

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI STRES KOŞULLARINDA *Debaryomyces hansenii*'den HÜCRE DIŞI  
PROTEİN ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

**Duygu Deniz YÜRÜT**

**Danışman: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ  
Eş- Danışman: Yrd. Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP**

**ANKARA  
2010**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### FARKLI STRES KOŞULLARINDA *Debaryomyces hansenii* 'DEN HÜCRE DIŞI PROTEİN ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

Duygu Deniz YÜRÜT

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP

*Debaryomyces hansenii* endüstriyel öneme sahip ekstremofilik bir mayadır. Deniz suyu, peynir, et, şarap, bira, meyve, toprak ve şekerli ürünler gibi düşük su aktivitesine sahip birçok ortamdan izole edilmiştir. Pek çok gıdanın üretiminde aroma verici ve istenmeyen mikroorganizmaları yok etmede yardımcıdır. *D. hansenii* endüstride peynir üretimi, et fermentasyonu, bazı değerli kimyasalların, litik enzimlerin ve alditollerin üretiminde kullanılır. Bu çalışmada, *D. hansenii*'nin farklı stres koşullarında çoğalması, hücre dışı protein üretimi ve protein dağılımını incelemek amacıyla, farklı glukoz derişimlerinde, sıcaklıklarda ve katkı maddelerinin varlığında üretimler gerçekleştirilmiştir. *D. hansenii*, UYM katı ve sıvı ön çoğalma ortamlarından pepton, maya özütü, malt özütü ve glukoz içeren protein üretim ortamlarına aktarılmıştır. Protein üretimi, çalkalamalı hava banyosunda gerçekleştirilmiş ve üretim ortamından t=0 anından itibaren belirli zaman aralıklarıyla örnekler alınarak hücre çoğalması spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Üretimin 24. ve 33. st'inde hücre dışı protein derişimi ölçülmüştür. *D. hansenii*'nin salgıladığı proteinler ileri analizler için ortamdan izole edilmiş ve 7 cm, pH 4-7 tutuklanmış pH gradyen (IPG) şeritleri ile birinci boyutta, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ikinci boyutta ayrılmaları sağlanmıştır. Elde edilen jeller Sypro Ruby ile boyanmış, Versa Doc (Biorad) görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmış ve PD-Quest v8.0 programı ile kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Bu şekilde ortamlarda farklı ifade olan proteinler ile iki kat artan ve azalan proteinler belirlenmiştir. Analizi tamamlanan tüm spotlar jelden kesilmiş, tripsinizasyon işleminin ardından Matriks Yardımcı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon sistemi ile kütle spektrumları elde edilmiş ve her proteinin kütle spektrumu Mascot arama motorunda peptid kütle parmak izi yöntemiyle analizlenmiştir. Yapılan çalışmada, en yüksek hücre derişimine (3,645 mg/ml) %1 glukoz içeren UYM ortamında 10 °C'de ulaşılırken, en yüksek hücre dışı protein derişimine (31,41 µg/ml) yine aynı ortamda ulaşılmıştır. Protein çeşitliliği açısından en yüksek değerlere, çoğalmanın 24. st'inde %20 glukoz içeren 30 °C'deki ortamda 228 spot ile ulaşılırken, 33. st'inde %1 glukoz içeren 20 °C'deki ortamda 113 spot ile ulaşılmıştır. Tüm analizler sonucunda 7 adet anlamlı protein tespit edilmiştir.

2010, 149 sayfa

**Anahtar kelimeler:** *Debaryomyces hansenii*, proteom, 2D-PAGE, MALDI-tof

## ABSTRACT

Master's Thesis

### INVESTIGATION OF EXTRACELLULAR PROTEIN PRODUCTION FROM *Debaryomyces hansenii* UNDER DIFFERENT STRESS CONDITIONS

Duygu Deniz YÜRÜT

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Co-supervisor: Asst. Prof. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP

*Debaryomyces hansenii* is an extremophilic yeast of industrial importance. *D. hansenii* can be found in many habitats with low water activity, such as sea water, cheese, meat, wine, beer, fruit and soil as well as in high-sugar products. It provides aroma components in some food production and helps to prevent the growth of unwanted microorganisms. *D. hansenii* is used for cheese production, meat fermentation, production of some fine chemicals, lytic enzymes and alditols in industry. In the present study, different glucose concentrations, temperatures and additives were examined as stress conditions to observe their effects on *D. hansenii* growth, extracellular protein production and protein profile. *D. hansenii* was inoculated from solid and liquid UYM pre-culture media into protein production medium containing malt extract, yeast extract, pepton and glucose. Protein production was performed in a rotary shaker and samples were collected periodically to follow the yeast growth spectrophotometrically. Extracellular protein concentrations were measured at the 24<sup>th</sup> and 33<sup>rd</sup> hours of production. Secreted proteins were isolated from the medium for further studies and separated by their isoelectric points in 7 cm, pH 4-7 IPG strips as the first dimension and by their molecular weights in sodium dodesil sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as the second dimension. Eventually, the gels were stained with Sypro Ruby, photographed with Versa Doc scanner (Biorad) and analyzed by PD-Quest v8.0 software, qualitatively and quantitatively. Thereby, the proteins which were expressed differently or disappeared under different stress conditions were detected. Once the analysis was completed, all spots in the gels were excised; and after trypsinization, their mass spectra were obtained with a matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) system. Each mass spectrum was then identified by searching the Swissprot protein database through Mascot search engine using peptide mass fingerprint method. As a result, the highest cell concentration (3,645 mg/ml) was reached in UYM medium containing 1% glucose at 10 °C; and the highest extracellular protein concentration (31,41 µg/ml) was also reached under same conditions. Protein diversity levels are the highest with 228 spots in UYM medium containing 20% glucose at 30 °C; and with 113 spots in UYM medium containig 1% glucose at 20 °C, at 24<sup>th</sup> and 33<sup>th</sup> h of cultivation, respectively. Among the matched proteins, 7 proteins were found to be significant.

2010, 149 pages

**Key words:** *Debaryomyces hansenii*, proteome, 2D-PAGE, MALDI-tof

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgisiyle ve geniş vizyonuyla bana çalışmalarımda önderlik edip yol gösteren, sorunlara yaklaşımı ve hayata bakış açısıyla ufkumu genişleten, yüksek lisansım süresince ilgisini asla eksik etmeyen, danışman hocam Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a çok teşekkür ederim.

Çalışma azminden ilham aldığım, her zaman her konuda bana yardımcı olan eş danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Duygu Özel DEMİRALP'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamı 09B4343011 nolu ve “Çeşitli Stres Koşullarında *Debaryomyces hansenii*'nin Proteinlerinin Karşılaştırılması” konulu proje ile destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

Acısıyla tatlısıyla çok zaman geçirdiğim tüm çalışma arkadaşlarıma, özellikle tüm sıkıntılara ortak olan ablam Uzm. Bio. Meral ALTUNER'e ve laboratuvara ilk geldiğim günden itibaren bana çalışmalarımda yardımcı olan, tecrübelerini benden esirgemeyen, beni anlayan ve her zaman yanımda olan arkadaşım, hocam Araş. Gör. A. Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPÇU'ya çok teşekkür ederim.

En zor zamanlarımda tüm anlayışıyla yanımda olup bana huzur veren, en güzel zamanlarımda mutluluğumu paylaşarak onu çoğaltan, en kıymetlim, nişanlım İlker ERGÜN'e hayatıma kattığı tüm renkler için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca daima bana destek olan, saygıyı, sevgiyi ve güveni görüp öğrendiğim, benim için değerlerini anlatmaya kelimelerin asla yetmeyeceği, canım annem Füsun YÜRÜT ve canım babam Erhan YÜRÜT'e, beni mutlu bir insan olarak yetiştirdikleri için çok ama çok teşekkür ederim.

Duygu Deniz YÜRÜT

Ankara, Ocak 2010

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	3
2.1.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin filogenisi, ekolojisi, fizyolojisi ve moleküler biyolojisi.....	3
2.1.2 <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin önemli özellikleri.....	9
2.1.3 <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin biyoteknolojik uygulamaları.....	13
2.2 Proteinler.....	21
2.2.1 Proteinlerin genel özellikleri.....	21
2.2.2 Proteinlerin sınıflandırılması.....	24
2.2.3 Proteinlerin denaturasyonu ve renaturasyonu.....	27
2.3 <i>Debaryomyces hansenii</i> Proteinleri.....	29
2.4 Proteobilim (Proteomiks) .....	33
2.4.1 Proteobilimin tanımı ve uygulamaları.....	33
2.4.2 Proteobilimde kullanılan yöntemler.....	35
2.4.2.1 Örnek hazırlama.....	35
2.4.2.2 İki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE).....	36
2.4.2.3 Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI).....	38
2.4.2.4 Proteinlerin tanımlanması.....	41
2.5 <i>Debaryomyces hansenii</i> Proteomu.....	43
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>51</b>
3.1 Materyal.....	51
3.2 Yöntem.....	51
3.2.1 Mikroorganizma çoğalma ve protein üretim ortamları.....	51
3.2.1.1 Katı çoğalma ortamı.....	51

3.2.1.2 Ön çoğalma ortamı.....	52
3.2.1.3 Protein üretim ortamı.....	52
3.2.2 Protein saflaştırma.....	52
3.2.3 Protein tanımlama.....	54
3.2.3.1 İki boyutlu jel elektroforezi yöntemi (2D-PAGE).....	54
3.2.3.2 PD-Quest programı ile jel analizi ve spot kesimi.....	55
3.2.3.3 Tripsinizasyon.....	56
3.2.3.4 MALDI plakasına örnek yükleme.....	57
3.2.3.5 Mascot programı ile protein tanımlama.....	57
3.3 Analizler.....	58
3.3.1 Hücre derişimi.....	58
3.3.1.1 Özgöl çoğalma hızı.....	59
3.3.2 Protein derişimi.....	59
3.3.3 Proteaz aktivitesi.....	60
3.3.4 Su aktivitesi.....	61
<b>4. ARAşTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>62</b>
4.1 İzole ve Ticari <i>D.hansenii</i> 'nin Karşılaştırılması.....	62
4.2 Tuzun (NaCl) <i>D. hansenii</i> Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi.....	63
4.3 Glukoz Derişiminin Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi.....	64
4.4 Sıcaklığın Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi.....	68
4.5 Katkı Maddelerinin Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi.....	71
4.6 Proteom Analizleri.....	73
4.6.1 Glukoz derişiminin <i>D.hansenii</i> 'nin hücre dışı protein dağılımına etkisi.....	74
4.6.2 Sıcaklığın <i>D.hansenii</i> 'nin hücre dışı protein dağılımına etkisi.....	84
4.6.3 Katkı maddelerinin <i>D.hansenii</i> 'nin hücre dışı protein dağılımına etkisi.....	94
4.7 Proteinlerin Tanımlanması.....	102
<b>5. TARTIşMA VE SONUÇ</b> .....	<b>117</b>
5.1 İzole ve Ticari <i>D.hansenii</i> 'nin Karşılaştırılması.....	117
5.2 Tuzun (NaCl) <i>D. hansenii</i> Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi.....	117
5.3 Glukoz Derişiminin Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi.....	118
5.4 Sıcaklığın Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi.....	119
5.5 Katkı Maddelerinin Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi.....	120
5.6 Proteom Analizleri.....	121

5.6.1 Glukoz derişiminin <i>D.hansenii</i> 'nin hücre dışı protein dağılımına etkisi.....	121
5.6.2 Sıcaklığın <i>D.hansenii</i> 'nin hücre dışı protein dağılımına etkisi.....	123
5.6.3 Katkı maddelerinin <i>D.hansenii</i> 'nin hücre dışı protein dağılımına etkisi.....	124
5.7 Proteinlerin Tanımlanması.....	125
<b>KAYNAKLAR</b> .....	127
<b>EKLER</b> .....	132
<b>EK 1</b> Deneylerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler.....	133
<b>EK 2</b> Poliakrilamid jel içeriği.....	135
<b>EK 3</b> MALDI kalibrasyon spektrumu.....	136
<b>EK 4</b> Kuru hücre kalibrasyon grafiği.....	137
<b>EK 5</b> Hücre çoğalması ve hücre dışı protein derişimi ölçümlerinin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği.....	138
<b>EK 6</b> Makro-Bradford kalibrasyon grafiği.....	140
<b>EK 7</b> Mikro-Bradford kalibrasyon grafiği.....	141
<b>EK 8</b> Proteaz aktivitesi kalibrasyon grafiği ve örnek hesabı.....	142
<b>Ek 9</b> pH 3-10 ve pH 4-7 şeritler kullanılarak elde edilmiş jellerin karşılaştırmalı görüntüleri.....	143
<b>EK 10</b> UYM ortamı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüsü.....	144
<b>EK 11</b> Mascot analizlerinde anlamlı sonuç veren proteinlere ait MALDI-tof spektrum örnekleri.....	145
<b>EK 12</b> Tanımlanan proteinlerin jellerde bağıl bulunurluğu.....	149
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	150

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	2
Şekil 2.1 Peptid bağı.....	22
Şekil 2.2 <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin enzim sınıflandırması ile ilişkilendirilen proteinlerinin dağılımı.....	32
Şekil 2.3 (a) İzoelektrik odaklama öncesi (b) İzoelektrik odaklama sonrası proteinlerin IPG şeritler üzerindeki şematik gösterimi.....	37
Şekil 2.4 Proteinleri SDS-PAGE yöntemiyle ayırma işleminin şematik görüntüsü.....	38
Şekil 2.5 MALDI iyonlaştırma yönteminin şematik gösterimi.....	40
Şekil 2.6 <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 767'nin %0, %8 ve %12 NaCl içeren YNB besiyerinde çoğalma eğrisi.....	44
Şekil 2.7 Tuzsuz YNB besiyerinde çoğalan <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 767'nin iki boyutlu jel elektroforezi.....	45
Şekil 2.8 %8 tuz konsantrasyonuna sahip YNB besiyerinde çoğalan <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 767'nin iki boyutlu jel elektroforezi.....	48
Şekil 2.9 %8 NaCl ortamına adapte olmakta olan <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 767'de gliserol-3-fosfatın indüklenmesi.....	49
Şekil 4.1 İzole ve ticari <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin çoğalma eğrileri.....	62
Şekil 4.2 İzole ve ticari <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin hücre dışı protein derişimleri.....	63
Şekil 4.3 Farklı glukoz konsantrasyonlarında <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin çoğalmasına tuzun etkisi.....	64
Şekil 4.4 Glukoz derişiminin hücre çoğalmasına etkisi.....	66
Şekil 4.5 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> için deneysel verilerin lojistik çoğalma modeli ile uyumu.....	67
Şekil 4.6 Farklı glukoz derişimlerinde <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin hücre dışı protein üretimi.....	67
Şekil 4.7 Sıcaklığın hücre çoğalmasına etkisi.....	69
Şekil 4.8 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> için deneysel verilerin lojistik çoğalma modeli ile uyumu.....	70
Şekil 4.9 Farklı sıcaklıklarda <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin hücre dışı protein üretimi.....	70
Şekil 4.10 Farklı katkı maddelerinin çoğalmaya etkisi.....	72
Şekil 4.11 Farklı katkı maddelerinin varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> için deneysel verilerin lojistik çoğalma modeli ile uyumu.....	72



Şekil 4.12 Farklı katkı maddelerinin varlığında <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin hücre dışı protein üretimi.....	73
Şekil 4.13 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-I.....	77
Şekil 4.14 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin pH 5–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırmış 2D-PAGE görüntüleri (a).....	78
Şekil 4.15 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-II.....	78
Şekil 4.16 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-III.....	79
Şekil 4.17 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-IV.....	81
Şekil 4.18 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin pH 5–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırmış 2D-PAGE görüntüleri (b).....	82
Şekil 4.19 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-V.....	82
Şekil 4.20 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-VI.....	83
Şekil 4.21 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-I.....	86
Şekil 4.22 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin pH 4–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırmış 2D-PAGE görüntüleri (a).....	87
Şekil 4.23 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-II.....	87
Şekil 4.24 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-III.....	88
Şekil 4.25 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-IV.....	89

Şekil 4.26 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin pH 4–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırılmış 2D-PAGE görüntüleri (b).....	90
Şekil 4.27 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-V.....	91
Şekil 4.28 Farklı sıcaklıklarda çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-VI.....	91
Şekil 4.29 40 °C'ta çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-I.....	93
Şekil 4.30 40 °C'ta çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-II.....	93
Şekil 4.31 Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-I.....	96
Şekil 4.32 Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin pH 4–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırılmış 2D-PAGE görüntüleri (a).....	97
Şekil 4.33 Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-II.....	97
Şekil 4.34 Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-III.....	98
Şekil 4.35 Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-IV.....	99
Şekil 4.36 Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin pH 4–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırılmış 2D-PAGE görüntüleri (b).....	100
Şekil 4.37 Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-V.....	100
Şekil 4.38 Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan <i>D. hansenii</i> 'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-VI.....	101
Şekil 4.39 Kromatin modifikasyon proteini EAF7'ye ait MALDI spektrumu.....	107
Şekil 4.40 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde kromatin modifikasyon proteini EAF7'nin bulunduğu nokta.....	107
Şekil 4.41 Kromatin modifikasyon proteini EAF7'nin kolon grafikleri halinde	

jellerdeki miktar dağılımı.....	108
Şekil 4.42 RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörüne ait MALDI spektrumu.....	108
Şekil 4.43 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörünün bulunduğu nokta.....	109
Şekil 4.44 RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörünün kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı.....	109
Şekil 4.45 WD tekrarı içeren protein JIP5'e ait MALDI spektrumu.....	110
Şekil 4.46 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde WD tekrarı içeren protein JIP5'in bulunduğu nokta.....	110
Şekil 4.47 WD tekrarı içeren protein JIP5'in kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı.....	111
Şekil 4.48 Otofaj proteini 18'e ait MALDI spektrumu.....	111
Şekil 4.49 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde otofaj proteini 18'in bulunduğu nokta.....	112
Şekil 4.50 Otofaj proteini 18'in kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı.....	112
Şekil 4.51 Protein RAI1'e ait MALDI spektrumu.....	113
Şekil 4.52 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde protein RAI1'in bulunduğu nokta.....	113
Şekil 4.53 Protein RAI1'in kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı.....	114
Şekil 4.54 Bakır transport proteini 86'ya ait MALDI spektrumu.....	114
Şekil 4.55 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde bakır transport proteini 86'nın bulunduğu nokta.....	115
Şekil 4.56 Sinaptobrevin benzeri YKT6'ya ait MALDI spektrumu.....	115
Şekil 4.57 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde sinaptobrevin benzeri YKT6'nın bulunduğu nokta.....	116
Şekil 4.58 Sinaptobrevin benzeri YKT6'nın kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı.....	116

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>D. hansenii</i> 'nin asimile edebildiği substratlar.....	7
Çizelge 2.2 Proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.....	24
Çizelge 2.3 Proteinlerin yapılarına göre sınıflandırılması.....	26
Çizelge 2.4 <i>D. hansenii</i> CYC 1021 toksininin farklı bileşiklerin varlığında üretimi.....	31
Çizelge 2.5 <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 767'nin tanımlanan proteinlerinin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılmış listesi.....	46
Çizelge 2.6 %8 ve %12 NaCl ortamında L-[ <sup>35</sup> S]-metiyonin işaretli proteinlerin eşleşme, indüksiyon ve represyon sayılarına genel bakış.....	47
Çizelge 2.7 %8 ve %12 NaCl varlığında en az iki kat indüklenmiş veya represe olmuş proteinler.....	49
Çizelge 4.1 Farklı glukoz derişimlerine sahip üretim ortamlarının su aktivitesi.....	65
Çizelge 4.2 Farklı glukoz derişimlerinde <i>D. hansenii</i> 'nin özgül çoğalma hız parametreleri.....	66
Çizelge 4.3 Farklı sıcaklıklarda <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin özgül çoğalma hız parametreleri.....	69
Çizelge 4.4 Farklı katkı maddelerinin varlığında <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin özgül çoğalma hız parametreleri.....	73
Çizelge 4.5 2D-PAGE jellerde glukoz etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-I.....	80
Çizelge 4.6 2D-PAGE jellerde glukoz etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-II.....	84
Çizelge 4.7 2D-PAGE jellerde sıcaklık etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-I.....	89
Çizelge 4.8 2D-PAGE jellerde sıcaklık etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-II.....	92
Çizelge 4.9 2D-PAGE jellerde katkı maddeleri etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-I.....	98
Çizelge 4.10 2D-PAGE jellerde katkı maddeleri etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-II.....	102
Çizelge 4.11 Mascot programında anlamlı sonuç veren proteinler, eşleşme oranları, moleköl ağırlıkları ve izoelektrik noktaları.....	103
Çizelge 4.12 Mascot programında anlamlı sonuç veren proteinlerin bulunduğu jel örnekleri.....	104

## SİMGELER DİZİNİ

A	Absorbans
ACN	Asetonitril
BSA	Sığır serum albümini
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHCA	<i>alpha</i> -siyano-4-hidroksisinnamik asit
C <sub>Xs</sub>	En yüksek hücre derişimi
D	Aspartat
Da	Dalton
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
g	Relative centrifugal force
HED	Hidroksietildisülfid
IPG	İmmobilize pH gradyeni
k	Üstel fazda özgül çoğalma hızı (zaman <sup>-1</sup> )
kDa	Kilodalton
M	Molarite
MALDI	Matriks Yardımcı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
N	Karıştırma hızı (rpm)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
2D-PAGE	İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
pI	İzoelektrik nokta
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Rotations per minute
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
rx	Hücre çoğalma hızı

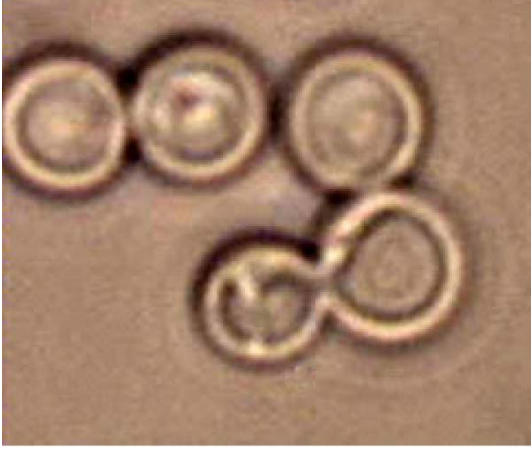
SDS	Sodyum dodesil sülfat
st	Saat
T	Sıcaklık (°C)
t	Kalma süresi, zaman (st)
TCA	Trikloroasetik asit
TEMED	Tetrametiletilediamin
TFA	Trifloroasetik asit
tof	Uçuş zamanı
U	Aktivite
U/mg	Spesifik aktivite
UV	Ultraviyole
UYM	Universal Yeast Medium
V	Volt
W	Triptofan
$\mu$	Özgül çoğalma hızı (zaman <sup>-1</sup> )
$\lambda$	Dalga boyu (nm)

## 1. GİRİŞ

Biyokimyanın erken dönemlerinde araştırılan ilk maya *Saccharomyces cerevisiae*'dir ve ökaryotlarda heterojen ekspresyonlar hakkındaki birçok bilgi, bu mikroorganizmanın çalışılmasıyla elde edilmiştir. Ancak doğaldır ki *S. cerevisiae* tüm biyoteknolojik uygulamalar için uygun değildir. Mayalarda çeşitliliğin ve metabolik yolların ortaya konması için diğer mayalarla da kayda değer çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda ekstrem mayalar ilgi odağı olmuş, ekstremofilik mayalar olan *Debaryomyces* türlerinin genetik ve biyokimyasal açıdan ilginç olduğu ve biyoteknolojik açıdan oldukça umut vaat ettiği görülmüştür.

*Debaryomyces* türleri ozmotoleranttır ve *S. cerevisiae* 1.7 M NaCl derişimine kadar dayanabilirken, *Debaryomyces* türleri 4 M NaCl derişimine sahip ortamlarda çoğalabilir. *D. hansenii* deniz suyu, peynir, et, şarap, bira, meyve ve toprak gibi pek çok ortamda doğal olarak gelişebilir. Ozmotolerant olması bazı biyoteknolojik uygulamalar için oldukça önemlidir. Örneğin, tarım-gıda sektöründe steril olmayan ortamlarda çalışabilen ve yüksek ürün konsantrasyonlarına sahip bir maya olması nedeniyle, üretim masraflarını oldukça düşürebilir. Ancak bunun yanısıra, *D. hansenii* turşu gibi salamura yoluyla saklanan yiyeceklerin bozulmasından sorumlu mikroorganizma olarak gösterilmektedir.

*D. hansenii* lipid depolayan 'oleajinöz' mayalardan biridir. Oleajinöz mayalar kendi kuru biyokütlelerinin %70'ine kadar lipid depolayabilirler ve açıktır ki metabolizmaları lipid metabolizmasına bağlıdır. *D. hansenii*'nin lipid sentezleme, biriktirme ve depolama konusunda ekstrem yeteneği biyoteknolojik olarak doğal ve yapay ürünlerin üretiminde avantaj sağlayabilir. Şekil 1.1'de *D. hansenii*'nin mikroskop görüntüsü görülmektedir.



**Şekil 1.1** *Debaryomyces hansenii* (Breuer and Harms 2006)

*D. hansenii* çok çeşitli ve çok yönlü bir mayadır. Farklı türleri arasındaki değişik karbon kaynaklarını asimile ve fermente etme yetenekleri, değişik lipaz ve proteaz aktiviteleri ve oldukça değişken optimum gelişme koşulları gibi fenotipik farklılıklar bunu gösterir. Şu anki taksonomiye göre *D. hansenii* var. *fabryi* ve *D. hansenii* var. *hansenii* olmak üzere iki farklı varyasyonu bulunmaktadır. Bu farklı varyasyonlar farklı maksimum büyüme sıcaklıkları gibi farklı özellikler taşırlar (Breuer and Harms 2006).

Bu yüksek lisans çalışmasında, ürün spektrumu çok geniş olduğu bildirilen *Debaryomyces hansenii*'nin farklı stres koşullarında çoğalmasını, hücre dışı protein üretimini ve protein dağılımını incelemek amacıyla, farklı glukoz derişimlerinde, sıcaklıklarda ve katkı maddelerinin varlığında üretimler gerçekleştirilmiştir. Farklı stres koşullarında çoğaltılan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinleri izole edilmiş, proteinler iki boyutlu jel elektroforeziyle izoelektrik noktalarına ve moleköl ağırlıklarına göre ayrılmış, ardından MALDI-tof kütle spektrometresi ile analizlenmiştir. Protein tanımlama çalışmaları için Mascot arama motoru kullanılmıştır ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 09B4343011 nolu ve "Çeşitli Stres Koşullarında *Debaryomyces hansenii*'nin Proteinlerinin Karşılaştırılması" konulu proje ile desteklenmiştir.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 *Debaryomyces hansenii*

#### 2.1.1 *Debaryomyces hansenii*'nin filogenisi, ekolojisi, fizyolojisi ve moleküler biyolojisi

Mantarlar ökaryotik filamentli, nadiren tek hücreli olabilen canlılardır. Filamentli formları, yapısal olarak süreklilik gösteren (bölmelerle ayrılmamış) miselyumlardan oluşmuştur. Bazı gruplarda ve yaşam döngülerinin belirli evrelerinde miselyumlar bölmeli yapıdadır. Mantarların tümünde hücre duvarlarının yapısında kitin vardır. Mantarlar çürükçül (saprofit) ya da besinlerini absorpsiyon yoluyla alan parazit heterotroflardır. Çoğalma döngülerinde hem eşeyli hem eşeysiz evreler içerirler. Çoğu haploiddir. Çoğunun yaşam döngülerinde çekirdeklerin kaynaşmadan durduğu iki çekirdekli bir evre vardır. Yaşam döngülerinde yalnızca zigot diploittir. Yaşamlarının hiçbir döneminde kamçı ve sil bulunmaz. 100.000 kadar türü tanımlanmıştır.

Mantarlar alemi dört bölümden oluşur. Bunlar zygomycota (küf mantarları), ascomycota (askuslu mantarlar), basidiomycota (bazidiyumlu mantarlar) ve deuteromycota (enfeksiyon yapan mantarlar) bölümleridir (Demirsoy 1990). *Debaryomyces hansenii* mantarlar aleminin ascomycota bölümüne mensup bir mayadır.

#### ***Filogenisi***

*Debaryomyces* cinsi ilk olarak Nakase *et al.* (1998) tarafından detaylı olarak tanımlanmıştır. Tüm *Debaryomyces* türleri multilateral tomurcuklanma ile vejetatif olarak çoğalan mükemmel haploid mayalardır. Pseudomiselyum yapısı ya yoktur, ya ilkeldir ancak nadiren gelişmiş olarak bulunur. Seksüel çoğalma ise heterogametik konjugasyon yoluyla olur. Bu konjugasyon sonunda genellikle kısa bir diplofaz evresi ve ardından

askospor oluşumu gözlenir. Askuslar bir ila dört adet küresel, globular, oval ve lentiküler formlarda siğilli ya da siğilsiz askospor içerirler. İzogametik konjugasyon da görülebilir (Breuer and Harms 2006).

*Debaryomyces* cinsi fizyolojik olarak zayıf ya da olmayan fermentasyon kapasiteleri, nitrata asimile edemeyişleri ve kemotaksonomik olarak koenzim Q-9 sentezlemeleriyle tanımlanır. %10 NaCl ve %5 glukoz oranlarına dayanabiliyor olması ise *Debaryomyces*'i diğer askomiset mayalardan ayıran kayda değer bir özelliktir.

*D. hansenii* türünün iki varyasyonu *D. hansenii* var. *fabryi* ve *D. hansenii* var. *hansenii*, 26S rRNA sekanslarının ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerinin elektroforetik mobilitelerinin farklı olmasıyla ve maksimum çoğalma sıcaklıkları (var. *hansenii* sadece 35 °C'ye kadar yaşayabilirken, var. *fabryi* 39 °C'ye kadar dayanabilir) arasındaki fark ile birbirinden ayrılırlar. Corredor *et al.* (2003) DNA fragmentlerini uzunluğuna göre ayıran bir yöntem olan PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)'nin *D. hansenii*'nin kesin tanımlanmasında kullanılması gerektiğini savunmaktadır. Bu yöntemin karyotip analizinde kullanılmasıyla *D. hansenii* tiplerinin genomik organizasyon bazında belirgin farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. *D. hansenii* var. *fabryi* ve *D. hansenii* var. *hansenii* arasında gözlemlenen kromozomal uzunluk polimorfizmlerinin tekrarlayan sekanslardan ve kromozomal düzenlemelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. *Debaryomyces* cinsinin ve iki varyasyonunun taksonomik sınıflandırmasının ileri analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanmasıyla yakın gelecekte değişiklik göstereceği öngörülmektedir (Breuer and Harms 2006).

### ***Ekolojisi***

*D. hansenii* ozmo-, halo- ve kserotolerant bir mayadır. Düşük su aktivitesine sahip bazı gıdalar için tıpkı *Pichia guilliermondi*, *Yarrowia lipolytica* ve *Candida parapsilosis* gibi kontaminant olarak bilinir. *D. hansenii* Namibya'nın Atlantik kıyıları ve Utah'taki büyük tuz gölü gibi yüksek tuzluluk oranlarına sahip sularda bulunur. %25 NaCl ya da %18

gliserol içeren besiyerlerinde çoğalabilir. Ayrıca *D. hansenii* hastalıklara neden olabilir. Bu özelliğinin bilinmesi tanı ve tedavi için önemlidir.

*D. hansenii* bazı toksinleri üretme ve tolere etme yeteneğindedir. Toksin üretme özelliği ekonomik prosesler geliştirerek toksinin kendisinin üretimi veya bazı ortamlarda istenmeyen mikroorganizmaların üremesinin engellenmesinde kullanılabileceği için biyoteknolojik araştırmalar için ilgi çekici olabilir. Gunge *et al.* (1993) araştırmalarına göre *Debaryomyces* bazı maya türlerini öldürmüştür. Bu toksin aktivitesini sadece NaCl ya da KCl gibi tuzların varlığında göstermiştir. Ayrıca toksin kodlayan gen bölgesinin pDHL plasmidlerinden birinde olduğu varsayılmış olmasına rağmen, öldürücü fenotip pDHL plasmidiyle ilişkili değildir. pDHL 1 plasmidi, *Kluyveromyces lactis* toksininin  $\alpha$  altbirimiyle benzerlikler taşıyan bir proteini kodlayan gen bölgesi içermektedir. *D. hansenii*'nin 37 °C'de kararlı olan bir toksin sentezleme yeteneğinde olduğu söylenmektedir. İnsan vücudu sıcaklığında kararlı olan maya toksinlerinin tıbbi uygulama alanları olabilir. Örneğin, saflaştırılmış ve konsantre edilmiş toksin preparatları patojenik mayaların tedavisinde kullanılabilir. Marguina *et al.* (2001) toksin üretimi için gerekli optimum koşulları araştırmış ve tuzun, bazı proteinlerin, non-iyonik deterjanların ve dimetilsülfoksit gibi bazı katkı maddelerinin toksin üretimini stimüle ettiğini gözlemlemişlerdir. Toksin salgılanması erken durağan fazda en yüksek seviyelere çıkmıştır. Santos *et al.* (2002) ise *D. hansenii*'nin toksininin hücre duvarındaki (1-6)- $\beta$ -glukan bağlarına bağlanarak etki ettiğini ve *Trichosporon cutaneum* ve *C. zeylanoides* tarafından üretilen toksinlere karşı dayanıklı olduğunu bildirmiştir. *Debaryomyces*'in toksin sentezleme ve toksinleri tolere etme yeteneği ileri medikal uygulamalar için detaylı olarak araştırılmalıdır.

*D. hansenii* ile ilgili bir diğer ilginç gözlem ise kuvvetli bir biyosid olan klordioksite (ClO<sub>2</sub>) karşı dirençli olmasıdır. Bu özelliği, istenmeyen mikroorganizmaları kontrol edebilmek için 0.3 mg/L'ye kadar ClO<sub>2</sub> içeren sterilizasyon yapılmamış ortamlarda kültüre edilmesine olanak sağlar. *D. hansenii* penkonazol, benomil ve sikloheksimid gibi antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir. Ayrıca flukonazol ve amfoterisin B için minimum inhibisyon konsantrasyonları (MICs) patojenik bir maya olan *Candida albicans*'a göre daha yüksektir (Breuer and Harms 2006).

## ***Fizyolojisi***

*D. hansenii*'nin fizyolojisi Nakase *et al.* (1998) tarafından özetlenmiştir. Bu mayanın birtakım olağanüstü özellikleri vardır. %10 NaCl veya %5 glukoz içeren ortamlarda yaşayabildiği gibi çok değişik karbon kaynaklarını da asimile edebilmektedir (Breuer and Harms 2006). *D.hansenii*'nin asimile edebildiği değişik substratlar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

*Candida albicans*, *Pichia pastoris* veya *Pichia angusta* gibi biyoteknolojik olarak yararlanılan diğer mayaların aksine *D. hansenii* n-alkanları kullanabilmekte ve melibiyoz, rafinoz, nişasta ve inositolü asimile edebilmektedir. Biyoteknolojik açıdan bir diğer önemli maya *Yarrowia lipolytica* n-parafinleri asimile edebilmekte; ancak %10 NaCl veya %5 glukoz içeren ortamlarda yaşayamamaktadır. *D. hansenii* yüksek kemostres toleransına sahiptir, yani pek çok substratın yüksek derişimleri hücrelerin besi ortamlarında kullanılabilir. Oksijen yokluğunda *D. hansenii* son derece zayıf gelişme gösterir ve glukoz varlığında naftalini ve benzo[a]pireni okside edebilir (Breuer and Harms 2006).

*D. hansenii*'nin glukoz, galaktoz, sükroz, maltoz, rafinoz ve trehaloz fermentasyonu zayıftır ve laktoz fermentasyonu hiç gözlenmemiştir. Bu durum *D. hansenii*'nin zayıf anaerobik gelişimine uygundur. Maya nitratı asimile edemezken nitriti asimile edebilir. *D. hansenii* optimum büyüme sıcaklığı 20-25 °C olarak bilinir; ancak 5-10 °C arasında büyüebildiği hatta 0 °C'nin altında dahi gelişebildiği bildirilmiştir. Van den Tempel and Jacobsen (2000) *D. hansenii*'nin 10 °C'de pH 4.0-6.0 arasında 0.99 su aktivitesinde ( $a_w$ ) yaşayabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca *D. hansenii*'nin pH 3.0-10 arasında yaşayabilme kabiliyetinde olduğunu belirtmişlerdir.

**Çizelge 2.1** *D. hansenii*'nin asimile edebildiği substratlar (Breuer and Harms 2006)

<i>Substrat</i>	<i>Kullanımı</i>	<i>Substrat</i>	<i>Kullanımı</i>
Glukoz	+	<i>N</i> -Acetil-D-glukosamin	D
Galaktoz	+	Metanol	—
L-Sorboz	D	Etanol	+/ <i>Z</i>
Sukroz	+	Gliserol	+
Maltoz	+	Eritritol	D
Sellobiyoz	+	Ribitol	+
Trehaloz	+	Galasitol	D
Laktoz	D	D-Mannitol	+
Melibiyoz	D	D-Glusitol	+/ <i>Z</i>
Rafinoz	+	$\alpha$ -Metil-D-glukosit	+
Melezitoz	D	Salisin	+/ <i>Z</i>
Inulin	D	D-Glukonat	+/ <i>Z</i>
Nişasta	D	DL-Laktat	D
D-Ksiloz	+	Suksinat	+
L-Arabinoz	+/ <i>Z</i>	Sitrat	D
D-Arabinoz	D	Inositol	—
D-Riboz	D	Heksidekan	D
L-Ramnoz	D	Nitrat	—
D-Glukozamin	D	Nitrit	D
2-Keto-D-glukona	+	5-Keto-D-glukonat	D
Sakkarat	—		

+, positif; *Z*, zayıf; D, değişken; — , negatif

Sitokrom c oksidazın yanısıra *D. hansenii* elektron transfer zincirinde terminal elektron gibi davranan ikinci bir oksidaz içerir. Bu alternatif oksidaz, siyanür ve antimisin A'ya karşı duyarsızken salisilhidroksamik aside karşı duyarlıdır. Siyanür dirençli solunum yolağı mayalarda çok yaygın olup enerji dönüşümleriyle bağlantılıdır ve *D. hansenii* üzerinden açıklanmıştır. Farklı fizyolojik koşullarda bu yolağın hücrenin enerji tedarik

etmesinde kullanıldığı düşünülmektedir. Bu yolak sitokrom c yolağındaki enerji üretimini akıştaki bazı elektronları alternatif oksidaza yönlendirerek azaltır.

*D. hansenii* genel olarak patojen olmayan mayalar grubuna dahil edilir. Ancak bazı enfeksiyonlar rapor edilmiştir. Bazı çalışmalar mayanın deri altı apselerine, osteite ve keratite neden olabileceğini ortaya koymuştur (Breuer and Harms 2006).

### ***Moleküler biyolojisi***

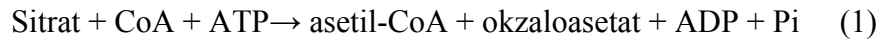
*D. hansenii*'nin moleküler biyolojisi hakkında çok az bilgi mevcuttur. Çoğu tipleri haploittir ve nadiren çiftleşirler (Breuer and Harms 2006).

*D. hansenii*'nin genomu Gënolevures Projesi kapsamında keşfedilmiştir. Bu projede hemiaskomiset sınıfı mayalarından *Saccharomyces cerevisiae* ve 14 farklı tür mayanın genomu çıkarılmış ve kıyaslanmıştır. *Saccharomyces sensu stricto*, *Saccharomyces sensu lato*, *Saccharomyces servazzii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, *Pichia angusta*, *D. hansenii* var. *hansenii*, *P. Sorbitophila*, *Candida tropicalis* ve *Yarrowia lipolytica* incelenmiştir. Hemiaskomiset sınıfı mayalar arasında *D. hansenii* tüm genom sekansı için seçilmiş türlerden biridir; çünkü halotolerant bir mayadır ve genelde gıda maddelerinde bulunur. Gënolevures Projesi hemiaskomiset sınıfı mayaların genomlarındaki tüm olayların aydınlatılması adına oldukça geniş kapsamlı ve önemli bir projedir (Sherman *et al.* 2004).

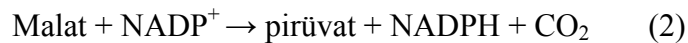
## 2.1.2 *Debaryomyces hansenii*'nin önemli özellikleri

### *Oleajinözlük*

*D. hansenii* dahil olmak üzere bazı mikroorganizmalar yüksek oranda yağ sentezler ve depolar. Yağ üreten bitki tohumlarına benzer olarak terminolojide bu mikroorganizmalara oleajinöz denir. 600 maya türü arasında yağ depolama özelliğine sahip mayaların sayısı 30'dan azdır. Oleajinöz mikroorganizmaların resmi bir tanımı yoktur; ancak pratikte kendi kütlelerinin %20-25'i kadar yağ depolayabilen mikroorganizmalar oleajinöz olarak anılır. Mayalar, küfler ve ökaryotik algler için oleajinözlük tanımı ATP:sitrat liyaz enziminin varlığıyla ifade edilir. Bu enzim sitoplazmada sitrattan yağ asiti biyosentezinde anahtar molekül olan asetil-CoA üretir. Oleajinöz mikroorganizmalar sitrati mitokondri dışına yani sitoplazmaya malat-sitrat translokaz çevirimiyle taşır ve sitrati ATP:sitrat liyaz enzimi ile bölerek asetil-CoA üretirler.



Oleajinöz olmayan organizmalar bu enzime sahip değildir ve sitoplazmada daha az asetil-CoA üretimi gerçekleştirirler. ATP:sitrat liyaz lipid depolanması açısından çok önemli bir enzimdir. Ancak depolanan lipidlerin metabolizmasının kontrolünde ve yönlendirilmesinde rol alan tek enzim değildir. Malat dehidrogenaz oleajinöz mikroorganizmalarda depolanacak lipid boyutlarını kontrol eden enzimdir.



*D. hansenii* lipidlerini inceleyen ilk araştırmacılar olan Merdinger and Devine (1965), *D. hansenii*'nin tüm lipidlerinin %67'sinin nötral lipidlerden, %33'ünün fosfolipidlerden oluştuğunu göstermişlerdir. Mikrodamlacıklar halinde bulunan nötral lipidler neredeyse tamamen triaçilgliserollerden oluşur. Hem nötral hem fosfolipidlerin açıl grupları geleneksel olarak şu bağıl yoğunlukta bulunur: oleik (18:1) > palmitik (16:0) > linoleik (18:2) = stearik asit (18:0). Bazı maya türleri arasında farklanmalar olabilir. Ergosteroller ve yanında az miktarda stigmasterol ve tanımlanamamış bazı steroller 16-30 karbonlu

doymuş hidrokarbon zincirleri halinde *D. hansenii* hücrelerinde bulunur. Esas fosfolipid olarak fosfotidilkolin, bunu takiben fosfotidilinozitol, fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin, fosfotidilgliserol ve kardiolipin ihtiva ederler. *D. hansenii* yüksek tuzluluk oranlarında geliştiğinde genel fosfolipid kompozisyonu çok az değişiklik gösterir. Benzer şekilde belirli fosfolipidlerin profilleri de yüksek tuzluluk ortamında fazla değişkenlik göstermez. Tuzluluktaki artış ile fosfotidilserin artarken fosfotidilinozitol, fosfotidiletanolamin ve fosfotidilgliserolde azalış gözlemlenmiştir. Fosfotidilkolin ve kardiolipinde ise ancak çok az değişiklikler gözlemlenmiştir.

Mayalar ticari öneme sahip olabilecek nadir yağ asitlerini ihtiva etmezler. Ayrıca çok ucuz substratlar veya atıklar kullanılmadığı sürece mikrobiyal yağlar henüz ucuz bitki tohumlarıyla yarışacak düzeyde değildir. Ancak bunun yanında mayalar glikolipid surfaktantları veya astaksantin gibi genellikle bitkiler tarafından üretilmeyen bazı lipileri üretmektedirler. Böyle lipidlerin ticari amaçlarla maya tabanlı biyoteknolojik proseslerle üretimi, mayalar indüklenir ya da ucuz yolla manipüle edilebilirlerse, kimyasal üretim prosesleriyle yarışabilir düzeye gelebilir. Bu amaçla genetik modifikasyonların uygulanması yararlı olabilir (Breuer and Harms 2006).

### ***Halotolerans***

*D. hansenii* ozmo- ve kserotolerant olmasının yanısıra halotolerant olmasıyla da oldukça ekstremofilik bir mayadır. Sahip olduğu bu özellikler *D. hansenii* üzerine pek çok araştırma yapılmasına sebep olmuş ve tuzluluğun çoğalmasıyla ilişkisi incelenmiştir. Bu araştırmalar göstermiştir ki *D. hansenii* 1 M NaCl ya da 1 M KCl konsantrasyonlarında daha düşük tuz konsantrasyonlarına oranla daha hızlı çoğalmaktadır. *Debaryomyces* çok geniş aralıktaki su aktivitesi değerlerine sahip ortamlarda çoğalabilir. Bu mayanın doğal ortamları deniz suyu, et, şarap, bira, peynir, meyve ve topraktır. *D. hansenii* %3-5 tuzluluk oranlarında optimum çoğalma gösterdiğinden ötürü ılımlı halofilikler sınıfına dahil edilir.



Tuzlu ortamlarda en yaygın olarak bulunan maya olması ve %25 tuzluluk oranlarına dayanabiliyor olması *D. hansenii*'yi tuz toleransı çalışmalarında model organizma haline getirmiştir ve osmotoleransı detaylı olarak incelenmiş durumdadır.

Halofilik organizmaların osmotik dengelerini sağlamaları ve tuzlu ortamlarda çoğalabilmeleri bazı maddeleri üretmeleri ve biriktirmeleri sayesinde gerçekleşir. Mantarlarda gliserol, mannitol, arabinitol ve eritritol gibi maddeler osmotik basıncı dengelemede ve yaşamı sürdürmede görev alır. *D. hansenii*'de ise bu maddeler gliserol ve arabinitoldür. Durağan faza geçişte gliserol azalmaya ve yerini arabinitole bırakmaya başlar. Tuz stresi enerji metabolizması ile ilişkili iki anahtar parametrede değişiklik olmasını indükler ve gliserol üretimini artırır. *D. hansenii* tuz stresi altında alditol metabolizmasını kontrol edebilme yeteneğine sahiptir ve böylece optimum büyüme sağlayabilir. Ayrıca trehalozun da yüksek tuzluluğun dengelenmesinde rol oynuyor olabileceği düşünülmektedir. Bazı bakterilerin aksine *D. hansenii*'de amino asitler bu dengede hiçbir rol oynamazlar. Adler *et al.* (1985) gliserolü kullanmayan mutant bir *D. hansenii* ile yaptıkları çalışmada ozmoregülasyon ve gliserol arasında bir bağlantı olduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmaya göre gliserol önce dihidroksiaseton fosfatın gliserol-3-fosfata redüklenmesi ardından bunun defosforilasyonu ile oluşturulmaktadır. Hücre içi gliserol konsantrasyonu ortam bileşenlerinin konsantrasyonlarının artırılmasıyla artırılabilmiştir. Düşük tuzluluk oranlarında ise en göze batan hücre içi bileşeni arabinitoldür. Farklı koşullarda farklı maddeler sentezleme yeteneği bazı uygulamalar için önemli olabilir. Ayrıca *D. hansenii* *S.cerevisiae*'dan daha fazla trehaloz üretir. Gonzalez-Hernandez *et al.* (2005) tuz stresi altında (2 ve 3 M tuz) *D. hansenii*'nin trehalozlardan daha fazla miktarda gliserol biriktirdiğini görmüştür. İlmli tuz streslerinde ise bunun tam tersi geçerlidir. Buradan anlaşıldığı üzere trehaloz diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi *D. hansenii* için de bir depo karbonhidratıdır.

