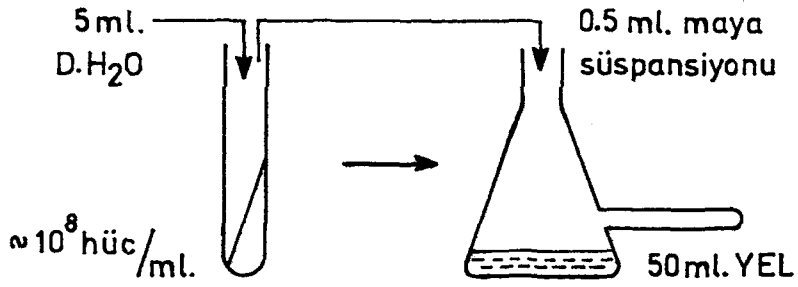
4. Metod

4.1. Suşun saflığının kontrolü:

Bu çalışmada kullanılan *ade2-739h⁻* mutanıtı, süt tozu (Skim milk, Difco) ile süspansiyonu yapılarak silika jel (0,2-0,5 mm çapında, Merck) içinde +4°C'de saklanan stoklardan alınarak eğri YEA'ya ekildi, 30°C'de ve aerobik koşullarda üretildi. Ekimden üç gün sonra kültürlerden, petrideki YEA besiyerlerine azaltma yöntemiyle ekim yapıldı. 3-5 gün sonra, gözlenen pembe renkli kolonilerden seçilen örnekler, MMA ve MMA + adenin'li petrideki besiyerlerine ekildi. 3-5 gün sonra petrillerdeki üreme durumu incelenerek MMA'da üremeyen, buna karşılık MMA + ade besiyerinde üreyen kolonilerin birinden alınan örnek, eğri YEA'lara ekilerek +4°C'de saklandı. Bu kültürlerin belli aralıklarla pasajları yapıldı ve çalışma boyunca zaman zaman saflıkları kontrol edildi.

4.2. Organizmanın kesikli kültürünün elde edilmesi:

Eğri YEA'daki mililitresinde yaklaşık 10^8 hücre bulunan 72 saatlik başlangıç kültürü, 5 ml destile su ile süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyondan 0,5 ml alınarak, içinde 50 ml YEL (değişik pH'larda) bulunduran 250 ml'lik (Şekil-II'de görülen) özel erlenlere ekimler yapıldı.



Şekil II: Kesikli kültür eldesi için özel erlene ekim.

Suş, dairesel hareket ile karıştırma yapan çalkalayıcıda (Braun, Lab Shaker) sabit koşullarda (30°C ; 100 devir/ dak) üç gün süreyle üretildi.

4.3. Üremenin izlenmesi:

Üç gün süren üretim işlemi sırasında, kültürün birim hacmi (1ml) içerisindeki hücre sayısı olarak ifade edilen üreme, hücre sayısı ve hücre kitlesinin ölçülmesine dayanan yöntemlerle izlendi.

4.3.1. Hücre sayısının ölçülmesi:

Çalışmada, kültürdeki hücre sayısının saptanmasında direkt mikroskopik hücre sayımı ve koloni sayımı yöntemleri kullanıldı.

4.3.1.1. Direkt mikroskopik hücre sayımı yöntemi:

Mikroskopik sayım, Thoma lamı (derinlik = 0,01 mm;

alan = 0,0025 mm²) ile yapıldı. Belli zaman aralıklarıyla alınan örnekler, mikroskop altında sayılacak kadar hücre içermesi için önce uygun oranda sulandırıldı.

Mikroskopta sayılıp, ortalaması alınan değerler,

$$\frac{\text{hücre sayısı} \times \text{sulandırma oranı}}{\text{lam sabiti}}$$

formülünde yerine koyularak kültürlerin mililitrelerindeki organizma sayıları bulundu.

4.3.1.2. Koloni sayımı yöntemi:

Belli zaman aralıklarıyla steril koşullarda alınan örnekler, petriye sayılacak kadar koloni düşürebilmek amacıyla uygun oranlarda sulandırıldı. YEA besiyeri içeren petrilere yayma yöntemiyle ekimleri yapıldı ve 30°C'lik etüvde 4-5 gün süreyle üremeye bırakıldı. Bu sürenin sonunda koloniler sayılarak ana kültürün mililitresindeki canlı hücre sayısı, aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{hücre/ml} = \frac{\text{koloni sayısı}}{\text{sulandırma oranı} \times \text{petriye yayılan örnek miktarı}}$$

4.3.2. Hücre kitlesinin ölçülmesi:

Çalışmada, kültürdeki üremenin hücre kitlesinin sap-

tanması yoluyla ölçülmesine dayanan yöntemlerden, nefelometrik yöntem kullanıldı.