*S. cerevisiae*'nın aksine *D. hansenii* hiperosmolarite stresi altında kendi gliserol metabolizmasını regüle edebilir. Ayrıca daha üstün transport mekanizmalarına sahiptir. Aminoasit ve karbonhidrat taşıyıcılarının *S. cerevisiae*'nin iki katı kadar olmasının yanında, ozmo-duyarlı genleri de *Saccharomyces* türlerinde olduğundan daha fazladır.

*D. hansenii*'nin yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olması ve bu ortamlarda çoğalabilmesi biyoteknolojik uygulamalar için oldukça önemlidir. *D. hansenii* çok steril ortamlara ihtiyaç duyulmadan kültüve edilebilir; çünkü yüksek tuz konsantrasyonlarında çoğalabiliyor olması, istenmeyen mikroorganizmaların kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Bu ortamların yaratılmasında ucuz tuzlu atıklar substrat olarak kullanılabilir.

### 2.1.3 *Debaryomyces hansenii*'nin biyoteknolojik uygulamaları

#### *Peynir üretimi*

Mayalar günlük mamüllerin üretiminde kullanılan mikrofloranın önemli bir kısmını oluştururlar. Aynı zamanda asidik ve/veya düşük su aktivitesine sahip yiyeceklerde bozulmadan da sorumludurlar. Bu nedenle, *D. hansenii*'nin yiyeceklerdeki etkisinin bilinmesi son derece önemlidir.

*D. hansenii* yumuşak, yarı sert ve sert olmak üzere her tip peynirde bulunan yaygın bir maya türüdür. Bunu sağlayan *Debaryomyces* cinsinin anahtar özellikleri tuz toleransı, süt proteinlerini ve yağlarını metabolize eden proteolitik ve lipolitik enzimleri, düşük sıcaklıklarda ve düşük su aktivitesine sahip ortamlarda yaşayabilme özellikleridir. Bunların yanında *D. hansenii*, *Clostridium butyricum* ve *C. tyrobutyricum* gibi istenmeyen mikroorganizmaların üremesini besin kaynakları için yarışarak ve hem hücre içi hem hücre dışı ürettiği antimikrobiyal ajanlar sayesinde engeller. *D. hansenii*'nin peynirde üreyebilmesi ve laktatı, sitratı, laktozu ve galaktozu metabolize edebiliyor olması onu peynir üretiminde önemli bir starter kültür yapar. Ayrıca asetatı karbon kaynağı olarak kullanabiliyor, laktozu asimile edebiliyor ve glukozu asimile ederken sınırlı miktarda fermente edebiliyor olması, peynir üreticileri için önemli özelliklerdir. Buna ek olarak *D. hansenii*'nin metabolik aktiviteleri peynir üretimi için faydalı olan bazı bakteri ve/veya *Penicillium roqueforti* gibi mayalara yarar sağlar ve peyniri istenmeyen karbonhidrat fermentasyonlarından korur.

*D. hansenii*'nin uçucu asitler, alkol ve peynir aromaları ve karbonil bileşikleri sentezlediği bulunmuştur. Metil ketonlarla meyve, çiçek, küf, peynir ve şarap kokuları, 2-feniletanol ile gül kokusu oluşumunu sağlar. Saf halde bulunan *D. hansenii*'nin gül kokusuna sahip olması da yüksek konsantrasyonda ihtiva ettiği 2-feniletanol ile açıklanabilir. *D. hansenii*'nin ve *Kluyveromyces marxianus*'un peynir aromalarında etkileri bilindiğinden bu iki mayayı içeren başlatıcı kültürler halihazırda kullanılmaktadır (Breuer and Harms 2006).

*D. hansenii* ve peynirin olgunlaşmasında görev alan pek çok maya, en yaygın uçucu kükürt bileşiği olan *S*-metiltiyooasetatı ve çedar, kamamber gibi peynirlerde bulunan daha az yaygın olan metiyonalı sentezler. Böylece güçlü kamamber aroması oluşumuna yardımcı olurlar. Ayrıca peynir olgunlaşması sırasında görev alan *Geotrichum candidum*, *K. lactis*, *S. cerevisiae* ve *Y. lipolytica* gibi diğer mayaların aksine *D. hansenii* uçucu kükürt bileşiklerinden olan metiltiyopropanolü sentezler.

Süt içinde çoğalması esnasında *D. hansenii* eser miktarda aminoasit (öncelikli olarak glutamik asit, glisin, arginin, prolin ve alanin) ve yağ asidi sentezler. Ayrıca çok az miktarda süksinik asit metabolize ederken, çok az miktarda etanol (<5 g/L) ve Danimarka peyniri yapımı sırasında da yine az miktarda laktik asit sentezler.

Araştırmacılar farklı tip *D. hansenii*'nin içerdiği enzimleri araştırmışlar ve fosfatazlar, C4-esterazlar, C8-esteraz-lipazlar, lösin arilamidazlar, valin arilamidazlar, aminopeptidazlar, β-galaktozidazlar ile karşılaşmışlardır (Van den Tempel and Jacobsen 2000). Ayrıca *D. hansenii*'nin β-kazein türevi peptidlere karşı etkili peptidazlara sahip olduğu ve bu durumun peynirde oluşan proteolitik aktiviteyi etkilediği anlaşılmıştır (Kumura *et al.* 2002).

Diğer bir konu ise *D. hansenii*'nin peynirlerde yüzeyde mi yoksa iç kısımlarda mı olmayı tercih ettiğidir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki peynirin türüne ve kullanılan başlangıç kültürünün kompozisyonuna göre *D. hansenii* iki lokasyonda tercih edebilmektedir (Breuer and Harms 2006).

### ***Et fermentasyonu***

*D. hansenii* süflitlenmiş, süflitlenmemiş, soyulmuş sosislerden ve kıymadan alınan 383 izolatta en yaygın olarak bulunan mayalardan biridir. Bu da onun et fermentasyonunda ne kadar önemli bir yere sahip olduğunu anlatır. Aslında *Debaryomyces* türlerinin et

fermentasyonundaki yeri 1960'larda bu mayanın hidrojen sülfür sentezleme yeteneği keşfedildiğinden beri bilinmektedir.

Dura *et al.* (2004) göstermiştir ki *D. hansenii* amonyak da dahil olmak üzere bazı uçucu bileşikleri sentezleyebilmekte, sosislerde serbest amino asit kompozisyonunu değiştirebilmekte ve başlangıç kültürü olarak kullanıldığında etteki aromaları değiştirebilmektedir. Ayrıca *Debaryomyces* türleri sosis fermentasyonu sırasında lipid oksidasyonu ürünlerini inhibe ederek ve etil esterlerin oluşumunu tetikleyerek uçucu bileşiklerin oluşumunda ve böylece tipik sosis karakterinin oluşmasında büyük bir etki sağlarlar.

Dallanmış zincirli amino asitlerden uçucu bileşiklerin sentezlenmesinde tuzun etkisi yok iken başka değişkenlerin etkisi olabilmektedir. Örneğın, pH'ın 4.5'e düşmesi alkol ve aldehit üretimini artırır; ancak üstel çoğalma fazında alkol ve aldehit üretimi öne çıkarken durağan faza geçište bu üretim yerini asit oluşumuna bırakır. Mayalar uçucu bileşikler sentezledikleri için ete bazı aromaları da kazandırmakta etkilidirler.

*D. hansenii*'nin et fermentasyonu esnasında da görev aldığını dair bazı bilgiler elde edilmiştir. Mayadan elde edilip saflaştırılan propil aminopeptidaz, arginil aminopeptidaz ve glutaminaz enzimleri bunun göstergesi olarak görülmektedir. Etlerin kürlenmesi prosesinde *Clostridium botulinum* kontaminasyonunu engellemek, pembe renk vermek ve belirli et aromaları oluşturmak için kürlenmiş etlere eklenen nitrat, nitrit, glukoz ve askorbik asitin *D. hansenii*'den izole edilen bu enzimler üzerinde hiçbir inhibisyon etkisi olmadığı görülmüştür.

Mayalar et üretiminde her zaman faydalı değildir. Uzun zaman önce sosis gibi etlerde oluşan bozulmaların *Debaryomyces* türlerinin sebep olduğu bulunmuş ve daha sonraki yıllarda bu türün *D. hansenii* olduğu tespit edilmiştir (Breuer and Harms 2006).

## ***Kimyasal üretimi***

*D. hansenii* peynir ve et üretiminde bahsedildiği gibi biyoteknolojik açıdan önemli maddeler sentezler. Osmotolerant bir maya olarak *D. hansenii* D-arabinitol üretir. Bu bileşik eğer düşük maliyetle üretilebilirse ticari açıdan ilgi çekici olabilir. D-arabinitol üstel çoğalma fazından sonra riboflavin ile eş zamanlı olarak üretilir.

*D. hansenii*'nin biyoteknolojik açıdan bir diğer avantajı da pirüvik asit üretme yeteneği, ayrıca inorganik amonyumu azot kaynağı olarak kullanabilmesidir. Kimya, eczacılık ve tarım sektörlerinde yaygın olarak kullanılan pirüvik asit günümüzde kimyasal olarak üretilmekte; ancak daha ucuz ve karbon kaynağının daha verimli olarak geri dönüşümü sağlanabilen tek basamaklı bir prosedür olan biyoteknolojik üretim daha avantajlı görülmektedir.

*D. hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii*'den daha az da olsa potasyum sorbattan pentadien oluşturabilir. Mayaların sorbatı parçalayarak pentadien oluşturması koruyucu olarak kullanılan sorbata karşı bir direnç mekanizması olarak görülebilir. Zayıf asitlere karşı mayalarda en geçerli direnç mekanizması ATP bağımlı proton pompaları ile hücre içi protonların dışarı pompalanması ve hücre içi pH'ın korunması şeklindedir (Breuer and Harms 2006).

## ***Litik enzimler***

Gıda endüstrisinde *D. hansenii*'nin litik enzimlerinden yararlanılmaktadır. Mayaların proteaz enzimleri bira ve şarap endüstrisinde protein bulanıklıklarını gidermek için kullanılır. Bu nedenle mayaların hücre dışı hidrolitik enzimleri oldukça araştırılmış bir konudur.

Ahearn (1968) gıda bozulmalarına etki etmesi sebebiyle 68 farklı tip *D. hansenii* ile çalışma yapmış; ancak yalnızca 4 tanesinde proteolitik aktivite bulabilmişlerdir. Lagace and Bisson (1990) ise aynı tür bir çalışmada hemen hemen hiç proteolitik aktivite gözlemlememişlerdir (Breuer and Harms 2006). Ancak daha sonra *Debaryomyces hansenii* CECT 12487 ile yapılan çalışmalarda iki temel proteinaz; proteinaz A ve proteinaz B tanımlanmış ve tuzlu etlerde bu enzimlerin büyük rol oynadığı öngörülmüştür (Bolumar *et al.* 2008).

Takaç ve Şengel (2010), *D. hansenii*'nin hücre dışı lipolitik enzim aktivitesini inceledikleri çalışmada, değişik trigliserid, yağ asitleri ve bitkisel yağları karbon kaynağı olarak kullanmış, en yüksek lipolitik aktiviteye tristearin (0,68 U/mg), oleik asit (0,56 U/mg) ve soya yağı (0,36 U/mg)'nin karbon kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamlarında ulaşmışlardır. Farklı azot kaynaklarının hücre dışı lipolitik aktivite üzerine etkisini de inceledikleri çalışmada, %0,5 pepton + %0,3 maya ekstraktı içeren ortamda mayalar 0,36 U/mg enzim aktivitesine ulaşırken, bunu %1 soya unu içeren ortam 0,30 U/mg ile takip etmiştir. Ayrıca peynir altı suyunun ve gliserolün enzim aktivitesini arttırırken, bir surfaktant olan Triton X-100'ün enzim aktivitesini azalttığını ortaya koymuşlardır.

Saha and Bothast (1996) *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* ve *Pichia* cinslerine ait 48 maya tipinin hücre dışına glukoz ve sıcaklık toleransına sahip  $\beta$ -glukozidazlar salgıladıklarını açıklamışlardır. Bu glukozidazlar selülozu hidrolizleyip glukoz oluşturabilirler ki bu ticari açıdan yakıt alkollerinin üretilmesinde önem taşır. *Debaryomyces* tiplerinin  $\beta$ -glukozidazları *Pichia kodamae*'ninkilerden 100 kat daha az enzim aktivitesi gösterse de, sellobiozu glukoz inhibisyonundan etkilenmeden hidrolize edebilirler. Ayrıca bu enzimlerin optimum sıcaklığı 65 °C 'dir ki bu da bağıl olarak yüksek bir sıcaklıktır. *D. hansenii*'den elde edilen bir hücre içi  $\beta$ -glukozidaz saflaştırılmış ve muskat üzümleri ile analizlenip test edilmiştir. Bu enzimin üzüm suyundaki yüksek glukoz derişimlerine dayanabilmek gibi bir avantajı varken ticari olarak satılan maya orijinli  $\beta$ -glukozidazların böyle bir yeteneği yoktur. *D. hansenii* glukozidazları monoterpenolleri açığa çıkarır. Bu özelliği şaraplarda aromaların artırılması için kullanılabilir. *D. hansenii* glukoz yokluğunda *Saccharomyces cerevisiae*'dan daha yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi

gösterir ki bu da onun şarap üretiminde aromaların oluşumunda daha büyük etkisi olduğunun bir kanıtıdır (Breuer and Harms 2006).

Besancon *et al.* (1995) *D. hansenii*'den esteraz enzimi (EC 4.1.1.1) izole etmiş ve tanımlamıştır. Bu enzim başka şarap mayalarından da izole edilmiş ve şarap yapımı için ana enzimlerden biri olduğunu anlaşılmıştır. Bu monomerik enzim tribütirin ve etil bütiratı maksimum aktivite ile, kısa yağ asitlerinin (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) metil ve etil esterlerini gayet hızlı şekilde ve uzun zincirli yağ asidi (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) esterlerini daha yavaş şekilde hidrolize eder. Ayrıca alifatik ve aromatik asetat esterleri de hidrolize edilebilir (Breuer and Harms 2006).

*D. hansenii* superoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) enzimi için potansiyel bir kaynaktır. Bu enzim superoksit radikalının dismutasyonunu sağlayan bir metalloenzimdir. Bu enzim ilaç ve gıda sektöründe genel olarak tüm oksidatif stres giderme uygulamalarında kullanılmaktadır. *D. hansenii* ile SOD üretimi deniz suyu gibi tuzlu ortamlarda üretilebilmesi ve çok farklı koşullara dayanabiliyor olması nedeniyle şu anda kullanılan metodlarla yarışabilecek düzeydedir. Hernandez- Saavedra and Romero-Geraldo (2001) *D. hansenii*'de bulunan SOD genini ilk defa klonlayan isimlerdir (Breuer and Harms 2006).

*Cryptococcus laurentii*, *D. hansenii* ve *Candida* türlerini içeren bazı antifungal aktiviteye sahip mayalar meyvelerden izole edilmiş ve meyve bozulmalarına sebep olan mayalara karşı biyokontrol ajanı olarak etkileri incelenmiştir. Bir başka çalışmada ise üzümün *D. hansenii* ile muamelesi sonucu *Penicillium digitatum* mayasının spor oluşumunda ve çoğalmasında azalma olduğu tespit edilmiştir. Biyokontrol proseslerinde besin yarışması da ayrıca önemli bir role sahiptir. Ancak *D. hansenii*'nin biyokontrol ajanı olarak kullanılması durumunda, bu mayanın patojenik olmamasına rağmen bazı klinik vakalarının olduğu unutulmamalıdır.



## ***Alditol üretimi***

*Debaryomyces*, alditol üretimi için tıpkı bir hücre fabrikası gibi çalışır. D-Ksilozdan ve odun hidrozilatlarından yüksek oranda ksilitol ürettiği için uzun yıllardır faydalanılmaktadır. Osmotolerant bir maya olarak *D. hansenii* diğer alditollerin üretimi için de kullanılabilir.

Ksilitol gıda endüstrisinde yüksek tatlandırma özelliği nedeniyle kullanılır. Bu sebeple diabetik ürünlerde sıklıkla kullanılır. Aslında ksilitol D-ksilozun fermentasyonu sırasında aldoz redüktaz (genelde ksiloz redüktaz diye anılır) ile açığa çıkan bir metabolik ara üründür. Bu enzim aldehitler ve aldol şekerleri için geniş bir substrat spesifitesine sahiptir.

*D. hansenii* kullanılan substratlara göre farklı ürünler üretebilir. Örneğin, pentoz şekerleri kullanıldığında ksilitol, arabinitol ve hatta etanol üretirken, glukoz kullanıldığında belirgin şekilde etanol ürettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca glukoz/arabinoz ve ksiloz/arabinoz gibi şeker çiftlerini de eş zamanlı olarak tüketebilir. Arabinoz içeren ortama az miktarda ksiloz eklenmesi ardından arabinitol üretiminin dört katına çıktığı görülmüştür; yani arabinitol üretimi ksiloz tarafından indüklenir. Bunun tersi olarak ortama glukoz eklenmesinin arabinitol üretimi üzerine hiçbir etkisi yoktur (Girio *et al.* 2000).

Nobre *et al.* (1999) *D. hansenii*'nin, iki tip şekerle de biyokütle veriminin yakın olmasına rağmen, pentoz varlığında heksozlara nazaran daha yavaş çoğaldığını tespit etmiştir. Ayrıca *D. hansenii* şeker karışımı içeren ortamlarda bu iki farklı şekeri aynı oranda tüketir. Bu durum genellikle şeker karışımları içeren hemisellüloz hidrolizatlarının substrat olarak kullanıldığı ksiloz üretimi için önemli olabilir. Daha sonra yapılan bir çalışmada ise Tavares *et al.* (2000) karbonhidrat kaynağının *Debaryomyces*'in çoğalmasını etkilediğini, glukoz varlığının ksiloz üretimini inhibe ettiğini ve mayanın sırasıyla D-glukoz, D-mannoz, D-ksiloz ve D-galaktozu tüketmeyi tercih ettiğini öne sürmüştür.

Ksilitolün yanısıra *D. hansenii* diğer pek çok askomiset maya gibi alkali çözülebilir glukanlar ve alkali çözünmöz glukanlar sentezler. Bu polisakkaritler son derece geniş endüstriyel ve medikal uygulama alanlarına sahiptir. Alkali çözülebilir glukanlar, koyulaştırma ajanları, yağ muadili veya diyet lif kaynağı olarak gıda ve kozmetik endüstrisinde kullanılabilir. Ayrıca antitümör aktiviteleri, bağışıklık sistemi tetikleme ve serum kolestrol düzeyini düşürme etkileri vardır. *Debaryomyces* pek çok mayadan daha yüksek hücre duvarı kitini seviyelerine sahipse de alkali çözülebilir glukan seviyesi çok düşük ve alkali çözünmöz glukan seviyesi yüksek bir mayadır (Breuer and Harms 2006).

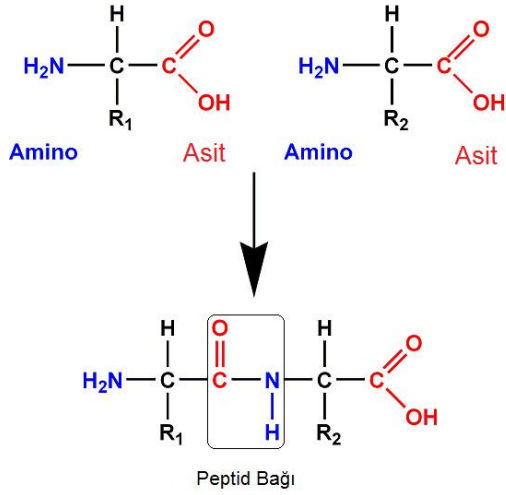
## 2.2 Proteinler

### 2.2.1 Proteinlerin genel özellikleri

Proteinler hücrelerde en fazla bulunan makromoleküller olup kuru ağırlığın yaklaşık % 50 sini teşkil ederler. 19. yüzyılın ortalarında Hollandalı kimyacı Gerardus Mulder hayvan ve bitki dokuları için ortak bir yapısal madde elde etmeyi başarmıştır. Bu maddenin bütün canlılar için önemli yapısal ve fonksiyonel bir madde olduğunu ve onsuz yeryüzünde hayatın mümkün olamayacağını belirtmiştir. Mulder, Yunancada ilk ve önemli anlamına gelen proteios sözcüğüne dayanarak bu maddeye protein adını vermiştir. Bu ad hiç değiştirilmeden bütün araştırmacılar tarafından benimsenerek günümüze kadar gelmiş bulunmaktadır.

Proteinlerin primer yapısı genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülleri tarafından denetlenmektedir. Hücre çekirdeğinde binlerce gen bulunmakta, bu genlerin ürünü olarak binlerce çeşit protein meydana getirilmekte ve her bir protein ise spesifik bir fonksiyon görmektedir. Fonksiyonu ve biyolojik aktivitesi ne olursa olsun bütün proteinler 20 amino asitten meydana gelmiştir. Amino asitlerin gerçek bir biyolojik aktivitesi olmamasına rağmen polipeptid zincirlerine yapıtaş olarak girdikten sonra oluşturdukları proteinler farklı aktiviteler için özelleşmiştir. Amino asitlere protein yapısının alfabesi olarak bakılmaktadır. Amino asitler sonsuz denecek sayıda farklı dizilme olanağına sahip olduklarından, sonsuz denecek çeşitte protein meydana getirebilirler (Gözükara 1994).

Amino asitler birbirine peptid bağı ile bağlanırlar. Peptid bağları bir amino asidin  $\alpha$ -karboksil karbonu ile bir başka amino asidin  $\alpha$ -amino azotu arasında oluşan C–N bağlarıdır.



**Şekil 2.1** Peptid bağı

Peptit bağlarındaki rezonans veya mezomeri nedeniyle OC–N bağı %50 çift bağ niteliği kazanmıştır. Çift bağların eksen etrafında dönmeleri sınırlı olduğundan, peptit bağı oluşumuna katılan grupların atomları (3C, O, N ve H atomları) bir düzlemde bulunurlar; peptit bağı, rijit ve düzlemseldir.

Proteinler arasında disülfid bağları, hidrojen bağları, iyon bağları ve apolar (hidrofobik) bağlar olmasının yanısıra elektrostatik etkiler ve Van der Waals güçleri nedeniyle meydana gelen itmeler de söz konusudur.

### ***Proteinlerin yapısı***

Proteinlerde primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuaterner (dördüncül) yapı olmak üzere dört farklı yapı tipi görülür.

Bir proteinin primer yapısı, protein için karakteristik ve genetik olarak tespit edilmiş olan amino asit dizilişidir; belirli türde, belirli sayıda, belirli diziliş sırasında amino asitlerin

birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturdukları bir polipeptit zinciri biçimindeki yapısıdır. Proteinin primer yapısının oluşmasını ve sürdürülmesini sağlayan, peptit bağlarıdır. Bir protein molekülünün primer yapısının yani amino asit dizilişinin bilinmesi, onun biyolojik aktivitesini gösterirken nasıl bir üç boyutlu yapı kazandığı hakkında bir fikir vermemektedir.

Bir proteinin sekonder yapısı, yarı sertleşmiş polipeptit zincirlerinin bükülmeler ve katlanmalarla oluşturdukları özgün kangallar biçimindeki yapısıdır. Bir proteinin sekonder yapısının oluşmasını ve sürdürülmesini sağlayan, primer yapı ile meydana gelen polipeptit omurgasının özelliği ve hidrojen bağlarıdır. Proteinler için,  $\alpha$ -heliks yapısı,  $\beta$ -konformasyonu veya kırmalı tabaka yapısı olmak üzere üç değişik sekonder yapı tanımlanır.

Bir proteinin tersiyer yapısı, polipeptit zincirinin sekonder yapı oluşumundan sonra, bağlayıcı güçlerin hepsinin toplamı ile uzayda daha ileri katlanmalar veya lifler halinde düzenlenme sonucu oluşan globüler veya fibriler yapısıdır. Bir proteinin tersiyer yapısının oluşmasına ve bu yapının sürdürülmesine, primer ve sekonder yapının oluşmasına katılan bağlardan başka Van der Waals çekimleri ve iyon bağları da katılır. Bir proteinin fonksiyonel karakterini onun üç boyutlu yapısı belirlemektedir. Gergin bir halde tutulan veya gelişi güzel kıvrılıp bükülen bir protein molekülü biyolojik fonksiyonunu yapamaz durumdadır. Proteinlerin fonksiyonunu yapabilme özelliği onların üç boyutlu yapı içinde atomlarının uygun bir şekilde düzenlenmesi ile yani uygun bir konformasyon kazanmaları ile ortaya çıkmaktadır.

Bir proteinin kuarterner yapısı, primer, sekonder ve tersiyer yapıya sahip polipeptit zincirlerinin daha büyük yapıli agregatlar halinde biraraya gelmesiyle oluşan yapıdır. Her proteinin kuarterner yapısı olmayabilir. Bir proteinin kuarterner yapısını oluşturan polipeptit zincirlerinin her birine alt birim veya monomer denir. Bu monomerler, hidrojen bağları, Van der Waals çekimleri ve iyon bağları etkisiyle polimerize olmuşlardır.

## 2.2.2 Proteinlerin sınıflandırılması

Proteinler, iki önemli özelliklerine göre sınıflandırılabilir:

- 1) Biyolojik fonksiyonlarına göre
- 2) Yapılarına göre

Çizelge 2.2’de proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılması gösterilmiş ve her sınıfa ait bazı proteinler için örnekler verilerek, o proteinlerin fonksiyonları kısaca belirtilmiştir. Proteinlerin yapılarına göre sınıflandırılması ise, örneklerle pekiştirilerek Çizelge 2.3’te özetlenmiştir.

**Çizelge 2.2** Proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılması (Gözükara 1994)

PROTEİNLER	BİYOLOJİK FONKSİYONLARI
<b>a) Enzimler</b>	
Heksokinaz	Glukozu fosforile eder.
Laktat dehidrogenaz	Piruvat-laktat dönüşümünü yapar.
Sitokrom c	Elektronları transfer eder.
DNA-Polimeraz	DNA sentezi ve tamiri yapar.
<b>b) Depo proteinleri</b>	
Ovalbumin	Yumurta akı proteindir.
Kazein	Süt proteindir.
Ferritin	Dalakta demir depo eden proteindir.
Gliadin	Buğday tohumlarında bulunan proteindir.
Zein	Mısır tohumlarında bulunan proteindir.
<b>c) Taşıma görevi yapan proteinler</b>	
Hemoglobin	Omurgalıların kanında O <sub>2</sub> taşıyan proteindir.
Hemosiyenin	Omurgasızların kanında O <sub>2</sub> taşıyan proteindir.
Miyoglobin	Kas hücrelerinde O <sub>2</sub> taşıyan proteindir.
Serum albumin	Kanda yağ asitlerini taşıyan proteindir.
b-Lipoprotein	Kanda lipitleri taşıyan proteindir.
Fe-bağlanmış globulin	Kanda demir taşıyan proteindir.
Seruloplazmin	Kanda bakır taşıyan proteindir.
<b>d) Kontraksiyon yapan proteinler</b>	
Miyozin	Kas miyofibrillerinin kalın filamentidir.

Aktin

Kas miyofibrillerinin ince filamentidir.

Dinein

Silia ve flagellada yani kirpik ve kamçılarda bulunan proteindir.

Tubilin

Mikrotübüllerde yer alan bir proteindir.

#### e) Toksinler

*Clostridium botulinum* toksini

Besin zehirlenmesi yapan bakteri toksinidir.

Difteri toksini

Bakteriyel toksin ve difteri etkeni olan proteindir.

Yılan zehiri

Fosfogliseritleri hidrolize eden enzim proteinleridir.

Risin

Kene otu tohumu toksik proteindir.

Gossipin

Pamuk çekirdeğinin toksik proteindir.

#### f) Koruyucu proteinler

Antikorlar (Antibodiler)

Yabancı proteinlerle kompleks yapan proteinlerdir.

Komplement

Bazı antijen-antibodi sistemi ile kompleks yaparlar.

Fibrinojen

Kan pıhtısı fibrinin öncül protein molekülüdür.

Trombin

Pıhtılaşma mekanizmasının komponenti olan proteindir.

#### g) Hormonlar

İnsulin

Kan glukoz seviyesini düzenler.

Glukogon

Glikojenin yıkılmasını sağlar.

Somatotrop hormon

Büyüme ve gelişmeyi sağlar.

Oksitosin

Doğum esnasında uterus kasının periyodik kasılmasını sağlar.

Melanin stimulan hormon

Pigment sentezini stimüle eder.

#### h) Yapısal proteinler

Viral-kılıf proteinleri

Viruslarda nükleik asitlerin etrafını saran kılıf proteinleridir.

Glikoproteinler

Hücre duvarı ve hücre zarı proteinleridir.

Keratin

Deri, tüy, tırnak ve toynaklarda bulunan proteindir.

Sklerotin

Böcek dış iskeletinde bulunan proteindir.

Fibroin

İpek böceği kozalarında ve örümcek ağlarında bulunan proteindir.

Kollajen

Fibrilli bağ dokusu proteindir. Tendon, kemik ve kıkırdakta bulunur.

Elastin

Elastik bağ dokusunda ligamentlerde bulunan proteindir.

Mukoproteinler

Mukus salgılarında ve eklem sıvılarında bulunan proteindir.

**Çizelge 2.3** Proteinlerin yapılarına göre sınıflandırılması (Gözükara 1994)

PROTEİNLER	YAPISAL KOMPONENTLERİ VE ÖZELLİKLERİ	ÖRNEKLER
<b>a) Basit proteinler</b>		
Albuminler	Suda çözünür doygun $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da çökelirler.	Serum albumini ve süt laktalbumini
Globulinler	Seyreltik NaCl da çözünür, %50 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doygunluğunda çökelirler.	Serum globulinleri ve bitki tohum globulinleri
Histonlar	Suda çözünür, $\text{NH}_4\text{OH}$ 'de çözünmezler.	Vücut hücrelerinde nukleik asitlerle kompleks yapan proteinlerdir.
Protaminler	Suda ve $\text{NH}_4\text{OH}$ 'de çözünürler.	Som balığı ve alabalık gamet hücresinin salmin adı verilen nukleoproteinidir.
Prolaminler	% 70 alkolde çözünürler.	Buğdayın gliadin ve mısırların zein proteinleridir.
Albuminoidler	Bütün çözücülerde çözünmezler.	Bağ dokusunun kollajen ve elastin proteinleri ve keratin proteinleridirler.
<b>b) Konjuge proteinler</b>		
Nukleoproteinler	Nukleik asitlerle kompleks yapmış proteinlerdir. 1 M NaCl'de çözünürler.	Hücre çekirdeği ve viruslarda bulunurlar.
Glikoproteinler	Karbohidratlarla kompleks yapmış proteinlerdir. Mukopolisakkarit ve oligosakkaritler	Bağ doku ara maddesi, gözün saydam kısmı tükrük ve servikal mukus salgısında bulunur.
Lipoproteinler	Lipitlerle ester yapmış proteinlerdir.	Serum lipoproteinleri ve yumurta sarısı proteinleridir.
Fosfoproteinler	Fosfatlarla ester yapmış proteinlerdir.	Süt kazein proteini ve yumurta vitellin proteininde bulunur.
Kromoproteinler	Fe-porfirin ile kompleks yapmış proteinlerdir.	Hemoglobin ve miyoglobinde bulunur.
Metalloproteinler	Fe, Cu ve Zn ile kompleks yapmış proteinler.	Plazma proteinleri transferrin, seruloplazmin, karbonik anhidraz, triptofan oksijenaz proteinleridir.



### 2.2.3 Proteinlerin denaturasyonu ve renaturasyonu

Üç boyutlu bir yapıya sahip olan ve biyolojik bakımdan aktif olan proteinlere yapısı bozunmamış anlamına gelen doğal proteinler adı verilmektedir. Peptit bağları koparılmadan bir proteinin üç boyutlu yapısının bozulmasına ve aktivitenin kaybolması olayına ise denaturasyon adı verilmektedir. Bir proteinde biyolojik aktivitenin bozulması ve çözünürlüğün değişmesi, denaturasyon için bir kriter olarak kabul edilmektedir.

Proteinler genellikle aşağıdaki koşullar altında denature olmaktadır.

- 1- Proteinler 50-60 °C'in üstündeki sıcaklıklarda denature olmaktadır.
- 2- Proteinler pH 4'ün altında ve pH 10'un üzerinde denature olmaktadır.
- 3- Proteinler alkol, aseton ve eter gibi organik çözücülerle veya üre,  $\beta$ -merkaptoetanol ve guanidin HCl gibi bileşiklerle muamele edildiklerinde denature olmaktadır.

Eğer protein kuaterner bir yapıya sahipse denaturasyon koşulları altında iki türlü değişme ortaya çıkmaktadır.

- 1- Proteinin subüniteleri birbirinden ayrılmaktadır.
- 2- Her bir subünitenin ve tersiyer yapıya sahip tek polipeptit zincirlerinin konformasyonu, yani üç boyutlu yapısı bozularak tesadüfi kıvrılmalar ve bükülmeler meydana gelmektedir.

Denaturasyon eğer ılımlı koşullarda gerçekleştirilmiş ise bazen kuaterner yapıya sahip proteinlerin sadece subüniteleri birbirinden ayrılmakta; fakat tersiyer yapıları bozulmamaktadır. Böyle durumlarda denature edici faktör ortadan kalktığında protein eski konformasyonunu, dolayısıyla aktivitesini geri kazanabilir. Proteinler, bozulmuş durumda iken tekrar üç boyutlu yapılarını kazanmaları ve yeniden biyolojik aktivite göstermeleri olayına renaturasyon adı verilmektedir (Gözükara 1994).

Daha ekstrem koşullarda denaturasyon uygulanacak olursa denaturasyon tersinir veya tersinmez olarak ortaya çıkmaktadır. Örneğin yumurtanın pişirilmesi ile yumurta akı proteininin kuagölasyonu tersinmez bir değişmedir.

Oligomer proteinlerin analizinde bir deterjan olan ve genellikle denature edici bir ayıraç olarak sodyum dodesil sölfat (SDS) kullanılmaktadır. SDS'ın proteinler ile yaptığı kompleks negatif yüklü ve çubuk şekilli partiküllerden ibarettir. SDS, her bir farklı proteine ancak belirli oranlarda bağlanabilmektedir. Bu negatif yüklü SDS-protein kompleksleri genellikle birbirini itmekte ve proteinlerin bir araya gelmeleri yani agregasyonları önlenmektedir. Bu ayıraç daha çok proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezinde moleköl ağırlıklarını tayin etmek için kullanılmaktadır. SDS-protein kompleksinin elektroforetik alanda hareket etmesi tamamen moleköl ağırlığına bağlı bir olaydır (Gözükara 1994).

### 2.3 *Debaryomyces hansenii* proteinleri

*Debaryomyces hansenii* proteinleri biyoteknolojide pek çok alanda kullanılmakta ve gelecek için bir o kadarını da vadetmektedir. Günümüzdeki kullanım alanlarının başında peynir üretimi, et fermentasyonu ve litik enzimlerin üretimi gelmektedir. Yapılan çalışmalar *D. hansenii*'nin içerdiği fosfatazlar, C4-esterazlar, C8-esteraz-lipazlar, lösin arilamidazlar, valin arilamidazlar, aminopeptidazlar,  $\beta$ -galaktozidazlar'ın peynir üretiminde önemini ortaya koymuştur (Van den Tempel and Jacobsen 2000). Ayrıca *D. hansenii*'nin sentezlediği peptidazların  $\beta$ -kazein türevi peptidlere karşı etkili olduğu ve bu durumun peynirde oluşan proteolitik aktiviteyi etkilediği anlaşılmıştır (Kumura *et al.* 2002). *D. hansenii*'nin et fermentasyonunda aroma vermenin yanısıra fermentasyon esnasında da görev aldığına dair bazı bilgiler elde edilmiştir. Mayadan elde edilip saflaştırılan propil aminopeptidaz, arginil aminopeptidaz ve glutaminaz enzimleri bunun göstergesi olarak görülmektedir. *D. hansenii*'nin sentezlediği proteazlar bira ve şarap sektöründe protein bulanıklıklarının giderilmesinde kullanılmaktadır. Yine *D. hansenii*'nin sentezlediği  $\beta$ -glukozidazlar selülozu hidrolizleyip glukozu çevirebilirler. *D. hansenii*'nin bu yeteneği ticari açıdan oldukça önemlidir (Saha and Bothast 1996). Besancon *et al.* (1995) yaptığı çalışmada *D. hansenii*'den izole ettiği esteraz enziminin (EC 4.1.1.1) şarap yapımı için ana enzimlerden biri olduğunu ortaya koymuştur. Gıda endüstrisindeki tüm bu faydalarının yanısıra bozulmalara da sebep oluyor olması bu mayanın incelenmesini önemli kılan bir diğer konudur. *D. hansenii*'nin bazı toksinleri üretme ve tolere etme yeteneği, ekonomik prosesler geliştirilerek toksinin kendisinin üretimi veya bazı ortamlarda istenmeyen mikroorganizmaların üremesinin engellenmesinde kullanılabileceği için biyoteknolojik araştırmalar için ilgi çekici olabilir.

*Debaryomyces hansenii*'nin biyoteknolojideki bu önemi neticesinde son yıllarda tanımlanan protein sayısı hızla artmış, endüstriyel öneme sahip toksinleri ve enzimleri üzerine yapılan araştırmalar oldukça popüler hale gelmiştir.

Santos *et al.* (2002), yaptığı çalışmada *D. hansenii* CYC 1021'in toksininin hücre duvarındaki (1-6)- $\beta$ -glukan bağlarına bağlanarak etki ettiğini ve *Trichosporon cutaneum* ve *C.zeylanoides* tarafından üretilen toksinlere karşı dayanıklı olduğunu bildirmiştir.

Marquina *et al.* (2001), *D. hansenii* CYC 1021'in toksin üretiminin farklı besi yerlerinde, pH'larda, sıcaklıklarda ve farklı maddelerin varlığında nasıl değiştiğini ve toksin stabilitesinin sıcaklığa olan duyarlılığını araştırmıştır. Bugüne kadar pek çok toksin üreten maya tanımlanmıştır. Bunların ticari proseslere uygulanması için iki temel aşama gereklidir: antimikrobiyal ajanların yüksek verimle üretilmesi ve ekonomik bir saflaştırma yöntemi. Bu çalışmada, çok farklı türlere karşı %6 NaCl varlığında öldürücü etkisi bulunan *D. hansenii*, zeytin salamurasından izole edilmiştir. Aynı salamuradan bozulmalara sebep olan *Candida boidinii* sensitif tür olarak seçilmiş ve izole edilmiştir.

Araştırmalar YNB (%1 glukoz, %0,67 YNB (yeast nitrogen base)) ve YMB (%1 glukoz, %0,3 maya özütü, %0,3 malt özütü, %0,5 proteoz pepton) olmak üzere iki farklı besi yerinde sürdürülmüştür. YMB besiyerinde  $0.31 \text{ st}^{-1}$  ve YNB besiyerinde  $0.18 \text{ st}^{-1}$  çoğalma hızları gözlenmiştir; ancak toksin üretimi sadece YMB'de tespit edilmiştir. Dolayısıyla toksin çalışmaları sadece YMB'de üretilen mayalarla yapılmıştır. Üstel (logaritmik) fazdan sonra toplanan mayalarda toksin üretim veriminin %17 düşmesinden de anlaşılacağı gibi *D. hansenii*'nin toksin üretimi mekanik gerilimden (santrifüj veya çalkalama gibi) hafifçe etkilenmektedir.

Çalışmada, toksinin pH 4,5 ve altında stabil olduğu anlaşılmıştır. pH 4,8'e çıktığında aktive oldukça düşmüş (%90) ve pH 5,1'e çıktığında aktivite yok olmuştur. Toksin  $15^{\circ}\text{C}$  ve altında 1 hafta aktivitesini koruyabilirken,  $20^{\circ}\text{C}$ 'de 5 gün %25 kayıp ile,  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün %45 kayıp ile ve  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gün %50 kayıp ile korunabilmiştir. Ayrıca toksin üretimini en çok arttıran maddelerin DMSO (1,7 kat) ve non-iyonik deterjanlar (Triton X-100, Igepal CA-630, Brij-58 1,2 kat) olduğu saptanmıştır. Farklı katkı maddeleri varlığında toksin üretimi ve spesifik aktivitelerinin değişimi Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

**Çizelge 2.4** *D. hansenii* CYC 1021 toksininin farklı bileşiklerin varlığında üretimi (Marquina *et al.* 2001)

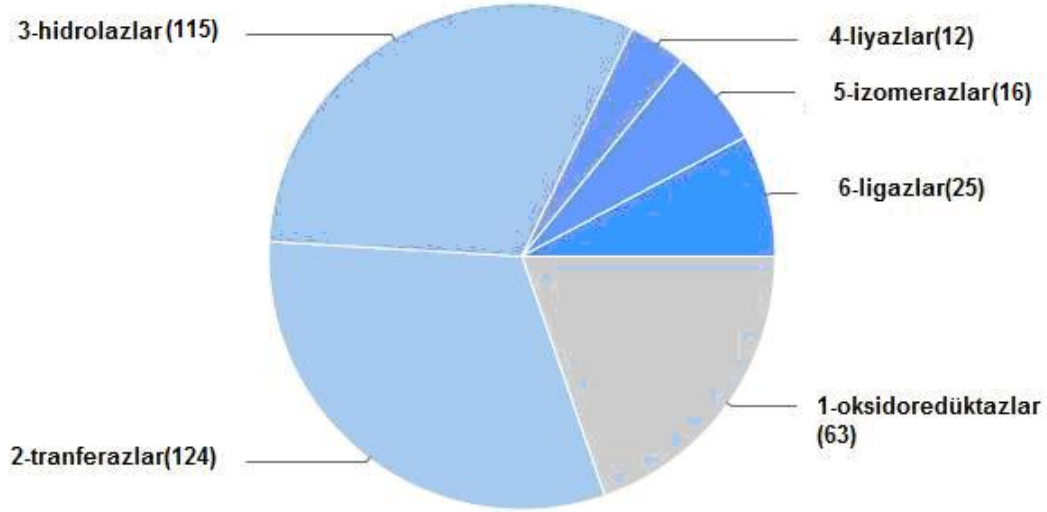
<i>Ek madde</i>	<i>Derişim (ppm)</i>	<i>Özgöl çoğalma hızı (st<sup>1</sup>)</i>	<i>Protein (mg/ml)</i>	<i>Spesifik aktivite (AU/mg)</i>
Kontrol	-	0.31	0.241	1378
Triton X-100	10	0.28	0.286	1637
Brij 58	1000	0.29	0.301	1724
PEG-400	100	0.29	0.286	1810
PEG-1500	100	0.30	0.287	1723
Igepal CA-630	100	0.24	0.301	1724
DMSO	100	0.30	0.107	2327

Besiyerine salgılanan bir kısım toksinin (1→6)-β-D-glukan bağlarında tutulduğundan ve proteazlar ile parçalandığından dolayı izole edilememiş olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *D. hansenii* CYC 1021'in toksin üretiminin YMB besiyerinde çoğalma bağımlı bir cevap olarak gerçekleştiği, üstel faz ve durağan fazın başlangıcında üretim olduğu, toksin üretimi ve stabilitesinin pH, sıcaklık ve katkı maddelerinden etkilendiği ortaya konmuştur.

Bolumar *et al.* (2008), *D. hansenii*'nin hücre dışı proteolitik enzimleri ile yaptığı çalışmada, proteaz A (PrA) ve proteaz D (PrD) enzimlerini izole etmiş ve tanımlamıştır. Yapılan çalışmada PrA'nın pH 5-6 aralığında, PrD'nin ise pH 7-8'de aktif olduğu ve enzimlerin sırasıyla 55 kDa ve 68 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu enzimlerin tanımlanması, etlerin kürlenmesi ve şarap fermentasyonu gibi proseslerde *D. hansenii*'nin rolü olduğunun bir kanıtı olarak gösterilebilir.

*Debaryomyces hansenii*'nin UniProt veritabanında bugüne kadar 6380 adet proteini tanımlanmıştır ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)). Bu proteinler arasından 2869 tanesi biyolojik proseslerde, 1981 tanesi hücre yapısında ve 3336 tanesi ise moleküler fonksiyonlarda görev almaktadır. Yine bu proteinler arasında enzim sınıflandırması ile ilişkilendirilen toplam 355 protein bulunmaktadır (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2** *Debaryomyces hansenii*'nin enzim sınıflandırması ile ilişkilendirilen proteinlerinin dağılımı ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch), erişim tarihi: 24 Ocak 2010)

## 2.4 Proteobilim (Proteomiks)

### 2.4.1 Proteobilimin tanımı ve uygulamaları

Biyolojik alanlarda yapılan çalışmalar hızla tekli analiz metodlarından global sistem yaklaşımlarına doğru değişim göstermektedir ve bu çalışmaların tümünde, bileşenlerin tanımlanması sistemin anlaşılması için temel adımı oluşturmaktadır. Bugüne kadar genom bilimi bu doğrultuda önemli bir zemin hazırlamış ve pek çok organizmanın tam genom sekansları çıkarılarak değerli veriler elde edilmiştir. Ekspresyon profili analizleri sayesinde ise bağıl transkript seviyeleri hakkında bilgi edinilmiştir. Ancak araştırmalar göstermiştir

ki, organizmada bulunan mRNA seviyeleri ile protein seviyeleri arasında oldukça zayıf ilinti bulunmakta ya da hiç ilinti bulunmamaktadır. Bu sayede, protein mekanizmalarının bağımsız olarak incelenmesinin, protein miktar analizlerinin ve profillendirilmesinin önemi anlaşılmıştır (Patterson 2000).

Bu yüzyılın en büyük bilimsel başarısı insan genom sekansının tamamlanması olmuştur. Projenin en şaşırtıcı sonucu ise insanın neredeyse bir sinek ya da solucanla benzer genlere sahip olduğunun anlaşılmasıdır. İnsanın karmaşık organizmasının ve diğer tüm organizma sistemlerinin açıklanması için gen ürünlerinin yani proteinlerin incelenmesi gerektiği sonucu ortaya çıkmıştır (Dhingra *et al* 2005).

Proteom kavramı ilk defa Wilkins (1995) tarafından ortaya atılmıştır. Wilkins'e göre genom proteomla eşdeğerdir yani bir gen bir protein üretiminden sorumludur. Proteobilim (proteomiks) ise genom tarafından ifade edilen proteinlerin sistematik analizidir. Ancak genomdan proteoma doğru yapılan yolculukta çok yollar katedilmiş, genler ile proteinler arasında daha karmaşık ilişkilerin bulunduğu görülmüş ve bir genin birden fazla proteinin sentezinden sorumlu olabileceği anlaşılmıştır. mRNA seviyeleri protein sentezi hakkında bilgi vermediği için proteinlerin doğrudan analizi zorunlu hale gelmiştir. Ne var ki, bir hücrenin protein profili hücre içi veya hücre dışı herhangi bir stres etkisi ile daima değişim göstermektedir. Proteobilimin en büyük avantajlarından birisi mRNA basamağından sonra gelişen olayları izleyebilmek, bir diğeri ise proteinler arasındaki etkileşimleri inceleyebilmektir. Böylece hücrenin spesifik bazı proseslerini ve yollarını anlamamıza olanak sağlar. Proteom bilimde amaç sadece proteinleri tanımlamak değil, aynı zamanda protein profili haritalarını oluşturmak olmalıdır. Bu amaç doğrultusunda moleküler biyoloji, biyokimya ve biyoinformatik gibi farklı disiplinler bir arada kullanılmalıdır. Dolayısıyla erken dönemlerde yapılan proteom tanımı (Wilkins 1995) oldukça dinamik bir doğaya sahip proteom için yetersiz kalmaktadır. Proteomun tanımı "belli bir zamanda belli bir hücrenin, izoformları ve modifikasyonları da dahil olmak üzere tüm protein içeriği" şeklinde olmalıdır (Dhingra *et al* 2005).

Genom tarafından ifade edilen proteinlerin büyük ölçekli tanımlanması ve fonksiyonel analizi proteombilimin bir diğer tanımıdır ve bu açıdan değerlendirildiğinde proteom; genomun protein tümleyeni olarak da ifade edilebilmektedir. Başka bir deyişle, genombilim bir sözlükteki kelimeleri simgelerken, proteombilim o kelimelerin tanımlarını simgelemektedir. Bu proteinlerin birbirleriyle, çevreleriyle ve diğer proteinlerle etkileşimleri ise anlamlı bir dilin gramerini oluşturmaktadır (Ünlü 2007).

Genombilim DNA'dan protein oluşumuna kadar devam eden süreci incelerken, proteombilim translasyon basamağını ve sonrasında sentezlenen proteinlerin kimyasal modifikasyonlarını incelemektedir. Translasyon sonrasında proteinin yapısında meydana gelen değişimlere “post-translasyonel modifikasyonlar” adı verilmektedir. Glikozilasyon, fosforilasyon, ubikinitasyon, metilasyon, asetilasyon ve lipidasyon en yaygın olarak görülen post-translasyonel modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar protein ömrünü, lokalizasyonunu, protein etkileşimlerini ve aktivitesini etkileyen çok önemli görevlere sahiptirler. Hayvanlarda ve bitkilerde, gelişimin, fizyolojinin ve hastalık oluşumunun tüm sınırları genelde bu modifikasyonlarda gizlidir. Günümüzde ayırma teknolojileri ve kütle spektrometreleri beraber kullanılarak, post-translasyonel modifikasyonların tespit edilmesi mümkündür, ancak tespit edilen modifikasyonlar ile protein fonksiyonunu doğrudan tahmin edebilmek için yeterli veri birikimi oluşmamıştır (Dhingra *et al* 2005).

Günümüzde proteombilim en çok tıp, patoloji, toksikoloji, ilaç geliştirme ve mikrobiyolojide kullanılmaktadır. Hastalıkların tedavisinde proteinlerin teşhis ve tedavi belirteçleri olarak saptanması, patojen analizi, ilaç hedeflerinin ve ilaç tasarımının araştırılması ilgilenilen konulardır. Ancak proteombilim tek başına uygulanabilen, başka bilimlerden bağımsız olarak kullanılabilen bir yöntem değildir. Kullanıldığı alana göre proteombilimin esas gücü, moleküler biyoloji, protein biyokimyası ve/veya biyofizik ile birleştirildiğinde ortaya çıkmaktadır (Ünlü 2007).



## 2.4.2 Proteombilimde kullanılan yöntemler

Proteombilimde kullanılan yöntemler temel olarak proteinlerin ayrılması ve ardından kütle spektrometreleri ile analizlenmesi esasına dayanır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan teknikler, proteinlerin 2D-PAGE ile izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılması ve ardından MALDI (Matriks Yardımcı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon) ile analizlenmesidir. Bu teknik klasik proteombilim tekniği olarak da bilinir. Son yıllarda proteinlerin çok boyutlu sıvı kromatografisi ile ayrılması ve ardından yine MALDI ile analizlenmesi şeklinde de çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

### 2.4.2.1 Örnek hazırlama

Örnek hazırlama tüm proteom analizi boyunca en önemli basamaklardan bir tanesidir. İki boyutlu jel elektroforezi öncesinde, protein örneği suda çözünür hale getirilmeli, denature edilmeli, proteinler arasındaki bağlar koparılmalı ve girişim yapabilecek kalıntılar uzaklaştırılmalıdır. Bu işlemler yapılırken protein örneğinde hiçbir kalıntı bırakılmadığından emin olunmalıdır.

Yapılması gereken ilk işlem hücrenin ya da dokunun parçalanmasıdır. Bunun için sıvı azotta dondurma, havanda dövme, homojenizatörde homojenize etme, lizis tamponu ile muamele, enzim ile muamele, mekanik parçalama teknikleri veya bu yöntemlerin farklı kombinasyonları kullanılabilir. Hücreler parçalandıktan sonra kalıntılar yüksek hızda santrifüj ile ortamdan uzaklaştırılırlar. Bu işlemlerde nihai amaç, proteinleri hücrede bulunduğu şekilde primer yapılarını koruyarak elde etmek ve modifikasyona uğrama olasılıklarını minimize etmektir (Dhingra *et al* 2005).

Elde edilen proteinleri suda çözünür hale getirmek için kaotropik ajanlar veya NP-40, Triton X-100, CHAPS ve SDS gibi etkili deterjanlar kullanılır. Protein modifikasyonlarını engellemek için enzim aktivitelerini inhibe eden üre, disülfid bağlarını koparmak içinse DTT (dithiothreitol) kullanılır. Bromofenol blue (aniyonik boya) ise jel elektroforezinin takibi için kullanılır (Dhingra *et al* 2005).

### 2.4.2.2 İki boyutlu jel elektroforezi

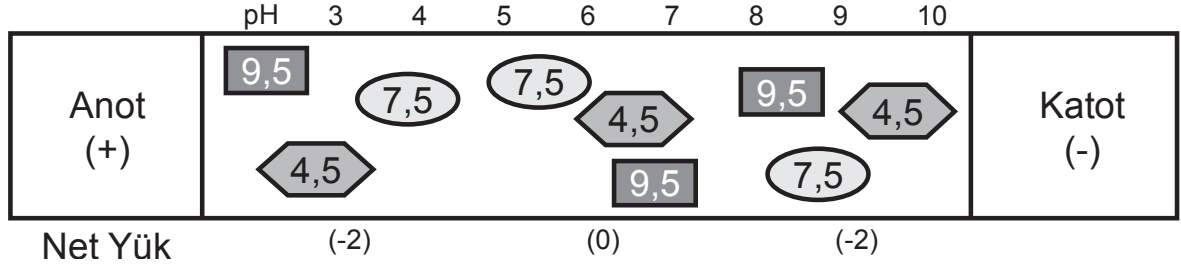
Proteomik çalışmaların en önemli gereksinimi proteinlerin yüksek kalitede ayrılmasını sağlamaktır. Bu çalışmalar için çığır açma niteliğinde olan iki boyutlu jel elektroforezi 35 yıl önce O'Farrel (1975) tarafından tanıtılmıştır. Bu teknik sayesinde proteinler iki boyutlu olarak ayrılırlar: birinci boyut proteinleri bir pH gradienti boyunca izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırırken, ikinci boyut SDS-PAGE ile moleküler boyutlarına göre ayırır. Bu iki tekniğin birleşmesiyle proteinler jel üzerinde bir nokta (spot) olacak şekilde haritalanırlar. Bu harita belli bir protein örneğinin parmak izi gibi düşünülebilir. Bir hücrenin farklı koşullarda veya safhalarında elde edilen bunun gibi iki parmak izi karşılaştırılarak ifadesi artan ve azalan proteinler ya da var iken yok olan, yok iken var olan proteinler tespit edilebilir. Böylece hücrenin o safhasında önem kazanan proteinler belirlenebilir ve metabolik yolların açıklanması mümkün olabilir (Dhingra *et al* 2005).

Birinci boyutta kullanılan izoelektrik odaklama jelleri, poli akrilamid bir jele amfolitler eklenerek hazırlanabilmektedir. Belli pI değeri aralığına sahip amfoterik maddeler olan amfolitler; düzgün iletkenlik ve yüksek tamponlama kapasitesine sahip, izoelektrik noktasında çözünür ve odaklanan proteinlerle etkileşimi en az düzeyde olacak şekilde seçilmelidir. İzoelektrik odaklama jellerinin bir diğer türü immobilinlerdir. Amfolitlere benzer yapıda olan immobilinler, poliakrilamid jel içine tutuklanmışlardır (tutuklanmış pH gradyenleri, IPG) ve ön odaklama işlemi gerektirmezler. Immobilinler tutuklanmış olduklarından, pH gradyeninin sürüklenme olasılığı bulunmamaktadır. Mekanik açıdan daha dayanıklı ve daha kararlı olmaları nedeniyle günümüzde IPG şeritleri olarak da bilinen immobilinler tercih edilmektedirler (Ünlü 2007). IPG şeritlerle proteinlerin ayrılma prensibi Şekil 2.3'te şematik olarak gösterilmiştir.

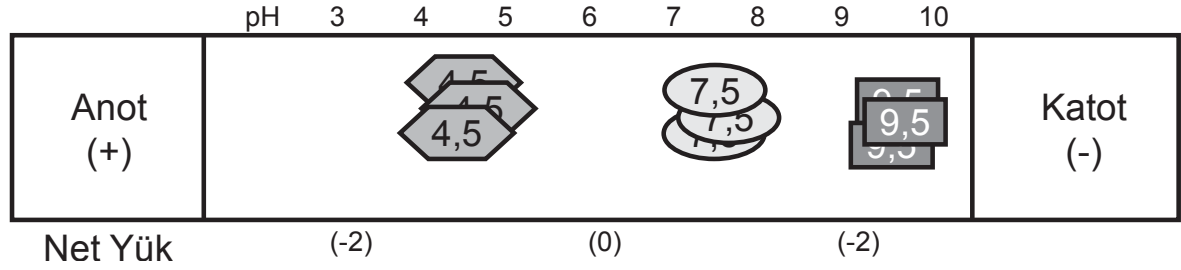
İkinci boyut ayırmada; izoelektrik odaklamaları tamamlanmış olan proteinleri içeren birinci boyut jeli, yatay olarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel yüzeyine oturtularak, dikey bir elektrik akımı uygulanır ve izoelektrik noktalarına göre ayrılmış olan proteinler, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayrılırlar (Şekil 2.4). Bu şekilde ikinci boyut ayırma da tamamlanmış olur. Elde edilen jeldeki proteinler çeşitli boyama teknikleri ile

görünür hale getirilirler (Ünlü 2007). En yaygın kullanılan boyama teknikleri Coomassie Blue, gümüş boyama ve florasan boyama teknikleridir (Gromova and Celis 2006).

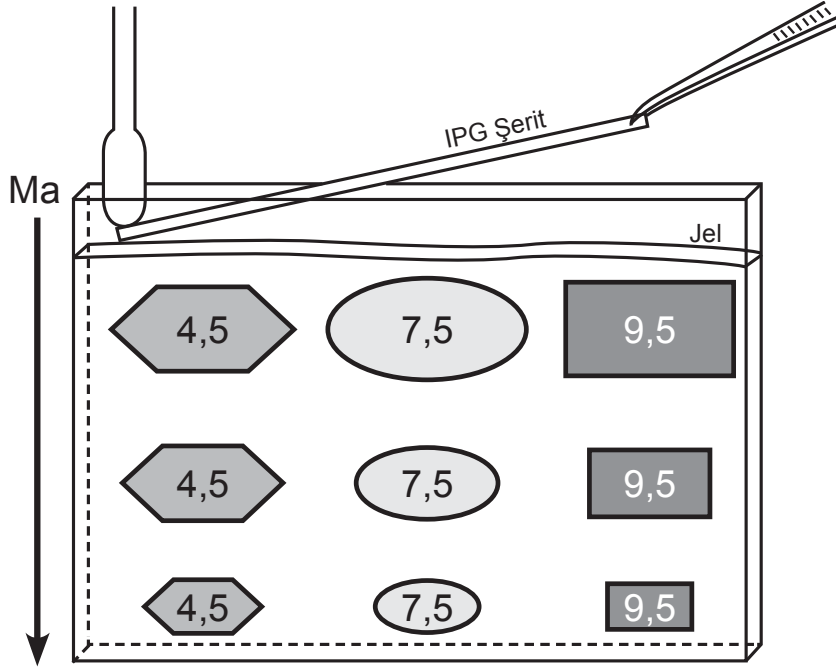
a)



b)



**Şekil 2.3** (a) İzoelektrik odaklama öncesi (b) İzoelektrik odaklama sonrası proteinlerin IPG şeritler üzerindeki şematik gösterimi



**Şekil 2.4** Proteinleri SDS-PAGE yöntemiyle ayırma işleminin şematik görüntüsü

2D-PAGE yöntemi yüksek ayırma gücüne sahip, tek bir jelde yüzlerce proteini tespit etmeye olanak sağlayan ekonomik bir yöntemdir. Bu teknikte çok asidik ve çok bazik veya çok küçük ve çok büyük proteinlerin tespiti zor olmasına rağmen, gelişen optimizasyon çalışmalarıyla bu sorunda hızla aşılmaktadır. Doğrudan kütle spektrometresiyle protein analizine olanak sağlayan teknikler henüz geliştirilemediğinden, 2D-PAGE yöntemi proteomik analizler açısından popülerliğini uzun yıllar koruyacaktır (Isaaq and Veenstra 2008).

#### 2.4.2.3 Matris yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI)

Kütle spektrometreleri iyon oluşturma ve bu iyonları kütle/yük oranlarına ( $m/z$ ) göre ayırma yeteneğine sahip cihazlardır. Ayırmanın sağlanabilmesi için cihaz içinde elektrik ya da manyetik alanlar oluşturulmuştur. Bu alanlar iyonların uzaysal yörüngelerini, hızını ve/veya istikametini etkileyerek ayırma sağlarlar. Elektromanyetik alanlar iyon hareketini iyonun kütlesiyle ters orantılı ve iyonun yüküyle doğru orantılı olarak etkiler. Böylece

moleküler kütlelerin tespit edilebildiği, iyon bolluğuna (abundance) karşı m/z oranını gösteren kütle spektrumları elde edilir.

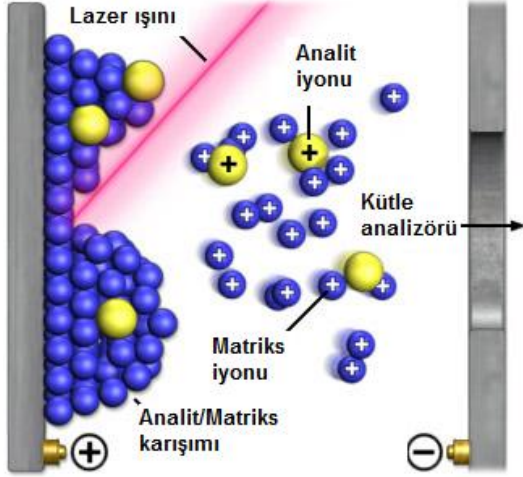
Kütle spektrometresinin temel bileşenleri iyonlaştırıcı kaynak, analizör, detektör, veri işlemcisi ve vakum pompasıdır. Etkili bir ayırma için iyonların hava molekülleriyle çarpışması engellenmeli, yani analizör ve dedektör vakumlu ortamda bulunmalıdır. İyon üretimi ise iyonlaştırma kaynağının türüne göre atmosferik basınç ya da vakum altında gerçekleştirilebilir (Canas *et al* 2006).

Elektromanyetik alanlarda ayırmanın sağlanabilmesi için nötral moleküllerin iyonlara dönüştürülmesi ve ihtiyaç halinde gaz faz haline geçmeleri gerekmektedir. Peptid ve proteinlerin yüksek moleküler ağırlıkları ve polar yapıları göz önüne alındığında, iyonlaştırıcı kaynak protein ya da peptidleri hem iyon haline hem de gaz faza geçirmelidir. Çeşitli iyonlaştırıcı kaynaklar arasında sadece ESI (elektrosprey iyonizasyon) ve MALDI (matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon) proteinlerle çalışmaya uygundur. ESI ile iyonlar atmosferik basınç altında oluşturulurken, MALDI'de atmosferik basınç veya vakum altında oluşturulabilir.

Analizör, iyonlaştırıcı kaynaktan elde edilen iyonların ayrılmasını sağlayan cihaz kısmıdır. Bu kısımda elektrik veya manyetik alanlar kullanılabilir. Tüm analizörler uygun bir iyonlaştırıcı kaynak ile birleştirildiğinde peptid ve proteinlerle çalışmaya uygundur. Kullanım kolaylığı ve düşük maliyetleri nedeniyle en yaygın kullanılan analizörler kuadropoller, uçuş süresi (TOF-time of flight) cihazları ve iyon tuzaklarıdır (Canas *et al* 2006).

Proteomik çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan MALDI'nin (Karas and Hillenkamp 1988) prensibi, ultraviyole ışınları absorblama özelliğine sahip bir matriksin kullanılmasına dayalıdır. Peptid karışımı ve matriks uygun bir çözücünde çözülerek karıştırılır ve örnek yükleme plakalarına aktarılır. Daha sonra çözücünün buharlaşmasına izin verilir ve böylece kristalleşmiş matriks molekülleri arasına gömülü peptidler elde edilmiş olur.

Örnek plakası cihaza yerleştirilir ve vakum altında, genellikle nitrojen kaynaklı UV lazeri ile uyarılır (pulse) yapılır. Matris molekülleri lazerin enerjisini absorblar ve peptid moleküllerini de beraberinde taşıyarak gaz fazda iyon haline geçerler. MALDI iyonlaştırma yöntemi Şekil 2.5'te şematik olarak gösterilmiştir (Canas *et al* 2006).



Şekil 2.5 MALDI iyonlaştırma yönteminin şematik gösterimi

MALDI yarışmalı bir proses olduğundan, bir analitin iyonlaşması diğerleri tarafından inhibe edilebilmektedir. Dolayısıyla triptik peptid karışımlarında arjinin içeren peptitler bu amino asitin güçlü gaz faz bazlığından dolayı ayrıcalıklı olarak iyonlaşmaktadırlar. Lizinin de bazikliğin artırılabilmesi için kimyasal prosedürler geliştirilmiştir. Fosfopeptitler ise fosfat grubunun asidik özelliğinden dolayı MALDI'de zayıf iyonlaşmaktadırlar (Ünlü 2007).

Sinapinik asit ve  $\alpha$ -siyano-4-hidroksinamik asit sırasıyla, protein ve peptid analizi için en çok kullanılan matrislerdir. 2,5-Dihidroksi benzoik asit de peptid haritalandırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Matrislere eklenen kimyasal katkıların fosfopeptitlerin daha iyi iyonlaşmasında ya da genel olarak MALDI performansını artırmada faydalı olabileceği iddia edilmektedir. Oktil-beta-glukosit gibi birkaç nötral deterjan, peptid iyonlaşması ile uyumludur ve MALDI performansını artırabilir, ancak sodyum dodesil sülfat gibi yüklü deterjanların zararlı etkisi bulunmaktadır. Düşük derişimlerdeki tampon ve tuz gibi örnek kontaminasyonlarına karşı toleransı olduğu için her durumda MALDI, ESI'ya göre daha

avantajlıdır. 2M derişimindeki üre gibi kaotropik ajanların varlığında bile spektrum elde edilebilmektedir. MALDI-TOF kütle spektrometre, 400 ile 350 000 Da moleköl ağırlığındaki proteinler, peptitler, oligosakkaritler ve oligonikleotitler gibi biyomoleküllerin dedeksiyonu ve tanımlanmasında kullanılabilmektedir (Ünlü 2007).

#### **2.4.2.4 Proteinlerin tanımlanması**

Protein ifade profillerinin çıkarılmasında ve protein tanımlamasında ilk adım genelde 2D-PAGE ile başlar ve böylece proteinler izoelektrik noktalarına ve moleköl ağırlıklarına göre ayrılmış olurlar. Ayrılan proteinler gümüş, Coomassie Blue veya florasan boyaarla boyanarak görünür hale getirilirler ve genelde jel içinde spesifik proteazlarla (örneğin tripsin) peptidlere parçalanırlar. Elde edilen peptidler jel parçalarından ekstrakte edilir ve MALDI-tof MS ile analizlenir. Bir proteine ait peptidlerden elde edilen kütle spektrumu, o proteinin parmak izini oluşturur. Bu yöntemle proteinler femtomol seviyesinin altında duyarlılıkla tanımlanabilirler.

Deneysel olarak elde edilen kütle profilleri, veri tabanlarında bulunan aynı proteinin aynı enzimle bilgisayar simülasyonu ile hazırlanmış teorik kütle profilleri ile karşılaştırılır. Veri tabanında bulunan proteinler, eşleşen peptid oranlarına göre belirli bir kütle hata toleransıya sıralanırlar. Ancak bir proteinin parmak izi beklenen tüm teorik peptid kütlelerini içermez. Ayrıca tripsin otolizinden ve keratin kontaminasyonundan hatalı pikler oluşabilir. Başarılı bir protein tanımlaması için, MALDI piklerinin doğruluğunun yüksek olması ve zengin bir veri tabanı kullanılması gerekmektedir. Bir proteinin başarı ile tanımlanması için, beş ya da daha fazla peptitin 30 ppm'den düşük hassasiyet ile belirlenmesi, deneysel ve teorik dizinlerin % 15 oranında eşleşmesi gerekmektedir (Canas *et al* 2006).

1993 yılından bu yana, peptid kütle parmak izi (PMF) ve MALDI-TOF kombinasyonu en hassas, hızlı ve güvenilir protein tanımlama yöntemi olmuştur. Son 12 yılda tanımlanan proteinlerin çoğu bu yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Pek çok arama motoruna

(MASCOT: [www.matixscience.co.uk](http://www.matixscience.co.uk), PROFOUND: <http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>, MSFIT: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>, ALDENTE: <http://www.expasy.ch/tools/aldente>) internet üzerinden ulaşılabilmektedir (Canas *et al* 2006).



## 2.5 *Debaryomyces hansenii* Proteomu

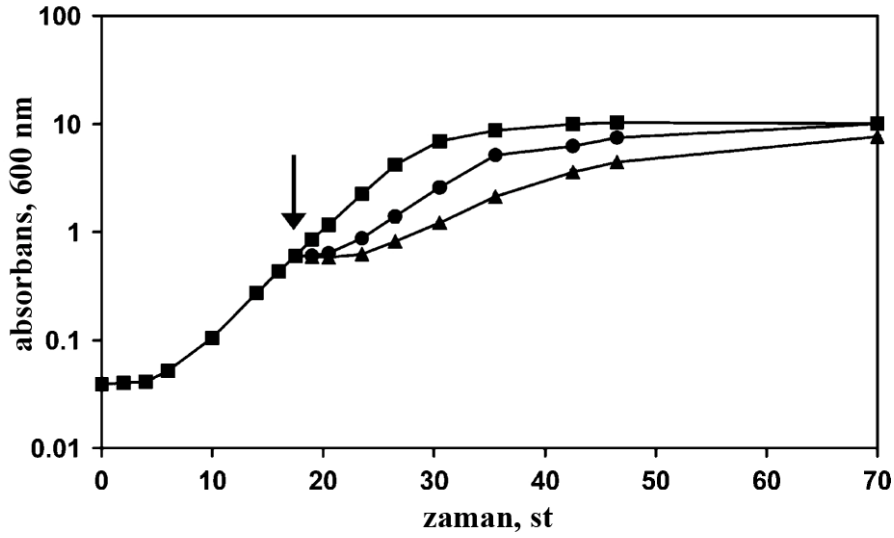
*Debaryomyces hansenii*, sahip olduğu özelliklerle birçok araştırmanın konusu olmaya ve bilim adamlarının son derece ilgisini çekmeye başlamıştır. Son yıllarda bu maya üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak hem bu mayanın hem de proteobilimin öneminin yeni anlaşılıyor olması nedeniyle, *D. hansenii* ile ilgili proteom verileri oldukça sınırlıdır. Bu bölümde, bu konuda yayımlanan tek çalışmanın bulguları özet olarak verilecektir.

Gori *et al.* (2007) *Debaryomyces hansenii* CBS 767'nin tuz stresi karşısındaki proteomik değişikliklerini incelemişlerdir. Besiyeri olarak YNB (yeast nitrogen base: 6.7g/L YNB ve 10g/L glukoz) kullanılmış ve besiyeri 4.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 46 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kullanılarak pH 5.3'e tamponlanmıştır. NaCl eklenmesi üstel çoğalma fazının ortasında gerçekleştirilmiş, %8 ve %12'lik tuz konsantrasyonlarında denemeler yapılmıştır. Mayanın çoğalması 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve ölçümlerin 0.2-0.6 değer aralığında kalması için seyreltmeler yapılmıştır. *D. hansenii*'nin tuz stresi karşısında protein sentezlemesinde nasıl değişiklikler olduğunu anlamak için iki boyutlu jel elektroforezinden (2D-PAGE) ve radyoaktif işaretleme yöntemlerinden yararlanılmıştır. Radyoaktif işaretleme için proteinler, 30 dk boyunca 100 µCi mL<sup>-1</sup> L-[<sup>35</sup>S]-metiyonin ile muamele edilmiştir.

Örnekler tuz eklenmesinden hemen önce ve 0.5, 1.5 ve 2.5 saat sonra alınmıştır. Farklı zamanlarda farklı tuz derişimlerinde alınan protein örnekleri incelenmiş ve L-[<sup>35</sup>S]-metiyoninin protein inkorporasyonu tespit edilerek protein dinamikleri açıklanmaya çalışılmıştır. Radyoaktif olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş proteinler ekstraksiyon tamponuyla elde edilmiştir.

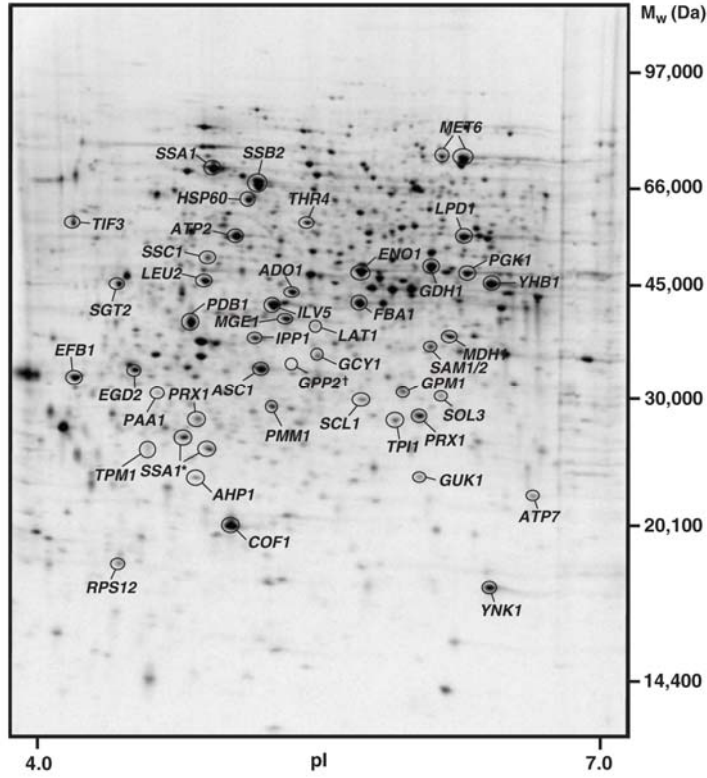
NaCl'ün büyüme üzerine etkisini incelemek için üstel çoğalma fazının ortasında %8 ve %12 oranlarında tuz ilave edilmiş ve mayanın çoğalma eğrileri karşılaştırılmıştır. Tuzun *D. hansenii*'nin çoğalması üzerine etkisi Şekil 2.6'da görülmektedir. Tuz eklenmesi

büyümede bir gecikme yaratmış; ancak son hücre konsantrasyonunu etkilememiştir. NaCl eklenmesinden önce en yüksek özgül çoğalma hızı  $0.22 \text{ st}^{-1}$  iken %8 tuz konsantrasyonlu ortamda  $0.15 \text{ st}^{-1}$  ve %12'lik ortamda  $0.11 \text{ st}^{-1}$  olduğu saptanmıştır.



**Şekil 2.6** *Debaryomyces hansenii* CBS 767'nin %0, %8 ve %12 NaCl içeren YNB besiyerinde çoğalma eğrisi (■→%0 NaCl, ●→%8 NaCl, ▲→%12 NaCl. Grafikteki ok tuz eklenme anını ifade eder) (Gori *et al.* 2007)

Yapılan iki boyutlu jel elektroforezlerinde, radyoaktif işaretli protein denemelerinde 738 tane protein spotu tespit edilmiştir. *D. hansenii* proteinlerinin pek çoğu 30 000-80 000 Da arasında olsa da belirteç olarak kullanılan proteinler 6 000-100 000 Da arasındadır. *D. hansenii* proteomunun geneli pI 5.0-6.5 arasındadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Tuzsuz YNB besiyerinde çoğalan *Debaryomyces hanseni* CBS 767'nin iki boyutlu jel elektroforezi (Gori *et al.* 2007)

MALDI-TOF MS ile glikolitik enzimler, nükleik asit ve aminoasit sentezinde görev alan biyosentetik enzimler ve ısı şok (heat shock) proteinleri gibi geniş bir çerçevede toplamda 47 protein spotu tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinler ve özellikleri Çizelge 2.5'te görülmektedir.

**Çizelge 2.5** *Debaryomyces hansenii* CBS 767'nin tanımlanan proteinlerinin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılmış listesi (Gori *et al.* 2007)

Gen	Gen ürünü	Hesaplanan pI	Hesaplanan moleküler ağırlık (Da)	Deneyisel pI	Deneyisel moleküler ağırlık (Da)	Eşleşen peptit	Kapsama (%)
<i>Energy metabolism</i>							
<i>Glycolysis</i>							
<i>ENO1</i>	Enolase	5.28	47 210	5.7	48 200	20	49
<i>FBA1</i>	Aldolase	5.34	39 448	5.7	43 500	14	45
<i>GPM1</i>	Phosphoglycerate mutase	5.51	27 554	5.9	31 600	11	59
<i>PGK1</i>	3-Phosphoglycerate kinase	5.90	44 587	6.2	48 200	7	26
<i>TPI1</i>	Triosephosphate isomerase	5.55	26 750	5.9	28 900	11	60
<i>Pentose phosphate pathway</i>							
<i>SOL3</i>	6-Phosphogluconolactonase	5.62	28 638	6.1	31 100	10	39
<i>Krebs cycle</i>							
<i>MDH1</i>	Mitochondrial malate dehydrogenase	5.62	34 677	6.1	38 700	18	59
<i>Routes towards Krebs cycle</i>							
<i>LAT1</i>	Dihydroliipoamide acetyltransferase	5.91	49 332	5.5	39 800	11	24
<i>LPD1</i>	Lipoamide dehydrogenase	6.38	53 159	6.2	54 900	18	36
<i>PDB1</i>	Pyruvate dehydrogenase $\beta$ -subunit	5.11	41 447	4.9	40 400	6	14
<i>Respiration</i>							
<i>ATP2</i>	F(1)F(0)-ATPase complex $\beta$ -subunit	5.26	53 847	5.1	55 700	21	58
<i>ATP7</i>	ATP synthase d subunit	6.63	19 664	6.5	21 900	10	60
<i>Biosynthesis of small molecules</i>							
<i>Amino acids</i>							
<i>GDH1</i>	NADP-dependent glutamate dehydrogenase	5.67	49 123	6.0	49 600	13	38
<i>ILV5</i>	Acetohydroxyacid reductoisomerase	6.30	44 324	5.3	42 900	16	29
<i>LEU2</i>	$\beta$ -Isopropylmalate dehydrogenase	5.10	41 106	4.9	46 800	9	30
<i>MET6</i>	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate Homocysteine methyltransferase	5.69	85 974	6.1	73 500	16	24
<i>MET6</i>	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate Homocysteine methyltransferase	5.69	85 974	6.2	72 400	33	54
<i>SAM1/2</i>	S-Adenosylmethionine synthetase	5.93	42 018	6.0	37 000	16	47
<i>THR4</i>	Threonine synthase	5.24	58 153	5.4	58 200	17	37
<i>Nucleotides</i>							
<i>GUK1</i>	Guanylate kinase	5.97	20 783	6.0	23 200	15	70
<i>YNK1</i>	Nucleoside diphosphate kinase	6.15	16 965	6.3	15 700	8	51
<i>Macromolecule metabolism</i>							
<i>Ribosomal proteins</i>							
<i>RPS12</i>	Ribosomal protein S12	4.57	15 745	4.5	17 100	6	50
<i>RNA synthesis, modification, DNA transcription</i>							
<i>EGD2</i>	$\alpha$ -Subunit of the heteromeric nascent polypeptide-associated complex	4.64	19 694	4.6	34 400	8	58
<i>Proteins (translation and modification)</i>							
<i>ASC1</i>	Guanine nucleotide-binding protein	5.40	34 376	5.2	34 400	15	73
<i>EFB1</i>	Translation elongation factor EF-1 $\beta$	4.31	23 008	4.3	33 500	5	30
<i>TIF3</i>	Translation initiation factor eIF4B	5.35	47 729	4.3	58 200	16	30
<i>Proteins (chaperones)</i>							
<i>HSP60</i>	Heat shock protein 60	5.24	60 620	5.1	62 600	20	41
<i>MGE1</i>	Protein folding, mitochondrial	6.49	27 214	5.3	41 000	8	24
<i>SSA1</i>	Heat shock protein of HSP70 family	4.95	70 245	4.9	70 400	4	8
<i>SSA1</i>	Heat shock protein of HSP70 family	4.95	70 245	4.8	26 900	19	52
<i>SSA1</i>	Heat shock protein of HSP70 family	4.95	70 245	5.0	25 700	18	25
<i>SSB2</i>	Heat shock protein of HSP70 family	5.11	66 279	6.3	54 900	13	31
<i>SSC1</i>	Protein folding, mitochondrial	5.32	69 461	5.0	51 100	6	14

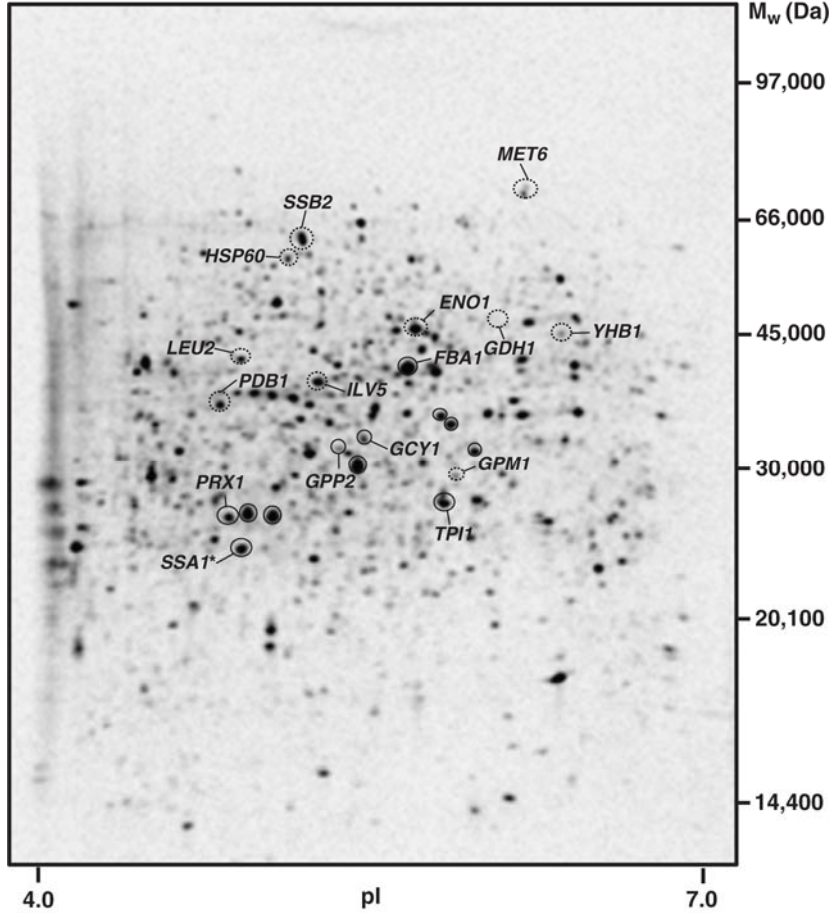
Degradation of macromolecules							
<i>SCL1</i>	Proteasome subunit YC7 $\alpha$ /Y8	5.45	27 448	5.7	30 700	12	44
Cytoskeleton							
<i>COF1</i>	Cofilin	4.96	15 850	5.1	19 800	7	72
<i>TPM1</i>	Tropomyosin	4.63	19 076	4.7	25 700	7	42
Cellular processes							
Osmotic adaptation							
<i>GCY1</i>	Glycerol dehydrogenase	5.21	32 976	5.5	36 000	11	40
<i>GPP2</i>	Glycerol-3-phosphatase	5.13	27 935	5.4	35 000	9	60
Other functions							
<i>ADO1</i>	Adenosine kinase	5.23	38 021	5.4	45 400	9	48
<i>AHP1</i>	Alkyl hydroperoxide reductase	4.97	18 602	4.9	23 200	9	76
<i>IPP1</i>	Inorganic pyrophosphatase	5.12	32 120	5.2	38 700	8	36
<i>PAA1</i>	Polyamine acetyltransferase	4.73	25 203	4.7	31 600	7	41
<i>PMM1</i>	Phosphomannomutase	5.17	28 558	5.3	30 200	13	47
<i>PRX1</i>	Peroxiredoxin	5.10	28 891	4.9	28 500	8	32
<i>PRX2</i>	Peroxiredoxin	5.70	25 251	6.0	28 900	11	58
<i>SGT2</i>	Glutamine-rich cytoplasmic protein	4.65	36 884	4.5	46 800	9	45
<i>YHB1</i>	Flavohaemoglobin	5.85	45 694	6.3	46 800	5	52

Çalışmada, tuz stresine maruz kalınca 2 kat artan ya da azalan proteinler indüklenmiş ya da repress olmuş olarak kabul edilmiştir. Çizelge 2.6'da %8'lik ve %12'lik tuz stresi sonucu meydana gelen proteomik değişiklikler sayısal veriler üzerinden ifade edilmiştir. Genellikle proteinlerdeki artış ve azalış 2 kat olmuş; ancak 12 kat değişim de gözlemlenmiştir. Ancak görülmüştür ki %8 ve %12'lik NaCl konsantrasyonlarında tuz stresine cevap olarak sentezlenen proteinler aynı olmakla beraber cevapta bir gecikme söz konusudur. Stres cevabı olarak tanımlanan proteinler Çizelge 2.7'de verilmiştir.

**Çizelge 2.6** %8 ve %12 NaCl ortamında L-[<sup>35</sup>S]-metiyonin işaretli proteinlerin eşleşme, indüksiyon ve represyon sayılarına genel bakış (Gori *et al.* 2007)

	Referans jel	%8 NaCl ilavesinden sonra geçen zaman			%12 NaCl ilavesinden sonra geçen zaman		
		0.5	1.5	2.5	0.5	1.5	2.5
<b>Detekte edilen spot sayısı</b>	738	205	197	207	15	161	202
<b>Referans jelle eşleşen spot sayısı</b>	–	189	185	190	14	147	173
<b>İki kattan fazla indüklenen spot sayısı</b>	–	36	35	37	2	29	28
<b>İki kattan fazla repress olan spot sayısı</b>	–	26	26	25	0	19	24

Şekil 2.8'de %8 tuzluluk oranında çoğalan *Debaryomyces hansenii* CBS 767'nin iki boyutlu jel elektroforezi görülmektedir. Bu jel fotoğrafının tuzsuz ortam proteinleri jel fotoğrafı ile kıyaslanması sayesinde tuz stresi cevabı olan proteinler tespit edilebilmiştir.

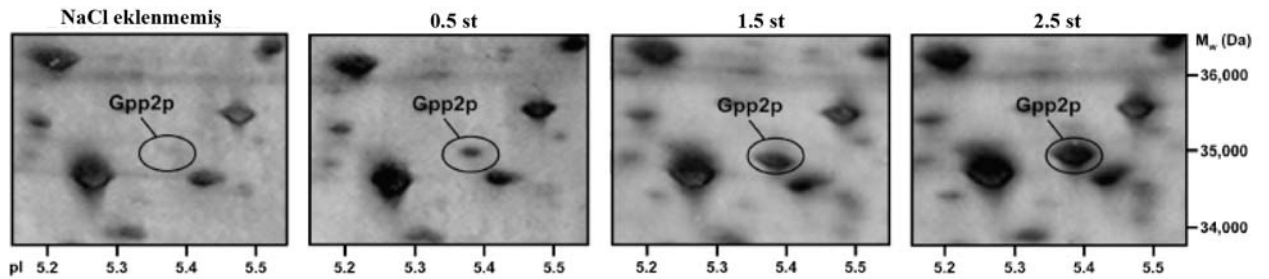


**Şekil 2.8** %8 tuz konsantrasyonuna sahip YNB besiyerinde çoğalan *Debaryomyces hansenii* CBS 767'nin iki boyutlu jel elektroforezi. Üstel çoğalma fazının ortalarında tuz eklenmiş ve 1.5 saat sonra protein örnekleri alınmıştır (Gori *et al.* 2007).

Proteinlerin tuz stresi altında L-[<sup>35</sup>S]-metiyonin inkorporasyonundan oldukça etkilendiği bulunmuş ve tuz varlığında artan ve azalan proteinler tespit edilerek, 47 adet *Debaryomyces hansenii* CBS 767 proteini tanımlanmıştır. L-[<sup>35</sup>S]-metiyonin inkorporasyonundaki azalmanın protein sentezinde meydana gelen genel azalmadan ileri geldiği düşünülmüştür.

**Çizelge 2.7** %8 ve %12 NaCl varlığında en az iki kat indüklenmiş veya represe olmuş proteinler

Gen	Gen ürünü	İndüksiyon/Represyon					
		%8 NaCl eklenmesinden sonra geçen zaman			%12 NaCl eklenmesinden sonra geçen zaman		
		0.5	1.5	2.5	0.5	1.5	2.5
<i>Energy metabolism</i>							
<i>Glycolysis</i>							
<i>ENO1</i>	Enolase	-1.5	-2.1	-3.0	ND	-1.8	-2.5
<i>FBA1</i>	Aldolase	2.6	6.9	6.1	1.1	4.0	7.1
<i>GPM1</i>	Phosphoglycerate mutase	-2.0	-1.3	-1.1	ND	-1.4	-1.5
<i>TPI1</i>	Triosephosphate isomerase	2.4	5.0	8.1	2.6	3.7	9.3
<i>Routes to Krebs cycle</i>							
<i>PDB1</i>	Pyruvate dehydrogenase $\beta$ -subunit	-4.5	-2.5	-3.2	ND	-6.9	-4.1
<i>Biosynthesis of small molecules</i>							
<i>Amino acids</i>							
<i>GDH1</i>	NADP-dependent glutamate dehydrogenase	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>ILV5</i>	Acetohydroxyacid reductoisomerase	1.6	-2.2	-2.4	ND	-1.9	-2.7
<i>LEU2</i>	$\beta$ -Isopropylmalate dehydrogenase	-2.8	-1.8	-2.3	ND	-1.4	-1.8
<i>MET6</i>	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	-2.6	-5.7	-3.9	ND	ND	-6.1
<i>Macromolecules</i>							
<i>Proteins (chaperones)</i>							
<i>HSP60</i>	Heat shock protein 60	-1.4	-4.4	-2.5	ND	-2.1	-2.1
<i>SSA1</i>	Heat shock protein of HSP70 family	6.8	2.2	3.6	1.5	8.4	4.0
<i>SSB2</i>	Heat shock protein of HSP70 family	-1.7	-4.3	-2.2	ND	-2.1	-2.3
<i>Cellular processes</i>							
<i>Osmotic adaptation</i>							
<i>GCY1</i>	Glycerol dehydrogenase	4.0	4.0	4.2	ND	1.4	2.0
<i>GPP2</i>	Glycerol-3-phosphatase	-	2.5 <sup>†</sup>	4.1 <sup>†</sup>	-	-	5.0 <sup>‡</sup>
<i>Other functions</i>							
<i>PRX1</i>	Peroxioredoxin	-1.3	3.1	5.5	2.1	2.7	5.6
<i>YHB1</i>	Flavohaemoglobin	-7.3	-8.7	-7.1	ND	ND	-3.4



**Şekil 2.9** %8 NaCl ortamına adapte olmakta olan *Debaryomyces hansenii* CBS 767'de gliserol-3-fosfatın indüklenmesi

Özetle, *D. hansenii* tuz stresine maruz kaldığında yüksek oranda gliserol sentezlemekte ve depolamaktadır. Bu nedenle gliserol-3-fosfattan bir fosfat grubu kopararak gliserol

oluşturan gliserol-3-fosfataz enzimi tuz stresinde oldukça arttırmıştır. Bu artışın görüntülendiği jel fotoğrafları Şekil 2.9’da verilmiştir. Aynı zamanda gliserol dissimilasyonunda görev alan enzimlerinde arttığı grlmştir. Represe olan enzimler ise genelde glikolizin alt kısımlarında yer alanlar ve aminoasit sentezinde görev alan enzimlerdir. Ayrıca bir ısı Şok (heat shock) proteini olan Ssa1p’nin indüklendiği, diğer yandan Ssb2p ve Hsp60p ısı Şok proteinlerinin repressede olduğu grlmştir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Çalışmada protein üretimi için mikrobiyal kaynak olarak süt mamulleri üretim tesisi yağlı atığından izole edilen ve 16S rRNA analizi ile *Debaryomyces hansenii* olduğu gösterilen (Takaç ve Şengel 2010) maya kullanılmıştır. Protein üretimlerinin karşılaştırılması amacıyla ticari olarak satın alınan *Debaryomyces hansenii* NRLL Y-7426 kullanılmıştır. Deneyleerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler EK 1’de verilmiştir.