Bu amaçla, bir cam boru ilavesi ile sterilite bozulmadan ölçüm yapmaya olanak veren özel erlenler (Şekil-II) içindeki kültürlerin bulanıklığı, belli zaman aralıklarında fotoelektrik kolorimetre (Erma) ile 530 nm dalga boyundaki ışık kullanılarak optik dansite (OD) cinsinden ölçüldü. OD cinsinden elde edilen değerler, standart grafikten yararlanılarak hücre/ml cinsine çevrildi. Bu amaçla, mililitresindeki hücre sayısı mikroskopik olarak saptanan kültürlerden belli oranlarda yapılan sulandırımın optik dansite cinsinden değerleri, 530 nm dalga boyunda ışık kullanılarak fotoelektrik kolorimetreyle ölçüldü. Optik dansite ile mililitredeki hücre sayısı arasındaki ilişki bir grafikte gösterildi. Bu standart eğri, deneylerde nefelometrik yöntemle elde edilen optik dansite değerlerinin hücre/ml değerlerine çevrilmesinde kullanıldı.

4.4. Üreme eğrisinin saptanması:

Üremenin izlenmesi bölümünde (4.3) verilen yöntemlerle, belli zaman aralıklarında elde edilen değerler yarı logaritmik kağıt üzerinde zamana karşı hücre/ml cinsinden gösterilerek; logaritmik üreme devresinin sonuna kadar değişik pH'lardaki, üreme eğrileri çizildi. Ön deneylerde, tüm yöntemlerle elde edilen bulgular, arasında paralellik gözlemlendi.

ği için çalışmanın sonraki aşamaları nefelometrik yöntemle sürdürüldü ve sadece bu yöntemle elde edilen bulgular verildi.

Deney serileri beş tekrarlı olarak yapıldı. Farklı pH değerlerinde (2,5; 3,5; 4,5; 6,5 ve 7,5) elde edilen bulguların kontrol değer (5,7) ile karşılaştırılması, t-testi kullanılarak yapıldı.

4.5. Generasyon süresi, generasyon sayısı ve özel üreme hızının hesaplanması:

Üreme eğrilerine dayanarak, üremenin artış hızının logaritmik olduğu evrelerde, hücrelerin kaç bölünme geçirdiği (generasyon sayısı) aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Moat, 1979).

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

N_1 = kültürde üremenin başlangıcındaki hücre sayısı

N_2 = logaritmik üreme sonundaki hücre sayısı

Logaritmik üreme süresince hücre kitlesinin iki katına çıkma süresi (generasyon süresi) aşağıdaki formüle göre saptandı (Boyd, 1984).

$$\text{generasyon süresi } (g_t) = \frac{T_2 - T_1}{n}$$

T_1 = logaritmik üremenin başlangıç zamanı

T_2 = logaritmik üremenin bitiş zamanı

Özel üreme hızının saptanmasında, aşağıda verilen formülden yararlanıldı (Moat, 1979).

$$\text{Özel üreme hızı } (\mu_g t) = \log_e X_t - \log_e X_0$$

X_t = t zamanında populasyondaki hücre sayısı

X_0 = üremenin başlangıcında populasyondaki hücre sayısı

4.6. Salgılanan ürünün saptanması:

Farklı pH değerlerinin, hipoksantin ve inozin salgılanması üzerindeki etkilerinin araştırılması için ince tabaka kromatografisi (T.L.C) yöntemi kullanıldı. 30°C'de logaritmik üreme fazının sonuna kadar üretilen kültürlerden (pH'ları 5,7; 6,5; 4,5; 2,5 olan) alınan örnekler, 2500 devir/dak.'da 15 dakika santrifüj edildi, üst sıvılar alındı ve 10µl plaklara uygulandı. T.L.C için silika jel (60-F-254 kalınlık: 0,25 mm; Merck) plaklar kullanıldı. Kontrol olarak plaklara, 1,2N HCl'de eritilen (Merck indeksi) 10 mg/ml'

lik hipoksantin (Fluka) ve suda eritilen (Merck indeksi) 16 mg/ml'lik inozin (Sigma) eriyiklerinden 1µl; YEL'den ise 10µl uygulandı. Plaklar 3 (Amonyak): 7 (izopropanol) sisteminde 3-4 saat yürütüldü (Bal ve Pieniazek, 1979). Daha sonra, 254 nm dalga boyunda ışık veren bir ultraviyole lambası altında gözlenerek, salgılanan ürünle ilgili olarak oluşan lekeler kalitatif olarak incelendi.

III. BULGULAR

1. pH'nin *Schizosaccharomyces pombe ade2* mutantı'nın üremesi üzerindeki etkileri:

Besiyerlerinin başlangıç pH'ları 2,5; 3,5; 4,5; 5,7 (Kontrol); 6,5 ve 7,5 değerlerinde olan deney serilerinde, nefelometrik yöntemle hücre/ml cinsinden elde edilen değerlerden, bu suşun üreme sırasında yaklaşık 56. saatte logaritmik fazın sonuna ulaştığı saptandı. Bu süre içinde belli zaman aralıklarında elde edilen ortalama değerler, standart hatalarıyla birlikte Tablo-IV'de verildi; bu değerlerden zamana karşı çizilen grafikler ise, Şekil-III'de gösterildi.

Şekil-III'de görüldüğü gibi *S. pombe ade2* suşu, üremesi için optimal pH değeri olduğu saptanan 5,7'de, üremenin hiç olmadığı kısa bir lag fazdan sonra, logaritmik üremenin görüldüğü faza geçmektedir. Logaritmik fazın iki aşamalı olduğu; 1. logaritmik faz olarak da adlandırılabilen bu aşamalardan birincisinde yaklaşık 22. saate kadar süren hızlı bir üreme, ikinci aşamasında (2. logaritmik faz) ise durağan faza girme saati olan 56. saatin sonuna kadar süren ve birinci aşamaya göre hızı daha az olan bir üreme saptandı.