#### 3.2 Yöntem

##### 3.2.1 Mikroorganizma üretim ortamları

*Debaryomyces hansenii*’den protein üretiminde, mikroorganizma agar içeren eğik tüplerde çoğaltılmış ve belli zaman aralıkları ile tüpten tüpe ekim yapılarak stok tazeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından mikroorganizma katı agar içeren tüplerden sıvı ön çoğalma ortamına, ön çoğalma ortamından da 1/10 aşılama oranı ile daha büyük hacimli protein üretim ortamına aktarılmıştır.

##### 3.2.1.1 Katı çoğalma ortamı

*Debaryomyces hansenii*’nin çoğalmasında kullanacağı besi yeri olarak UYM (Universal Yeast Medium) seçilmiştir. UYM ortamı % 0.3 maya ekstraktı, % 0.3 malt ekstraktı, % 0.5 pepton, % 1 glukoz ve % 1.5 agar içermektedir. Hazırlanan katı ortam, 121 °C’ta 20 dakika sterilizasyonun ardından (ALP CL-40M Sterilizatör), laminar akış kabininde (Biolab Faster BHG 2004-S) tüplere paylaştırılarak tüpler eğik duracak şekilde agarın donması

beklenmiştir. Besi yeri donduktan sonra katı ortama laminar akış kabini içinde steril koşullara dikkat edilerek ekim yapılmış ve mikroorganizma 30 °C'ta 22 saat inkübasyona bırakılmıştır (Shel Lab S16R-2 İnkübatör).

### **3.2.1.2 Ön çoğalma ortamı**

Ön çoğalma ortamı, mikroorganizmanın protein üretim ortamına aktarılmadan önce çoğaltıldığı sıvı ortamdır. Bu çalışmada ön çoğalma ortamı, katı besi yeri ile aynı bileşimde dir. Sadece agar içermemektedir. Ön çoğalma ortamı, T=30 °C ve N=150 rpm koşullarında t=22 saat çalkalamalı hava banyosunda inkübe edilmiştir. t=22. saatte 10 ml'lik ön çoğalma ortamlarında yeteri kadar çoğalmış olan hücreler, protein üretim ortamlarına steril koşullarda 1/10 oranında aktarılmıştır.

### **3.2.1.3. Protein üretim ortamı**

Protein üretim ortamı, mikroorganizmanın çoğalırken protein ürettiği ortamdır. Çalışmada kullanılan ve mikroorganizma için uygun karbon, azot kaynakları ve iyonları içeren temel UYM ortamı, % 0.3 maya ekstraktı, % 0.3 malt ekstraktı, % 0.5 pepton ve % 1 glukoz içermektedir. Çalışmada, üretim ortamının bileşimi ve sıcaklık, incelenmek istenen parametre olarak değiştirilmiş ve her deney setinde bir önceki denemelerde elde edilen optimize koşullar kullanılmıştır.

## **3.2.2 Protein Saflaştırma**

*D. hansenii*'nin hücre dışına yani protein üretim ortamına salgıladığı proteinlerin saflaştırılması için bir dizi işlem uygulanmıştır. Bu işlemler sırasıyla aşağıda anlatılmıştır:

### *Hücrelerin ortamdan ayrılması*

Hücrelerin ortamdan ayrılması için protein üretim ortamı çoğalmanın t=24. ve t=33. saatlerinde +4 °C'de 10000 rpm'de (12000 x g) 10 dk santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina 35R). Elde edilen üst faz ile analizlere devam edilmiştir.

### *Etanol çöktürmesi*

Proteinlerin üst fazdan izole edilmesi için etanol çöktürme yönteminden (<http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols>) faydalanılmıştır. Bu amaçla örnek üzerine hacminin 9 katı olacak şekilde soğuk saf etanol eklenmiş, 15 s vortekslemenin ardından en az 1 saat -20 °C'ta bekletilmiştir. 15 dk 4 °C'ta 10000 rpm'de santrifüj edilen örneklerin üstte kalan sıvısı atılarak protein pelletleri alınmıştır. Pelleti yıkamak amacıyla üzerine %90'luk soğuk etanol çözeltisi eklenmiş ve kısa bir vortekslemenin ardından 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek tekrar üstte kalan sıvı atılmıştır. Bu işlem sayesinde örneklerdeki proteinler çökelek halinde elde edilmiştir. Elde edilen çökelek ise yaklaşık 200 µl, pH=5, 10mM sitrat-fosfat tamponunda çözülmüştür.

### *Ultrafiltrasyon*

200 µl, pH=5, 10mM sitrat-fosfat tamponunda çözülen hücre dışı proteinlerin hacmi saf su ile 12 ml'ye tamamlanarak, ultrafiltrasyon tüplerinde (Amicon Ultra-15) 5000 x g'de 45 dk santrifüjlenmiştir.

### *Protein derişimi tayini*

Elde edilen ultrafiltratın protein derişimi Bradford yöntemiyle tayin edilmiştir (Bradford 1976). Ultrafiltratın 5 µl'sine 495 µl Bradford boyası (Biorad 500-0006) eklenmiş, vortekslenmiş ve 5 dk beklendikten sonra 595 nm'de absorbans (Biorad Smartspec Plus) ölçülmüştür. Her ölçümde eş zamanlı olarak hazırlanan kalibrasyon grafikleri protein miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

### *TCA çöktürmesi*

Ultrafiltratın protein derişimi hesaplandıktan sonra jele yüklenecek protein miktarını içeren ultrafiltrat hacmi TCA yöntemiyle çöktürülmüştür. Bu amaçla örnek üzerine örneğin %10 hacminde %100 TCA eklenmiş, 15 sn vortekslemenin ardından 15 dk buzda bekletilmiştir. 10 dk 14000 rpm'de santrifüjlenerek üst faz atılmış, pellet 200 µl %25 soğuk aseton ile yıkanarak tekrar 10 dk 14000 rpm'de santrifüjlenerek üst faz atılmıştır. Elde edilen pellet 2D-PAGE analizlerinde kullanılmıştır.

## **3.2.3 Protein tanımlama**

### **3.2.3.1 İki boyutlu jel elektroforezi yöntemi (2D-PAGE)**

Çalışmada yürütme jeli olarak %12,5'lik, yığılma jeli olarak %4'lük akrilamid jel 10 cm jel kasetlerinde, tek dişli tarak kullanılarak hazırlanmıştır. Proteinlerin iki boyutlu ayrılmasında kullanılan poliakrilamid jelin içeriği EK 2'de verilmiştir. Protein miktarları Bradford yöntemiyle (Bradford 1976) tayin edilen protein örnekleri, belli oranlarda 7M üre, 2M tiyoüre, %4 CHAPS, %1 amfolit, 10 mM DTT, %1 HED, proteaz inhibitörü ve bromofenol blue boyası içeren rehidratasyon tamponuyla karıştırılmış ve elektroforez tepelerine (tray) konulmuştur. pH 4-7 gradyen aralığına sahip IPG şeritler bu karışımın

üzerine yerleştirilmiş ve üstleri mineral yağı ile kaplanmıştır. IPG şeritlerin örneği emebilmesi için aktif rehidratasyon yöntemi kullanılmış, yani IPG şeritler ile 16 saat 50V akımda kuru elektroforez yapılmıştır (Biorad, Protean IEF Cell). Rehidratasyonu tamamlanan IPG şeritler temiz bir tepsiye alınmış ve 250V akımda kuru elektroforez ile izoelektrik fokuslama işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece proteinler IPG şerit üzerinde izoelektrik noktalarına göre ayrılmıştır. Ardından IPG şeritler dengeleme tamponu I ve II ile 15'er dakika çalkalanarak hazırlanmış ve jellere yerleştirilerek elektroforez başlatılmıştır (Biorad, Mini Protean System). Dengeleme tamponu I, 6M üre, 1,5M Tris-HCl pH 8,8 tamponu, %2 SDS, %20 gliserol ve %2 DTT içermektedir. Dengeleme tamponu II ise benzer bileşime sahiptir ancak DTT yerine %0,3 iyodoasetamit ve bromofenol blue boyası içerir. Elektroforez esnasında yürütücü tampon olarak SDS tamponu (%3.03 Tris-Base, %1,44 glisin, %1 SDS) kullanılmış ve jeller 100V akımda yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrası jeller fiksatif solüsyonuna (%10 metanol, %7 asetik asit) koyulup çalkalayıcıda bekletilmiştir. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise Sypro Ruby (Sigma) boyama yapılmıştır. Gece boyunca boyada kalan jeller daha sonra 15 dk daha fiksatif solüsyonunda çalkalanmış ve UV ışıkta görünür hale gelen Sypro Ruby boyalı jeller Versa-Doc (BioRad) görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

### **3.2.3.2 PD-Quest programı ile jel analizi ve spot kesimi**

İki boyutlu jeller kesilmeden önce ultraviyole ışıkta görüntülenmiş, jel görüntüleri PD-Quest v8.0.1 programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Yapılan kalitatif ve kantitatif analizler sonucunda, artan ve azalan veya yok iken var olan, var iken yok olan proteinler tespit edilmiştir. Tespit edilen bu proteinler spot kesici (BioRad, Spotcutter) ile otomatik olarak kesilmiş ve 96'lık v tabanlı plakalara alınmıştır.

PD-Quest programı ile jeller karşılaştırılmadan önce, her bir jel aynı kamera ayarları kullanılarak görüntülenmiş ve elde edilen jel imajları aynı formata getirilmiştir. Bunun için imajlar önce döndürülmüş ya da rotasyonu düzeltilmiş, Salt- Gaussian- 3x3 parametreleri kullanılarak filtrelenmiş ve lokal regresyon modeli kullanılarak normalize edilmiştir.

Böylece istenmeyen kirliliklerden uzaklaştırılan imajların hepsi aynı boyutta kesilerek (crop) eşleştirme setlerinde analizlenmeye hazır hale getirilmiştir. Jellerin eşleştirilmesi için önce PD-Quest programının otomatik eşleştirme yapması sağlanmış, ardından olası post-translasyonel modifikasyonlar nedeniyle meydana gelebilecek spot kaymaları tek tek kontrol edilerek, uygun görülen yerlerde el ile düzeltmeler yapılmıştır. Jel analiz setlerinde otomatik olarak eşleşen spotlar mavi harflerle, el ile eşleştirilen spotlar yeşil harflerle ve referans noktası olarak seçilen (yer belirleyici) spotlar mor harflerle gösterilmiştir. Tüm jel analizleri en az iki defa tekrar edilmiştir.

Kalitatif ve kantitatif spot analizleri tamamlandıktan sonra, PD-Quest programının manuel spot kesimi aracı kullanılarak tüm spotlar jelden kesilmiştir. Kesim işleminde 1,5 mm'lik kesici uç kullanılmış ve kesilen jel parçaları her bir kuyucuğunda 200 µl saf su içeren 96'lık v tabanlı plakalara alınmıştır.

### **3.2.3.3 Tripsinizasyon**

Kesilen spotlar içinde hapsolan proteinlerin geri kazanılması için öncelikle boyadan uzaklaştırma işlemi uygulanmıştır. Sypro Ruby boyanın uzaklaştırılması için 50 µl 100 mM amonyum bikarbonat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>) kuyucuktaki jellerin üzerine konulmuştur. 50 µl %100 asetonitril (ACN) ilave edilmiş ve 10 dk 37 °C' de inkübe edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılmış ve bu işlem 2-3 kere tekrar edilmiştir. Ardından jel içindeki proteinlerin kimyasal bağlarını kırmak ve tripsin enzimi ile büyük proteinleri küçük peptidlere parçalamak gerekir. Bu amaçla jel parçaları üzerine 50 µl %100 ACN eklenmiş, 10 dk 37 °C' de inkübe edilmiş ve ardından 37 °C' de ACN'nin tamamı uçurularak uzaklaştırılmıştır. 10 mM DTT, 50 mM amonyum bikarbonat içinde çözülerek her kuyucuğa 50 µl ilave edilmiş ve 30 dk 37 °C' de inkübe edilmiştir. Daha sonra 55 mM iyodoasetamit, 55 mM amonyum bikarbonat içinde çözülerek her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde üzerlerine ilave edilmiş ve 20 dk 37 °C' de inkübe edilmiştir. Kuyucuklardan DTT ve iyodoasetamit uzaklaştırılıp, 100'er µl %100 ACN eklenmiş ve 5dk 37 °C' de inkübe edilmiştir. Sıvı faz atılıp %100 ACN ile iki kez yıkama yapılmıştır. Sıvı faz tekrar atılmış ve 6.25 ng/µl' lik tripsin stoğundan 12.5'er µl kuyucuklara koyulmuştur. 30 dk oda

sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzeri kapatılıp 37 °C’de 4-5 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin ardından tekrar 6.25 ng/μl’ lik tripsin stoğundan 12.5’er μl kuyucuklara koyulmuştur. Yine üzeri kapatılıp 37 °C de 4-5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sıvı faz uzaklaştırılmış ve %1 formik asit, %2 ACN içeren ekstraksiyon tamponu her kuyucuğa 30 μl olacak şekilde ilave edilmiştir. 30 dk 37 °C de üzeri kapatılarak inkübe edilmiş ve 15 dk ultrasonike edilmiştir. Böylece jel içinde hapsolmuş peptidler tampon ile ekstrakte edilmiştir. Peptidleri içeren sıvı faz temiz kaplara aktarılmıştır.

#### **3.2.3.4 MALDI plakasına örnek yükleme**

MALDI-tof cihazı (Waters, Micromass) ile analizlenecek olan peptitlerine ayrılmış proteinler, matriks adı verilen iyonlaşmayı sağlayacak bir materyal ile karıştırılmıştır. Çalışmada matriks olarak *alpha*-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) kullanılmıştır. Rekristalize işlemiyle saflığı artırılan CHCA’nın 3 mg’ı 150 μl çözücü (%50 ACN+ %50 Asetonitril+ %0,1 TFA) ile çözülüp 1:1 oranında örnek ile karıştırılmıştır. Bu karışım steril koşullarda MALDI plakalarına yüklenmiş ve sonra çözücünün buharlaşmasına izin verilmiştir. Plakalar MALDI-tof cihazıyla analizlenmiş ve her bir proteinin peptitleri için kütle spektrumları elde edilmiştir. Kalibrasyon için her denemede molekül ağırlığı ve yükü bilinen peptitlerden oluşan bir örnek karışımı aynı şekilde hazırlanıp plakalara yüklenmiştir. Bu amaçla anjiotensin, substance P, glu fib, renin ve ACTH içeren beş peptitli bir karışım kullanılmıştır. MALDI-tof cihazının kalibrasyon spektrumu EK 3’te verilmiştir.

#### **3.2.3.5 Mascot programı ile protein tanımlama**

Mascot, kütle spektrum verilerini kullanarak proteinlerin tanımlanmasında kullanılan gelişmiş bir arama motorudur ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Bu çalışmada yapılan Mascot analizlerinde veri tabanı olarak SwissProt kullanılmış ve arama alanı mayalarla kısıtlanmıştır. Karbamidometil ve metiyonin oksidasyonu modifikasyonlarının olduğu ve peptitlerin +1 değerlikte olduğu varsayılmıştır.

### 3.3 Analizler

Çalışmada yapılan analizler; spektrofotometrik yöntemlerle hücre ve protein derişimlerinin belirlenmesi ve proteaz aktivite tayinidir.

#### 3.3.1 Hücre derişimi

Hücre derişimi  $\lambda=600$  nm'de spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV-1601) belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle kuru hücre kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve bu doğrudan yararlanılarak UYM üretim ortamından alınmış örneklerin  $\lambda=600$  nm'de absorbansları okunarak hücre derişimleri hesaplanmıştır. Hücre derişimi ölçümlerinde referans çözelti olarak UYM ortamı kullanılmıştır. Okunan absorbansların 1 değerini geçmesi durumunda örnekler belli oranlarda seyreltilmiştir. Kalibrasyon doğrusu oluşturulurken, öncelikle UYM ortamında çoğaltılmış hücreler 12000 x g'de (10000 rpm), 4°C'ta 10 dk süreyle santrifüj edilmiş, üstteki sıvı dökülmüş, çökelek bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra aynı koşullarda yeniden santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemine çökeleğin üzerindeki sıvı berraklaşınca kadar devam edilmiştir, iki kez santrifüj yeterli olmuştur. Saf su ile yıkama işleminin ardından tüplerin dibinde çökmüş olan hücreler petri kabının üzerine alınıp, kurumaları için etüvde 45°C'ta 24 saat bekletilmiştir. Kuru hücreden 1 mg/ml'lik stok çözelti hazırlanmış, stok çözelti seyreltilerek farklı derişimde hücre süspansiyonları oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, farklı derişimlerdeki kuru hücre süspansiyonlarının UV spektrofotometrede  $\lambda=600$  nm'de referans çözelti olarak saf su kullanımı ile absorbansları okunarak oluşturulmuştur. Kuru hücre kalibrasyon grafiği EK 4'te verilmiştir. Çalışmada, spektrofotometrik olarak ölçülen tüm hücre derişimleri en az iki kez tekrar edilmiş ve standart sapma hesabı yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği, standart sapma örnek hesabı ile Ek 5'te verilmiştir.



### 3.3.1.1 Özgül çoğalma hızı

Çalışmada, belli zaman aralıklarında ölçülen mikroorganizma derişimleri, logistik model yardımı ile her bir ortamdaki özgül çoğalma hızlarının bulunmasında kullanılmıştır (Nielsen and Villadsen 1994). Bu amaçla zaman ve mikroorganizma derişimi verileri Eş. (1-3) içinde kullanılarak eğri-uyum yöntemi ile Excel programı kullanılarak denklem parametreleri  $k$  ve  $C_{Xs}$  bulunmuştur.

$$\mu = k \left(1 - \frac{C_X}{C_{Xs}}\right)$$

(1)

$$r_x = \frac{dC_X}{dt} = \mu C_X$$

(2)

$$\frac{dC_X}{dt} = k C_X \left(1 - \frac{C_X}{C_{Xs}}\right)$$

(3)

Burada;

- $\mu$  = özgül çoğalma hızı (zaman<sup>-1</sup>)
- $k$  = üstel fazda özgül çoğalma hızı (zaman<sup>-1</sup>)
- $C_{Xs}$  = en yüksek hücre derişimi (derişim)
- $t$  = zaman (zaman)
- $r_x$  = hücre çoğalma hızı (derişim/zaman)

### 3.3.2 Protein derişimi

Protein derişimlerinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford 1976). Bu yöntem organik bir boyanın proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır. Bradford çözeltileri makro yöntem ve daha hassas olan

mikro yöntem (<50 µl) için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Mikro yöntemin makro yöntemden farkı hazırlanan Bradford çözeltisinin daha yoğun, örnek/boya oranının da daha yüksek olmasıdır. Boyalar hazırlanıp süzölmüş ve makro yöntemde 5 ml Bradford çözeltisi üzerine hücresi çöktürölmüş 100 µl UYM üretim ortamı, mikro yöntemde ise 240 µl Bradford çözeltisi üzerine hücresi çöktürölmüş 960 µl UYM üretim ortamı eklenerek karışım vortekslenmiştir. 5 dk beklendikten sonra karışım yine vortekslenmiş ve  $\lambda=595$  nm'de spektrofotometrik okuma (Shimadzu UV-1601) yapılmıştır. Boya normal şartlarda  $\lambda=465$  nm'de maksimum absorbans verirken, proteine bağlandığı zaman  $\lambda=595$  nm'de maksimum absorbans vermektedir. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik aminoasitler ve aromatik aminoasitler) önemlidir. Kalibrasyon doğrusu sığır serum albuminin (BSA) farklı derişimleri kullanılarak hazırlanmıştır. Makro-Bradford yöntemi kalibrasyon grafiğı EK 6'da, Mikro-Bradford kalibrasyon grafiğı EK 7'de yer almaktadır. Çalışmada, spektrofotometrik olarak ölçölen tüm hücre dışı protein derişimleri en az iki kez tekrar edilmiş ve standart sapma hesabı yapılmıştır. Yapılan ölçömlerin doğruluğı ve tekrarlanabilirliğı, standart sapma örnek hesabı ile Ek 5'te verilmiştir.

### 3.3.3 Proteaz aktivitesi

Proteaz aktivitesi, substrat olarak kazein kullanılarak enzimatik hidroliz sonucunda açığa çıkan hidrolizat absorbansının, spektrofotometrik olarak ölçölmeleriyle belirlenmiştir. Bu amaçla %0.037 EDTA (a/h), %0.5 kazein (a/h) içeren, pH=10 borat tamponu ile hazırlanan çözeltiden 2 ml alınarak hücresi çöktürölmüş 1 ml UYM üretim ortamı ile 100 rpm'de, 37 °C'ta 20 dk süreyle bir reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 2 ml %10 TCA (a/h) ile durdurulmuştur. 15 dakika buzda bekletilen karışım 12000 x g'de (10000 rpm), 4 °C'ta 10 dk santriföjlenerek üstte kalan sıvının  $\lambda=275$  nm'de spektrofotometrik okunması yapılmıştır. Bu yöntemle tanımlanan 1 Ünite (U) Proteaz aktivitesi, 1 dakikada 4 nmol tirozin açığa çıkaran enzim miktarıdır (Moon and Parulekar, 1991). Proteaz aktivitesi kalibrasyon grafiğı ve proteaz aktivitesi örnek hesabı ise EK 8'de verilmiştir.



### **3.3.4 Su aktivitesi**

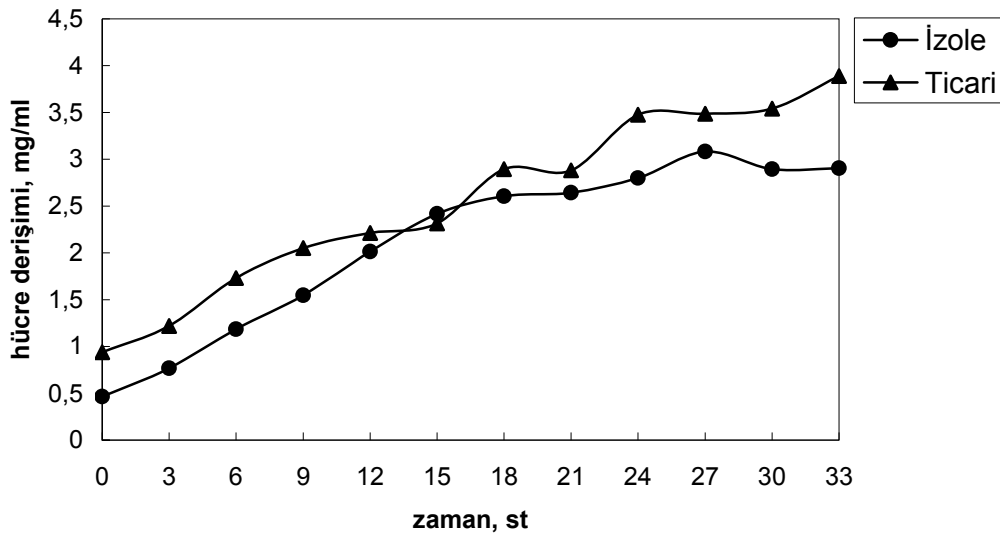
Farklı derişimlerde glukoz içeren UYM ortamlarının su aktivitelemi Novasina aw sprint TH-500 cihazında 25 °C’de ölçülmüştür.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

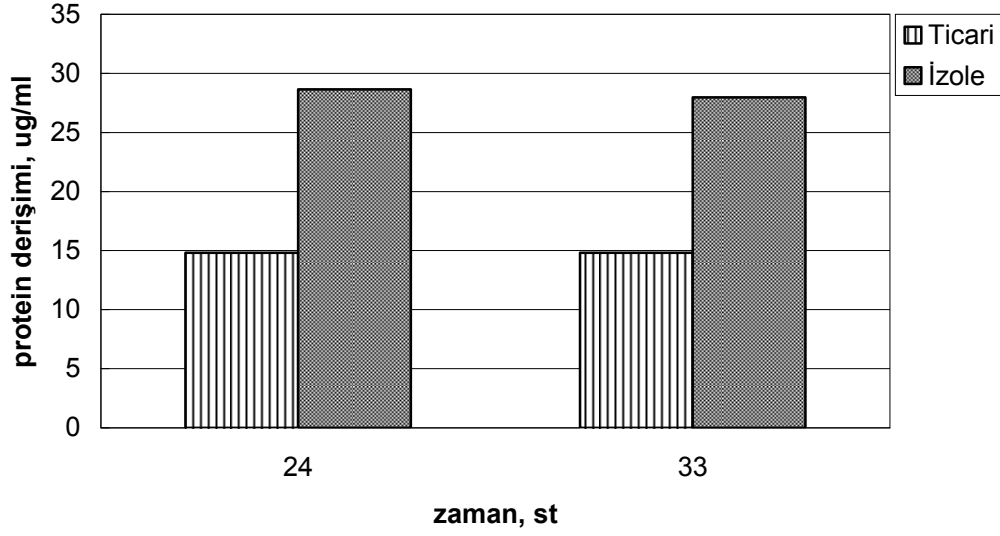
### 4.1 İzole ve Ticari *D.hansenii*'nin Karşılaştırılması

*Debaryomyces hansenii* mayasından protein üretimi çalışmalarına başlamadan önce, bu mayanın iki farklı suşu çoğalma ve protein üretimi açısından karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan suşlardan biri ticari olarak satın alınan *Debaryomyces hansenii* NRRL-Y-7426, diğeri ise peyniraltı suyundan izole edilmiş olan (Takaç ve Şengel 2010) suştur.

Farklı iki suşun protein üretiminin karşılaştırıldığı deneyler T=30 °C, N=150 rpm çalkalama hızında, besiyeri olarak UYM kullanılarak, 250 ml'lik erlenlerdeki 100 ml'lik üretim ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Hücre çoğalması 3 st aralıklarla üretim ortamından alınan örneklerle 33 st boyunca izlenmiştir. Hücre dışı protein derişimi ise çoğalmanın 24. ve 33. saatlerinde ölçülmüştür. İzole ve ticari *Debaryomyces hansenii*'nin çoğalma eğrileri Şekil 4.1'de; ürettikleri protein miktarları ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Üretim sonunda ticari mayanın daha fazla çoğaldığı; ancak protein üretiminin daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmalara izole *D. hansenii* ile devam edilmiştir.



Şekil 4.1 İzole ve ticari *Debaryomyces hansenii*'nin çoğalma eğrileri (T=30 °C, N=150 rpm, UYM ortamı)

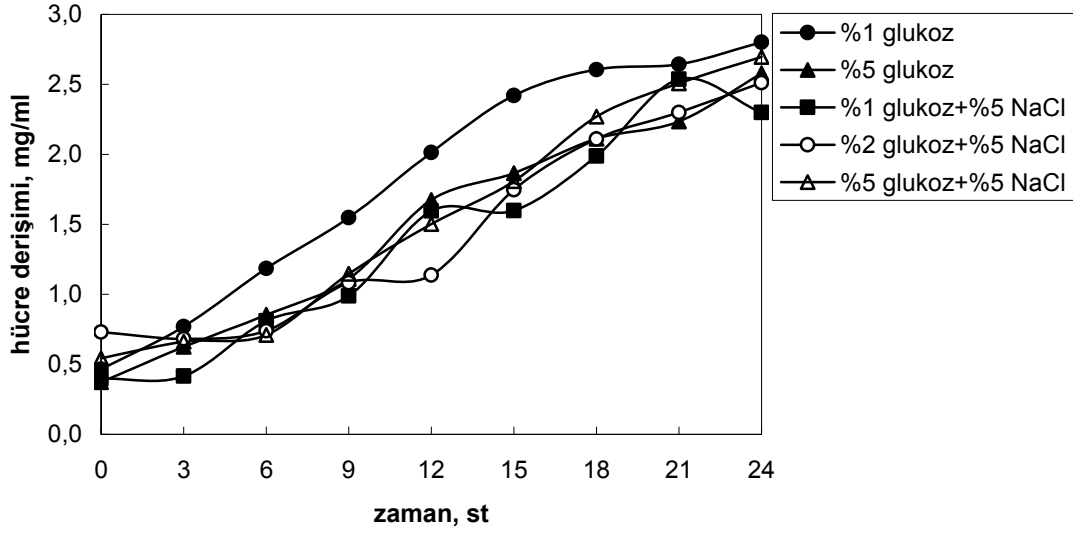


Şekil 4.2 İzole ve ticari *Debaryomyces hansenii*'nin hücre dışı protein derişimleri (T=30 °C, N=150 rpm, UYM ortamı)

#### 4.2 Tuzun (NaCl) *D. hansenii* Çoğalmasına Etkisi

*Debaryomyces hansenii* halotolerant yani tuzluluğa dayanıklı bir mayadır. Tuzlu ortamlarda yaygın olarak bulunur ve %25 tuzluluk oranlarına dayanabilir (Breuer and Harms 2006). Çalışmada, ön deneme olarak *D. hansenii*'nin %5 NaCl içeren ve içermeyen, farklı glukoz derişimlerine sahip UYM ortamlarında çoğalması 3 st aralıklarla 24 st boyunca takip edilmiştir. *D. hansenii*'nin çoğalma eğrileri Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Genel olarak NaCl mayanın çoğalmasını yavaşlatmış; ancak NaCl varlığında farklı glukoz derişimleri hücre çoğalmasında belirgin bir değişiklik yaratmamıştır. En yüksek hücre derişimine %1 glukoz içeren UYM ortamında ulaşılmış ve en hızlı çoğalma yine aynı ortamda gözlenmiştir. Deney sonunda hücre dışı protein derişimleri tuzun Bradford yöntemiyle girişim yapması sonucu ölçülememiş, dolayısıyla tuzlu ve tuzsuz ortamda salgılanan protein miktarları kıyaslanamamıştır



**Şekil 4.3** Farklı glukoz konsantrasyonlarında *Debaryomyces hansenii*'nin çoğalmasına tuzun etkisi (T=30 °C, N=150 rpm, UYM ortamı)

#### 4.3 Glukoz Derişiminin Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi

Bu çalışmada, *D. hansenii*'den protein üretiminde ekstrem glukoz derişimlerinin hücre çoğalması ve hücre dışı protein derişimi üzerine etkisi %1, 5, 10, 20 ve 30 glukoz derişimleri için incelenmiştir. Farklı glukoz derişimlerine sahip üretim ortamlarının su aktivite değerleri ( $a_w$ ) de ölçülerek, sonuçlar ayrıca su aktivitesinin etkisi olarak da değerlendirilmiştir. Glukoz derişiminin artışı, ortamın su aktivitesini azaltmaktadır (Çizelge 4.1).

Glukoz derişiminin hücre çoğalmasına etkisi Şekil 4.4'te yer almaktadır. Glukoz derişiminin artması ile hücre çoğalma hızı ve ulaşılan hücre derişimi azalmaktadır. Ancak düşük glukoz derişimlerinde (%1 ve %5) önemli bir fark yoktur. En yüksek hücre derişimi sırasıyla %1 glukoz içeren ortamda 33. saatte 2,807 mg/ml ve %5 glukoz içeren ortamda 33. saatte 2,672 mg/ml olarak bulunmuştur. Yine, en yüksek özgül çoğalma hızı  $0,14 \text{ st}^{-1}$  olmak üzere aynı glukoz derişimlerinde bulunmuştur (Çizelge 4.2). Farklı glukoz derişimlerinde; hücre çoğalması için kullanılan logistik hız modeline ait parametreler (k ve

C<sub>Xs</sub>) Çizelge 4.2’de, kullanılan çoğalma modeli ile deneysel verilerin uyumu ise Şekil 4.5’te gösterilmiştir.

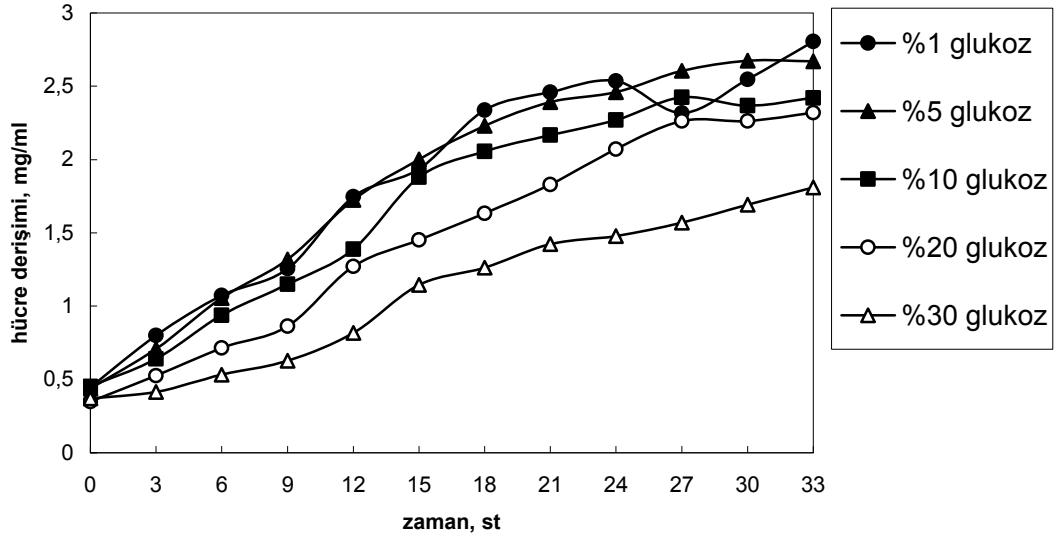
Sonuçlar *D. hansenii*’nin çok yüksek glukoz derişimi (çok düşük su aktivitesi) değerlerinde de yaşayabildiğini göstermektedir. Glukoz derişimi %1 den %30 değerine artırıldığı zaman ulaşılan hücre derişimi % 34 ve hücre çoğalma hızı ise %36 azalmıştır.

Üretimin 24. ve 33. saatlerinde üretim ortamından alınan örneklerle hücre dışı protein miktarları Mikro Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Genel olarak glukoz derişimi arttıkça hücre çoğalmasına paralel olarak hücre dışına salgılanan protein derişimi azalmaktadır (Şekil 4.6). 24. ve 33. st örnekleri arasında önemli bir fark olmaması, hücrelerin hücre dışı protein üretimini, başlıca üstel fazda gerçekleştirdiğini göstermektedir. En yüksek hücre dışı protein üretimi %1 glukoz içeren ortamda 24. saatte 28,64 µg/ml olarak belirlenmiştir. Glukoz derişimi %1’den %30 değerine artırıldığı zaman ulaşılan protein derişimi 24. saat için %46, 33. saat için ise %65 azalmıştır.

**Çizelge 4.1** Farklı glukoz derişimlerine sahip üretim ortamlarının su aktivitesi ( $a_w$ )

<b>Glukoz derişimi (%)</b>	<b>Su aktivitesi (<math>a_w</math>)</b>
1	0.997
5	0.997
10	0.989
20	0.976
30	0.962

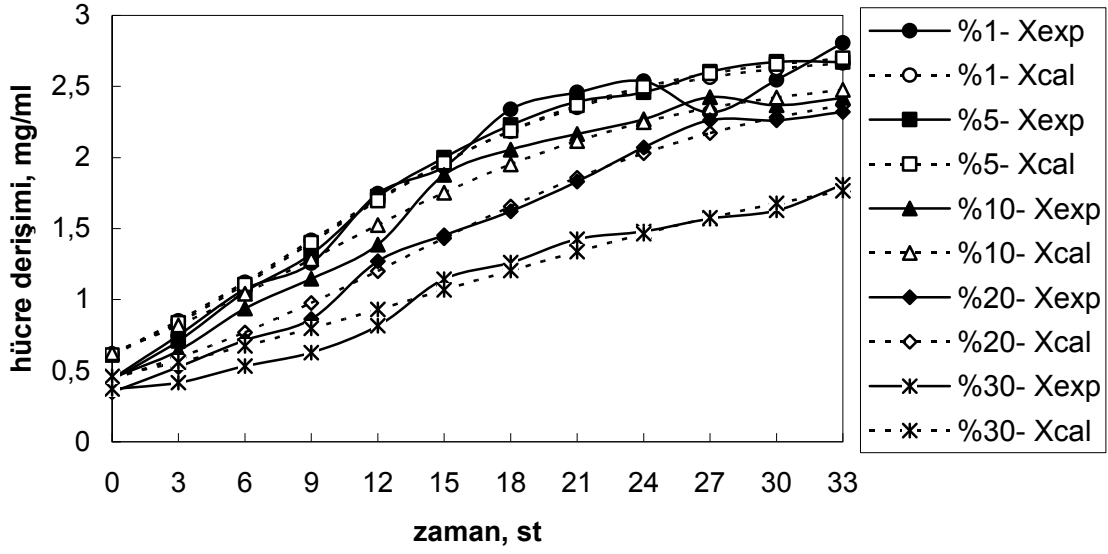




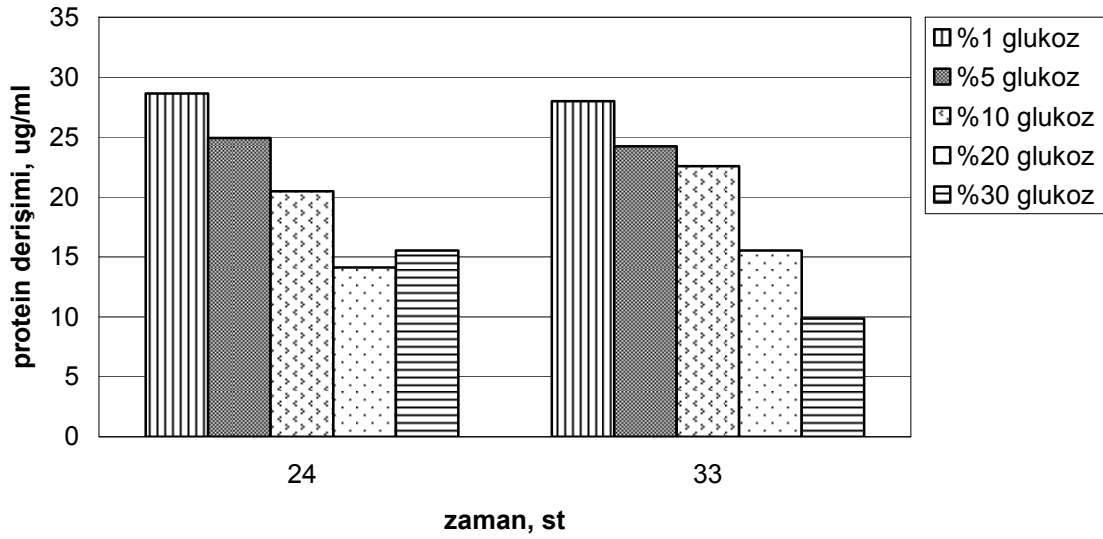
Şekil 4.4 Glukoz derişiminin hücre çoğalmasına etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)

Çizelge 4.2 Farklı glukoz derişimlerinde *D. hansenii*'nin özgül çoğalma hız parametreleri (T=30 °C)

Glukoz derişimi (%)	$k$ ( $st^{-1}$ )	$R^2$	$C_{Xs}$ (mg/ml)
1	0.14	0,978	2,665
5	0.14	0,997	2,655
10	0.12	0,987	2,477
20	0.12	0,994	2,283
30	0.09	0,981	1,765



Şekil 4.5 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii* için deneysel verilerin logistik çoğalma modeli ile uyumu (T=30 °C, N=150 rpm)



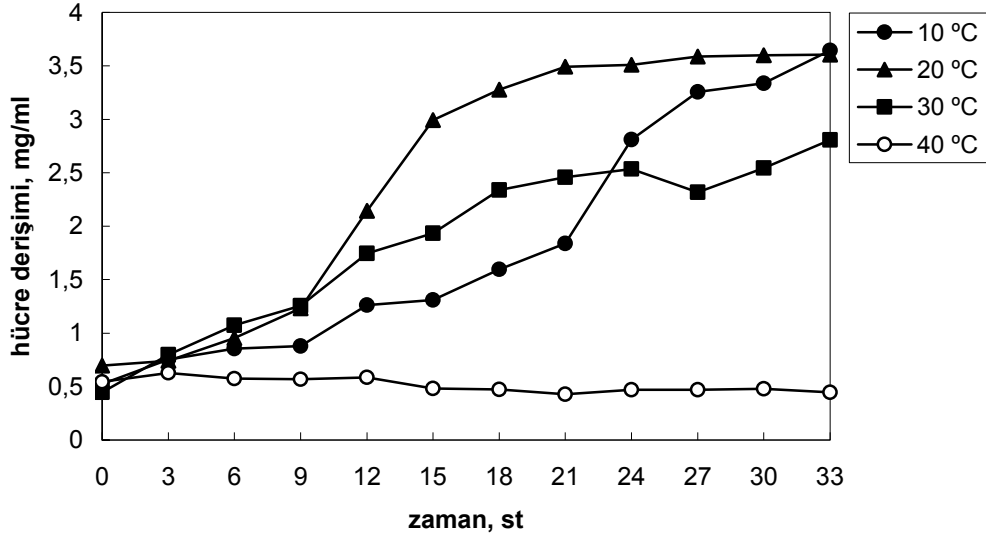
Şekil 4.6 Farklı glukoz derişimlerinde *Debaryomyces hansenii*'nin hücre dışı protein üretimi (T=30 °C, N=150 rpm)

#### 4.4 Sıcaklığın Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi

Bu çalışmada, *D. hansenii*'den protein üretiminde farklı sıcaklıkların hücre çoğalması ve hücre dışı protein derişimi üzerine etkisi 10, 20, 30 ve 40 °C'de gerçekleştirilen deneyler ile çoğalma ve hücre dışı protein üretimi için optimum glukoz derişimi olarak belirlenen %1 glukoz içeren UYM ortamında incelenmiştir.

Farklı sıcaklıklarda hücre çoğalma eğrileri Şekil 4.7'de yer almaktadır. 40 °C dışında incelenen tüm sıcaklıklarda hücre çoğalması gözlenmiştir. Düşük sıcaklıklarda (10 ve 20 °C) hücreler yavaş çoğalmış; ancak ulaşılan hücre derişimi yüksek olmuştur. Buna karşın, yüksek sıcaklıkta (30 °C) daha hızlı çoğalan hücrelerin ulaştıkları derişim düşük sıcaklıklardan daha azdır. En yüksek hücre derişimi 10 °C'de 33. saatte 3,645 mg/ml olarak; en yüksek özgül çoğalma hızı ise 30 °C'de 0,14 st<sup>-1</sup> olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Kullanılan çoğalma modeli ile deneysel verilerin uyumu Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

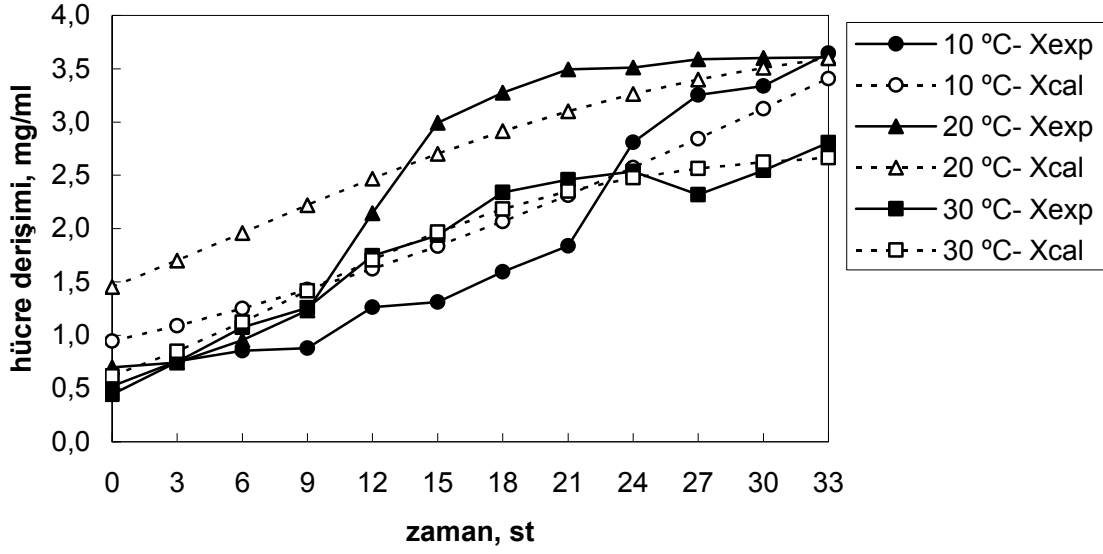
Üretimin 24. ve 33. saatlerinde üretim ortamından alınan örneklerle hücre dışı protein miktarı Mikro Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda (30 ve 40 °C) 24. ve 33. st'lerde üretilen protein miktarlarında önemli fark gözlenmezken, düşük sıcaklıklarda (10 ve 20 °C) 33. st'de daha yüksek protein derişimi ölçülmüştür. Bu, düşük sıcaklıklarda durgunluk fazına daha geç ulaşılması nedeniyle. En yüksek hücre dışı protein üretimi 10 °C'de gerçekleştirilen üretimin 33. saatinde 31,41 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



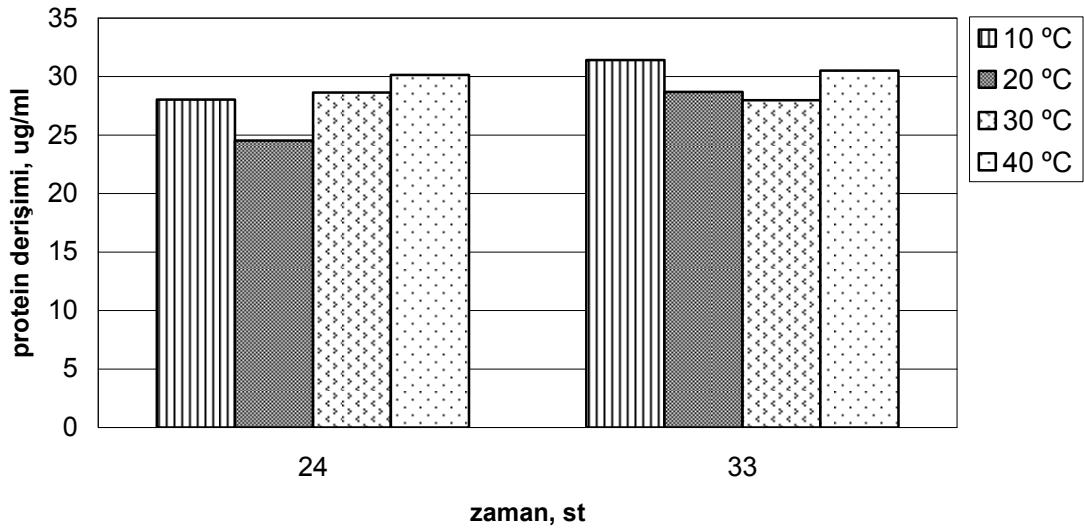
Şekil 4.7 Sıcaklığın hücre çoğalmasına etkisi (N=150 rpm, UYM %1 glukoz)

Çizelge 4.3 Farklı sıcaklıklarda *Debaryomyces hansenii*'nin özgül çoğalma hız parametreleri (%1 Glukoz)

Sıcaklık	$k$ ( $st^{-1}$ )	$R^2$	$C_{Xs}$ (mg/ml)
10	0.06	0,961	3,645
20	0.09	0,933	3,606
30	0.14	0,978	2,665



Şekil 4.8 Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii* için deneysel verilerin lojistik çoğalma modeli ile uyumu (T=30 °C, N=150 rpm)



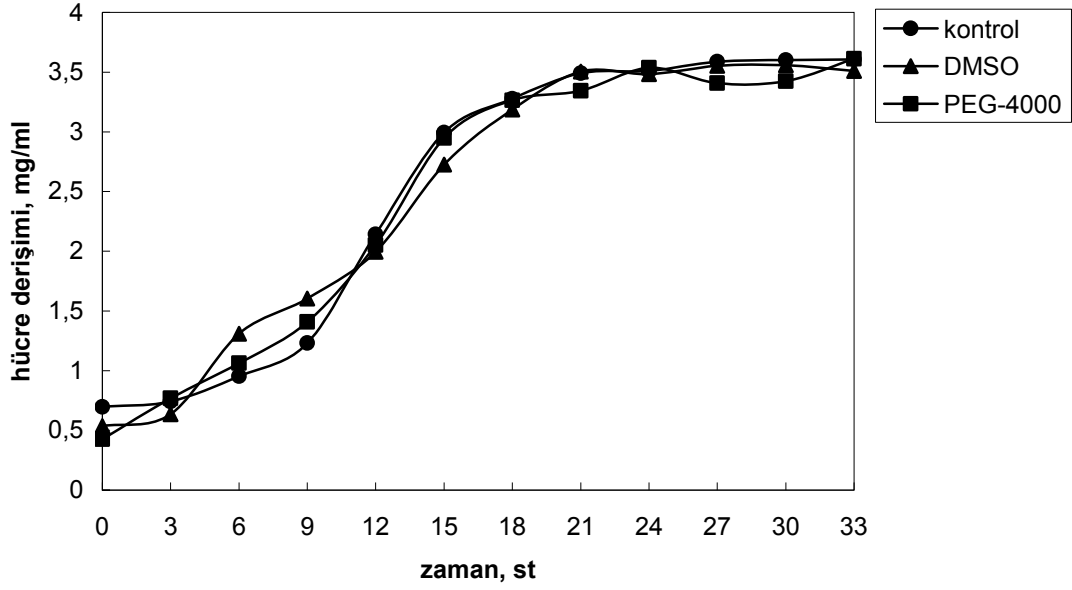
Şekil 4.9 Farklı sıcaklıklarda *Debaryomyces hansenii*'nin hücre dışı protein üretimi (N=150 rpm, %1 glukoz)

#### 4.5 Katkı Maddelerinin Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi

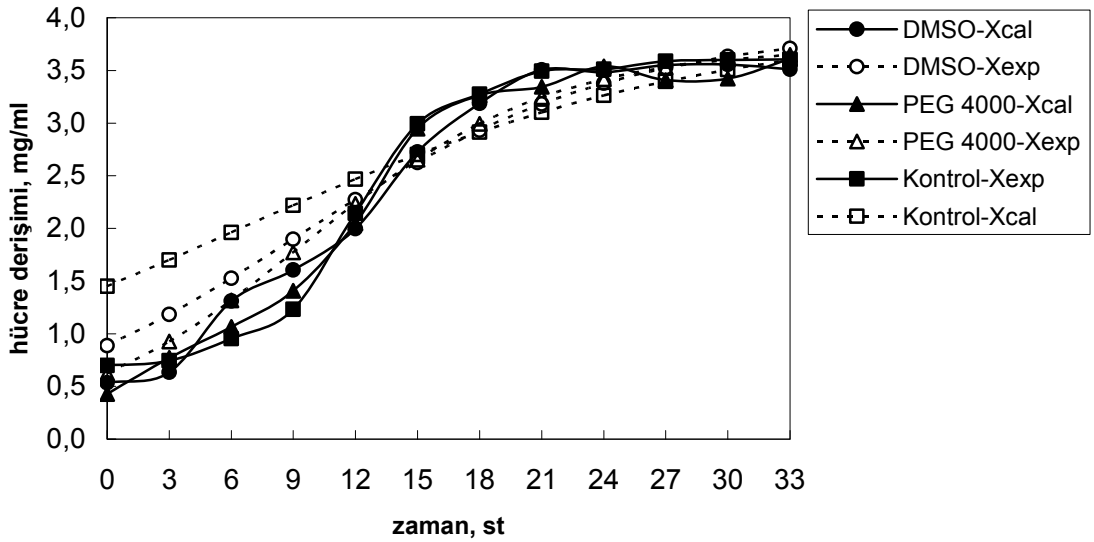
*Debaryomyces hansenii*'nin farklı katkı maddelerinin varlığında çoğalması ve hücre dışı protein derişimine etkisini incelemek için üretim ortamlarına ayrı ayrı 100 ppm dimetil sülfoksit (DMSO) ve polietilen glikol (PEG-4000) eklenmiştir. Besiyeri olarak çoğalma açısından optimum glukoz derişimi olarak bulunan %1 glukoz içeren UYM ortamı kullanılmış ve optimum büyüme sıcaklığı olan 20 °C'de üretim gerçekleştirilmiştir.

Katkı maddelerinin hücre çoğalmasına etkisi Şekil 4.10'de gösterilmiştir. Denemede kontrol olarak 20 °C'ta, %1 glukoz içeren, UYM ortamı çoğalma verileri kullanılmıştır. DMSO ve PEG-4000 içeren ortamlarda ve kontrolde hücre çoğalması hemen hemen aynı şekilde gerçekleşmiş, katkı maddelerinin belirgin bir etkisi olmamıştır. En yüksek hücre derişimine ve özgül çoğalma hızına PEG-4000 içeren ortamda 3,610 mg/ml ve 0,17 st<sup>-1</sup> ile ulaşılmıştır (Çizelge 4.4). Kullanılan çoğalma modeli ile deneysel verilerin uyumu ise Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Üretimin 24. ve 33. saatlerinde üretim ortamından alınan örneklerle hücre dışı protein miktarı Mikro Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Katkı maddelerinin varlığı genel olarak protein üretiminde hafif bir azalmaya sebep olmuştur. 33. st protein üretimleri ise 24. st protein üretimlerinden yüksektir. En yüksek protein üretimine kontrol üretim ortamında çoğalmanın 33. st'inde 28,64 µg/ml ile ulaşılmıştır. (Şekil 4.12).



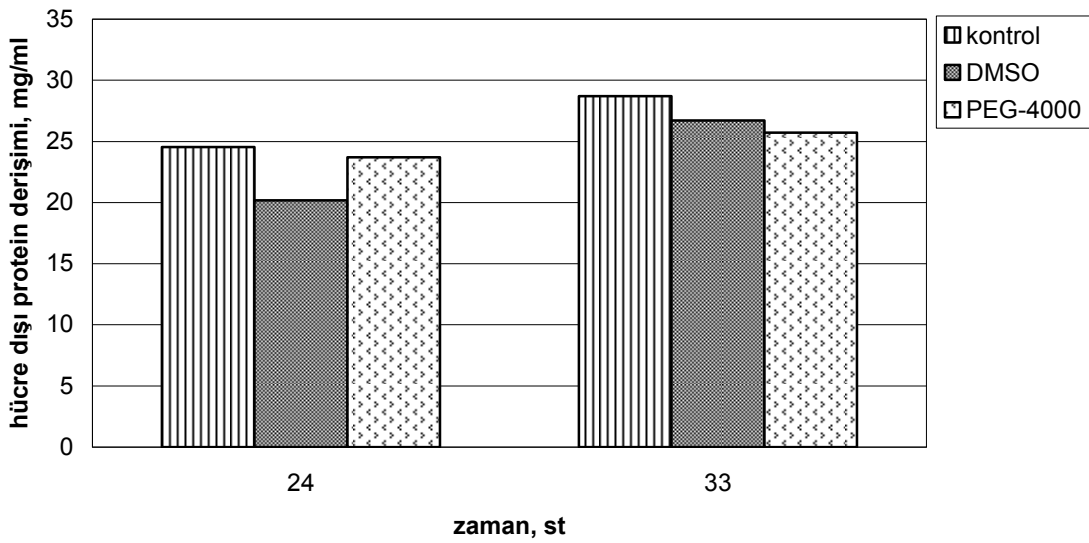
Şekil 4.10 Farklı katkı maddelerinin çoğalmaya etkisi (T=20 °C, N=150 rpm, UYM %1 glukoz)



Şekil 4.11 Farklı katkı maddelerinin varlığında çoğalan *D. hansenii* için deneysel verilerin lojistik çoğalma modeli ile uyumu (T=20 °C, N=150 rpm)

**Çizelge 4.4** Farklı katkı maddelerinin varlığında *Debaryomyces hansenii*'nin özgül çoğalma hız parametreleri (%1 Glukoz)

<i>Katkı maddesi</i>	<i>k (st<sup>-1</sup>)</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>C<sub>Xs</sub> (mg/ml)</i>
Kontrol	0.09	0,933	3,606
DMSO	0,13	0,974	3,510
PEG-4000	0,17	0,977	3,612



**Şekil 4.12** Farklı katkı maddelerinin varlığında *Debaryomyces hansenii*'nin hücre dışı protein üretimi (T=20 °C, N=150 rpm, %1 glukoz)

#### 4.6 Proteom Analizleri

*D. hansenii*'nin hücre dışı proteinleri 2D-PAGE yöntemi ile ayrılırken, birinci boyut ayırmada proteinlerin farklı izoelektrik noktalarından faydalanılmış ve bu amaçla immobilize pH gradyan (IPG) şeritleri kullanılmıştır. En iyi ayırmanın sağlandığı pH aralığına sahip şeritlerin seçimi için ön deneme olarak pH 3-10 aralığındaki şeritlerle çalışmalar yapılmış ve proteinlerin daha çok pH 4-6 aralığında yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, pH 4-7 aralığındaki şeritlerle denemelere devam edilmiş ve böylece



proteinlerin ayırım gücü artırılmıştır. *D. hansenii*'nin aynı ortamdan izole edilen hücre dışı proteinlerine ait pH 3-10 ve pH 4-7 şeritler kullanılarak elde edilmiş jellerin karşılaştırmalı görüntüleri Ek 9'da gösterilmiştir.

Ayrıca, *Debaryomyces hansenii* mayasının hücre dışı protein dağılımları karşılaştırılmadan önce UYM ortamının 2D-PAGE analizi yapılmış ve mayanın ortamdaki proteinleri kullanarak yeni proteinler ürettiği bu şekilde tespit edilmiştir. UYM ortamına ait 2D-PAGE görüntüsü Ek 10'da verilmiştir.

#### **4.6.1 Glukoz Derişiminin *D.hansenii*'nin Hücre Dışı Proteomlarına Etkisi**

%1, 5, 10, 20 ve 30 glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii* hücrelerinin, çoğalmalarının 24. ve 33. saatlerinde hücre dışına salgıladıkları proteinler 2D-PAGE analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır. Şekil 4.13 ve Şekil 4.17'de, sırasıyla t=24.st ve t=33. st örneklerinin 2D-PAGE jellerinin görüntüleri, eşleştirme setleri içindeki görüntüleriyle yer almaktadır. Tüm görüntülerde proteinler pH 4-6 aralığında yoğunlaşmaktadır. 24. saat jellerinin pH 5-6 aralığının yakınlaştırılmış görüntüsü Şekil 4.14'te, 33. saat jellerinin aynı pH aralığındaki yakınlaştırılmış görüntüsü ise Şekil 4.18'de gösterilmiştir. PD-Quest programı ile yapılan analizlerde, her iki saat örnekleri için de, %1 glukoz derişiminde çoğalan hücrelerin protein dağılımını gösteren jel referans jel (master jel) seçilip, diğer glukoz derişimlerinde çoğalan hücrelerin proteinleri, benzerlik ve farklılıklar açısından bu jel ile karşılaştırılmıştır. 24. ve 33. saatin jellerindeki her bir proteine karşılık gelen spotlar sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.19'da işaretlenerek gösterilmiştir. Şekil 4.16 ve Şekil 4.20'de ise referans jeldeki proteinler ile eşleşen ve eşleşmeyenler proteinler işaretlenerek belirtilmektedir. Jellerin PD-Quest programı ile yapılan analizi sonucu elde edilen proteinlere ait karşılaştırmalı veriler ise Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Üretimin 24. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakılacak olursa; glukoz derişiminin artması ile %1 glukoz içeren ortama göre hücre dışına salgılanan protein sayısı önce artmış, %30 glukoz derişimine ulaşıldığında ise hafif bir

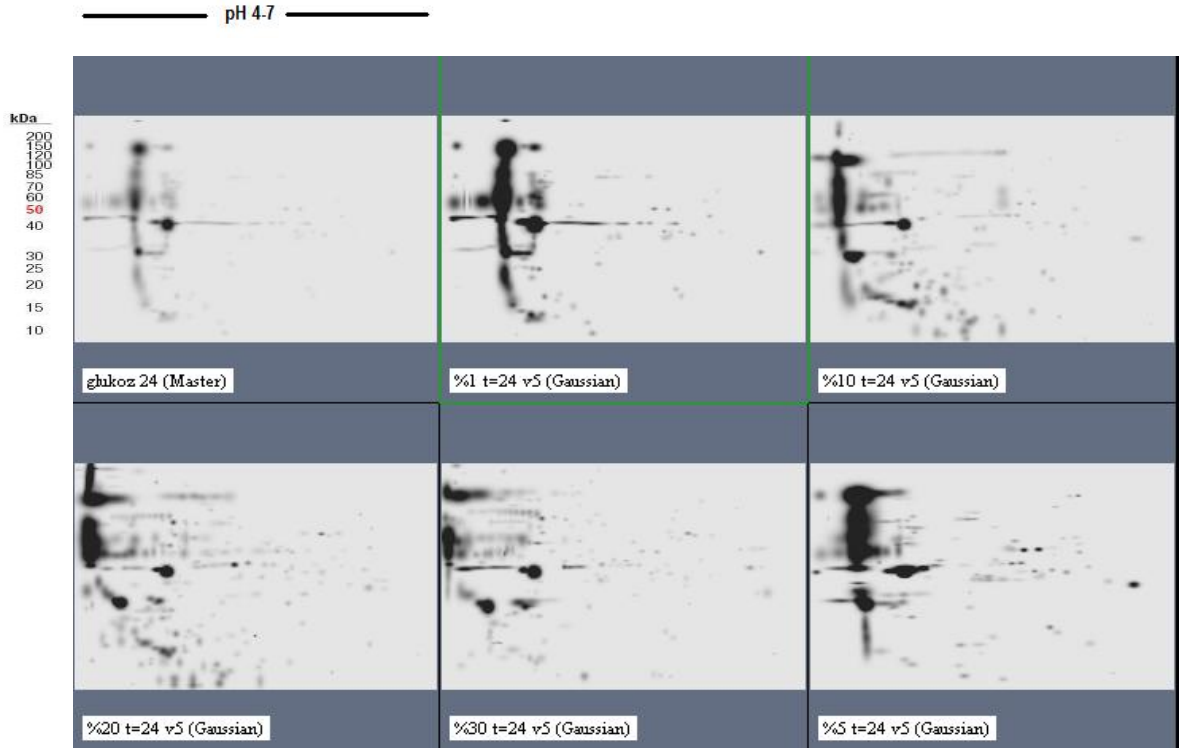
azalma olmuştur. Ancak tüm yüksek glukoz derişimlerinde toplam protein sayısı %1 glukoz jelinden daha fazladır (Çizelge 4.5). Bu, yüksek glukoz derişimlerinde hücrenin daha az çoğalmasına karşın, yaratılan stres nedeniyle hücrelerin daha fazla sayıda protein salgıladığını göstermektedir. En yüksek protein sayısı 228 ile, %1 glukoz içeren ortama göre %96 oranında artış gösteren, %20 glukoz içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 4.5). Diğer taraftan, glukoz derişiminin artması ile hücre dışı toplam protein derişiminin azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.4, Çizelge 4.5). Bu iki bulgu, her ortamda hücre dışına salgılanan proteinlerin sadece miktar olarak değil aynı zamanda tür olarak da farklı olduğunu göstermektedir. Nitekim, yüksek glukoz derişimli jellerde %1 glukoz jeli ile eşleşen ve eşleşmeyen protein spotlarının farklı sayıda olduğu görülmektedir. %1 Glukoz jeli ile en büyük farklılık, %20 glukoz jelinde elde edilmiştir (155 eşleşmeyen spot); bunu %30 glukoz jeli (114 eşleşmeyen spot) izlemektedir. Bu iki glukoz derişiminin, *D. hansenii* tarafından hücre dışına salgılanan proteinler açısından en büyük farklılığı yarattıkları için en önemli oldukları düşünülmektedir. Eşleşmeyen spotlar arasında, %1 glukoz jelinde olup da diğer jellerde olmayan proteinler açısından karşılaştırma yapıldığı zaman, %20 ve %30 glukoz jelinde bu sayının diğer jellere göre daha fazla olduğu görülmektedir (sırasıyla 43 ve 44). Elde edilen sonuçlar, glukoz derişiminin değişimi ile bazı proteinlerin miktarlarının en az iki kat arttığını veya azaldığını da göstermektedir. Bu anlamda glukoz derişiminin önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.5).

Üretimin 33. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakılacak olursa; %1 glukoz derişimine sahip ortama göre toplam spot sayısı, %5 glukoz derişiminde %26 azalma gösterirken, %20 glukoz derişiminde %29 artmıştır. Diğer glukoz derişimlerinde ise (%1, 5 ve 30) yaklaşık olarak aynı kalmıştır. Glukoz derişiminin artması ile hücre dışı toplam protein derişiminin azaldığı bulunmasına karşın (Şekil 4.6, Çizelge 4.6), en yüksek protein sayısı 103 ile %20 glukoz içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 4.6). Örnek jelde %1 glukoz içeren ortamla eşleşmeyen spot sayılarına yani sentezlenen farklı proteinlerin sayılarına bakılacak olursa, en büyük farklılık yine 53 spot ile %20 glukoz içeren ortamda görülmektedir. Toplam spot sayısı %1 glukoz derişimine sahip ortama göre en yüksek jel olduğundan, eşleşmeyen spot sayısının da en yüksek olması beklenen bir durumdur. Diğer tüm glukoz derişimlerinde %1 glukoz derişimine sahip ortamla eşleşmeyen spot sayıları yaklaşık birbirine yakın ve %20 glukoz derişimine sahip ortamın eşleşmeyen spot sayısından küçüktür. %1 glukoz jelinde (referans jelde) olup da

diğer jellerde olmayan proteinler açısından karşılaştırma yapıldığı zaman, %5 glukoz derişimine sahip ortamın 41 spotla en yüksek sayıya ulaştığı görölmektedir. Eşleşmenin en az olduğu (33 spot) bu jelde elde edilen bu sonuç yine beklenen bir durumdur (Çizelge 4.6).

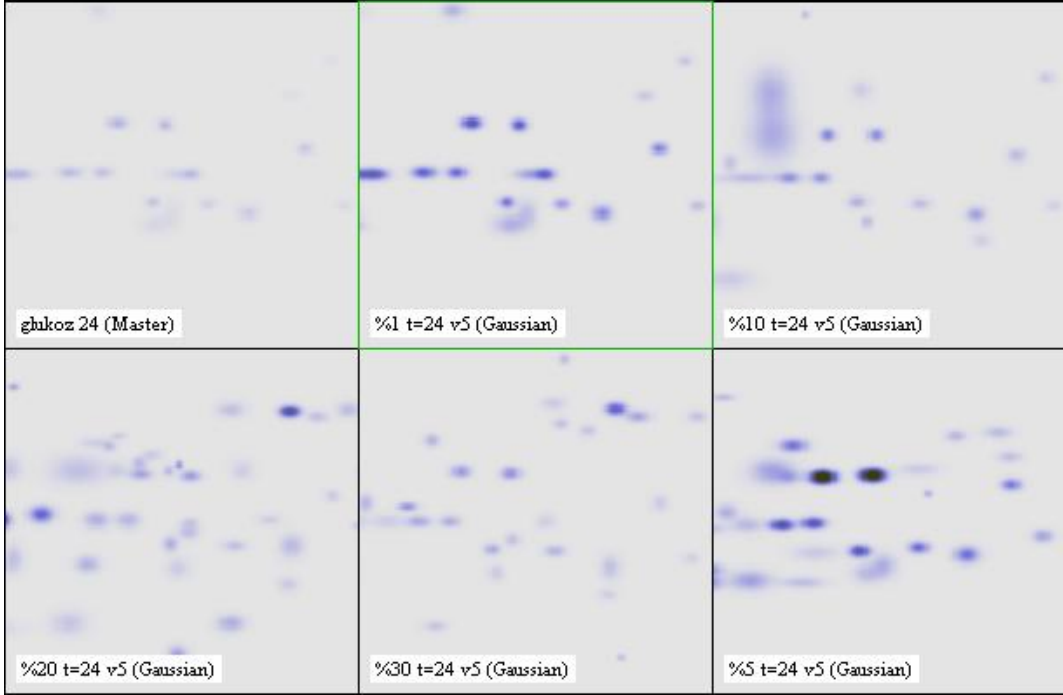
Çalışmada %10 ve %20 glukoz içeren ortamların üretim sonrası proteaz aktiviteleri üretimin 24. ve 33. st'inde ölçülmüş ve %10 glukoz içeren ortamda 24. st'de 44,443 U/ml , 33. st'de 52,391 U/ml proteaz aktivitesi, %20 glukoz içeren ortamda ise sırasıyla 43,307 U/ml ve 55,959 U/ml proteaz aktivitesi tespit edilmiştir. Yapılan bu analizle mayanın hücre dışı proteaz aktivitesi olduğu saptanmış ancak değişen glukoz derişiminin proteaz aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

24. saatin jel analiz sonuçları 33. saatin sonuçlarından bazı farklılıklar göstermiştir. Genel olarak 33. saatte toplam protein sayısında bir azalma söz konusu olmuştur. Bu duruma mayanın salgıladığı proteaz enzimlerinin ortamdaki proteinleri parçalaması sebep olabileceğı gibi, çalkalamalı hava banyosunda gerçekleşen inkübasyonun uzayan sürelerinde mekanik etkilerin proteinleri denature etmesi de olabileceğı düşünölmektedir. Artan ve azalan spotlar her iki saatte de gözlenmiş ancak 24. saatte glukoz derişiminin bu etkisi daha kuvvetli olmuştur. Ancak her iki saatte en yüksek spot sayısı %20 ile aynı glukoz derişiminde gözlenmiştir. Sonuç olarak; farklı glukoz derişimlerinde hücre dışı proteinlerin dağılımı değerlendirildiğı zaman, sayı, tür ve derişim açısından önemli farklılıklar olduğu görölmektedir.

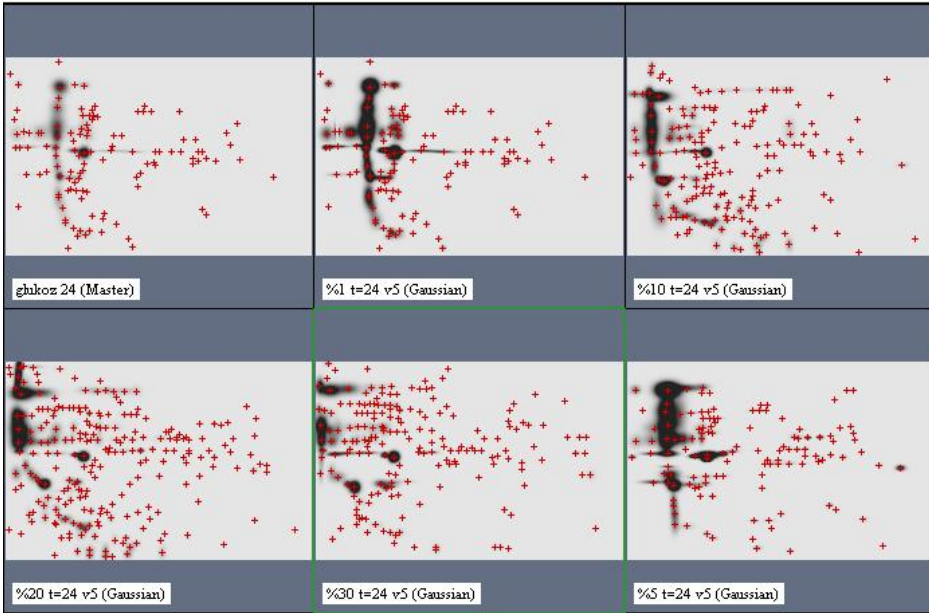


**Şekil 4.13** Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-I (t=24 st)

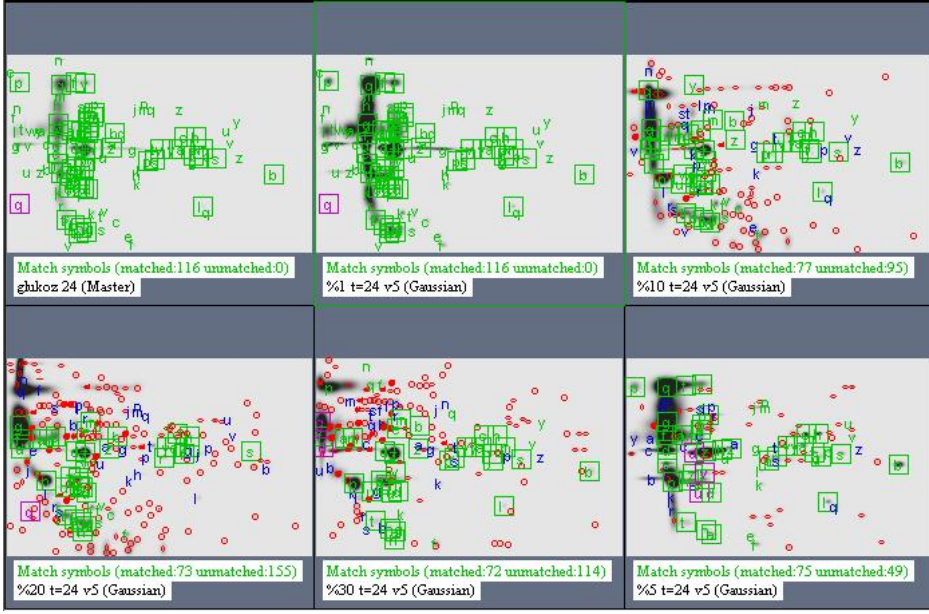
pH 5-6



Şekil 4.14 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii*'nin pH 5–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınılaştırılmış 2D-PAGE görüntüleri (a) (t=24 st)



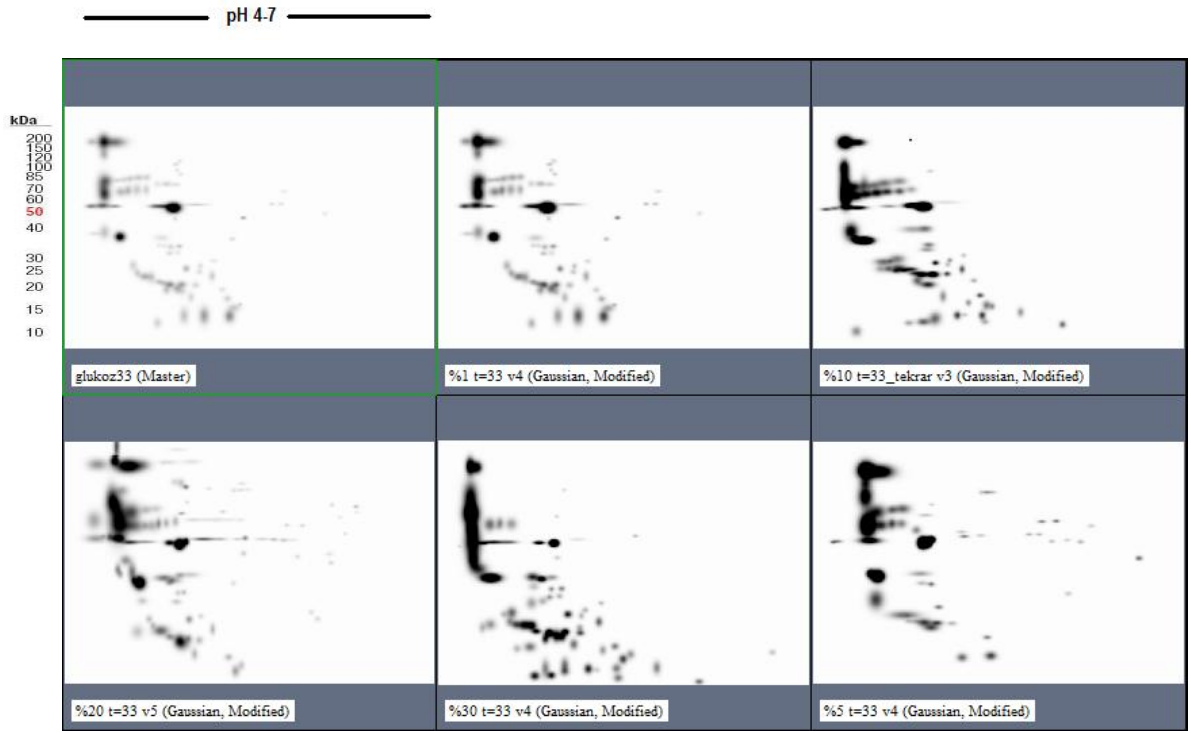
Şekil 4.15 Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-II (spot merkezleri kırmızı artı ile işaretlenmiştir, t=24 st)



**Şekil 4.16** Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-III (yeşil harfler master jeldekiler ile el ile eşleştirilen spotlar, mavi harfler otomatik olarak eşleşen spotlar, kırmızı yuvarlaklar eşleşmeyen spotlar, mor harfler yer belirleyici olarak seçilen spotlar, t=24 st)

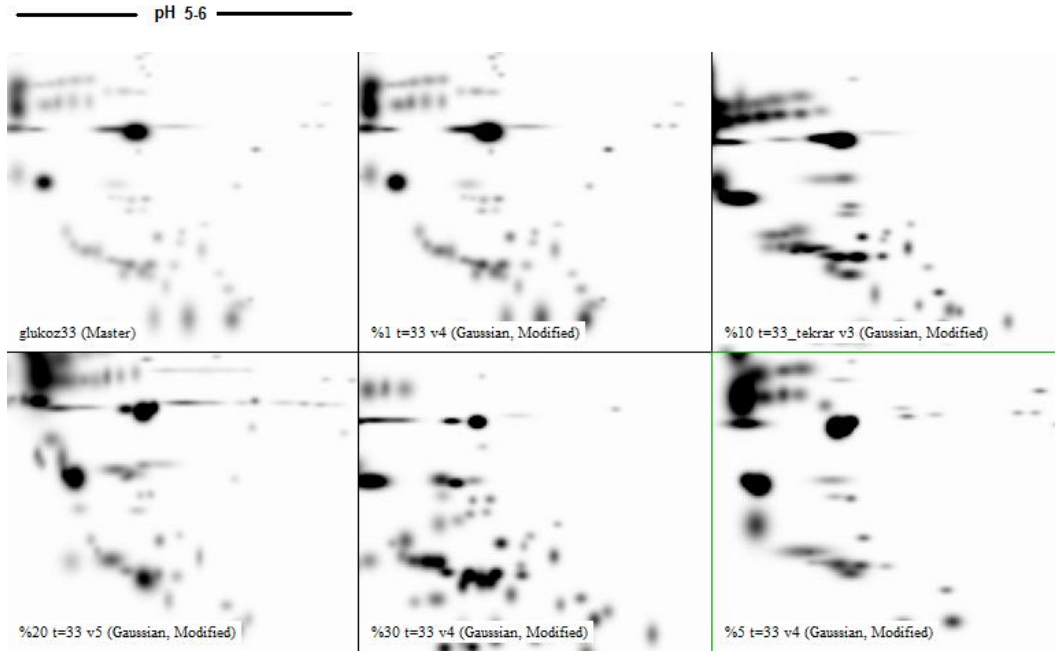
**Çizelge 4.5** 2D-PAGE jellerde glukoz etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-I (t=24 st)

<i>Örnek</i>	<i>Protein Derişimi (µg/ml)</i>	<i>KALİTATİF ANALİZ</i>			<i>KANTİTATİF ANALİZ</i>		
		<i>Toplam spot sayısı</i>	<i>Eşleşen spot sayısı</i>	<i>Eşleşmeyen sayısı Referans jelde</i>	<i>spot Örnek jelde</i>	<i>En az 2 kat artan spot sayısı</i>	<i>En az 2 kat azalan spot sayısı</i>
%1 glukoz, t=24 st	28,64	116	116	-	-	-	-
%5 glukoz, t=24 st	24,93	124	75	41	49	15	16
%10 glukoz, t=24 st	20,47	172	77	39	95	26	15
%20 glukoz, t=24 st	14,13	228	73	43	155	17	22
%30 glukoz, t=24 st	15,54	186	72	44	114	21	21

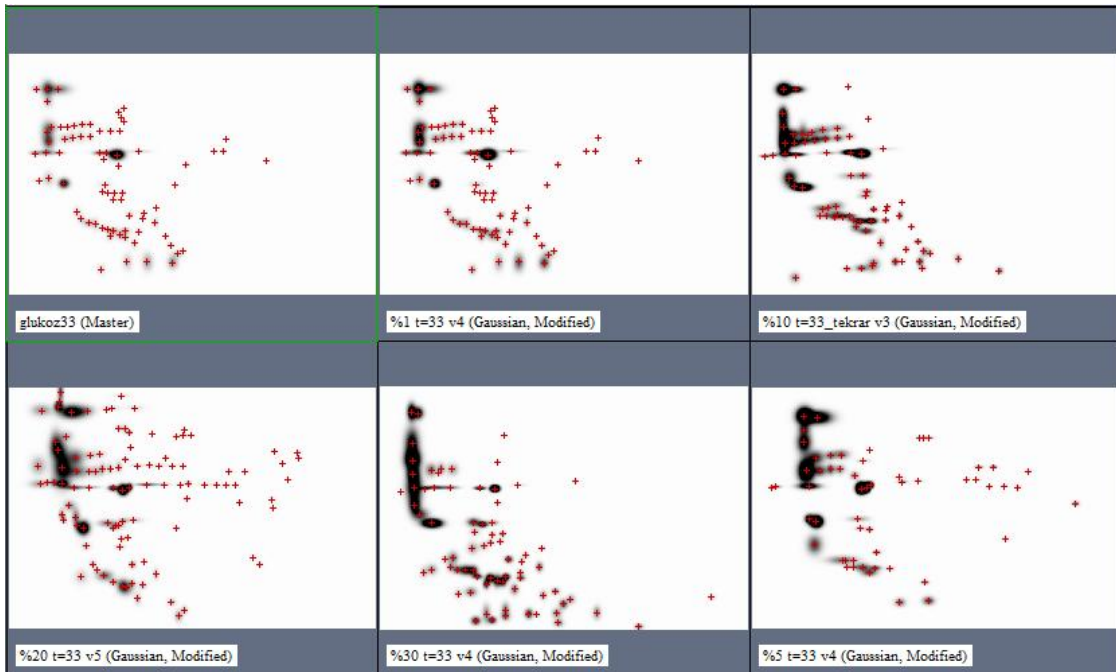


**Şekil 4.17** Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-IV (t=33 st)

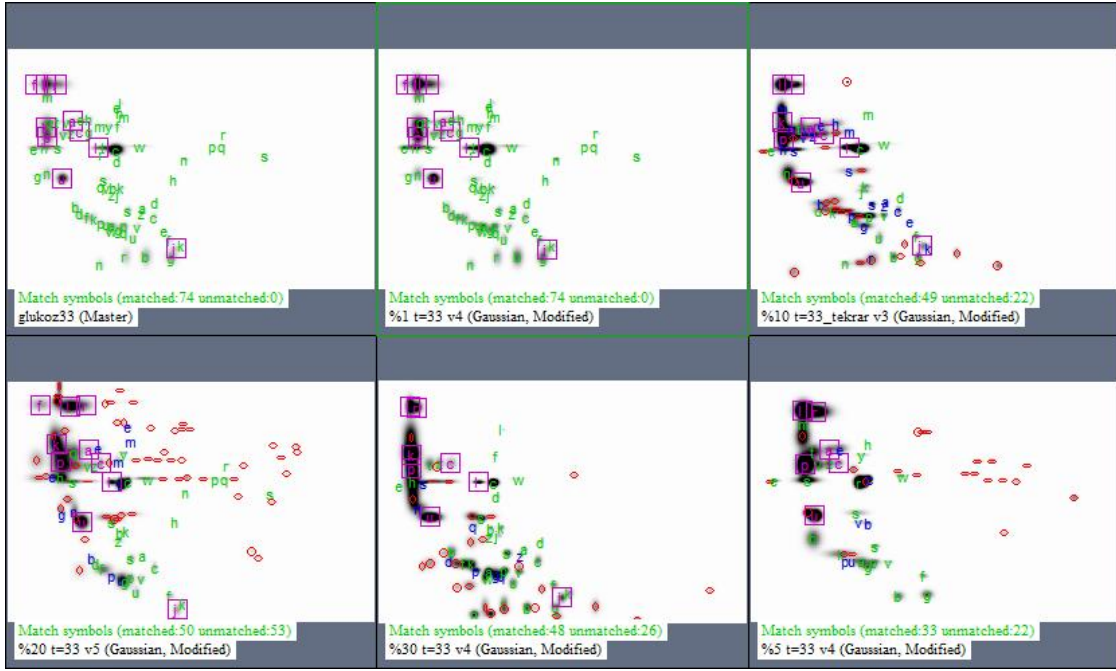




**Şekil 4.18** Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii*'nin pH 5–6 aralğındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırmış 2D-PAGE görüntüleri (b) (t=33 st)



**Şekil 4.19** Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-V (spot merkezleri kırmızı artı ile işaretlenmiştir, t=33 st)



**Şekil 4.20** Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-VI (yeşil harfler master jeldekiler ile el ile eşleştirilen spotlar, mavi harfler otomatik olarak eşleşen spotlar, kırmızı yuvarlaklar eşleşmeyen spotlar, mor harfler yer belirleyici olarak seçilen spotlar, t=33 st)

**Çizelge 4.6** 2D-PAGE jellerde glukoz etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-II (t=33 st)

Örnek	Protein Derişimi (µg/ml)	KALİTATİF ANALİZ				KANTİTATİF ANALİZ	
		Toplam spot sayısı	Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Referans Örnek jelde	En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı
%1 glukoz, t=33 st	27,98	74	74	-	-	-	-
%5 glukoz, t=33 st	24,23	55	33	41	22	10	6
%10 glukoz, t=33 st	22,58	71	49	25	22	5	10
%20 glukoz, t=33 st	15,54	103	50	24	53	5	7
%30 glukoz, t=33 st	9,86	74	48	26	26	5	7

#### 4.6.2 Sıcaklığın *D.hansenii*'nin Hücre Dışı Proteomlarına Etkisi

10, 20 ve 30 °C sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii* hücrelerinin, çoğalmalarının t=24. ve 33. saatlerinde hücre dışına salgıladıkları proteinler 2D-PAGE analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır. Şekil 4.21 ve Şekil 4.25'te sırasıyla t=24.st ve 33. st örneklerinin 2D-PAGE jellerinin görüntüleri eşleştirme setleri içindeki görüntüleriyle yer almaktadır. Bu görüntülere göre, proteinler pH 4-6 aralığında yoğunlaşmaktadır. 24. saat jellerinin pH 4-6 aralığının yakınlaştırılmış görüntüsü Şekil 4.22'de, 33. saat jellerinin aynı pH aralığında yakınlaştırılmış görüntüsü ise Şekil 4.26'da gösterilmiştir. PD-Quest programı ile yapılan analizde 30 °C sıcaklıkta çoğalan hücrelerin protein dağılımını gösteren jel, referans jel

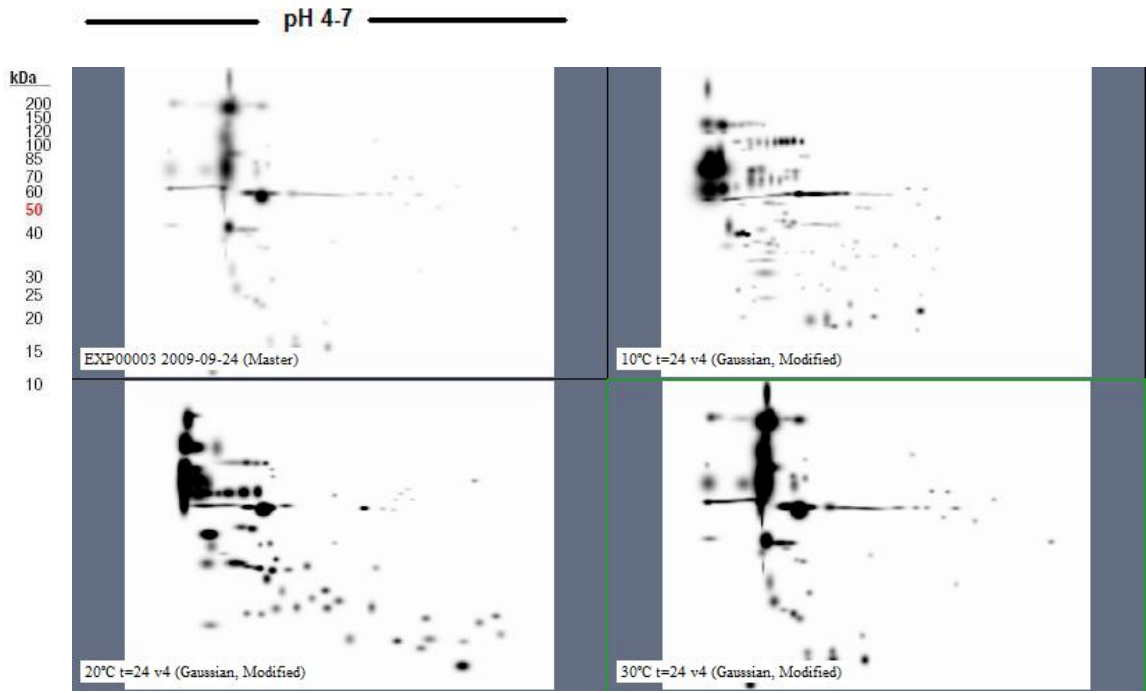
(master jel) seçilip, diğer sıcaklıklarda çoğalan hücrelerin proteinleri benzerlik ve farklılıklar açısından bu jel ile karşılaştırılmıştır. 24. ve 33. saatin jellerindeki her bir proteine karşılık gelen spotlar sırasıyla Şekil 4.23 ve Şekil 4.27'de işaretlenerek gösterilmiştir. Şekil 4.24 ve Şekil 4.28'de ise referans jeldeki proteinler ile eşleşen ve eşleşmeyen proteinler işaretlenerek belirtilmiştir. Jellerin PD-Quest programı ile yapılan analizi sonucu elde edilen proteinlere ait karşılaştırmalı veriler ise Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Üretimin 24. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakılacak olursa, üretim sıcaklığı azaldıkça toplam protein sayısının referans jele göre arttığı ve en yüksek protein sayısına %79'luk artış ile 10 °C'ta (131 spot) ulaşıldığı görülmektedir (Çizelge 4.7). Referans jelle eşleşmeyen spot sayısı yani sentezlenen farklı protein sayısı yine 10 °C üretiminde 83 spot ile en yüksek değere ulaşmıştır. Ancak 10 °C sıcaklıkta üretilen 22 protein en az 2 kat azalma göstermiştir. Bu durum stres koşuluna adaptasyon sağlamaya çalışan *D. hansenii*'nin farklı proteinler sentezlediğini, ancak pek çok protein miktarında azalma olduğunu gösterir. Bunun sebebi olarak 10 °C sıcaklıkta mayaların çoğalmaya daha geç başlaması gösterilebilir. Mayanın en iyi çoğalma gösterdiği sıcaklık 20 °C'ta ise, referans jele göre yine büyük farklılık gözlenmektedir (Çizelge 4.7).

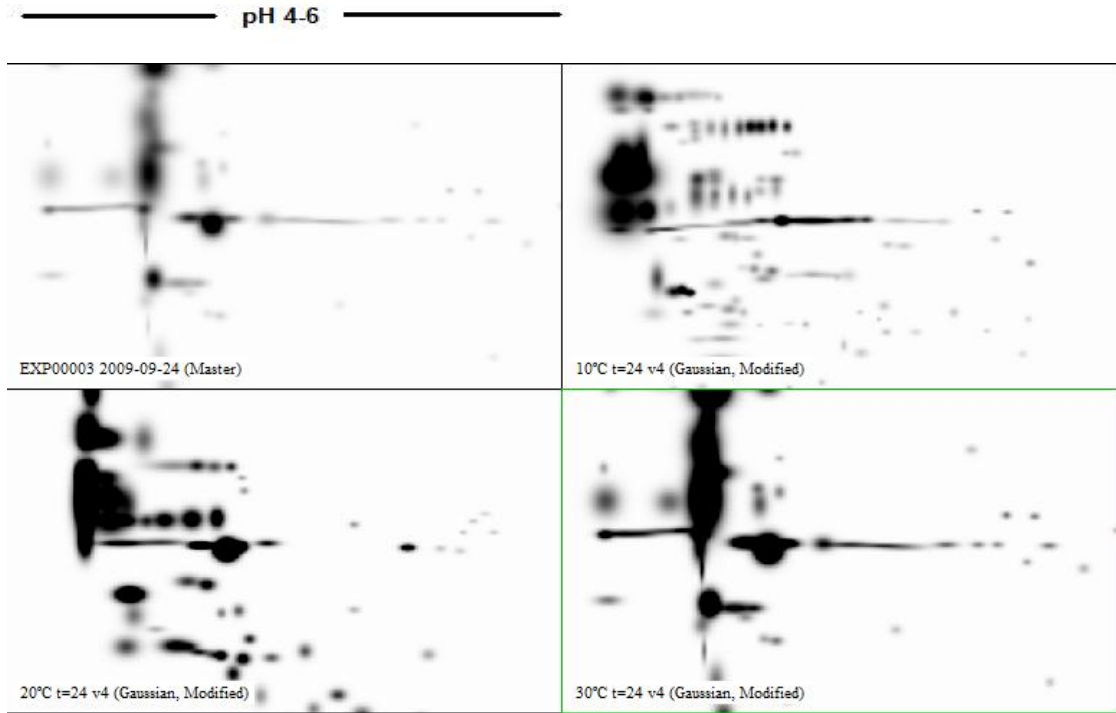
Üretimin 33. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakılacak olursa, toplam protein sayısının referans jele göre 20 °C'ta %22 artış ile 113 spota ulaştığı, 10 °C'ta ise %6 azalma ile 87 spota düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.8). 20 °C'ta elde edilen proteinler referans jel ile kıyaslanınca, bu 113 proteinin 59 tanesinin eşleştiği, geri kalan 54 tanesinin ise bu ortamda farklı olarak sentezlendiği görülmektedir. 10 °C'ta ise toplam 87 spotun 34 tanesi referans jel ile eşleşmekte, 53 tanesinin ise yine bu ortamda farklı olarak sentezlendiği görülmektedir. Her iki sıcaklıkta en az 2 kat artan spot sayısı, en az 2 kat azalan spot sayısında fazladır. Azalan spot sayıları her iki sıcaklıkta da aynıken, 20 °C'ta artan spotların (26 spot) sayısı, 10 °C'ye göre (14 spot) oldukça fazladır.