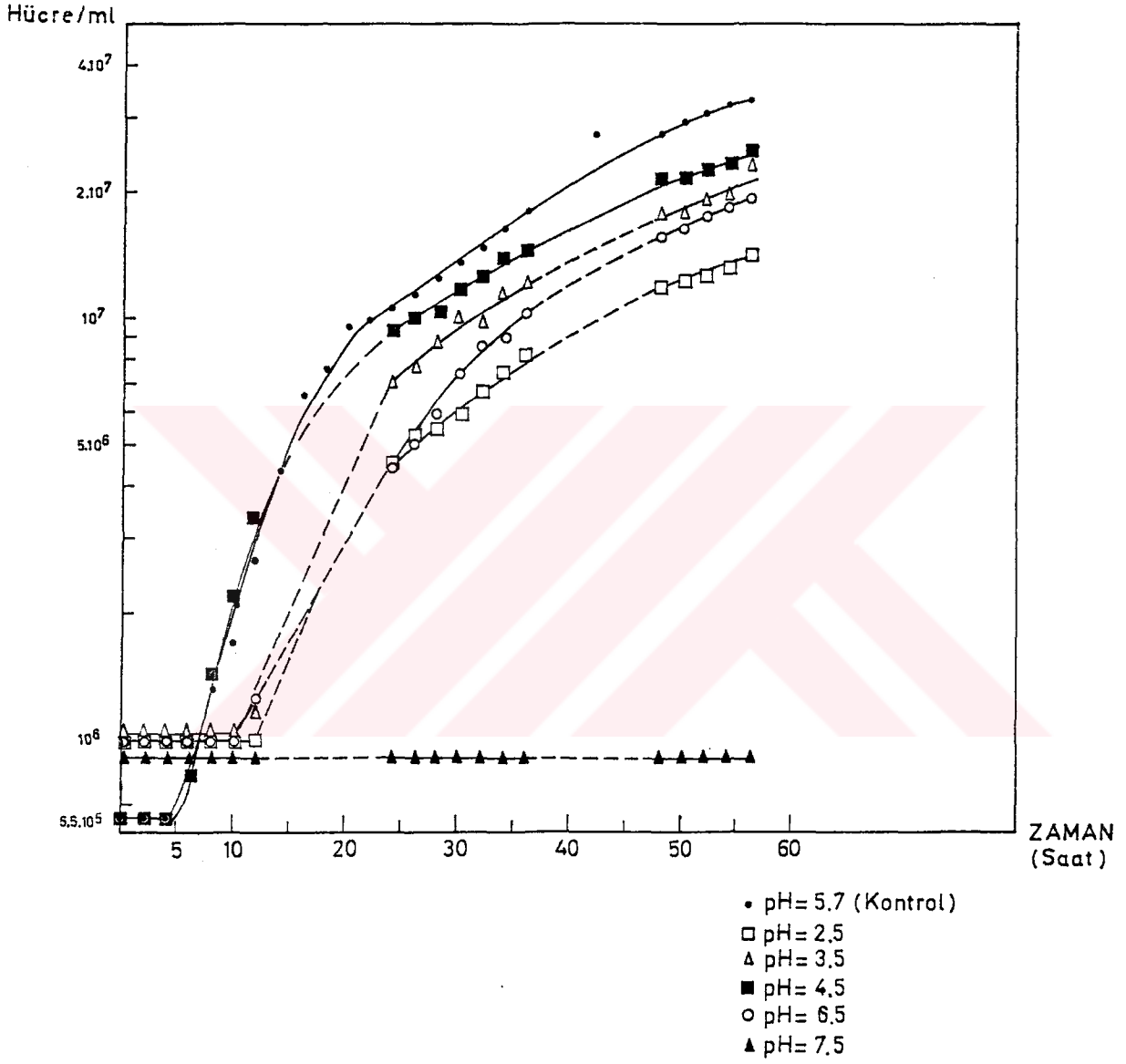
Uygulanan tüm pH değerlerinde (pH = 7,5 hariç) optimal pH olan 5,7'ye göre daha az olmakla beraber üremenin

olduğu bulundu. pH = 7,5'da ise üremenin tamamen durduğu gözlemlendi. Optimal değer olan pH = 5,7'ye göre bazik pH'lar, *S. pombe ade2-739h⁻* mutant suşunun üremesini önemli derecede etkiledi. pH = 5,7'den bazikliğe doğru yaklaşık 1.0 pH birimlik artışlarda üreme, hızla düşüş gösterdi. pH'nın 6,5 olduğu deneylerde üreme, optimale göre düşük olup, logaritmik devrenin ikinci aşamasına geçiş yaklaşık altı saat gecikmeyle oldu. Buna karşılık organizmanın üremesi, 2,5; 3,5 ve 4,5 gibi optimale göre asidik olan değerlerden, bazik pH'lara göre çok daha az etkilendi. Bu asidik değerlerde optimale göre logaritmik devrenin ikinci aşamasına geçiş saatinde önemli bir kayma izlenmedi. 2,5 gibi oldukça kuvvetli bir asidik pH'da bile üreme gözlemlendi.