10 °C’de mayalar 24. st’den 33. st’ye hızlı bir çoğalma göstermiş ve her iki saatin jel görüntülerinde yakın sayıda protein sayılmıştır. Bu durum *D. hansenii*’nin çoğalma sırasında daha çok yapısal protein üretmesi ve hücre dışına fazla protein salgılamamasından kaynaklanıyor olabilir. 20 °C’de ise hücreler 24. st’den sonra durağan faza geçmiş ve 24. st’ten 33. st’e kadar hücre dışına salgıladıkları protein derişimi ve sayısı artmıştır. Sonuç olarak, 24.saatin jel analiz sonuçları 33. saatin sonuçlarından bazı farklılıklar göstermiş olsa da, hem 24. hem 33. saatte farklı sıcaklıkların hücre dışı protein dağılımı değerlendirildiği zaman, sayı, tür ve derişim açısından önemli farklılıklar olduğu görülmektedir.

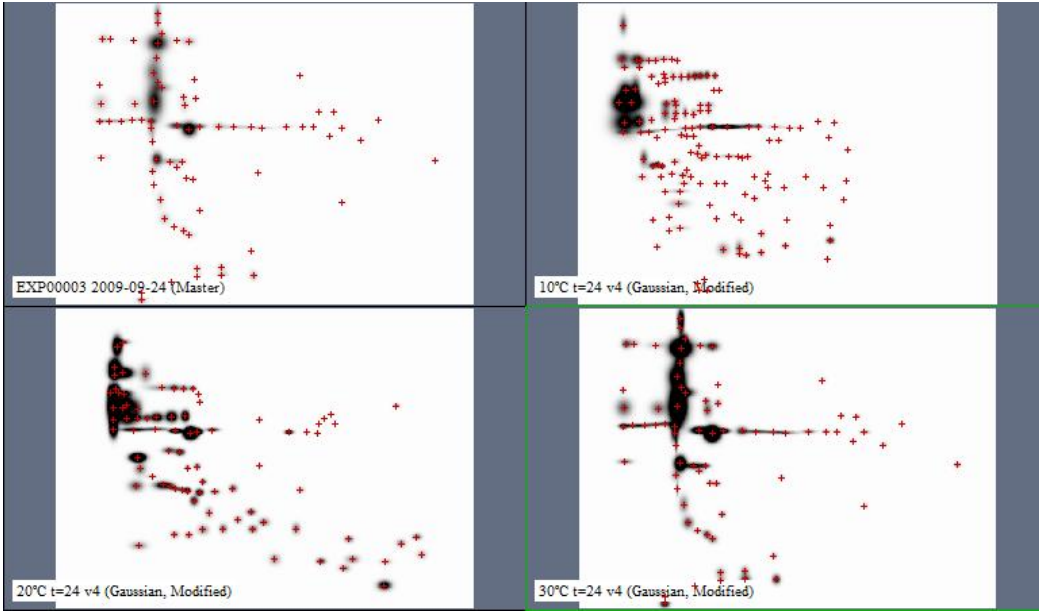
Yapılan denemelerde 40 °C’de de üretim gerçekleştirilmiş ancak çoğalma gözlenmemiştir. Bu ortamdan izole edilen proteinlerin 2D-PAGE analizi yapıldığında az da olsa protein spotları gözlenmiştir. Hücre çoğalmasının gözlenmediği 40 °C sıcaklıkta elde edilen proteinlerin ise, başlıca bu sıcaklıktaki ortama aktarılmadan önce 30 °C’de çoğalan hücrelerin salgıladığı proteinler olduğu, ayrıca 40 °C’da hücrelerin kendilerini bu sıcaklığa adapte etmek için salgıladıkları veya lizizlerinden gelebilecek proteinler olduğu da düşünülmektedir. Hücre çoğalması olmadığından verimlilik açısından önem arz etmeyen 40 °C jelleri eşleştirme setlerinde analizlenmemiştir. 40 °C üretim ortamının 24. saat jel görüntüsü Şekil 4.29’da, 33. saat jel görüntüsü ise Şekil 4.30’da verilmiştir.



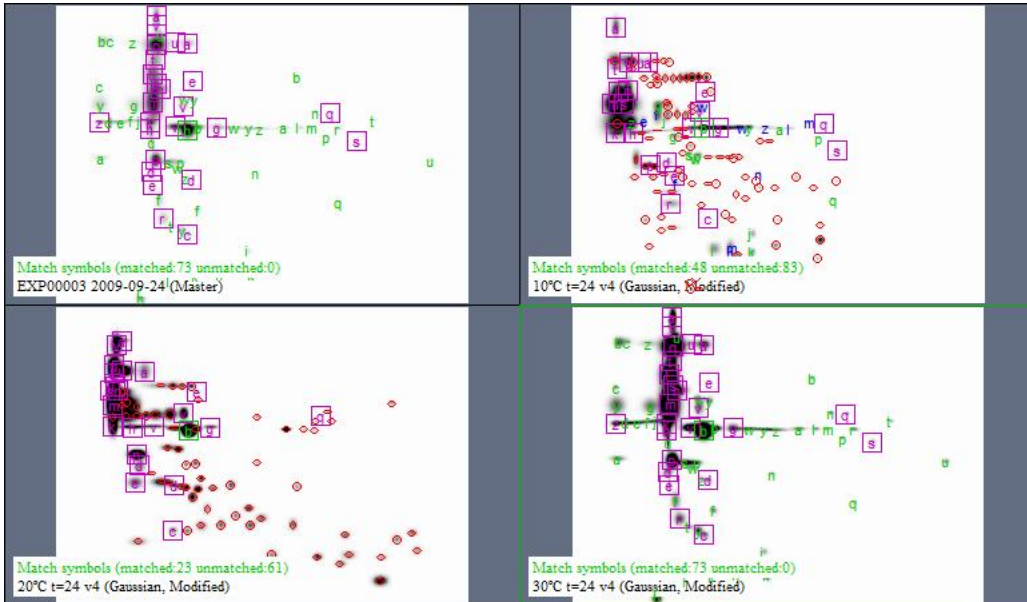
Şekil 4.21 Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-I (t=24 st)



Şekil 4.22 Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii*'nin pH 4-6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırılmış 2D-PAGE görüntüleri (a) (t=24st)



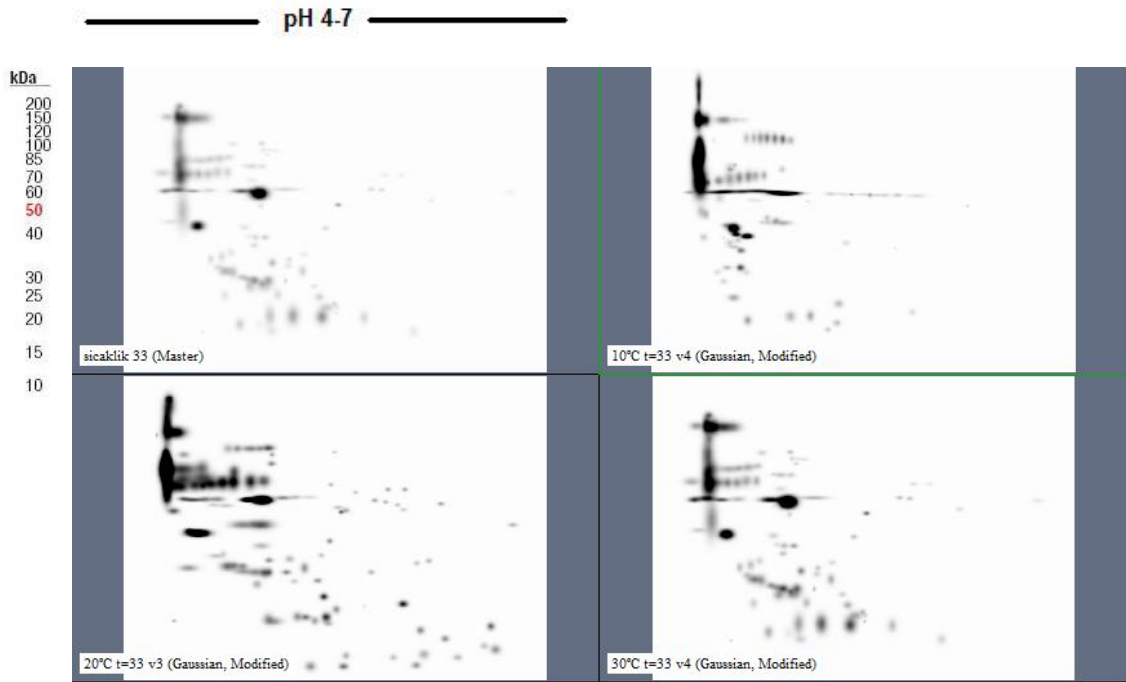
Şekil 4.23 Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-II (spot merkezleri kırmızı artı ile işaretlenmiştir, t=24 st)



Şekil 4.24 Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-III (yeşil harfler master jeldekiler ile el ile eşleştirilen spotlar, mavi harfler otomatik olarak eşleşen, kırmızı yuvarlaklar eşleşmeyen spotlar, mor harfler yer belirleyici olarak seçilen spotlar, t=24 st)

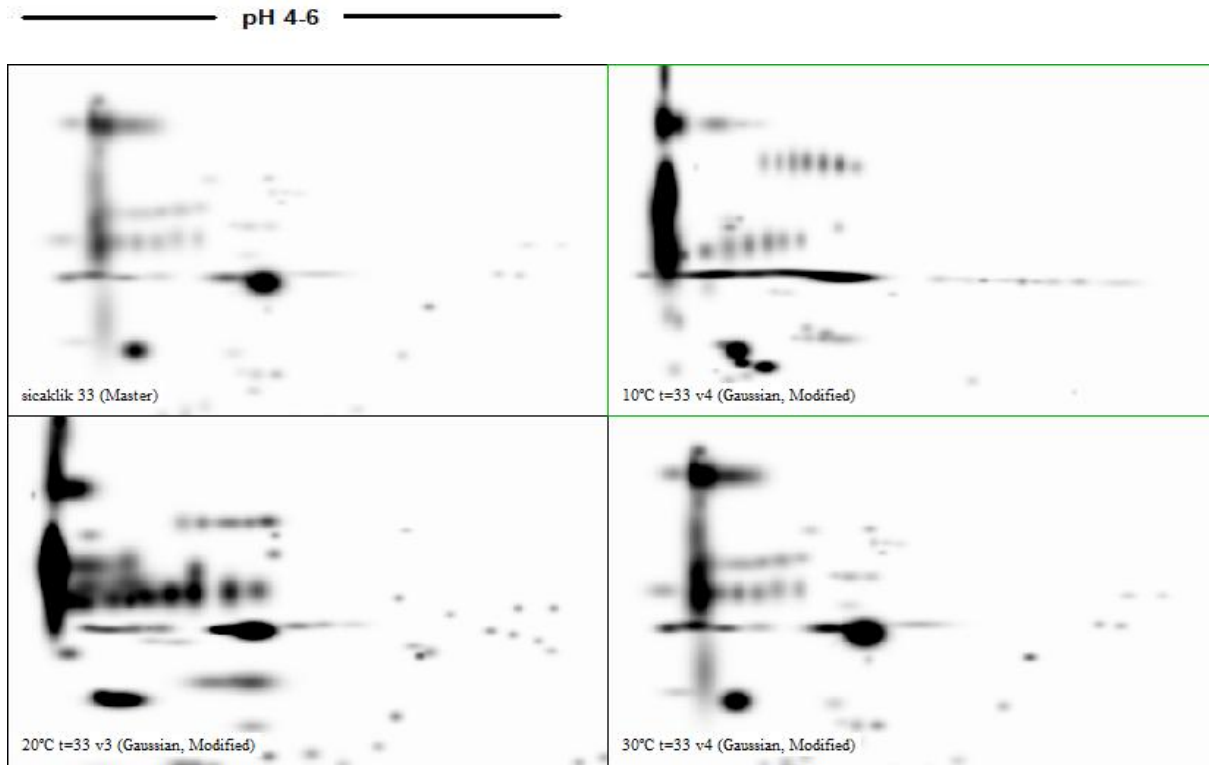
**Çizelge 4.7** 2D-PAGE jellerde sıcaklık etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-I (t=24 st)

Örnek	Protein Derişimi (µg/ml)	KALİTATİF ANALİZ				KANTİTATİF ANALİZ		
		Toplam spot sayısı	Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Referans jelde	Örnek jelde	En az 2 kat artan	En az 2 kat azalan
							spot sayısı	spot sayısı
30 °C, t=24 st	28,64	73	73	-	-	-	-	
20 °C, t=24 st	24,54	84	23	50	61	5	6	
10 °C, t=24 st	28,03	131	48	25	83	3	22	

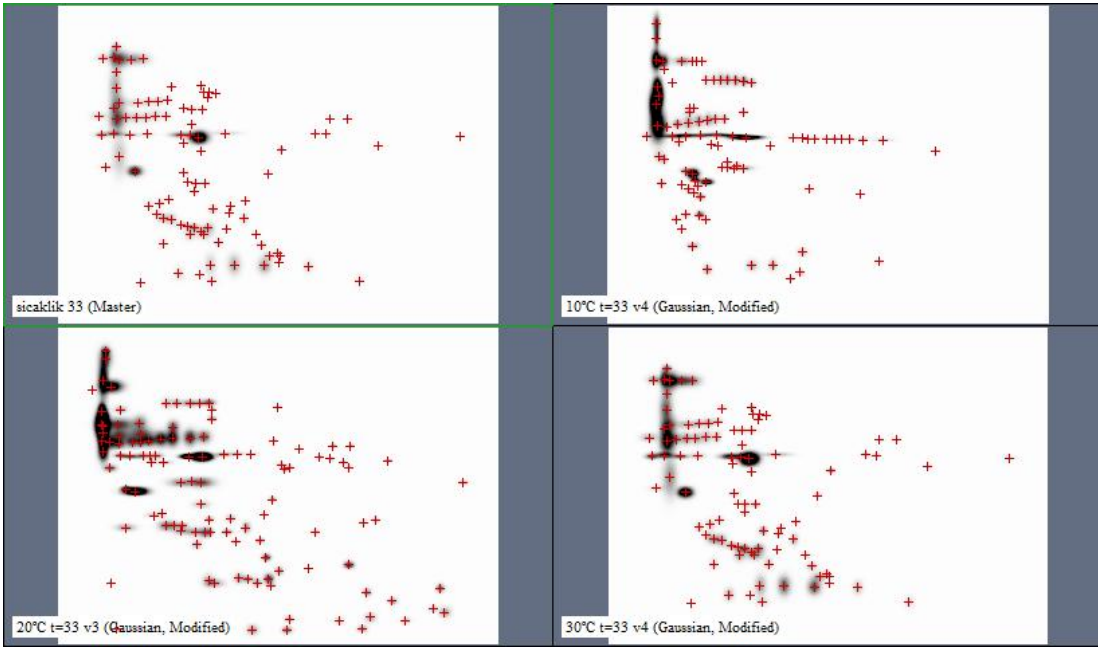


**Şekil 4.25** Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-IV (t=33 st)

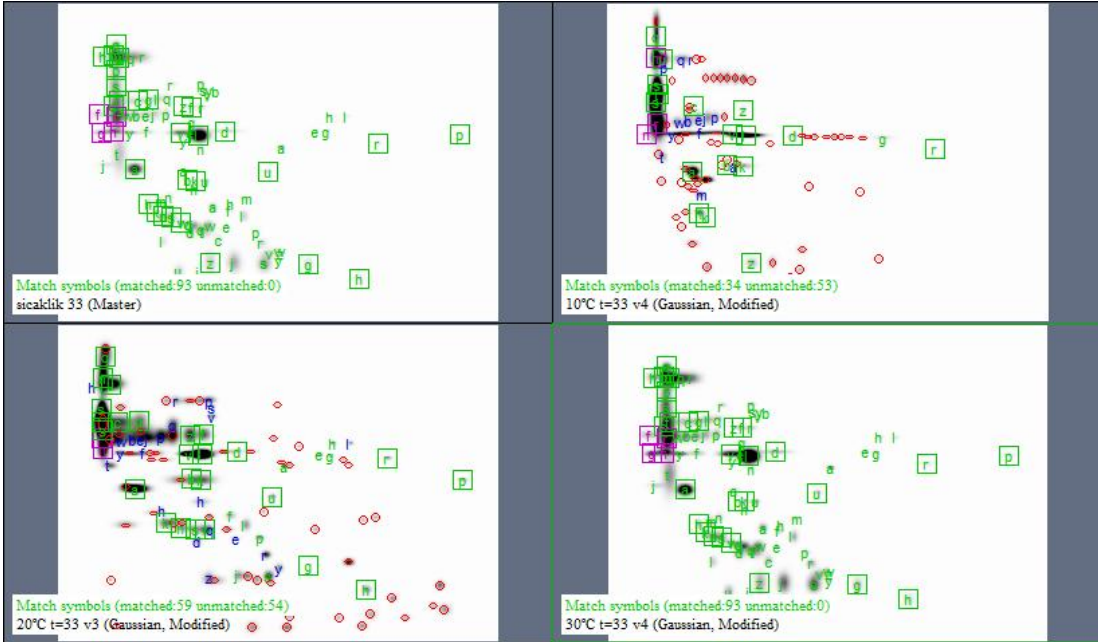




**Şekil 4.26** Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii*'nin pH 4–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yakınlaştırılmış 2D-PAGE görüntüleri (b) (t=33 st)



Şekil 4.27 Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-V (spot merkezleri kırmızı artı ile işaretlenmiştir, t=33 st)



Şekil 4.28 Farklı sıcaklıklarda çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-VI (yeşil harfler master jeldekiler ile el ile eşleştirilen spotlar, mavi harfler otomatik olarak eşleşen, kırmızı yuvarlaklar eşleşmeyen spotlar, mor harfler yer belirleyici olarak seçilen spotlar, t=33 st)

**Çizelge 4.8** 2D-PAGE jellerde sıcaklık etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-II (t=33 st)

<i>Örnek</i>	<i>Protein Derişimi (µg/ml)</i>	<i>KALİTATİF ANALİZ</i>				<i>KANTİTATİF ANALİZ</i>	
		<i>Toplam spot sayısı</i>	<i>Eşleşen spot sayısı</i>	<i>Eşleşmeyen spot sayısı</i>	<i>Referans Örnek jelde</i>	<i>En az 2 kat artan spot sayısı</i>	<i>En az 2 kat azalan spot sayısı</i>
30 °C, t=33 st	27,98	93	93	-	-	-	-
20 °C, t=33 st	28,69	113	59	34	54	26	9
10 °C, t=33 st	31,41	87	34	59	53	14	9



**Şekil 4.29** 40 °C'ta çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-I (t=24 st)



**Şekil 4.30** 40 °C'ta çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-II (t=33 st)

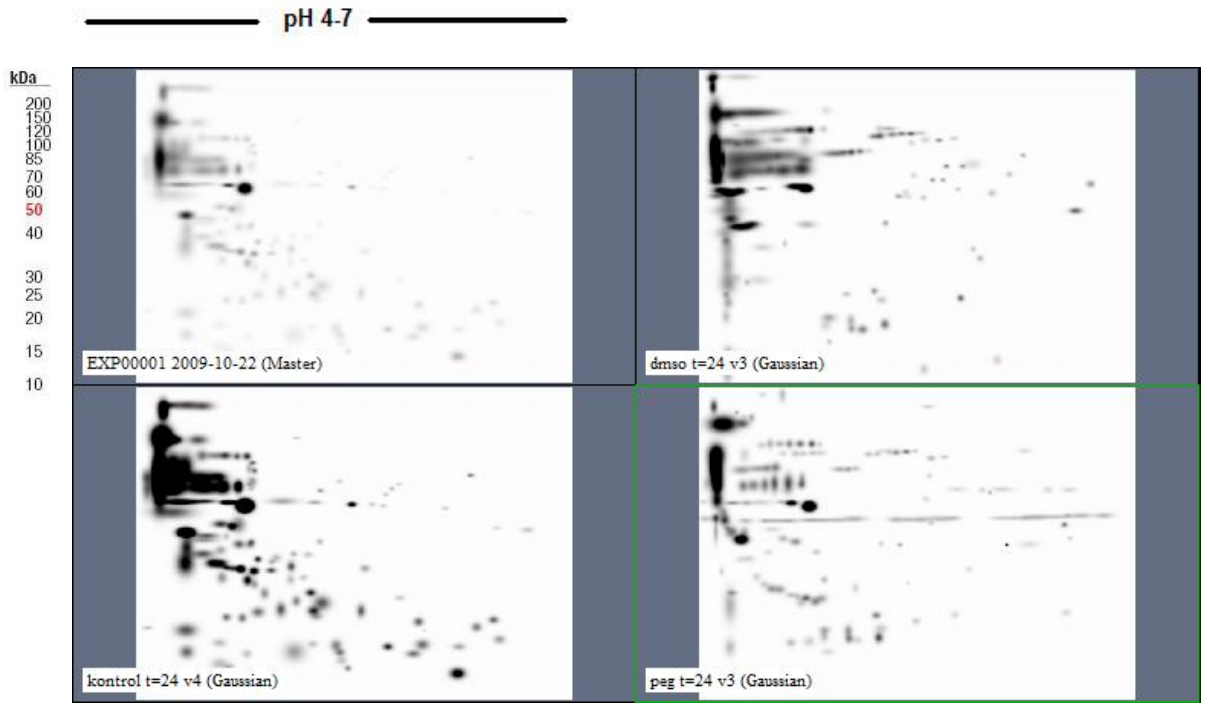
#### 4.6.3 Katkı Maddelerinin *D.hansenii*'nin Hücre Dışı Proteomlarına Etkisi

100 ppm derişimlerinde DMSO ve PEG-4000 varlığında çoğalan *D. hansenii* hücrelerinin, çoğalmalarının 24. ve 33. saatlerinde hücre dışına salgıladıkları proteinler 2D-PAGE analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır. Şekil 4.32 ve 4.35'te örneklerin sırasıyla 24. ve 33. saat 2D-PAGE jellerinin görüntüleri eşleştirme setleri içindeki görüntüleriyle yer almaktadır. Tüm görüntülerde proteinler pH 4-6 aralığında yoğunlaşmaktadır. 24. saat jellerinin pH 4-6 aralığının yakınlştırılmış görüntüsü Şekil 4.33'te, 33. saat jellerinin aynı pH aralığındaki yakınlştırılmış görüntüsü ise Şekil 4.36'da gösterilmiştir. PD-Quest programı ile yapılan analizlerde katkı maddesi içermeyen üretim ortamında çoğalan hücrelerin protein dağılımını gösteren jel, referans jel (master jel) seçilip, diğer ortamlarda çoğalan hücrelerin proteinleri, benzerlik ve farklılıklar açısından bu jel ile karşılaştırılmıştır. 24. ve 33. saatin jellerindeki her bir proteine karşılık gelen spotlar sırasıyla Şekil 4.34 ve Şekil 4.37'de işaretlenerek gösterilmiştir. Şekil 4.35 ve Şekil 4.38'de ise master jeldeki proteinler ile eşleşen ve eşleşmeyenler proteinler işaretlenerek belirtilmektedir. Jellerin PD-Quest ile yapılan analizi sonucu elde edilen proteinlere ait karşılaştırmalı veriler ise Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir.

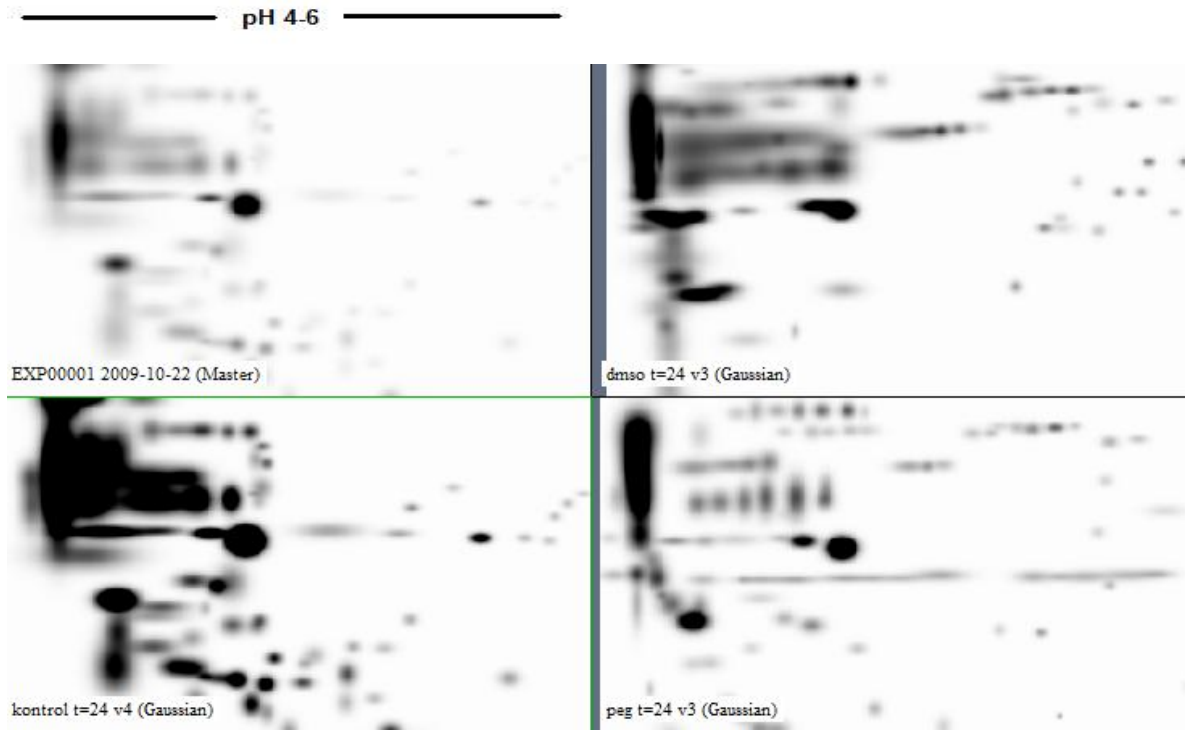
Üretimin 24. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakılacak olursa, toplam protein sayısının PEG-4000 içeren ortamda en yüksek (144 spot) olduğu, DMSO içeren ortamda ise toplam protein sayısının referans jele benzer olduğu (116 spot) saptanmıştır (Çizelge 4.9). Eşleşen spot sayıları karşılaştırılınca PEG-4000 içeren ortamda 54 spot, DMSO içeren ortamda ise 32 spot olduğu görülmektedir. Örnek jelde olup referans jelde olmayan spot sayıları büyük farklılık göstermezken, referans jelde olup örnek jelinde olmayan spot sayıları bakımından DMSO içeren ortam 88 spotla, PEG-4000 içeren ortamdan (66 spot) daha fazla spot içermektedir (Çizelge 4.9). Her iki örnekte en az iki kat artan ve azalan protein spotları saptanmıştır. DMSO içeren ortamda artan ve azalan protein sayıları birbirine yakınken, PEG-4000 içeren ortamda azalan proteinlerin sayısı artanların 8 katıdır.

Üretimin 33. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakılacak olursa, toplam spot sayısının en yüksek 99 spotla yine PEG-4000 içeren ortamda gözlenmekte olduğu; ancak genel anlamda tüm toplam protein spot sayılarının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Referans jelle eşleşen ve eşleşmeyen spot sayıları açısından da benzer durum saptanmıştır. DMSO içeren ortamda 50 farklı protein sentezlediği gözlenirken, PEG-4000 içeren ortamda 51 farklı spot sentezlendiği gözlenmiştir. Her iki örnekte en az iki kat artan ve azalan protein spotları saptanmıştır. DMSO içeren ortamda artan spot sayısı 8, azalan spot sayısı 11 iken, PEG-4000 içeren ortamda bu sayı sırasıyla 10 ve 11'dir. Sonuç olarak 33. saat örneklerine baktığımızda katkı maddelerinin protein profilinde değişiklik yarattığı; ancak DMSO ve PEG-4000'in bu anlamda birbirlerine bir üstünlüğü olmadığı saptanmıştır.

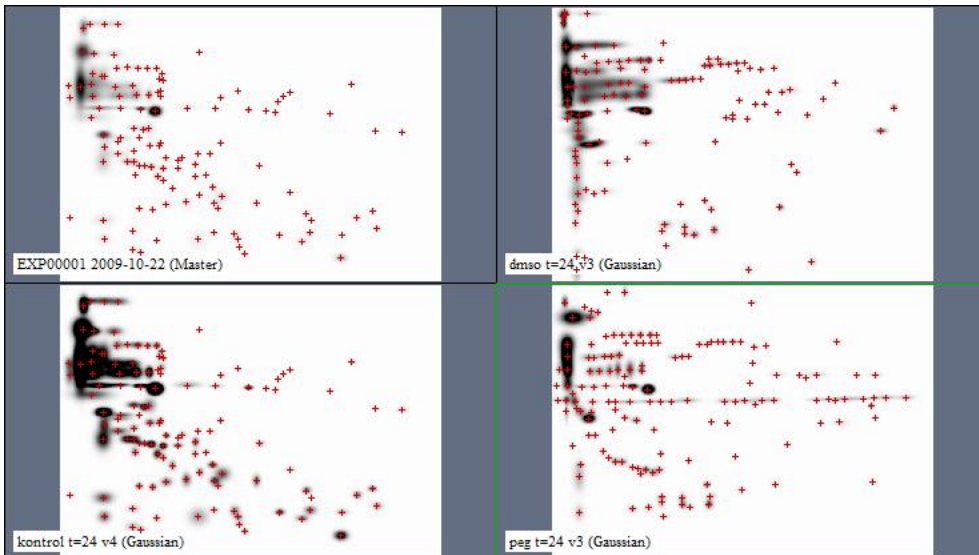
24 ile 33 saatlerin jel analizleri genel olarak birbirine yakın sonuç vermiş ancak 33. st'de eşleşmeyen spot sayılarında artış olmuştur. Ayrıca PEG-4000 içeren ortamda 24. st'de en az 2 kat azalan spot sayısı, 33. st'ye gelindiğinde 3 kat azalmıştır.



**Şekil 4.31** Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-I (t=24 st)

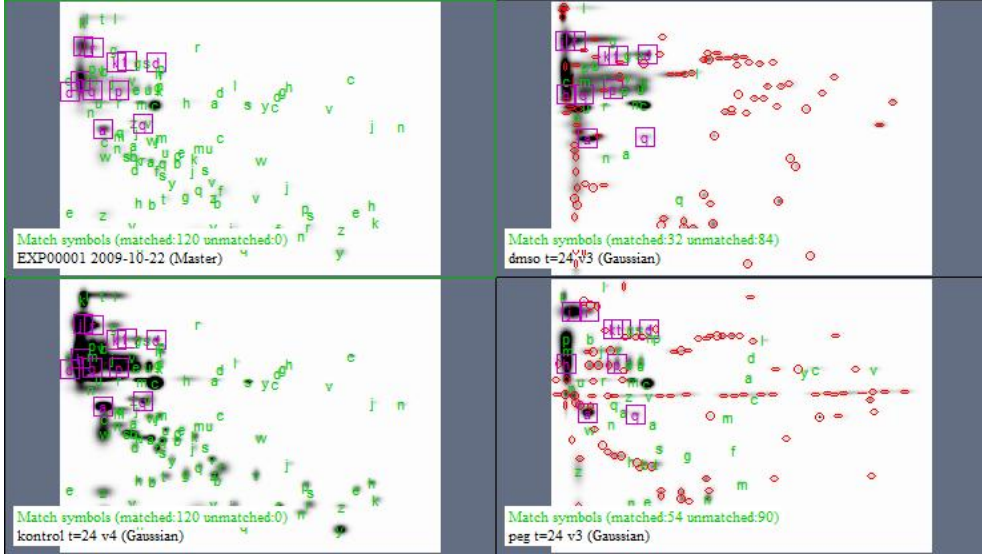


**Şekil 4.32** Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan *D. hansenii*'nin pH 4–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yaklaşıtırlmış 2D-PAGE görüntüleri (a) (t=24 st)



**Şekil 4.33** Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-II (spot merkezleri kırmızı artı ile işaretlenmiştir, t=24 st)

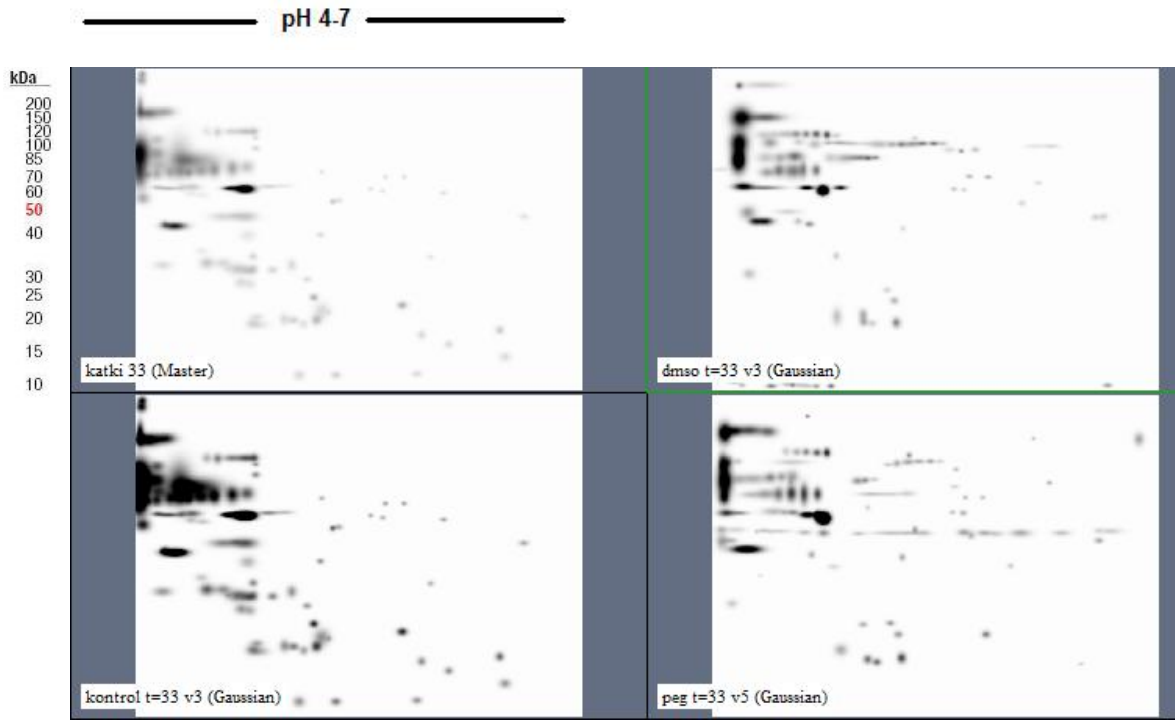




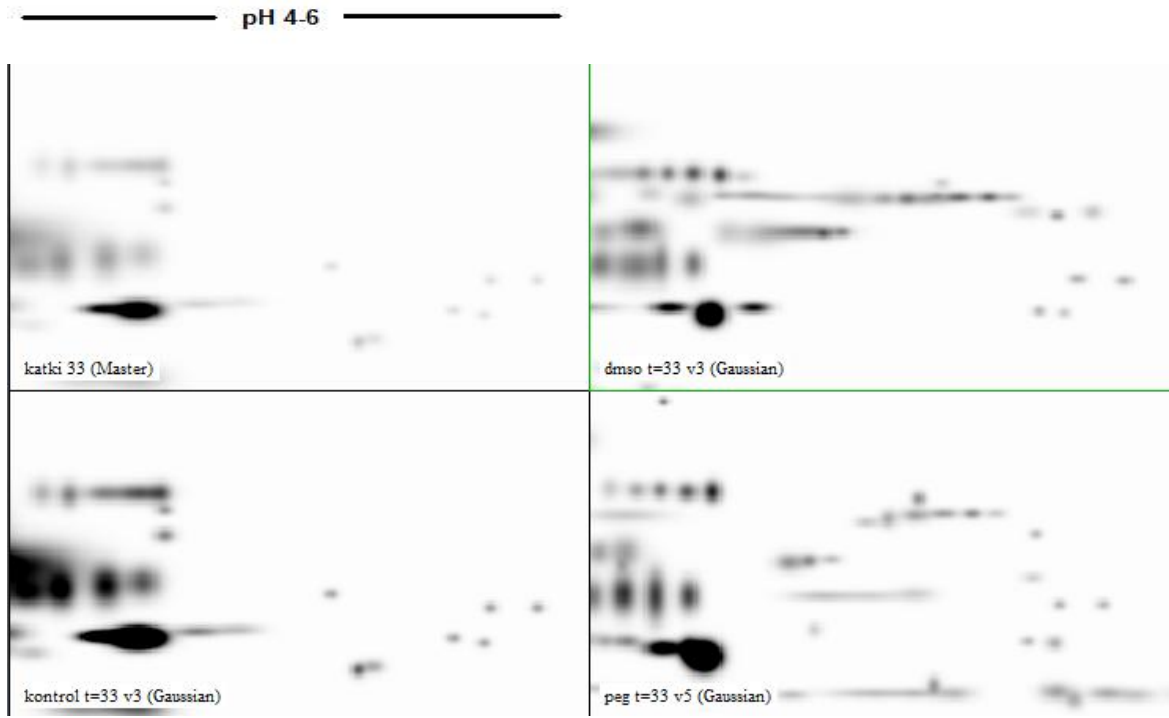
**Şekil 4.34** Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-III (yeşil harfler master jeldekiler ile el ile eşleştirilen spotlar, mavi harfler otomatik olarak eşleşen, kırmızı yuvarlaklar eşleşmeyen spotlar, mor harfler yer belirleyici olarak seçilen spotlar, t=24 st)

**Çizelge 4.9** 2D-PAGE jellerde katkı maddeleri etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-I (t=24 st)

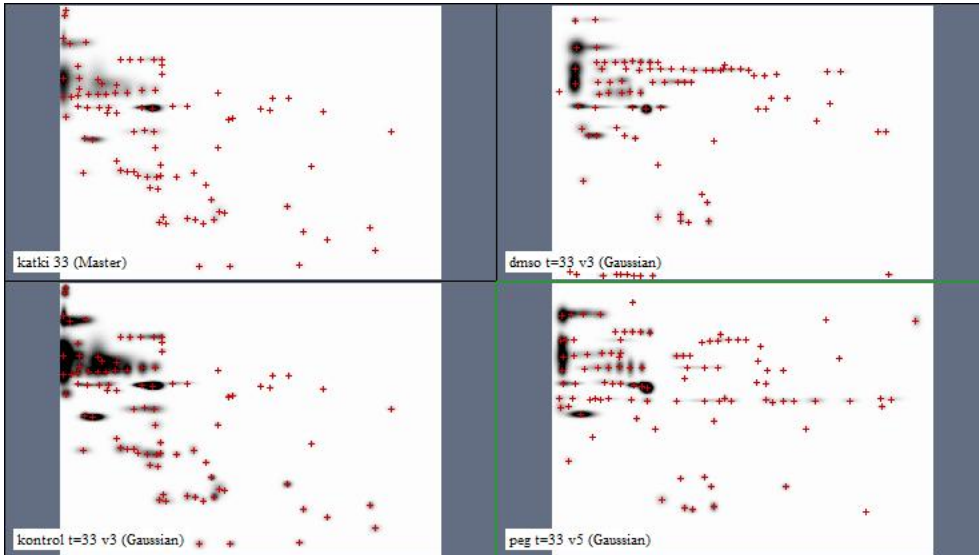
Örnek	Protein Derişimi ( $\mu\text{g/ml}$ )	KALİTATİF ANALİZ				KANTİTATİF ANALİZ	
		Toplam spot sayısı	Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Referans jelde	Örnek jelde	En az 2 kat artan spot sayısı
Kontrol	24,54	120	-	-	-	-	-
DMSO, t=24 st	20,19	116	32	88	84	8	10
PEG-4000, t=24 st	23,71	144	54	66	90	4	32



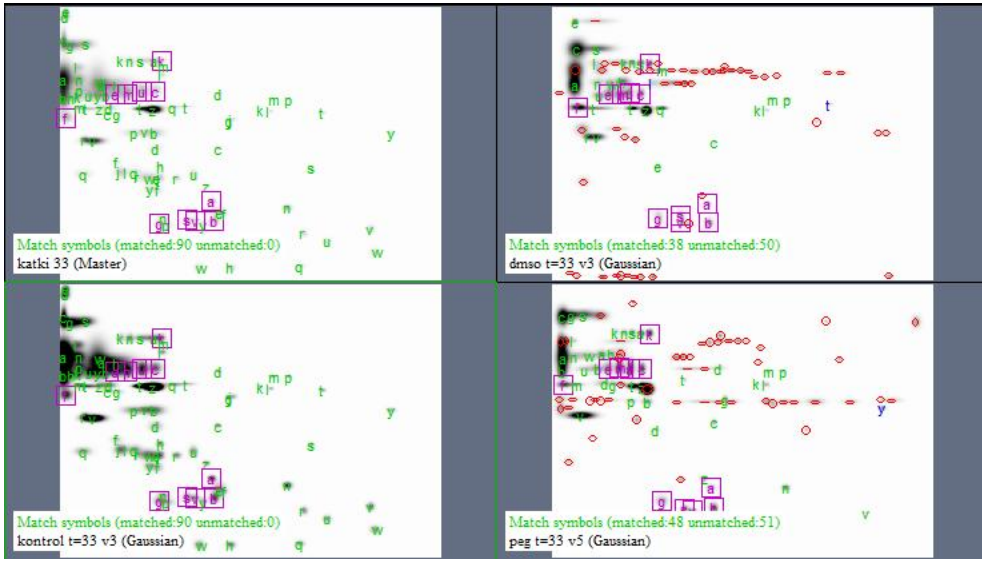
**Şekil 4.35** Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-IV (t=33 st)



**Şekil 4.36** Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan *D. hansenii*'nin pH 4–6 aralığındaki hücre dışı proteinlerinin yaklaşıtırlmış 2D-PAGE görüntüleri (b) (t=33 st)



**Şekil 4.37** Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-V (spot merkezleri kırmızı artı ile işaretlenmiştir, t=33 st)



**Şekil 4.38** Farklı katkı maddeleri varlığında çoğalan *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüleri-VI (yeşil harfler master jeldekiler ile el ile eşleştirilen spotlar, mavi harfler otomatik olarak eşleşen, kırmızı yuvarlaklar eşleşmeyen spotlar, mor harfler yer belirleyici olarak seçilen spotlar, t=24 st)

**Çizelge 4.10** 2D-PAGE jellerde katkı maddeleri etkisinin PD-Quest analiz sonuçları-II  
(t=33 st)

Örnek	Protein Derişimi (µg/ml)	KALİTATİF ANALİZ				KANTİTATİF ANALİZ	
		Toplam spot sayısı	Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Referans Örnek jelde	En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı
Kontrol	28,69	90	90	-	-	-	-
DMSO, t=33 st	26,71	88	38	52	50	8	7
PEG-4000, t=33 st	25,73	99	48	42	51	10	11

#### 4.7 Proteinlerin Tanımlanması

MALDI-tof ile her protein için 30-50 adet kütle spektrumu alınmış, en iyi spektrum seçilerek Mascot programı ile analizlenmiştir. Anlamlı sonuç veren proteinlere ait spektrum örnekleri EK 11'de verilmiştir. Arama motorunda SwisProt veri tabanı kullanıldığında anlamlı sonuç veren 7 protein, eşleşme oranları (coverage), pI'ları (izoelektrik noktaları) ve molekül ağırlıklarıyla beraber Çizelge 4.11'de gösterilmiş, proteinlerin hangi örneğin jeline bulunduğu ise Çizelge 4.12'de verilmiştir. Bu proteinlerin tümü glukoz deney setinin 33. st örneklerine aittir. Anlamlı sonuç veren proteinlerden 6 tanesinin jellerde bağıl bulunurlukları sayısal veriler halinde Ek 12'de verilmiştir. Bakır transport proteini 86 referans jelde bulunmadığı için bağıl bulunurluğu PD-Quest programı tarafından hesaplanamamaktadır.

**Çizelge 4.11** Mascot programında anlamlı sonuç veren proteinler, eşleşme oranları, molekül ağırlıkları ve izoelektrik noktaları

<i>Protein No #</i>	<i>Protein Adı</i>	<i>Eşleşme oranı (coverage)(%)</i>	<i>MA (Da)</i>		<i>pI</i>	
			<i>Deneysel</i>	<i>Teorik</i>	<i>Deneysel</i>	<i>Teorik</i>
1	Kromatin modifikasyon proteini EAF7 ( <i>Chromatin modification-related protein EAF7</i> )	20	45600	36441	5,10	4,47
2	RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörü ( <i>Mediator of RNA polymerase II transcription subunit</i> )	34	20000	16139	5,20	5,05
3	WD tekrarı içeren protein JIP5 ( <i>WD repeat-containing protein JIP5</i> )	9	55700	65164	4,40	4,9
4	Otofaj proteini 18 ( <i>Autophagy-related protein 18</i> )	23	50200	62868	4,30	5,62
5	Protein RAI1 ( <i>Protein RAI1</i> )	38	44500	44740	4,900	5,67
6	Bakır transport proteini 86 ( <i>Copper transport protein 86</i> )	15	44500	56774	4,50	4,85
7	Sinaptobrevin benzeri YKT6 ( <i>Synaptobrevin homolog YKT6</i> )	22	25600	23109	4,70	6,44

**Çizelge 4.12** Mascot programında anlamlı sonuç veren proteinlerin bulunduğu, glukoz t=33 setine ait jel örnekleri

<i>Protein No #</i>	<i>Protein Adı</i>	<i>Jel Örnekleri (t=33 st)</i>				
		%1	%5	%10	%20	%30
1	Kromatin modifikasyon proteini EAF7	+	+	+	+	+
2	RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörü	+	+	+	-	+
3	WD tekrarı içeren protein JIP5	+	+	+	+	-
4	Otofaj proteini 18	+	+	+	+	+
5	Protein RAI1	+	+	+	+	+
6	Bakır transport proteini 86	-	-	-	+	+
7	Sinaptobrevin benzeri YKT6	+	+	+	+	+

Protein #1: Kromatin modifikasyon proteini EAF7, NuA4 histon asetiltransferaz kompleksinin bir bileşenidir ve transkripsiyon aktivasyonunda görev alır. Bu kompleks ayrıca DNA tamirinde de görev alır (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BKL0>). Proteine ait Mascot analizlerinde kullanılan MALDI spektrumu Şekil 4.39'da verilmiştir. Proteinin jel üzerinde bulunduğu nokta Şekil 4.40'da verilirken, kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı ise Şekil 4.41'de verilmiştir.

Protein #2 RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörü, tüm RNA polimeraz II transkripsiyon genlerinin regülasyonunda görev alır (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BM45>). %20 glukoz örneği hariç tüm örnek jellerinde tespit edilen bu proteine ait Mascot analizlerinde kullanılan MALDI spektrumu Şekil 4.42'de verilmiştir. Jel üzerinde bulunduğu nokta Şekil 4.43'te verilirken, kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı ise Şekil 4.45'te verilmiştir.