Başlangıç pH'ları 2,5; 3,5; 4,5; 6,5 ve 7,5 değerlerine ayarlanarak yapılmış deneylerin 56. saatlerindeki, mililitredeki hücre sayılarına ait ortalama değerlerin, optimal değerin (pH = 5,7) 56. saatinin ortalama değerine ile karşılaştırılması için yapılan t-testi bulgularına göre pH'ları 2,5; 6,5 ve 7,5'a ayarlanmış deneylere ait değerlerin optimale göre farklarının anlamlı, pH'ları 3,5 ve 4,5'a ayarlanmış olanların ise optimale göre farklarının anlamsız olduğu saptandı.

Tablo-IV: *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutantının farklı pH'larda YEL içinde üremesi.

Zaman (saat)	Hücre sayısı ($\times 10^7$ /ml)				
	pH=2,5	pH=3,5	pH=4,5	pH=5,7	pH=6,5
0	0,1 \pm 0	0,02 \pm 0	0,065 \pm 0	0,065 \pm 0,023	0,1 \pm 0,05
2	0,1 \pm 0	0,02 \pm 0	0,065 \pm 0	0,065 \pm 0,023	0,1 \pm 0,05
4	0,1 \pm 0	0,02 \pm 0	0,065 \pm 0	0,065 \pm 0,023	0,1 \pm 0,05
6	0,1 \pm 0	0,02 \pm 0	0,082 \pm 0,045	0,106 \pm 0,024	0,1 \pm 0,05
8	0,1 \pm 0	0,02 \pm 0,009	0,144 \pm 0,04	0,133 \pm 0,029	0,1 \pm 0,05
10	0,1 \pm 0	0,02 \pm 0,02	0,212 \pm 0,044	0,17 \pm 0,033	0,1 \pm 0,05
12	0,1 \pm 0	0,12 \pm 0,33	0,336 \pm 0,039	0,268 \pm 0,053	0,126 \pm 0,066
24	0,453 \pm 0,013	0,716 \pm 0,072	0,934 \pm 0,069	1,06 \pm 0,1	0,446 \pm 0,04
26	0,526 \pm 0,026	0,78 \pm 0,074	1 \pm 0,086	1,15 \pm 0,106	0,5 \pm 0,034
28	0,546 \pm 0,026	0,878 \pm 0,075	1,07 \pm 0,073	1,27 \pm 0,114	0,59 \pm 0,04
30	0,613 \pm 0,013	0,96 \pm 0,44	1,19 \pm 0,08	1,38 \pm 0,113	0,74 \pm 0,04
32	0,686 \pm 0,023	1 \pm 0,09	1,27 \pm 0,08	1,49 \pm 0,12	0,86 \pm 0,034
34	0,746 \pm 0,026	1,13 \pm 0,11	1,39 \pm 0,08	1,65 \pm 0,13	0,913 \pm 0,028
36	0,813 \pm 0,006	1,22 \pm 0,11	1,48 \pm 0,08	1,81 \pm 0,15	1,03 \pm 0,02
48	1,21 \pm 0,02	1,76 \pm 0,15	2,12 \pm 0,07	2,75 \pm 0,25	1,58 \pm 0,01
50	1,26 \pm 0,02	1,82 \pm 0,15	2,17 \pm 0,07	2,92 \pm 0,25	1,65 \pm 0
52	1,31 \pm 0,02	1,91 \pm 0,15	2,27 \pm 0,08	3,06 \pm 0,26	1,76 \pm 0
54	1,37 \pm 0,01	2 \pm 0,17	2,36 \pm 0,1	3,24 \pm 0,29	1,85 \pm 0
56	1,45 \pm 0	2,38 \pm 0,15	2,48 \pm 0,135	3,29 \pm 0,37	1,95 \pm 0,01



Şekil-III: YEL'de üretilen *Schizosaccharomyces pombe* *ade2-739h⁻* mutantının farklı pH'lardaki üreme eğrileri.

2. pH'nın generasyon süresi, generasyon sayısı ve özel üreme hızı üzerindeki etkileri:

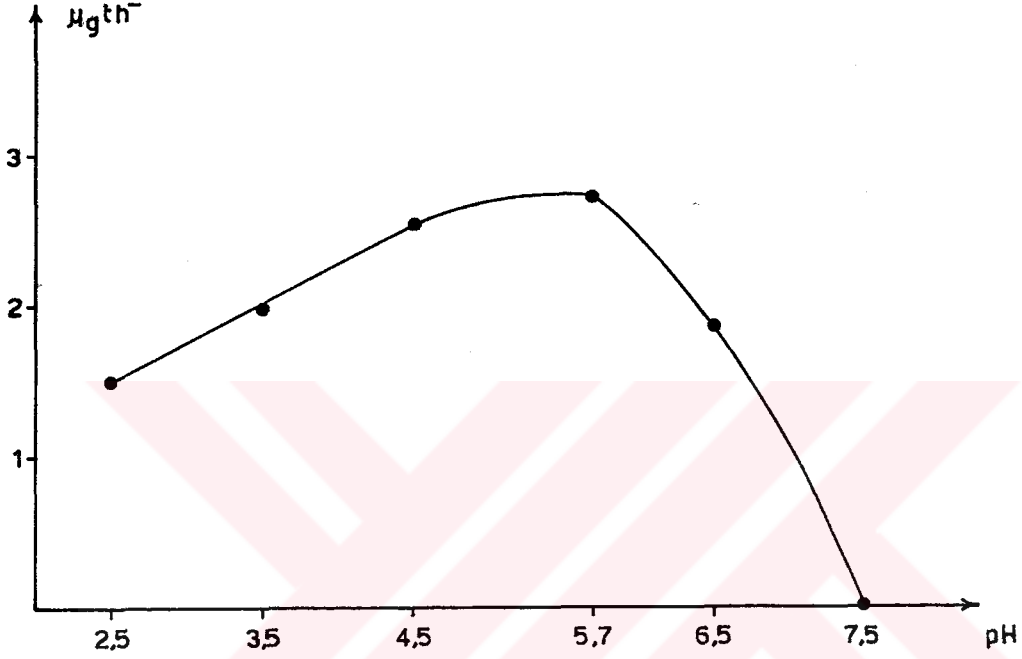
II.4.5'de verilen formüllerle 1. logaritmik faz için hesaplanan generasyon süresi, generasyon sayısı ve özel üreme hızlarına ait veriler, Tablo-V'de verildi. Bu tabloda da görüldüğü gibi 2,5; 3,5; 4,5 ve 6,5 deneylerinin 1. logaritmik fazlarına ait generasyon sürelerinin, pH = 5,7'ye göre daha uzun olduğu saptandı. Generasyon süresine bağlı olarak generasyon sayılarının da, optimal değer olan pH = 5,7'ye göre bazik ve asidik değerlerde (asitlik derecesinin artmasına bağlı olarak), azalma gösterdiği bulundu.

Tablo-V: Farklı pH değerlerinin, *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutant suşunun üremesinin 1. logaritmik aşamasında generasyon süresi, generasyon sayısı ve özel üreme hızı üzerine etkileri.

pH	Generasyon süresi (g_t) (saat)	Generasyon sayısı (n)	Özel üreme hızı (μ_t)
2,5	5,5	2,18	1,5
3,5	5	2,84	2
4,5	4,87	3,69	2,55
5,7	4,56	3,94	2,73
6,5	6,74	2,67	1,86
7,5	0	0	0

Tablo-V ve Şekil-IV'de görüldüğü gibi pH = 2,5; 3,5;

4,5; 6,5 deneylerinde, özel üreme hızlarında pH = 5,7'ye göre azalma izlendi.



Sekil-IV: Farklı pH değerlerinin, *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutantının üremesinin 1. logaritmik aşamasındaki özel üreme hızı (μ_{gth}^{-}) üzerindeki etkileri.

3. pH'nın *S. pombe ade2* mutantının purin salgılaması üzerindeki etkileri:

Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻ mutant suşunun, üretildiği ortama purin nükleotidleri metabolizmasına ait ara ürünlerden hipoksantini salgıladığı ince tabaka kromatografisi yöntemiyle kalitatif olarak saptandı ve farklı

pH değerlerindeki deneylerde elde edilen sonuçlar, Şekil-V' de gösterildi.



Şekil-V: *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutan-tının purin salgılaması üzerine pH'nın etkisi.

Şekilden de izleneceği gibi, pH = 2,5; 4,5; 6,5 deneylerinde hipoksantin salgılamasında optimal değer olan pH = 5,7'ye göre azalma olduğu, hipoksantin lekelerinin büyüklükleri karşılaştırılarak saptandı. Buna karşın inozin'e ait lekelerin, besiyerindeki (YEL) leke ile aynı büyüklükte oluşu, suşun inozin salgılaması yapmadığını gösterdi.

IV. TARTISMA

Her mikroorganizmanın metabolik olaylarını optimum düzeyde gerçekleştirebilmesi ve sonuçta hızlı biçimde üreyebilmesinin, bir takım fiziksel ve kimyasal koşullarla sıkı ilişkili olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada kullanılan bir adenin oksotrofu olan *S. pombe ade2-739h⁻* mutantının, kontrol olarak kullanılan ve pH'sı yaklaşık 5,7 olan sıvı besiyerindeki (YEL) üremesinin, Şekil-III'de verilen grafikte de görüldüğü gibi, dört saat süren bir lag fazdan sonra, hızlı bir üremenin görüldüğü 1. logaritmik faz, bunu izleyen üremenin birinci logaritmik faza göre daha yavaş olduğu 2. logaritmik faz geçirdiği saptandı. *S. pombe ade2h⁻* suşunun üreme eğrisinin iki logaritmik fazlı olduğu, Nagy ve ark. (1974) tarafından, aynı organizmanın, üremesi tek logaritmik fazlı olan yabancı tipiyle karşılaştırılarak gösterilmiştir. Bu araştırmacılar *ade2h⁻* suşunda, yabancı tipin üreme eğrisine benzeyen 1. logaritmik fazdan sonraki, üreme hızının özellikle 1. logaritmik faza göre daha yavaş olduğu 2. logaritmik fazın muhtemelen adenin açlığından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Mayaların üremesi için genellikle pH 4-5 arasındaki değerlerin optimal olduğu, bununla beraber bu organizmaların geniş pH sınırları (pH:2,5-8,5) içinde üreyebildikleri bilinmektedir (Rehm ve Reed, 1981).