Protein #3: WD tekrarı içeren protein JIP5, hücre çekirdeğinde bulunan ve yapısal olarak triptofan-aspartat aminoasitlerinin tekrarlarını içeren bir proteindir

(<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BWJ5>). %30 glukoz örneği hariç tüm örnek jellerinde tespit edilen bu proteine ait Mascot analizlerinde kullanılan MALDI spektrumu Şekil 4.45'te verilmiştir. Jel üzerinde bulunduğu nokta Şekil 4.46'da verilirken, kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı ise Şekil 4.47'de verilmiştir.

Protein #4: Otofaj proteini 18, hücrede vezikül formasyonunda, dejenere organellerin sindirilmesinde ve otofajda görev alır (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BIL4>). Tüm örnek jellerinde tespit edilen bu proteine ait Mascot analizlerinde kullanılan MALDI spektrumu Şekil 4.48'de verilmiştir. Proteinin jel üzerinde bulunduğu nokta Şekil 4.49'da verilirken, kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı ise Şekil 4.50'de verilmiştir.

Protein #5: Protein RAI1'in ise mRNA ve rRNA prekürsör prosesinde yer aldığı tahmin edilmektedir (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BLU6>). Bu proteine ait Mascot analizlerinde kullanılan MALDI spektrumu Şekil 4.51'de verilmiştir. Jel üzerinde bulunduğu nokta Şekil 4.52'de verilirken, kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı ise Şekil 4.53'te verilmiştir.

Protein #6: Bakır transport proteini 86, *D. hansenii*'de treonin sentezinde görev alır. Mikroorganizmaların çoğu aspartik asitten yola çıkarak treonin sentezleyebilme yeteneğine sahiptir; ancak insan vücudu tarafından sentezlenemediği için dışarıdan beslenme yoluyla alınması gerekmektedir (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BKV2>). Denemelerde, yüksek glukoz derişimine ait ortamlarda (%20 ve %30 glukoz) varlığı tespit edilen bakır transport proteini 86'ya ait Mascot analizlerinde kullanılan MALDI spektrumu Şekil 4.54'de gösterilmiştir. Proteinin jel üzerinde bulunduğu nokta ise eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde Şekil 4.55'te gösterilmiştir.

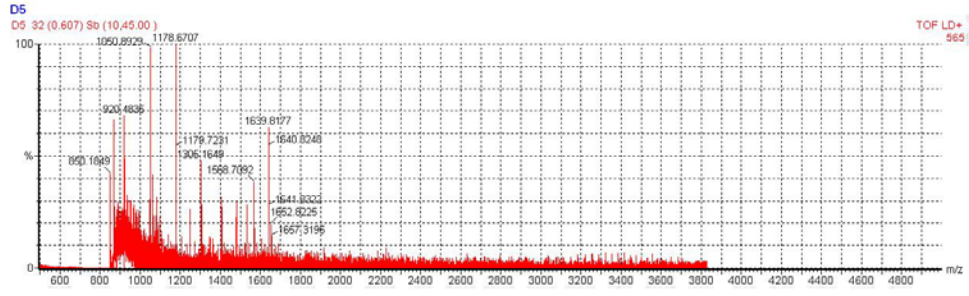
Protein #7: Sinaptobrevin benzeri YKT6, salgı veziküllerinde membran proteindir ve hücre içi iletişimde ya da hücre dışına yapılan salgılarda görev alır (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BSL0>). Tüm örnek jellerinde tespit edilen bu proteine ait Mascot analizlerinde kullanılan MALDI spektrumu Şekil 4.56'da verilmiştir. Jel



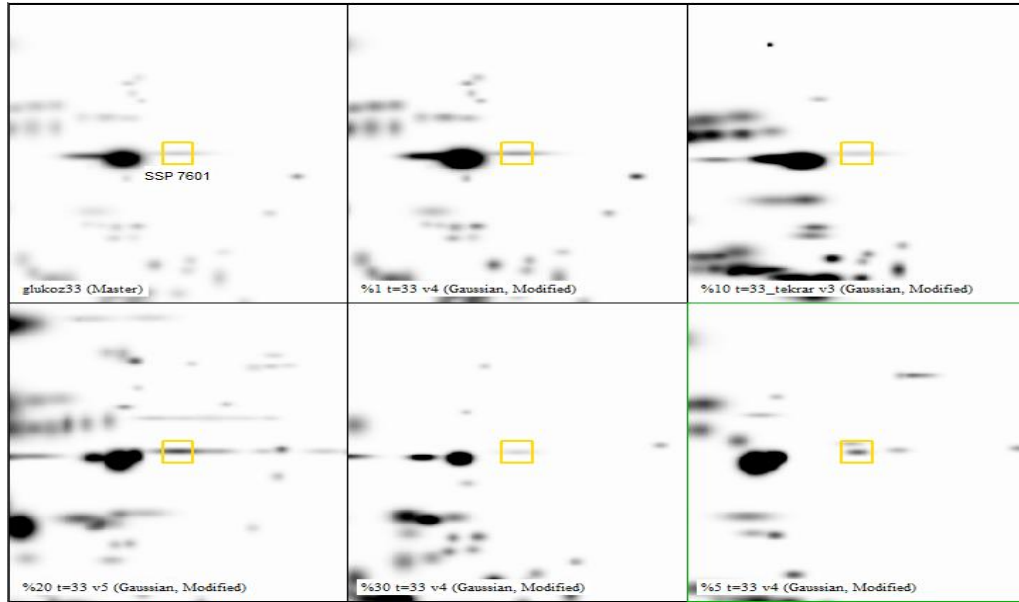
üzerinde bulunduğu nokta Şekil 4.57'de verilirken, kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı ise Şekil 4.58'de verilmiştir.

*D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerinin incelendiği bu çalışmada bazı hücre içi proteinlerin tespit edilmiş olması, hücre lizizinden kaynaklanıyor olabileceği gibi, o proteinlerin görevlerinin henüz tam bilinmiyor olmasından da kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca veri tabanlarında *D. hansenii*'nin yeterli sayıda tanımlanmış proteinin bulunmayışı da sınırlandırıcı faktörler arasındadır. Deneysel ve teorik molekül ağırlıklarında ya da pI'larda görülen küçük farklanmalar ise post-translasyonel modifikasyonlardan kaynaklanmaktadır.

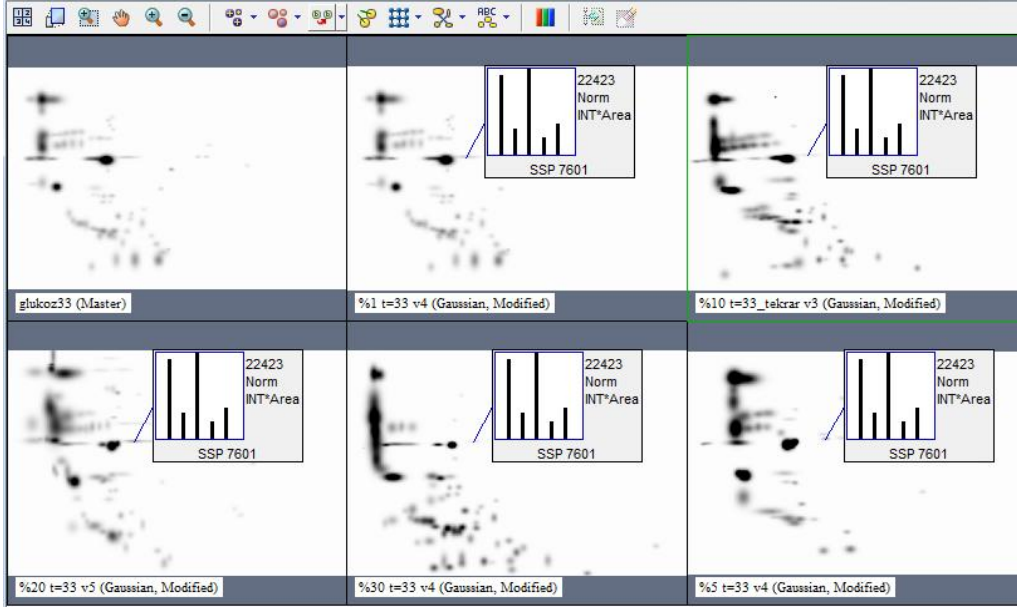
## Kromatin modifikasyon proteini EAF7



Şekil 4.39 Kromatin modifikasyon proteini EAF7'ye ait MALDI spektrumu

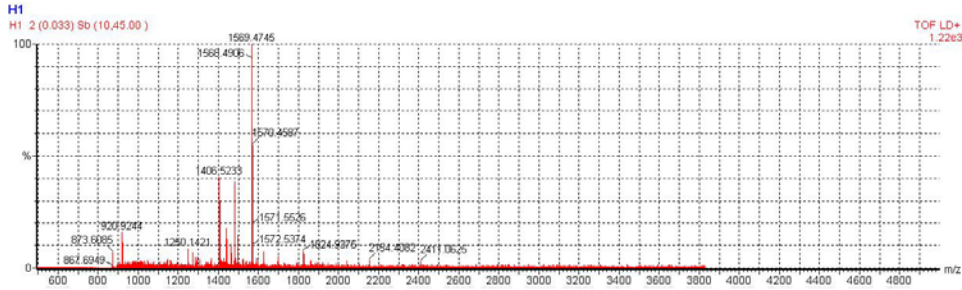


Şekil 4.40 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlştırılmış görüntüsü üzerinde kromatin modifikasyon proteini EAF7'nin bulunduğu nokta



Şekil 4.41 Kromatin modifikasyon proteini EAF7'nin kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı

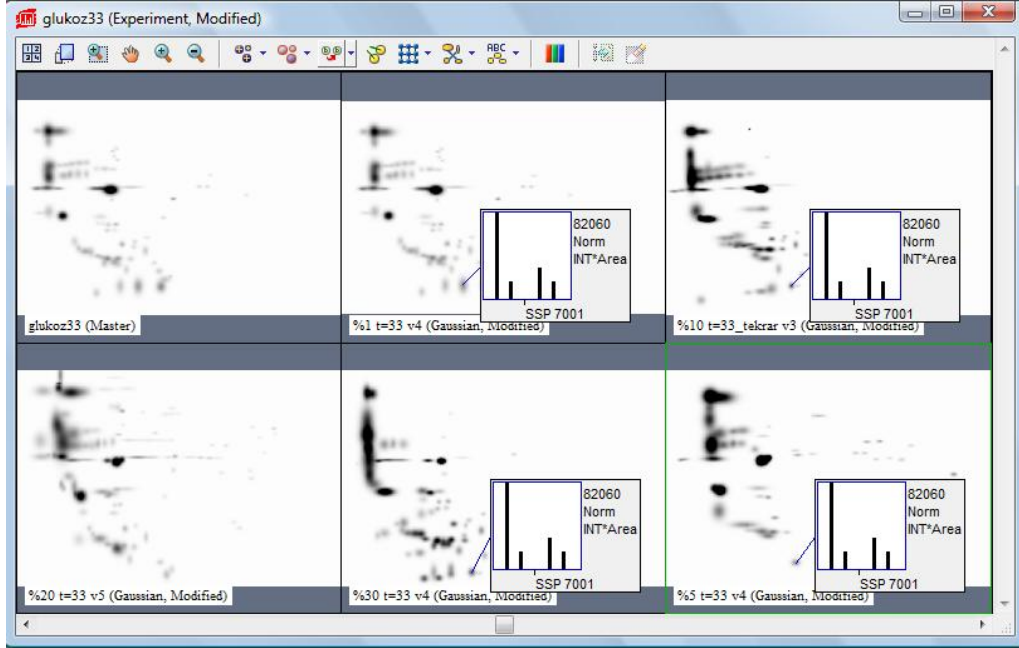
### *RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörü*



Şekil 4.42 RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörüne ait MALDI spektrumu

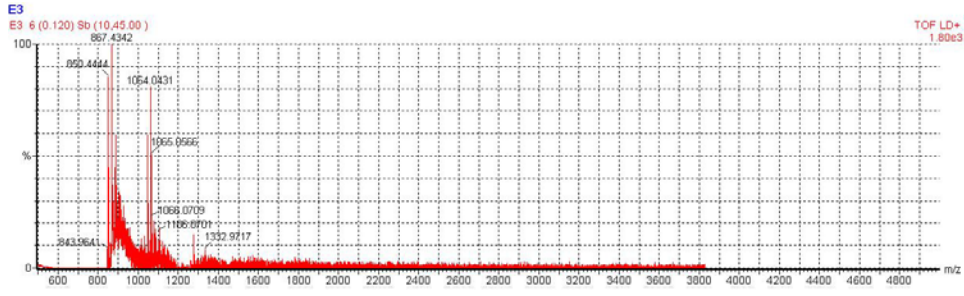


Şekil 4.43 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörünün bulunduğu nokta

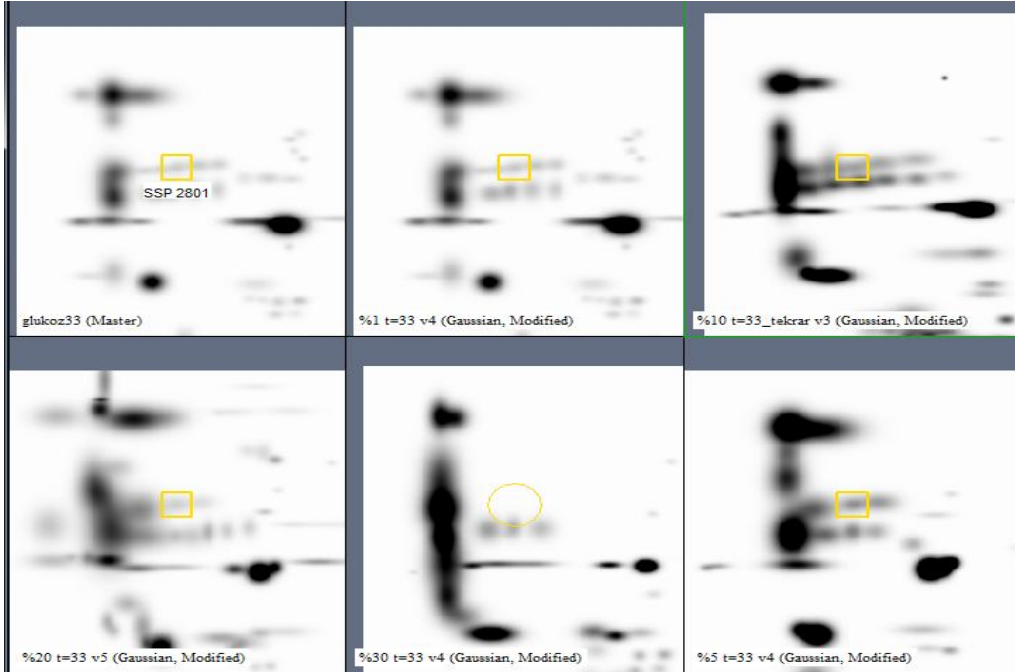


Şekil 4.44 RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörünün kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı

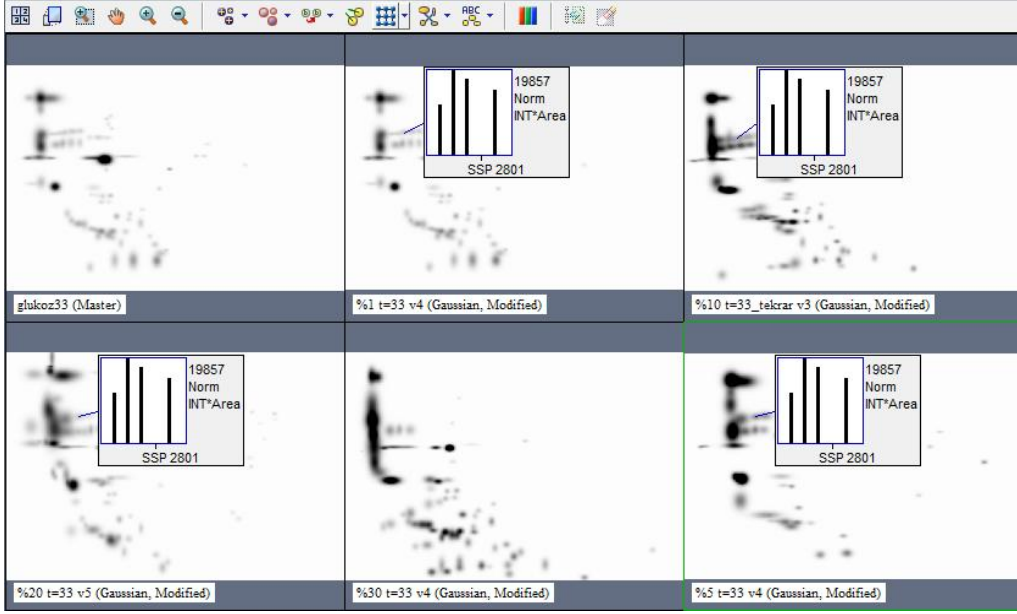
## WD tekrarı içeren protein JIP5



Şekil 4.45 WD tekrarı içeren protein JIP5'e ait MALDI spektrumu

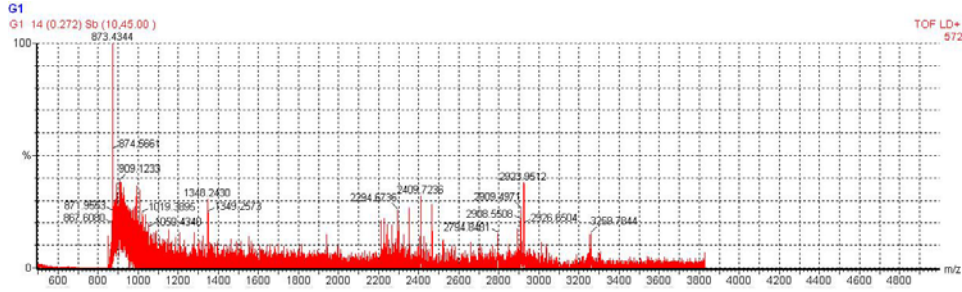


Şekil 4.46 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlştırılmış görüntüsü üzerinde WD tekrarı içeren protein JIP5'in bulunduğu nokta



Şekil 4.47 WD tekrarı içeren protein JIP5'in kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı

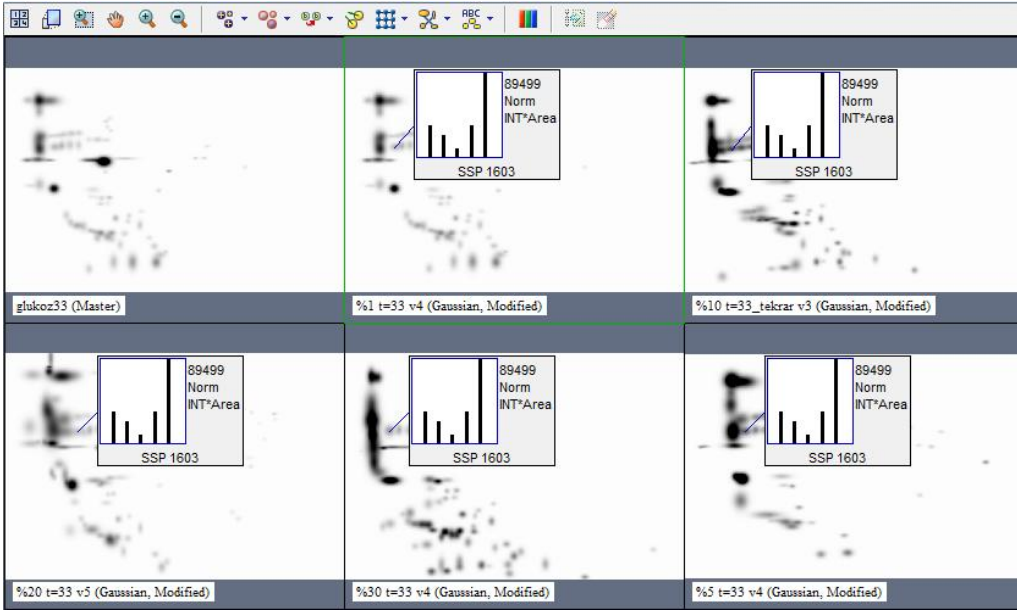
### Otofaj proteini 18



Şekil 4.48 Otofaj proteini 18'e ait MALDI spektrumu



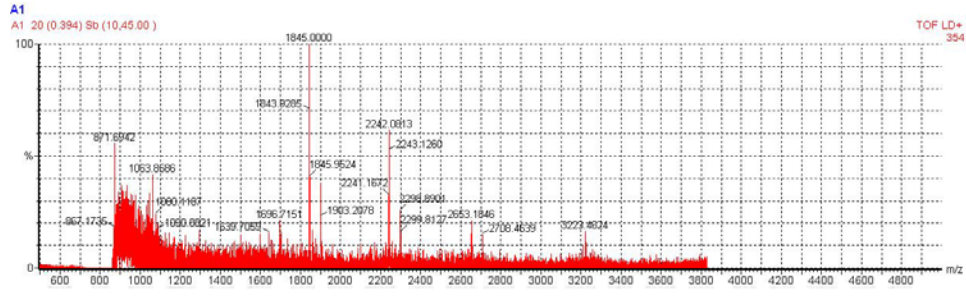
Şekil 4.49 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde otofaj proteini 18'in bulunduğu nokta



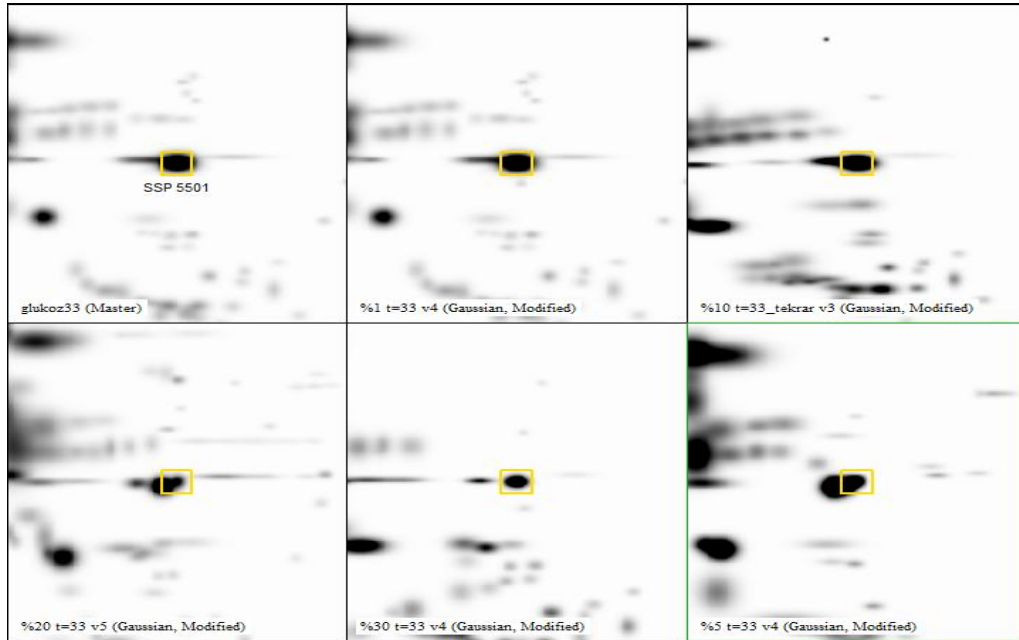
Şekil 4.50 Otofaj proteini 18'in kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı



## Protein RAI1

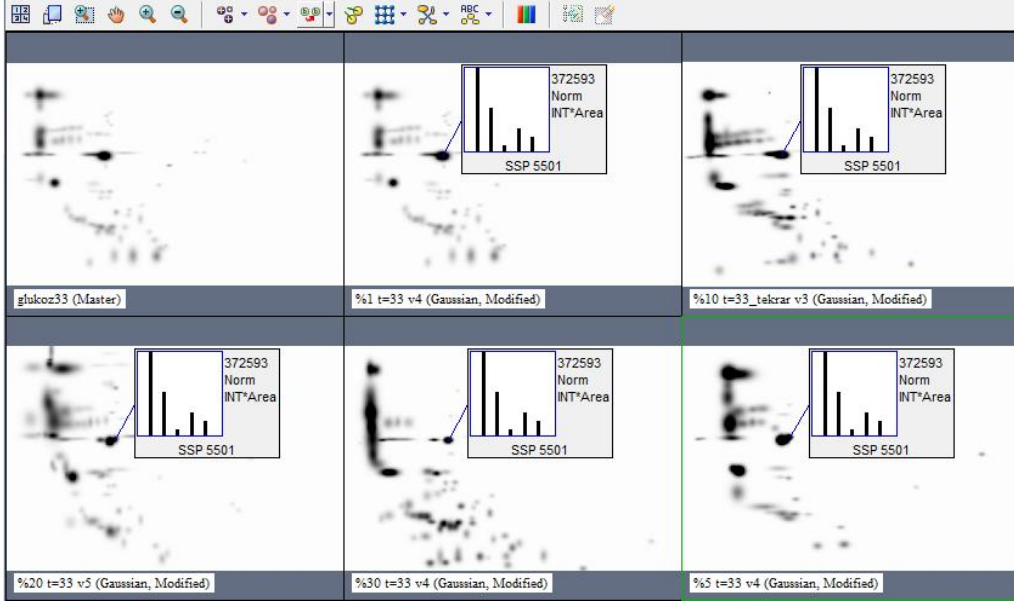


Şekil 4.51 Protein RAI1'e ait MALDI spektrumu



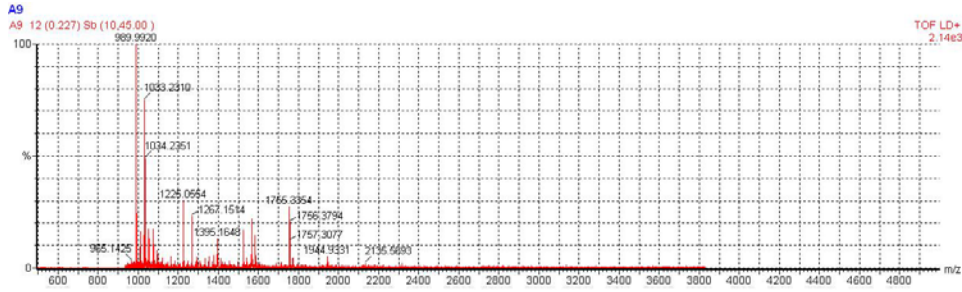
Şekil 4.52 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde protein RAI1'in bulunduğu nokta





Şekil 4.53 Protein RAI1'in kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı

### *Bakır transport proteini 86*

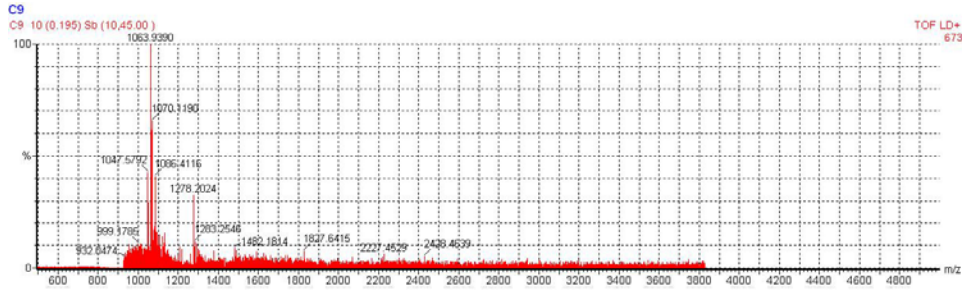


Şekil 4.54 Bakır transport proteini 86'ya ait MALDI spektrumu

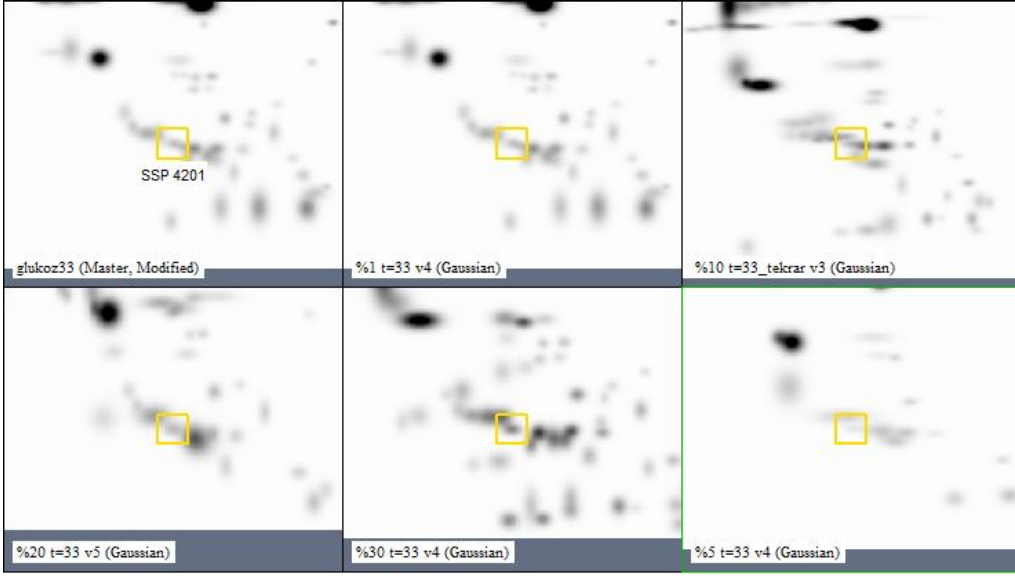


**Şekil 4.55** Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde bakır transport proteini 86'nın bulunduğu nokta

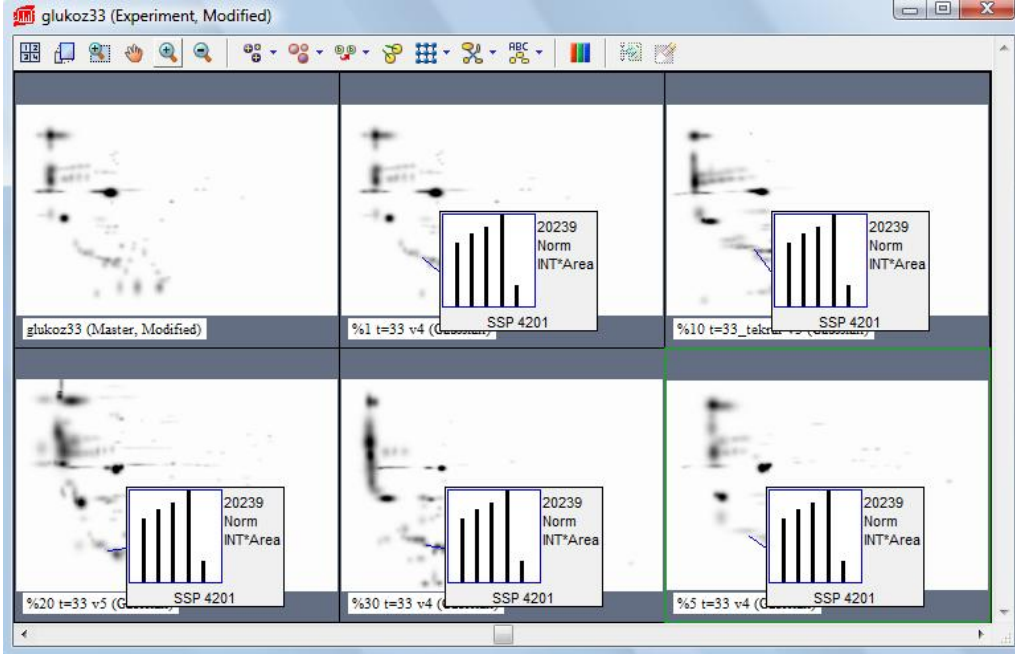
### *Sinaptobrevin benzeri YKT6*



**Şekil 4.56** Sinaptobrevin benzeri YKT6'ya ait MALDI spektrumu



Şekil 4.57 Glukoz t=33 eşleştirme setinin yakınlaştırılmış görüntüsü üzerinde sinaptobrevin benzeri YKT6'nın bulunduğu nokta



Şekil 4.58 Sinaptobrevin benzeri YKT6'nın kolon grafikleri halinde jellerdeki miktar dağılımı

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1 İzole ve Ticari *D.hansenii*'nin karşılaştırılması

Hücre dışı protein üretimi ve dağılımı incelenecek *Debaryomyces hansenii* türü mayanın seçilmesi için iki farklı izolat ile denemeler yapılmıştır. Bu mayalardan biri ticari olarak satın alınan *Debaryomyces hansenii* NRLL Y-7426, diğeri ise süt mamulleri üretim tesisi yağlı atığından izole edilen ve 16S rRNA analizi ile *Debaryomyces hansenii* olduğu gösterilen (Takaç ve Şengel 2010) mayadır.

30°C'de 150 rpm'de UYM besi ortamında mayaların çoğalması, 3 saat aralıklarla spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. 33. saatin sonunda ticari *D. hansenii* 3,888 mg/ml derişime ulaşırken, izole edilen *D. hansenii* 2,906 mg/ml hücre derişimine ulaşmıştır (Şekil 4.1). Ancak iki maya hücre dışı protein üretimi açısından kıyaslandığında, ticari *D. hansenii*'nin 14,81 µg/ml'e, izole edilen *D. hansenii*'nin ise 27,98 µg/ml'e ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.2). Çalışmanın amacına uygun olduğundan, denemelere daha fazla miktarda protein salgılayan, süt mamulleri üretim tesisi yağlı atığından izole edilen *D. hansenii* ile devam edilmesine karar verilmiştir.

### 5.2 Tuzun (NaCl) *D. hansenii* Çoğalmasına Etkisi

*Debaryomyces hansenii*'nin en önemli özelliklerinin başında yüksek tuz derişimlerine dayanabilen halofilik bir maya olması gelmektedir. Bu maya %3-5 tuzluluk oranlarında optimum çoğalma gösterirken, %25 tuzluluk oranlarına kadar dayanabilir (Breuer and Harms 2006). Bu nedenle ön deneme olarak mayanın %5 NaCl içeren ve içermeyen, farklı glukoz derişimine sahip UYM ortamlarında çoğalmaları karşılaştırılmıştır. Bunun için %1 glukoz, %5 glukoz, %1 glukoz+%5 NaCl, %2 glukoz+%5 NaCl ve %5 glukoz+%5 NaCl içeren UYM ortamlarında 30°C'de 150 rpm'de üretimler gerçekleştirilmiştir. Genel olarak tuzun hücre çoğalmasını hafifçe azalttığı, en iyi çoğalmanın %1 glukoz içeren ortamda

gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.3). Sorenson and Jakobsen (1997), yaptıkları çalışmada %1, %6 ve %12 NaCl içeren ortamlarda *D. hansenii*'nin çoğalmasını incelemiş ve tuz oranındaki artışın hücrenin özgül çoğalma hızını azalttığını ortaya koymuştur. Gonzalez-Hernandez *et al.* (2005), *D. hansenii*'den trehaloz üretimini incelediği çalışmasında ise, 1M NaCl içeren besi ortamında, tuz içermeyen ortama göre mayanın daha iyi çoğaldığını bildirmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, literatürde sunulan iki farklı veriden ilkiyle uyum göstermektedir. *D. hansenii*'nin çoğalmasında tuzun etkisi hakkında farklı sonuçların elde ediliyor olması, kullanılan maya izolatu ve besiyerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Tuzlu ortamlarda, *D. hansenii*'nin hücre dışına salgıladığı protein derişimleri, tuzun Bradford yöntemi ile girişim yapması sonucu ölçülememiş ve dolayısıyla bir kıyaslama yapılamamıştır.

### 5.3 Glukoz Derişiminin Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi

*D. hansenii*'den protein üretiminde ekstrem glukoz derişimlerinin hücre çoğalması ve hücre dışı protein derişimi üzerine etkisi %1, 5, 10, 20 ve 30 glukoz derişimleri için incelenmiştir. İncelenecek ortamların su aktivitesi değerleri de ölçülerek, sonuçlar aynı zamanda su aktivitesi olarak da değerlendirilmiştir. Beklendiği gibi, glukoz derişimi arttıkça, su aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

UYM ortamında 30°C ve 150 rpm'de hücreler çoğaltılmış ve 3 saat aralıklarla alınan örnekler spektrofotometrik olarak analizlenmiştir. Glukoz derişiminin artmasıyla hücre çoğalma hızının ve ulaşılan en yüksek hücre derişimlerinin azaldığı gözlenmiş ve en yüksek hücre derişimine %1 glukoz içeren ortamda 33. saatte 2,807 mg/ml ile ulaşılmıştır (Şekil 4.4). Ancak mayanın yüksek glukoz derişimlerinde dahi çoğalabildiği yani düşük su aktivitesi stresine dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Saha and Bothast (1996), *D. hansenii*'nin %30 glukoz içeren besi ortamında çoğalabildiğini ve Van den Tempel (2000) de mayanın düşük su aktivitesinde çoğalabildiğini göstermiştir. Bu anlamda elde edilen veriler literatür ile uyumludur. En yüksek özgül çoğalma hızı 0,14 st<sup>-1</sup> olmak üzere yine %1 glukoz derişiminde bulunmuştur (Çizelge 4.2). Glukoz derişimi %1 den %30 değerine artırıldığı zaman ulaşılan hücre derişimi % 34 ve hücre çoğalma hızı ise %36 azalmıştır.

Hücre dışına salgılanan protein derişimleri ise 24. ve 33. saatlerde belirlenmiştir. Genel olarak glukoz derişimi arttıkça hücre çoğalmasına paralel olarak hücre dışına salgılanan protein derişiminin azaldığı gözlenmiştir. En yüksek hücre dışı protein üretimi %1 glukoz içeren ortamda 24. saatte 28,64 µg/ml olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6). Glukoz derişimi %1'den %30 değerine artırıldığı zaman ulaşılan protein derişimi 24. saat için %46, 33. saat için ise %65 azalmıştır. Ayrıca 24. ve 33. st örnekleri arasında önemli bir fark olmaması, hücrelerin hücre dışı protein üretimini, başlıca üstel fazda gerçekleştirdiğini göstermektedir. Farklı glukoz derişimlerinin *D. hansenii*'nin hücre dışı protein derişimine etkisi ile ilgili literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

#### 5.4 Sıcaklığın Hücre Çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi

*Debaryomyces hansenii* mayasının optimum büyüme sıcaklığı 20-25 °C'dir; ancak 0 °C'nin altında dahi yaşamını sürdürebildiği bilinmektedir (Breuer and Harms 2006). Bu çalışmada, protein üretiminde önemli parametrelerden biri olan sıcaklık etkisi 10, 20, 30 ve 40 °C'de gerçekleştirilen deneyler ile incelenmiştir.

İncelenen sıcaklıklar arasından *D. hansenii* sadece 40 °C'de çoğalma göstermemiştir. Diğer tüm sıcaklıklarda çoğalmış, ancak düşük sıcaklıklarda (10 ve 20 °C) çoğalma yavaş olmasına rağmen en yüksek hücre derişimlerine bu sıcaklıklarda ulaşılmıştır. Buna karşın, yüksek sıcaklıkta (30 °C) daha hızlı çoğalan hücrelerin ulaştıkları derişim düşük sıcaklıklardan daha azdır. En yüksek hücre derişimine 10 °C'de 33. saatte 3,645 mg/ml olarak (Şekil 4.7); en yüksek özgül çoğalma hızına ise 30 °C'de 0,14 st<sup>-1</sup> (Çizelge 4.3) olarak ulaşılmıştır. Sorenson and Jakobsen (1997), yaptıkları çalışmada sıcaklığın *D. hansenii*'nin çoğalması üzerine etkisini incelemiş ve bu mayanın 10 ila 30 °C arasındaki sıcaklıklarda yaşayabildiğini göstermiştir. Ayrıca literatürde, *D. hansenii*'nin 39 °C sıcaklığa kadar yaşamını sürdürebildiğine dair bilgiler mevcuttur (Nakase and Suzuki 1985).

En yüksek hücre dışı protein üretimi 10 °C'de gerçekleştirilen üretimin 33. saatinde 31,41 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.9). 20 °C'de gerçekleştirilen denemede ise en yüksek

28,69 µg/ml hücre dışı protein derişimine ulaşılmıştır. Marquina *et al.* (2001), *D. hansenii*'den toksin üretimini incelediği çalışmasında, YMB (Yeast Morphology Broth) besi ortamında 20 °C'de çoğalan *D. hansenii* CYC 1021'nin hücre dışı protein derişiminin 0,241 mg/ml'ye ulaştığını bildirmiştir. Bu anlamda elde edilen sonuçlar arasındaki fark, kullanılan maya izolatlarının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. 30 ve 40 °C sıcaklıklarında 24. ve 33. st'lerde üretilen protein miktarlarında önemli fark gözlenmezken, 10 ve 20 °C sıcaklıklarında 33. st'de daha yüksek protein derişimi ölçülmüştür. Bu duruma, düşük sıcaklıklarda mayanın durgunluk fazına daha geç ulaşılmasının neden olduğu düşünölmektedir.

### **5.5 Katkı Maddelerinin Hücre çoğalması ve Hücre Dışı Protein Derişimine Etkisi**

Marquina *et al.* (2001), çalışmalarında farklı katkı maddelerinin *D. hansenii*'den toksin üretimine etkisi incelemiş ve bazı katkı maddelerinin toksin üretimini artırdığını tespit etmişlerdir. Bu katkı maddeleri arasında polar aprotik bir solvent olan DMSO toksin üretimini 1.7 kat ve birer polieter olan PEG-400 ile PEG-1500 de 1.3 kat artırmıştır.

Bu alışmada, *Debaryomyces hansenii*'nin farklı katkı maddelerinin varlığında çoğalması ve hücre dışı protein derişimine etkisini incelemek amacıyla üretim ortamlarına ayrı ayrı 100 ppm DMSO ve 100 ppm PEG-4000 eklenmiştir. Kontrol ortamı olarak katkı maddesi içermeyen UYM ortamı kullanılmış, denemeler *D. hansenii*'nin en iyi çoğalma gösterdiği 20°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

İncelenen tüm ortamlarda ve kontrolde hücre çoğalması benzer şekilde gerçekleşmiş, katkı maddelerinin önemli bir etkisi olmamıştır. En yüksek hücre derişimine ve özgül çoğalma hızına PEG-4000 içeren ortamda 3,610 mg/ml ve 0,17 st<sup>-1</sup> ile ulaşılmıştır (şekil 4.10, izelge 4.4).

Katkı maddesi içeren ortamlarda protein üretiminde hafif bir azalma gözlenmiş ve genel olarak 33. st protein üretimlerinin, 24. st protein üretimlerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12). En yüksek protein üretimine kontrol üretim ortamında çoğalmanın 33. st'inde 28,69 µg/ml ile ulaşılmıştır.

## 5.6 Proteom Analizleri

### 5.6.1 Glukoz Derişiminin *D.hansenii*'nin Hücre Dışı Protein Dağılımına Etkisi

*D. hansenii* hücrelerinin %1, 5, 10, 20 ve 30 glukoz derişimlerinde çoğalmalarının 24. ve 33. saatlerinde hücre dışına salgıladıkları proteinler, 2D-PAGE analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır. Genel olarak proteinler tüm jellerde pH 4-6 aralığında yoğunlaşmaktadır. PD-Quest programı ile yapılan jel analizlerinde %1 glukoz derişiminde çoğalan hücrelerin protein dağılımını gösteren jel, referans jel (master jel) seçilmiş, diğer glukoz derişimlerinde çoğalan hücrelerin proteinleri, benzerlik ve farklılıklar açısından bu jel ile karşılaştırılmıştır.

Üretimin 24. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerle yapılan 2D-PAGE jel analizlerinde, glukoz derişiminin artması ile %1 glukoz içeren ortama göre hücre dışına salgılanan protein sayısı önce arttığı, %30 glukoz derişimine ulaşıldığında ise hafif bir azalma olduğu görülmüştür. Ancak tüm yüksek glukoz derişimlerinde toplam protein sayısı (toplam spot sayısı) %1 glukoz jelinden daha fazladır. Bu sonuç, yüksek glukoz derişimlerinde hücrenin daha az çoğalmasına karşın, hücrelerin yaratılan stres nedeniyle daha fazla sayıda protein salgıladığını göstermektedir. En yüksek protein sayısı 228 ile %20 glukoz içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 4.5). Ayrıca, glukoz derişiminin artması ile hücre dışı toplam protein derişiminin azaldığı bulunmuştur. Bu iki bulgu, her ortamda hücre dışına salgılanan proteinlerin hem miktar olarak, hem de tür olarak farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonucun bir diğer göstergesi, yüksek glukoz derişimli jellerde %1 glukoz jeli ile eşleşen ve eşleşmeyen protein spotlarının farklı sayıda olmasıdır. %1 glukoz jeli ile en büyük farklılık, %20 glukoz jeline elde edilmiştir (155 eşleşmeyen



spot); bunu %30 glukoz jeli (114 eşleşmeyen spot) izlemektedir. Bu iki glukoz derişiminin, *D. hansenii* tarafından hücre dışına salgılanan proteinler açısından en büyük farklılığı yarattıkları için en önemli oldukları düşünölmektedir. Elde edilen sonuçlar, glukoz derişiminin değışimi ile bazı proteinlerin miktarlarının en az iki kat arttığını veya azaldığını da göstermektedir.

Üretimin 33. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel analizlerine bakıldığında, %1 glukoz derişimine sahip ortama göre toplam spot sayısının, %5 glukoz derişiminde azaldığı, %20 glukoz derişiminde arttığı ve diğer glukoz derişimlerinde hemen hemen aynı kaldığı görölmektedir. Hücre dışı toplam protein derişiminin, glukoz derişiminin artması ile azaldığı bulunmasına karşın, en yüksek protein sayısı 103 ile %20 glukoz içeren ortamda elde edilmiştir. Eşleşmeyen spot sayılarına yani sentezlenen farklı proteinlerin sayılarına bakılacak olursa, beklendiğı gibi, %1 glukoz içeren ortamla en büyük farklılık yine 53 spot ile %20 glukoz içeren ortamda görölmektedir. %1 glukoz jeline (referans jelde) olup da diğer jellerde olmayan proteinler açısından karşılaştırma yapıldığında ise, %5 glukoz derişimine sahip ortamın 41 spotla en yüksek sayıya ulaştığı görölmektedir. Referans jel ile eşleşen spot sayısının en az olduğu bu jelde (33 spot) elde edilen bu sonuç yine beklenen bir durumdur (Çizelge 4.5).

24. saatin jel analiz sonuçları 33. saatin sonuçları ile kıyaslandığında genel olarak 33. saatte toplam protein sayısında bir azalma söz konusu olduğu görölmüştür. Bu azalmaya, inkübasyonun ilerleyen zamanlarında mayanın salgıladığı proteaz enzimlerinin ve çalkalamalı hava banyosunun mekanik etkilerinin sebep olabileceğı düşünölmektedir. Miktar olarak artan ve azalan spotlar her iki saatte gözlenmiş; ancak 24. saatte glukoz derişiminin bu etkisi daha kuvvetli olmuştur. Her iki saatte en yüksek spot sayısı %20 ile aynı glukoz derişiminde gözlenmiştir. Sonuç olarak farklı glukoz derişimlerinde hücre dışı proteinlerin dağılımı değerlendirildiğı zaman, tür ve derişim açısından önemli farklılıklar olduğu görölmektedir. Literatürde, glukoz derişiminin *D. hansenii*'nin hücre dışı protein dağılımına dair bilgi bulunmamaktadır.