Şekil-III'de de görüldüğü gibi *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutant suşunun üremesi için optimum pH değerinin 5,7 dolayında olduğu saptandı. Johnson ve McDonald (1983), sürekli kültürde ürettikleri *S. pombe*'nin hücre bölünmesi üzerine oksijen konsantrasyonu ve sıcaklıkla beraber pH'nın etkisini inceledikleri çalışmalarında, optimal pH değeri olarak 5,5'u kullanmışlardır. Agar ve Bailey ise (1982), *S. pombe*'nin sıcaklığa bağlı olarak sürekli kültürde sinkronize üremesinin ölçülmesi ile ilgili çalışmalarında pH'yı 5.0 olarak kullanmışlardır. Buna göre *S. pombe*'nin üremesi için optimal pH değerinin, 5-6 arasında olduğu söylenebilir.

S. pombe ade2-739h⁻ mutantının üremesinin, pH = 5,7'ye göre bazık olan pH değerlerinde hızla azaldığı saptandı. pH = 6,5'da üremenin 5,7'ye göre az olması, pH = 7,5'da ise hiç olmaması suşun bazık pH'lardan çok kuvvetle etkilendiğini düşündürdü. Oysa uygulanan asidik pH değerleri olan 2,5; 3,5 ve 4,5'da üreme optimale göre asitlik derecesinin artışına bağlı olarak azalmakla beraber bu azalma bazık değerlerde olduğundan daha yavaş oldu. Bu durum ise *S. pombe ade2-739h⁻* mutantının asit pH değerlerine oldukça dayanıklılığının yanı sıra, geniş pH alanlarında üreyebildiğini göstermektedir.

Tablo-V'de verilen farklı pH değerlerine ait generasyon süresi ve generasyon sayıları verilerinden anlaşılacağı gibi, bu pH değerlerinde suşun üreme özelliklerine bağlı

olarak generasyon süreleri ve generasyon sayıları değişmektedir. Böyle bir sonucu, Swada (1981) *Saccharomyces cerevisiae*'nin bir mutantında tek hücrelerin üremeleri üzerinde pH'nın etkisini incelediği çalışmasında saptamıştır. *Acremonium diospyri*'de de maksimum özel üreme hızı (μ_{max})'nin en yüksek olduğu pH derecesinde generasyon süresinin en kısa, μ_{max} 'ın en düşük olduğu pH derecesinde ise generasyon süresinin en uzun değerinde olduğu Read ve Seviour (1984) tarafından saptanmıştır.

Bu çalışmada, uygulanan farklı pH değerlerinin, üreme üzerinde yaptığı etkiye paralel olarak özel üreme hızını da etkilediği saptanmıştır (Tablo-V). Bu bulgu literatür sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir. Greenman ve ark. (1983) çalışmalarında pH'nın, *Propionibacterium acnes*, *P. avidum* ve *P. granulosum*'da özel üreme hızını etkilediğini bulmuşlardır. Ayrıca yine asit pH'lara karşı oldukça duyarlı olan ve pH = 6.0'dan daha düşük değerlerde üremenin görülmediği *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Selemonas ruminatum* subsp. *lactilytica*, *Megasphaera elsdenii*, *Veillonella alcalescens* ve *Propionibacterium acnes* bakterilerinde özel üreme hızınının pH'dan etkilendiği saptanmıştır (Therion ve ark., 1982). Read ve Seviour (1984)'un yaptıkları çalışmada bir maya olan *Acremonium diospyri*'nin özel üreme hızınının pH değişimlerinden etkilendiğini, pH = 3.0 ve pH = 9.0 gibi uç noktalarda özel üreme hızınının az, pH = 6.0'da

ise tüm diğer değerlere göre yüksek olduğunu saptamışlardır. *Clostridium sporogenes*'in özel üreme hızınının, fermentörde ve test tüplerinde yapılan üretimlerde aynı pH değerleri için farklı olmak üzere pH değişimlerinden etkilendiği Montville ve ark. (1985) tarafından yapılan çalışmada saptanmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*'nin *maltozda* kesikli kültürü yapıldığında, pH artışları özel üreme hızını olumsuz yönde etkilemiştir. Ama *glukoz* veya *galaktozda* kesikli kültürü yapıldığı zaman etkilenme aynı şekilde olmamıştır (Olivero ve ark., 1982). Yine *Saccharomyces cerevisiae*'nin solunum eksikliği gösteren bir mutantında, hücrelerin tomurcuklanma devresinde özel üreme hızlarınının, pH'dan etkilendiği Swada (1981) tarafından gösterilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutant suşunun, uygulanan tüm pH değerlerindeki üreme hızına bağlı olarak, hücre dışına salgıladığı hipoksantin miktarınının da değiştiği Şekil-V'de görüldüğü gibi kalitatif olarak saptandı. Suşun hipoksantin biriktirip salgılamasının nedeni, adenilosüksinat sentetaz enzimini içermediğinden purin nukleotidleri *de novo* sentezinde IMP (inozinat)'den s-AMP (adenilosuksinat)'yi oluşturamaması sonucu, ortamda fazla miktarda biriken IMP'nin önce inozine, inozinin de hipoksantine dönüşmesidir (Henderson ve Paterson, 1973).

Literatürde *S. pombe ade2* mutantının hipoksantini salgıladığına ait verilere rastlanmamıştır. Bununla beraber, başka mikroorganizmaların s-AMP sentetaz enzimi bulunmayan mutantlarının hipoksantini salgıladığı kaydedilmiştir. *Neurospora crassa*'nın adenilosuksinaz aktivitesine sahip olan *ad8* mutanıtı'nın (Partridge ve Giles, 1956; Sabina ve ark., 1979), *Saccharomyces cerevisiae*'nin adenilo suksinat sentetaz aktivitesine sahip olmayan *ad-12* mutanıtı'nın (Armitt ve Woods, 1970; Dorfman, 1969) hipoksantin salgıladığı bilinmektedir.

Ayrıca bazı mikroorganizmalarda purin biyosentezinin değişik kademelerine ait mutantların da hipoksantini biriktirdiği ve salgıladığı saptanmıştır. Örneğin; *Schizosaccharomyces pombe*'nin hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz enzimi eksik olan *pur-1* (Reichert ve Winter, 1974-Sabina ve ark.'dan, 1979) ve 8-azaguanine dirençli olan *aza1* mutanıtı'nın (Heslot, 1966-1972'den), *Bacillus subtilis*'in adenine gereksinme duyan bir oksotrofu'nun (Demain ve Hendlin, 1967), adenin ilaveli besiyerinde üreyen *Escherichia coli*'nin hipoksantin salgıladığı bilinmektedir (Mans ve Koch, 1960-Sabina ve ark.'dan, 1979).

Çalışmada kullanılan *S. pombe ade2* mutantının uygulanan tüm pH değerlerinde, T.L.C yöntemiyle gözlenen inozin lekelerinin, hemen aynı büyüklükte olarak, uygulanan besiyerinde (YEL) çıkması süşun inozin salgılamadığını düşün-

dürdü. Buna karşılık Pourquie ve Heslot (1971) bu çalışmadan farklı ve çok hassas yöntemlerle yaptıkları analizlerde *Schizosaccharomyces pombe*'nin IMP birikimi olan tüm mutantlarının inozin salgıladığını kaydetmişlerdir.

Ayrıca, *Neurospora crassa*'nın *ad8* mutanı'nın (Sabina ve ark., 1979), *Saccharomyces cerevisiae*'nin *ad-12* mutanı'nın (Armitt ve Woods, 1970; Dorfman, 1969) hipoksantin ile birlikte inozin de salgıladıkları, *Bacillus subtilis*'in adenilosuksinat sentetaz enzimini içermeyen RDA-16 ve RDA-15 ile RDA-3 mutanı'nın (Momose ve Shio, 1969-Ishii ve Shio'dan, 1971) ise inozin biriktirdiği bilinmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgulardan, besiyerindeki pH değişimlerinin kesikli kültürü yapılan *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutanı suşunun, üreme ve dolayısıyla purin salgılama özelliklerini etkileyen önemli bir parametre olduğu sonucu elde edilmiştir. Farklı pH değerlerinin suşun üreme ve salgılama özelliklerini ne yönde değiştirdiğinin bilinmesinin, bu organizmanın fermentasyon metodlarıyla üretiminde, optimum üretim koşullarının belirlenmesi yönünden yardımcı olacağı düşünülmüştür.

V. Ö Z E T

Bu çalışmada, bir adenin oksotrofu olan *Schizosaccharomyces pombe ade2-739h⁻* mutan^tı'nın, üreme ve purin salgılaması üzerine pH'nın etkisi incelenmiştir. Üremenin izlenmesi için, mikroskopik hücre sayımı, koloni sayımı ve nefelometrik yöntemler, purin salgılanmasının saptanması için de ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

Purin nükleotidleri biyosentezine ait bir ürün olan adenozin monofosfat (AMP)'ı sentezleyemeyen bu mutant suş'un kesikli kültürdeki üremesinde, optimum pH değerinin pH \approx 5,7 olduğu saptanmıştır. Suşun üremesinin asidik pH değerlerinden, bazı pH değerlerine oranla daha az etkilendiği bulunmuştur.

S. pombe ade2-739h⁻ mutan^tı'nın hipoksantin salgılanmasının, uygulanan pH değerlerindeki üremesine bağlı olarak pH'dan etkilendiği gözlenmiştir.

Üreme ve salgılama gibi biyolojik olayların, özellikle son yıllarda mikroorganizmalar'la gerçekleştirilen endüstriyel uygulamalardaki önemine bağlı olarak; elde edilen sonuçların, salgıladığı ürünlerin kullanım alanından dolayı, bu suşun endüstriyel boyutlarda üretim koşullarının belirlenmesinde yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

VI. LITERATUR

- AGAR, D.W. and BAILEY, J.E. (1982): Measurements and models of synchronous growth of fission yeast induced by temperature oscillations. *Biotechnology and Bio-engineering*. 24:217-236.
- ARMITT, S. and WOODS, R.A. (1970): Purine-excreting mutants of *Saccharomyces cereviside*. I. Isolation and genetic analysis. *Genet. Res., Camb.* 15:7-17.
- 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 *Brochotrix thermosphacta* ATCC 11509^T at different pH values and temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. Dec: 1345-1350.
- BOYD, R.F. (1984): General Microbiology. Phd. Witz, Virginia.
- DEMAIN, A.L. and HENDLIN, D. (1967): Phosphohydrolases of a *Bacillus subtilis* mutant accumulating inosine and hypoxanthine. *Journal of Bacteriology*. July: 66-74.
- DEMAIN, A.L. and SOLOMON, N.A. (1981): Industrial Microbiology. *Scientific American*. 245, 3:67-76.
- DORFMAN, B.Z. (1969): The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics*. 61:377-389.

- GREENMAN, J., HOLLAND, K.T. and CUNLIFFE, W.J. (1983): Effects of pH on biomass, maximum specific growth rate and extracellular enzyme production by three species of cutaneous Propionibacteria grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology*. 129:1301-1307.
- GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U. and LOPRIENO, N. (1974): *Schizosaccharomyces pombe*. In "Handbook of genetics" 1:395-446, Edit. KING, R.C. Plenum Press, New York.
- HENDERSON, J.F. and PATERSON, A.R.P. (1973): Nucleotide Metabolism. Academic Press, New York.
- HESLOT, H. (1972): Genetic control of the purine nucleotide pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today, 1972:867-876.
- IINO, Y. and YAMAMOTO, M. (1985): Mutants of *Schizosaccharomyces pombe* which sporulate in the haploid state. *Mol. Gen. Genet.* 198:416-421.
- ISHII, K. and SHIIO, I. (1972): Improved inosine production and derepression of purine nucleotide biosynthetic enzymes in 8-azaguanine resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Agr. Biol. Chem.* 36:1511-1522.
- 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. and SHIMOSAKA, M. (1982): Proceedings of the IV th International Symposium on Genetic of Industrial Microorganisms. The Organizing Committee of GIM.

- MITCHISON, J.M. (1970): Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. In "methods in cell physiology" Edit. PRESCOTT, D.M. 4:131-165, Academic Press, New York.
- MOAT, A.G. (1979): Microbial Physiology. John Wiley and Sons, New York.
- MONTVILLE, T.J., PARRIS, N. and CONWAY, L.K. (1985): Influence of pH on organic acid production by *Clostridium sporogenes* in test tube and fermentor cultures Applied and Environmental Microbiology. Apr.:733-736.
- NAGY, M., REICHERT, U. and RIBET, A.-M. (1974): Regulation of purine metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. IV. Variations in the stability and kinetic parameters of amidophosphoribosyltransferase depending on growth phase and growth conditions. Biochimica et Biophysica Acta. 370:85-95.
- OLIVERO, I., RUIZ-MACIAS, C., CHORDI, A. and PEINADO, J.M. (1982): Effect of external pH on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* fermenting maltose in Batch and continuous culture. Biotechnology and Bioengineering. 24:2725-2729.
- PARTRIDGE, C.W.H. and GILES, N.H. (1957): Identification of major accumulation products of adenine-specific mutants of *Neurospora*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 67:237-238.

- PEKİN, B. (1979): Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler), Birinci Kitap, Kısım: 1. Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir.
- POURQUIE, J. and HESLOT, H. (1971): Utilization and inter-conversions of purine derivatives in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Genet. Res., Camb. 18:33-44.
- READ, M.A. and SEVIOUR, R.J. (1984): Effect of pH on maximum specific growth rate (μ_{\max}) of *Acremonium diospyri*. Trans. Br. mycol. Soc. 82, 1.
- REHM, H.-J. and REED, G. (1981): Biotechnology, Vol. 1. Verlag Chemie, Weinheim.
- ROSE, A.H. and HARRISON, J.S. (1970): The yeasts, Vol. 3. Academic Press, New York.
- SABINA, R.L. HANKS, A.R., MAGILL, J.M. and MAGILL, C.W. (1979): Role of purine base excretion in regulation of purine pools. Molec. gen. Genet. 173:31-38.
- SWADA, T. (1981): Effect of pH on growth in a respiration-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering. 23:1623-1637.
- TESHIBA, S. and FURUYA, A. (1984): Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. IV. Excretion mechanisms of 5'-IMP. Agric. Biol. Chem. 48:1311-1317.
- THERION, J.J., KISTNER, A. and KORNELIUS, J.H. (1982): Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactilytic Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. Aug:428-434.

VRANA, D. (1983): The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 25:1989-1994.

WANNER, H. (1955): Die Akkumulation von Hypoxanthin durch adenin-abhängige, Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Julius Klaus-Stift. Vererbungsforsch, Sozianthropol. Rassenhyg.* 30:516-520.

WISEMAN, A. (1983): *Principles of Biotechnology*. Surrey University Press, New York.