### 5.6.2 Sıcaklığın *D.hansenii*'nin Hücre Dışı Protein Dağılımına Etkisi

*Debaryomyces hansenii* hücre dışı proteinlerinin dağılımına sıcaklığın etkisi 10, 20 ve 30°C sıcaklıklar için 2D-PAGE analizleri yapılarak incelenmiştir. PD-Quest programı ile jellerin karşılaştırılması sırasında 30°C sıcaklıkta çoğalan hücrelerin protein dağılımını gösteren jel, referans jel (master jel) seçilip, diğer sıcaklıklarda çoğalan hücrelerin proteinleri benzerlik ve farklılıklar açısından bu jel ile karşılaştırılmıştır.

Üretimin 24. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakıldığında, üretim sıcaklığı azaldıkça toplam protein sayısının arttığı ve en yüksek protein sayısına 131 spot ile 10°C'ta ulaşıldığı görülmektedir (Çizelge 4.7). Mayanın en iyi çoğalma gösterdiği sıcaklık olan 20°C'ta ise toplam 84 protein spotu bulunmaktadır. Referans jelle eşleşmeyen spot sayısı yani sentezlenen farklı protein sayısı 10°C'ta 83 spot ile en yüksek değere ulaşırken, 20°C'ta 23 adet farklı spot olduğu tespit edilmiştir. 10°C sıcaklıkta stress koşuluna adaptasyon sağlamaya çalışan *D. hansenii*'nin farklı proteinler sentezlediği ama pek çok protein miktarında azalma olduğunu görülmektedir. Bu sıcaklıkta üretilen 22 protein en az 2 kat azalma göstermiştir (Çizelge 4.7). Bunun sebebi, 10°C sıcaklıkta mayaların çoğalmaya daha geç başlamasıdır.

Üretimin 33. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakıldığında, toplam protein sayısının referans jele göre 20°C'ta artarak 113'e ulaştığı, 10°C'ta ise azalarak 87'e düştüğü görülmektedir. 20°C'ta 59 spotun referans jel ile eşleştiği, geri kalan 54 spotun ise farklı olarak sentezlendiği görülmektedir. 10°C'ta ise toplam 87 spotun 34 tanesi referans jel ile eşleşmekte, 53 tanesinin ise farklı olarak sentezlendiği görülmektedir. En az iki kat azalan spot sayıları her iki sıcaklıkta da aynıyken (9 spot), 20°C'ta artan spotların sayısı (26 spot), 10°C'ye göre (14 spot) oldukça fazladır (Çizelge 4.8). Sonuç olarak, hem 24. hem 33. saatte farklı sıcaklıkların hücre dışı protein dağılımı değerlendirildiği zaman, sayı, tür ve derişim açısından önemli farklılıklar olduğu görülmektedir.

Sıcaklık etkisinin incelendiği deney setinde, 40°C sıcaklıkta mayanın çoğalmadığı görülmüş, ancak 24. saatte 30,14 µg/ml ve 33. saatte 30,52 µg/ml protein derişimleri ölçülmüştür. Bu proteinlerin hücrelerin yüksek sıcaklığa adaptasyonu sırasında salgılanmış olabileceğinden, 30°C sıcaklıkta gerçekleşen ön çoğalma işleminden ve hücre lizisi nedeniyle ortama salınan hücre içi proteinlerden dolayı bağıl olarak yüksek derişime sahip olduğu düşünülmektedir. Hücre çoğalmasının olmadığı bu sıcaklık, verimlilik açısından önem göstermediği için 40°C jelleri eşleştirme setlerine dahil edilmemiştir. Beklendiği gibi bu ortamdan izole edilen proteinler, jel üzerinde çok az sayıda spot oluşturmuştur (Şekil 4.29, Şekil 4.30).

### 5.6.3 Katkı Maddelerinin *D.hansenii*'nin Hücre Dışı Protein Dağılımına Etkisi

100 ppm derişimde DMSO ve PEG-4000 içeren ortamda çoğaltılan *D. hansenii* hücrelerinin, çoğalmalarının 24. ve 33. saatlerinde hücre dışına salgıladıkları proteinler 2D-PAGE analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır. PD-Quest programı ile yapılan analizlerde katkı maddesi içermeyen üretim ortamında çoğalan hücrelerin protein dağılımını gösteren jel, referans jel (master jel) seçilip, diğer ortamlarda çoğalan hücrelerin proteinleri, benzerlik ve farklılıklar açısından bu jel ile karşılaştırılmıştır.

Üretimin 24. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakıldığında, en fazla protein sayısına 144 spot ile PEG-4000 içeren ortamda ulaşıldığı görülmüştür. Bu proteinlerden 54 tanesi referans jel ile eşleşirken, 90 tanesi eşleşmemiş yani farklı olarak sentezlenmiştir. DMSO içeren ortamda ise, referans jelde toplam spot sayısına benzer olarak 116 spot sayılmıştır. Bu jelde ise 32 spot referans jel ile eşleşirken, 84 tanesi eşleşmemiştir. DMSO içeren ortamda artan ve azalan protein sayıları birbirine yakinken, PEG-4000 içeren ortamda azalan proteinlerin sayısı artanların 8 katıdır.

Üretimin 33. saatinde izole edilen hücre dışı proteinlerin 2D-PAGE jel sonuçlarına bakılacak olursa, toplam spot sayıları, eşleşen ve eşleşmeyen spotlar açısından genel olarak bir benzerlik olduğu görülmektedir. Ancak toplam spot sayısı en yüksek 99 spotla yine PEG-4000 içeren ortamda tespit edilmiştir. Toplamda 88 spot sayılan DMSO içeren

ortamda 50 farklı protein sentezlediği gözlenirken, PEG-4000 içeren ortamda 51 farklı spot sentezlendiği gözlenmiştir. DMSO içeren ortamda artan spot sayısı 8, azalan spot sayısı 11 iken, PEG-4000 içeren ortamda bu sayı sırasıyla 10 ve 11'dir. Sonuç olarak 33. saat örneklerine baktığımızda katkı maddelerinin protein profilinde değişiklik yarattığı, ancak DMSO ve PEG-4000'in bu anlamda birbirlerine bir üstünlüğü olmadığı saptanmıştır.

## 5.7 Proteinlerin Tanımlanması

PD-Quest programı ile kalitatif ve kantitatif analizleri tamamlanan jellerde bulunan tüm spotlar kesilmiş ve proteinler jel içindeyken tripsine edilerek, peptitlerine parçalanmış halde jelden ekstrakte edilmiştir. MALDI ile kütle spektrumu elde edilen proteinlerin, peptid kütle parmak izi yöntemi kullanılarak Mascot programında tanımlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, toplam 269 kütle spektrumu Mascot programı ile aynı parametreler kullanılarak analizlenmiş ve SwissProt veri tabanında eşleşen proteinler arasından 7 tanesi anlamlı sonuçlar vermiştir. Bu proteinler kromatin modifikasyon proteini EAF7, RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörü, WD tekrarı içeren protein JIP5, otofaj proteini 18, protein RAI1, bakır transport proteini 86 ve sinaptobrevin benzeri YKT6 proteinleridir. Bu proteinlerin spektrumlarında elde edilen peptid kütlelerinin, teorik peptid kütleleriyle eşleşme yüzdeleri (coverage) sırasıyla 20, 34, 9, 23, 38, 15 ve 13'tür. Elde edilen tüm protein sonuçlarının kütleleri ve pI'ları teorik saptamalara uygundur (Çizelge 4.11).

Veri tabanlarında tanımlanmış *Debaryomyces hansenii* proteinlerinin az sayıda olması sonuca ulaşmayı kısıtlayan faktörler arasındadır. Yapılan çalışmada daha hassas protein tanımlamalarına ulaşmak için ayrıca deneysel tekniklerin de geliştirilmesi gerekmektedir.

### ***Toplu sonuçlar ve öneriler:***

Bu yüksek lisans çalışmasında farklı stres koşullarında *Debaryomyces hansenii*'nin çoğalması, hücre dışı protein üretimi ve bu proteinlerin dağılımı incelenmiştir. Glukoz derişiminin, sıcaklığın ve katkı maddelerinin *D. hansenii* üzerinde etkisi incelenmiş ve incelenen stres koşullarının proteinler üzerinde gerek çeşitlilik gerekse miktar açısından oldukça etkili olduğu saptanmıştır.

Endüstriyel açıdan önemli bir maya olan *Debaryomyces hansenii*'nin proteinleri hakkında elde edilecek her türlü bilgiye pek çok biyoteknolojik prosesin açıklanabilmesi için ihtiyaç vardır. *D. hansenii* proteinlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı protein izolasyon teknikleri denenmeli, kullanılan yöntemler optimize edilmeli ve neticede daha hassas protein tanımlamalarına ulaşılmalıdır. Bu sayede, ortamda az bulunan veya molekül ağırlığı çok düşük olan proteinler de tanımlanabilir. Bunun için PF-2D (protein fractionation system) gibi daha hassas sonuçların elde edilebildiği kromatografik protein ayırma yöntemlerinden faydalanılabilir.

Bölüm 2.4'te *D. hansenii*'nin hücre içi proteomuna ilişkin yayımlanan tek çalışmanın bulguları özetlenmiştir (Gori *et al.* 2007). Bu çalışma ise, *D. hansenii*'nin hücre dışı proteinlerini global olarak analizlemesi ve proteomik tekniklerin kullanılması açısından literatürde tektir. Yapılan çalışma aynı zamanda, uzun denemeler ile ortaya çıkan yöntem optimizasyonları sonucu ile oluşması nedeniyle, sonraki çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

## KAYNAKLAR

- Adler, L., Blomberg, A., Nilsson A. 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* . *J Bacteriol* 162: 300–306.
- Besancon, X., Ratomahenina, R., Galzy, P. 1995. Isolation and partial characterization of an esterase (EC 3.1.1.1) from a *Debaryomyces hansenii* strain. *Neth Milk Dairy J* 49: 97–110.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M., Toldra, F. 2008. Purification and characterisation of Proteases A and D from *Debaryomyces hansenii*, *Int. J. Food Microbiol*, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* , 72; 248-254.
- Breuer, U. and Harms, H. 2006. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23 ; 415-437.
- Canas, B., Ferrer, D. L., Fernandez, A. R., Camafeita, E., Calvo, E. 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 4(4);295-320.
- Corredor, M., Davila, A-M., Casaregola, S., Gaillardin, C. 2003. Chromosomal polymorphism in the yeast species *Debaryomyces hansenii* . *Antonie van Leeuwenhoek* 83:215- 222.
- Demirsoy, A. 1990. Yaşamın Temel Kuralları-Omurgasızlar. Meteksan Yayınları.
- Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., Fu, Z. F. 2005. New frontiers in proteomics research: A perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 299; 1-18.
- Dura, MA., Flores, M., Toldra, F. 2004. Effects of curing agents and the stability of a glutaminase from *Debaryomyces* spp. *Food Chem* 86: 385–389.
- Girio, FM., Amaro, C., Azinheira, H., Pelica, F., Amaral-Collaco, MT. 2000. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii* . *Biores Technol* 71: 245–251.
- Gonzalez-Hernandez, J. C., Jimenez-Estrada, M., Pena, A. 2005. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles*, 9; 7–16.

- Gori, K., H'ebraud, M., Chambon, C., Mortensen, H.D., Arneborg N., Jespersen L. 2007. Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Res*, 7; 293–303.
- Gözükara, E. 1994. *Biyokimya, Cilt I. Evin Yayınları*.
- Gromova, I. and Celis, J. E. 2006. Protein detection in gels by silver staining: A procedure compatible with mass-spectrometry. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3rd Edition. Elsevier. Academic Press.
- Gunge, N., Fukuda, K., Morikawa, S., et al. 1993. Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 23; 443–449.
- Hernandez-Saavedra, NY., Romero-Geraldo, R. 2001. Cloning and sequencing the genomic encoding region of copper–zinc superoxide dismutase enzyme from several marine strains of the genus *Debaryomyces* (Lodder & Kreger-van Rij). *Yeast* 18: 1227–1238.
- Issaq, H. J. and Veenstra, T. D. 2008. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*, 44; 697-700.
- Karas, M. and Hillenkamp, Z. 1988. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem*, 60: 2299-2301.
- Kumur, H., Takagaki, K., Sone, T., Tsukahara, M., Tanaka, T., Shimazaki, K. 2002. Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from cheese. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 66(6); 1370-1373.
- Marquina, D., Barroso, J., Santos, A., Peinado, J.M. 2001. Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbial Research*, 156 ; 387-391.
- Merdinger, E. and Devine, EM. 1965. Lipids of *Debaryomyces hansenii* . *J Bacteriol* 89: 1488-1493.
- Moon, S. H. and Parulekar, S. J. 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 37 (5); 467-483.
- Nakase, T. and Suzuki, M. 1985. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-Van Rij and related species. II. Practical discrimination and nomenclature. *J Gen Appl Microbiol* 31: 71–86.
- Nielsen, J. and Villadsen, J. 1994. *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York, P.175.

- Nobre, A., Lucas, C., Leao, C. 1999. Transport and utilization of hexoses and pentoses in the talotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* . *Appl Environ Microbiol* 65: 3594–3598.
- O'Farrel, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. The Journal of Biological Chemistry, Vol.250, No.10; 4007-4021.
- Patterson, S. D. 2000. Proteomics: the industrialization of protein chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*, 11; 413-418.
- Saha, B. C. and Bothast, R. 1996. Glucose tolerant and thermophilic  $\beta$ -glucosidases from yeasts. *Biotechnology Letters*, V.18(2); 155-158.
- Santos, A., Marquina, D., Barroso, J., Peinado, JM. 2002. (1–6)- $\beta$ -D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Lett Appl Microbiol* 34; 95–99.
- Sherman, D., Durrens, P., Beyne, E., Nikolski, M., Souciet, J. 2004. Genolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acid Research* 32;315-318.
- Sorensen, B. B. and Jakobsen, M. 1997. The combined effects of temperature, pH and NaCl on growth of *Debaryomyces hansenii* analyzed by flow cytometry and predictive microbiology. *Food Microbiology*, 34; 209-220.
- Takaç, S. ve Şengel, B.Ş. 2010. Extracellular lipolytic enzyme activity of a newly isolated *Debaryomyces hansenii*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 40; 1-11.
- Tavares, JM., Duarte, LC., Amaral-Collaco, MT., Girio, FM. 2000. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. *Enz Microb Technol* 26: 743–747.
- Ünlü, E. 2007. Kimya mühendisliğinde proteombilimin yeri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora semineri.
- Van den Tempel, T. and Jacobsen, M. 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int Dairy J* 10: 263–270.
- <http://www.expasy.ch> (erişim tarihi: 24 Ocak 2010)
- <http://www.expasy.ch/tools/aldente> (erişim tarihi: Ocak 2010)
- <http://www.matixscience.co.uk> (erişim tarihi: Ocak 2010)
- <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard> (erişim tarihi: Ocak 2010)
- <http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols> (erişim tarihi: Ekim 2008)



<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BM23> (erişim tarihi: Ocak 2010)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BKL0> (erişim tarihi: Ocak 2010)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BM45> (erişim tarihi: Ocak 2010)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BWJ5> (erişim tarihi: Ocak 2010)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BIL4> (erişim tarihi: Ocak 2010)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BLU6> (erişim tarihi: Ocak 2010)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BKV2> (erişim tarihi: Ocak 2010)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BSL0> (erişim tarihi: Ocak 2010)

## EKLER

EK 1 Deneylelerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler

EK 2 Poliakrilamid jel içeriği

EK 3 MALDI kalibrasyon spektrumu

EK 4 Kuru hücre kalibrasyon grafiği

EK 5 Hücre çoğalması ve hücre dışı protein derişimi ölçümlerinin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği

EK 6 Makro-Bradford kalibrasyon grafiği

EK 7 Mikro-Bradford kalibrasyon grafiği

EK 8 Proteaz aktivitesi kalibrasyon grafiği ve örnek hesabı

Ek 9 pH 3-10 ve pH 4-7 şeritler kullanılarak elde edilmiş jellerin karşılaştırmalı görüntüleri

EK 10 UYM ortamı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüsü

EK 11 Mascot analizlerinde anlamlı sonuç veren proteinlere ait MALDI-tof spektrum örnekleri

## EK 1 DeneYlerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler

<i>Kimyasal</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog No</i>
Agar	Scharlau	07-004
Akrilamid	Biorad	161-0141
Amonyum persulfat	Biorad	161-0700
Amonyum bikarbonat	Sigma	A6141
Asetik asit	Riedel-de Haën	27225
Asetonitril	Sigma	34998
Boyasız marker	Promega	V8491
Bradford boyası	Biorad	500-0006
Bromofenol blue	Biorad	161-0404
BSA	Sigma	A-9647
CHCA	Sigma	C2020
D(+)-glukoz-monohidrat	Applichem	A1349
DMSO	Merck	1,16743,1000
DTT	Biorad	161-0611
EDTA	Sigma	E9884
Etanol	Sigma	34870
Formik asit	Riedel-de Haën	27001
Glisin	Applichem	4-1067
Hidroklorik asit	Riedel-de Haën	07102
İyodoasetamid	Biorad	<a href="#">163-2109</a>
Kazein	Sigma	C5890
Malt özütü	Scharlau	07-080
Maya özütü	Scharlau	07-079
Metanol	Merck	1.13351.2500
Mineral oil	Biorad	<a href="#">163-2129</a>
PEG-4000	Applichem	A1249
Pepton	Fluka	70171
Proteaz inhibitörü	Roche	1.697.498
Sodyum dodesil sulfat	Biorad	161-0302

Sodyum klorür	AppliChem	A2942
Sypro ruby	Sigma	S4942
TCA	Merk	100810
TEMED	Biorad	161-0801
TFA	Pierce	28904
Tiyoüre	Sigma	Sigma 7875
Tripsin	Promega	V511A
Trisma-Base	Sigma	T6066
Üre	Merk	108488

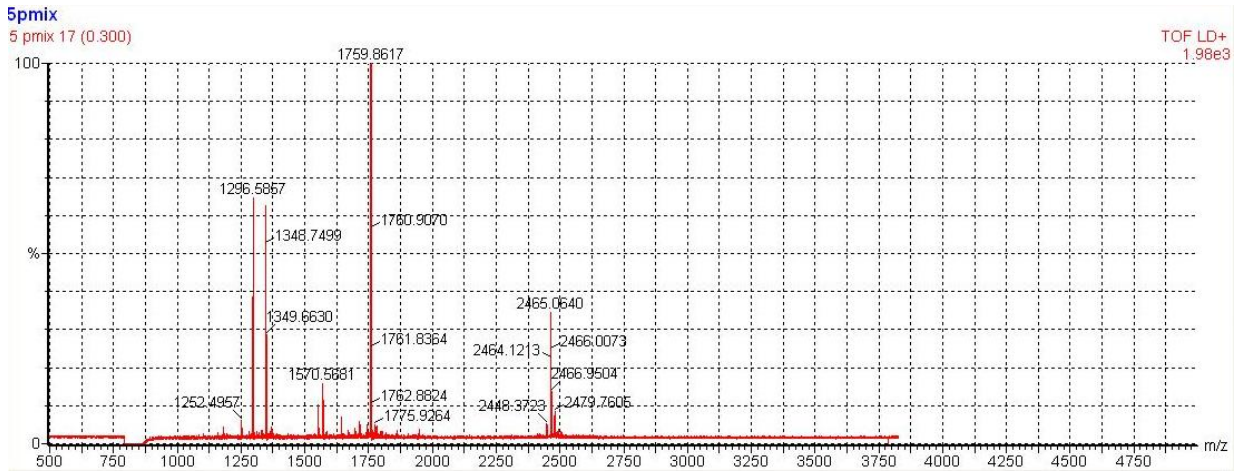
---

## EK 2 Poliakrilamid jel içeriği

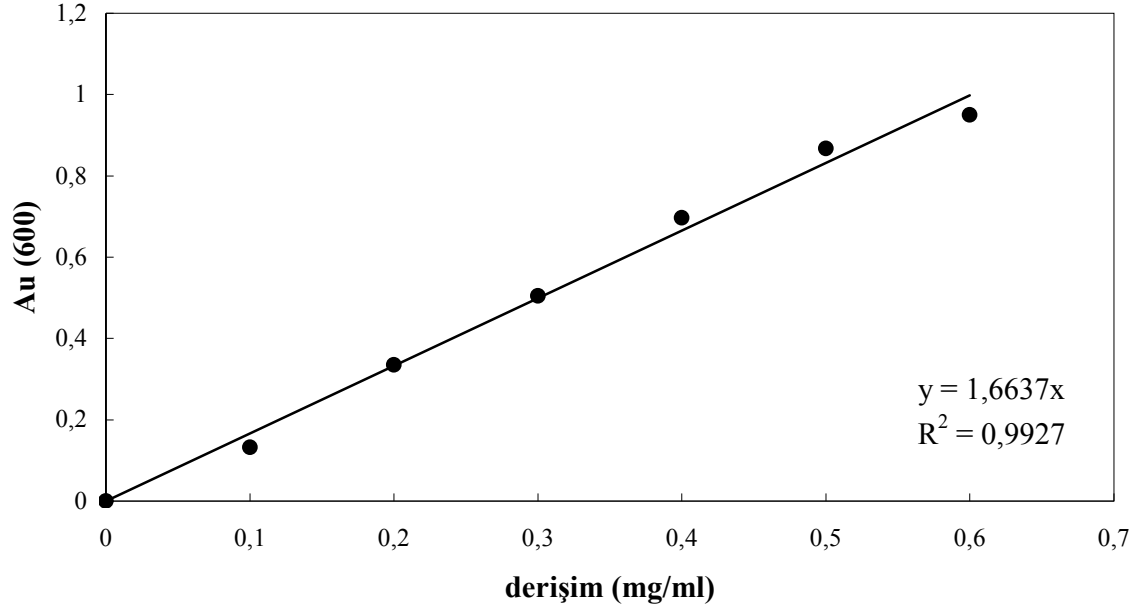
	<i>Koşturma Jeli</i>	<i>Yığma Jeli</i>
Son oran (%)	12,5	4
Son hacim	10 ml	3 ml
1,5 M Tris HCL pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris HCL pH 6,8	-	750 $\mu$ l
%40 akrilamid/bis çözeltisi (37,5:1)	3.125 ml	300 $\mu$ l
%10 SDS	100 $\mu$ l	30 $\mu$ l
Ultra saf su	4.22 ml	1.902 ml
%10 amonyum persülfat	50 $\mu$ l	15 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	3 $\mu$ l

### EK 3 MALDI kalibrasyon spektrumu

<i>Peptid</i>	<i>Moleküler ağırlık (kDa)</i>
Angiotensin	1296,6853
Substance P	1347,7360
Glu Fib	1570,6774
Renin	1758,9326
ACTH	2465,1989



#### EK 4 Kuru hücre kalibrasyon grafiği



## EK 5 Hücre çoğalması ve hücre dışı protein derişimi ölçümlerinin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği

*D. hansenii*'nin hücre çoğalması ve hücre dışı protein üretimi deneylerinde elde edilen verilerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla her ölçüm en az iki kez tekrar edilmiş ve standart sapmaları Eş.(1) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \mu)^2}{N - 1}}$$

(1)

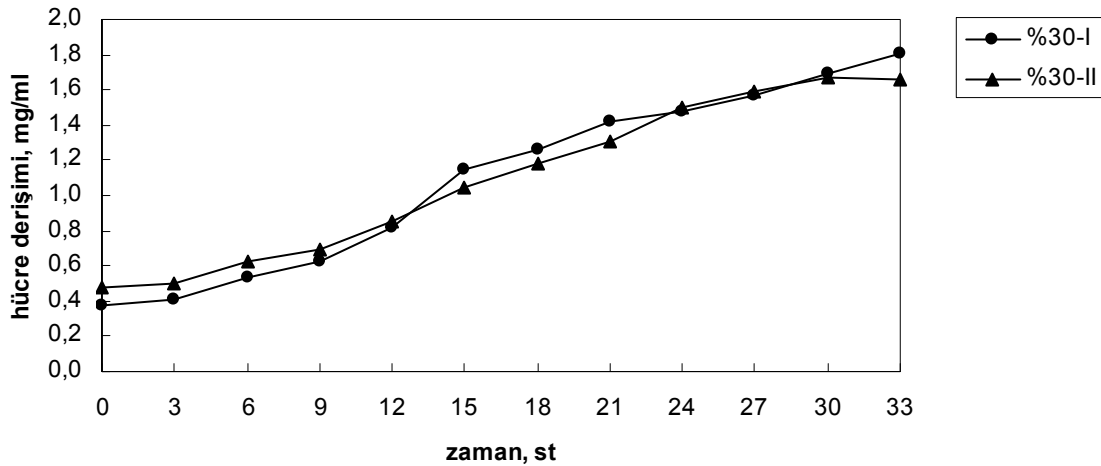
S= Standart sapma

x= Veri değeri

$\mu$ = Ortalama

N= Alınan veri adedi

### Hücre çoğalması



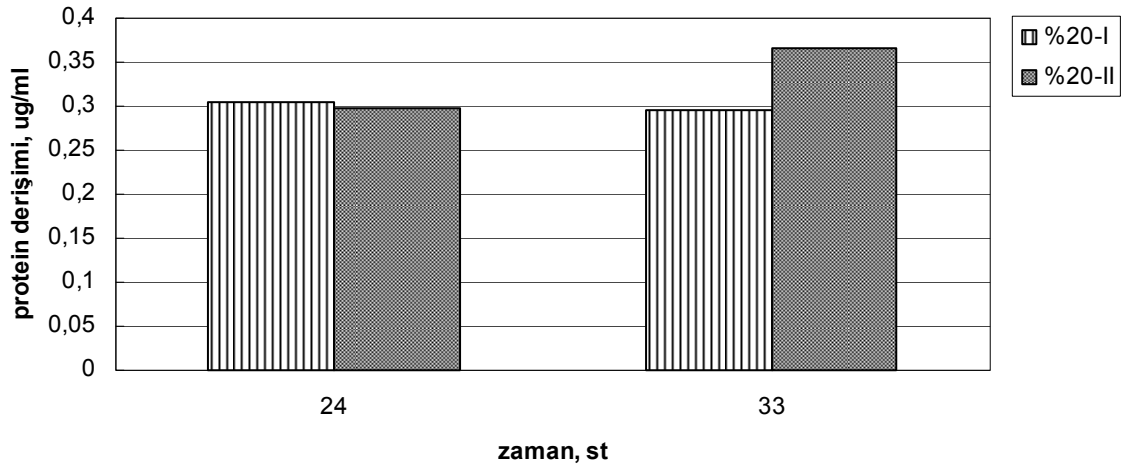
%30 glukoz derişimine sahip UYM ortamında çoğalan *D. hansenii*'nin iki paralel deneyde elde edilen hücre derişimi verilerinin (x) zamanla değişimi



%30 glukoz derişimine sahip UYM ortamında çoğalan *D. hansenii*'nin iki paralel deneyde elde edilen hücre derişimi ( $x$ ; mg/ml) ve standart sapma değerleri

$t, st$	$x_1$	$x_2$	$\mu$	$S$
0	0,370	0,472	0,421	0,072367
3	0,415	0,496	0,455	0,057461
6	0,532	0,622	0,577	0,063677
9	0,628	0,697	0,663	0,048707
12	0,817	0,848	0,833	0,021599
15	1,145	1,049	1,097	0,067909
18	1,262	1,184	1,223	0,055329
21	1,425	1,31	1,367	0,080989
24	1,479	1,497	1,488	0,012988
27	1,569	1,59	1,579	0,014996
30	1,692	1,668	1,680	0,016979
33	1,809	1,656	1,733	0,108343

#### Hücre dışı protein derişimi



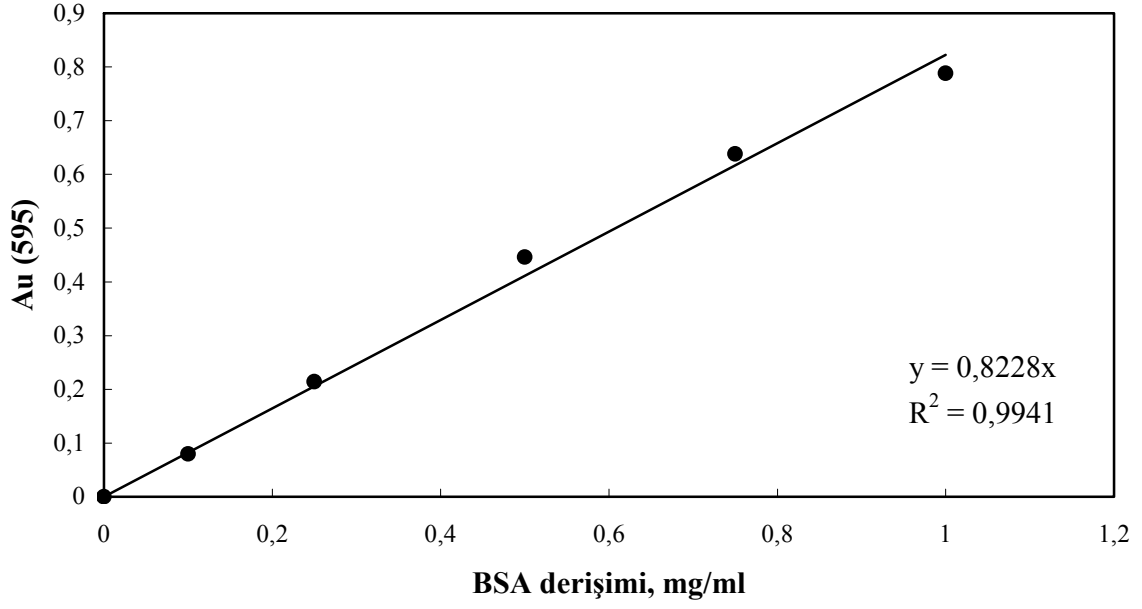
%20 glukoz derişimine sahip UYM ortamında çoğalan *D. hansenii*'nin iki paralel deneyde elde edilen hücre dışı protein derişimi verilerinin ( $x$ ) zamanla değişimi

%20 glukoz derişimine sahip UYM ortamında çoğalan *D. hansenii*'nin iki paralel deneyde elde edilen hücre dışı protein absorbans ( $x$ ;  $\lambda=595$  nm) ve standart sapma değerleri

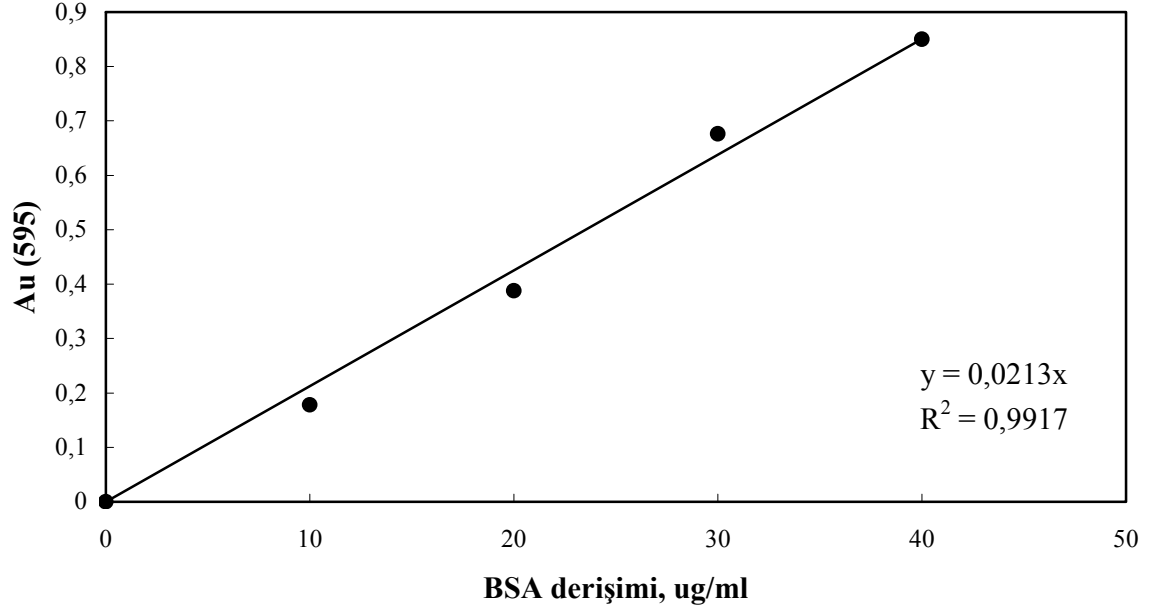
<i>t, st</i>	<i>x<sub>1</sub></i>	<i>x<sub>2</sub></i>	$\mu$	<i>S</i>
24	0,304	0,298	0,301	0,004243
33	0,296	0,365	0,331	0,048795

**SONUÇ:** Hesaplanan standart sapma değerlerinin ortalaması alınmış ve hücre derişimi için ortalama standart sapma değerleri 0,052 ve hücre dışı protein derişimi için ortalama standart sapma değerleri 0,027 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, ilgili veriler ile birlikte değerlendirildiği zaman hem deneylerin, hem de analizlerin hassasiyetinin ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu görölmektedir.

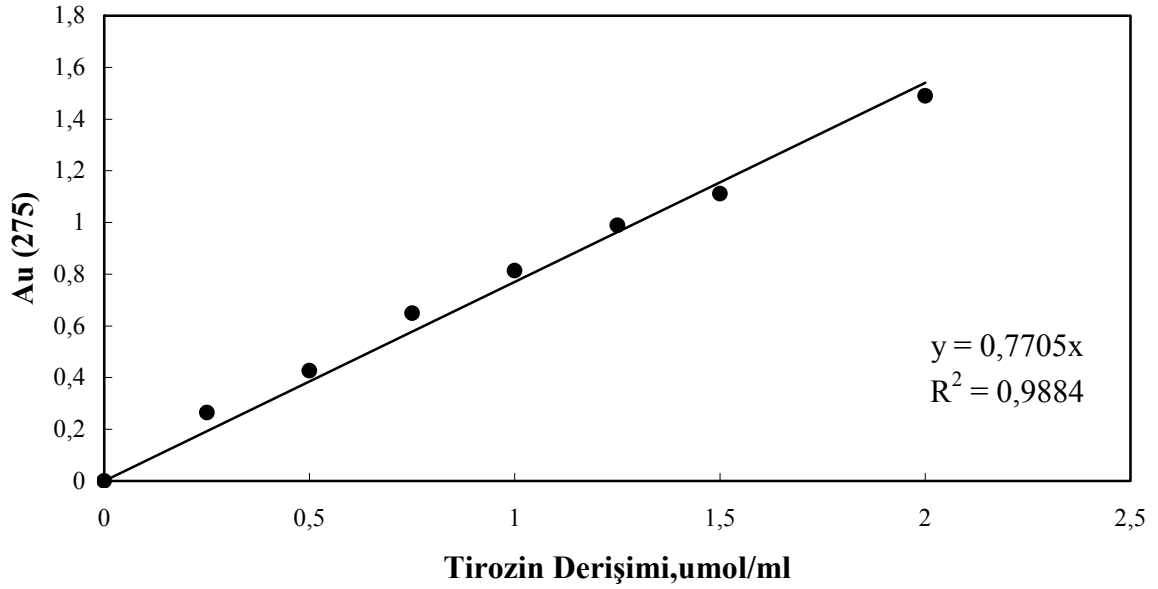
## EK 6 Makro-Bradford kalibrasyon grafiği



## EK 7 Mikro-Bradford kalibrasyon grafiği



## EK 8 Proteaz aktivitesi kalibrasyon grafiği ve örnek hesabı



Bir nite enzim (U), bir dakikada 4 nmol tirozin açığa çıkararak enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$U / ml \text{ enzim} = \frac{(\text{tirozin derişimi, } \mu\text{mol} / \text{ml}) \times F \times (1000 \text{ nmol})}{\Delta x}$$

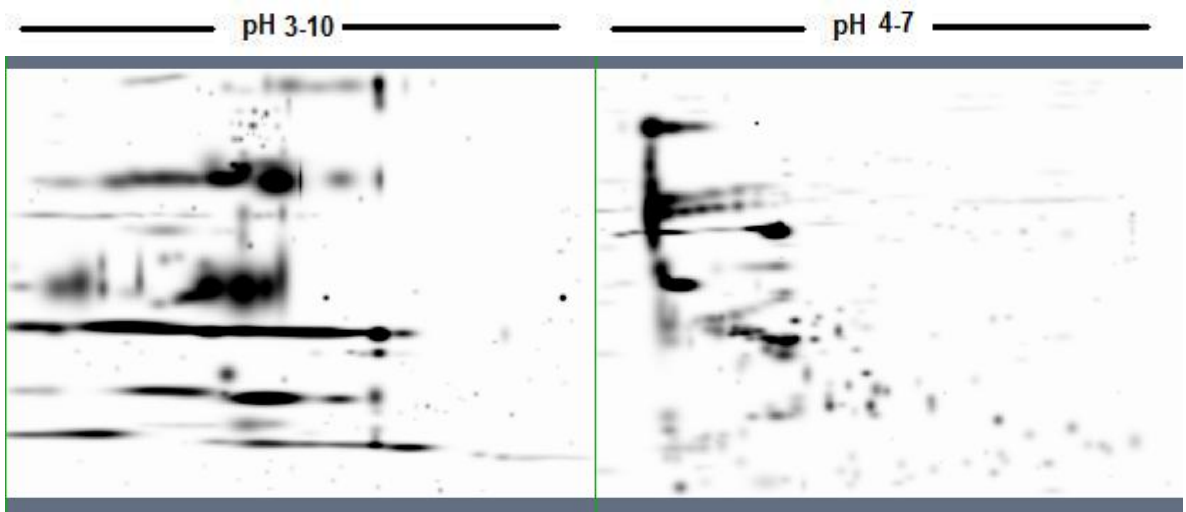
$$F = \text{seyrelme faktörü} = 1$$

$$U / ml \text{ enzim} = \frac{((\text{Abs} / 0,7705 \mu\text{mol}) / (1 \text{ ml enzim})) \times F \times (1000 \text{ nmol})}{4 \times 20 \text{ dk} \times 1 \mu\text{mol}}$$

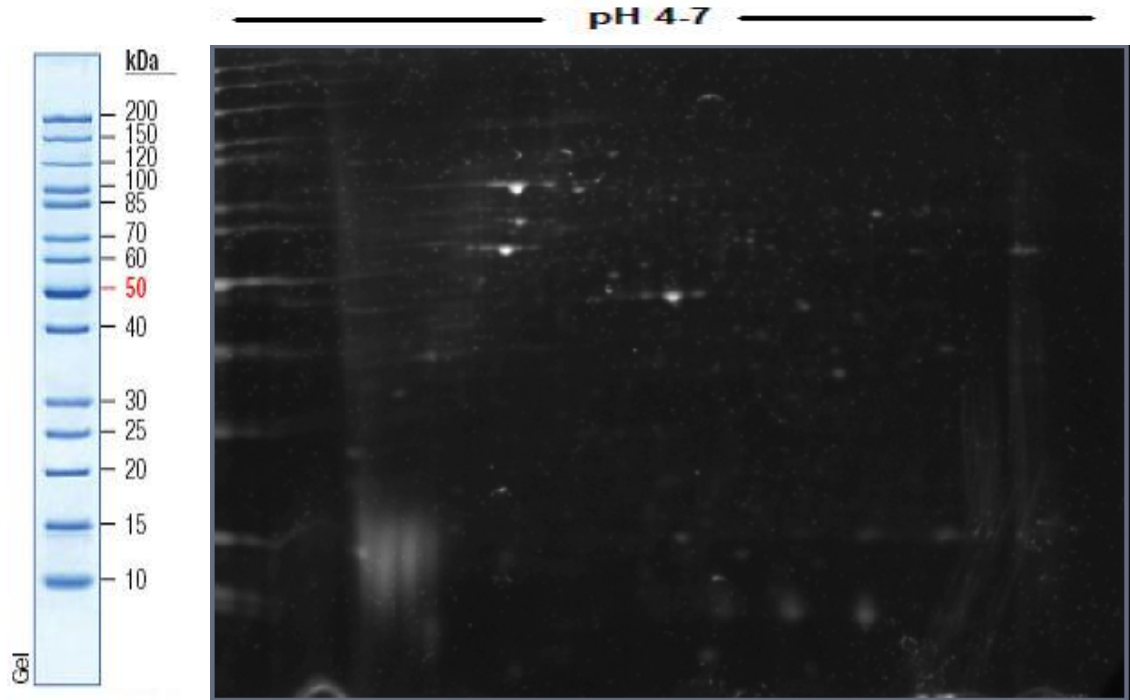
$$U / ml \text{ enzim} = \text{Abs} \times 16,22$$

**Ek 9 pH 3-10 ve pH 4-7 şeritler kullanılarak elde edilmiş jellerin karşılaştırmalı görüntüleri**

%10 glukoz içeren UYM ortamında çoğalan mayaların, çoğalmanın 33. st'inde izole edilen hücre dışı proteinlerine ait pH 3-10 ve pH 4-7 şeritler kullanılarak elde edilmiş jel görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

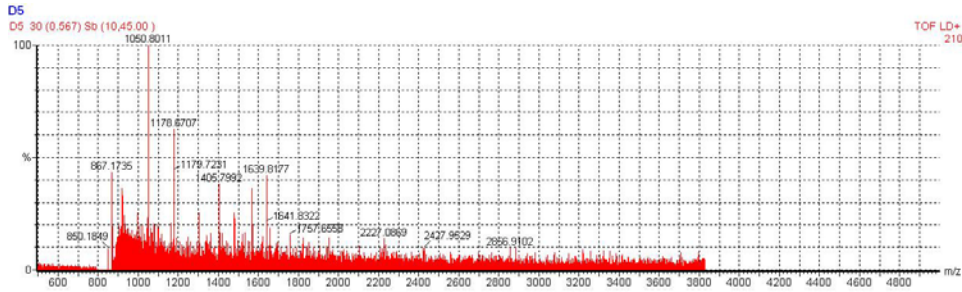
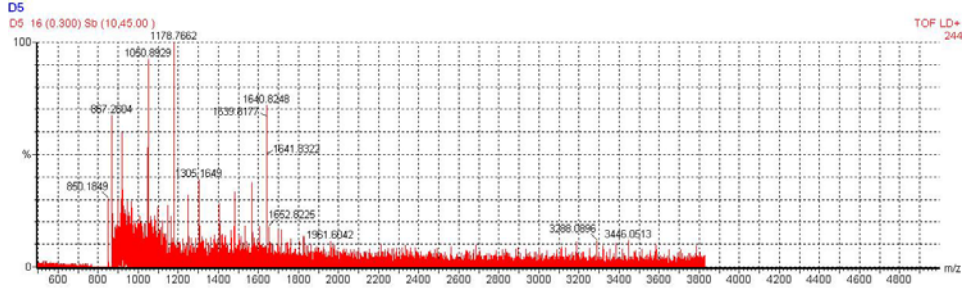


## EK 10 UYM ortamı proteinlerinin 2D-PAGE görüntüsü

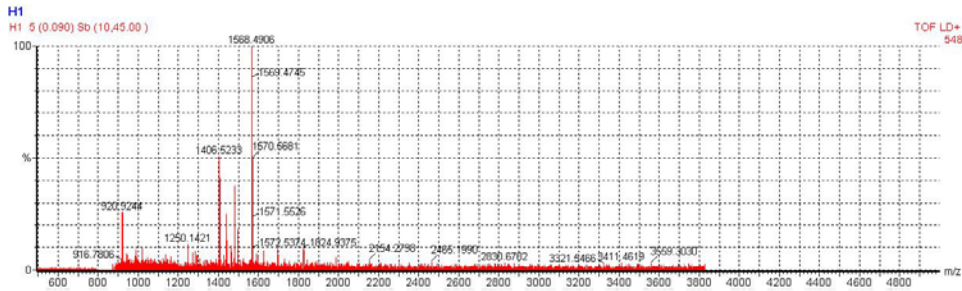
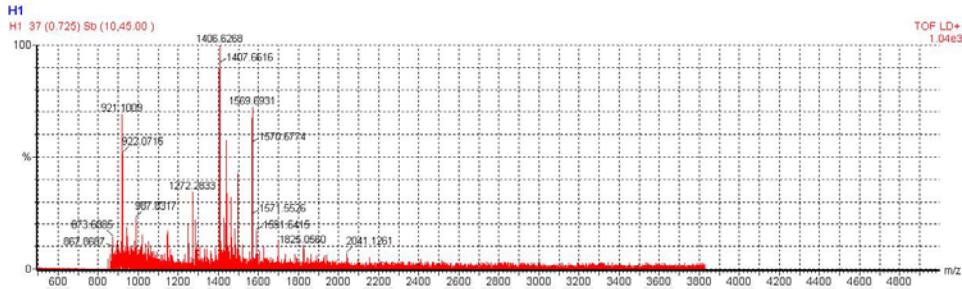


## EK 11 Mascot analizlerinde anlamlı sonuç veren proteinlere ait MALDI-tof spektrum örnekleri

### *Kromatin modifikasyon proteini EAF7*

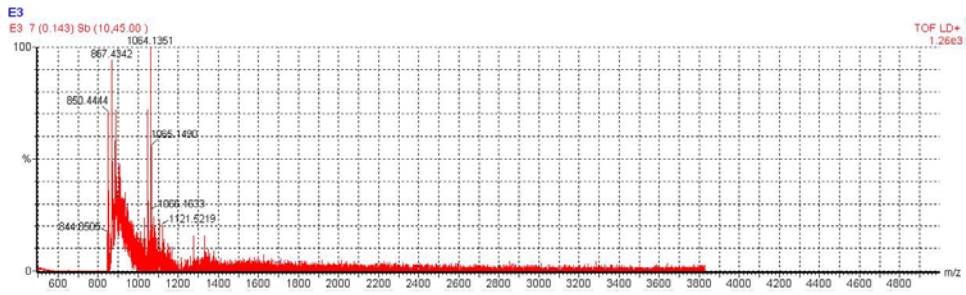
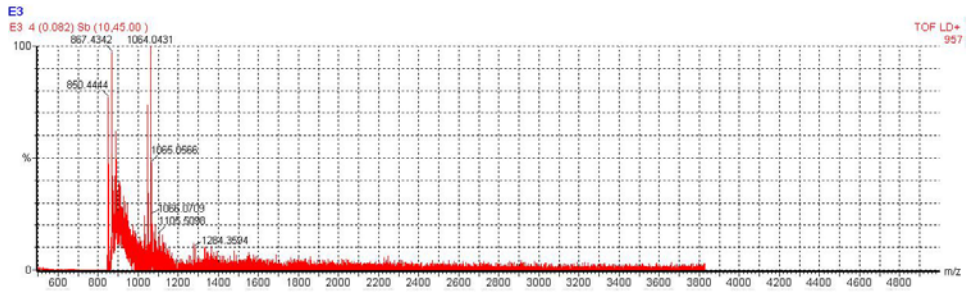


### *RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörü*

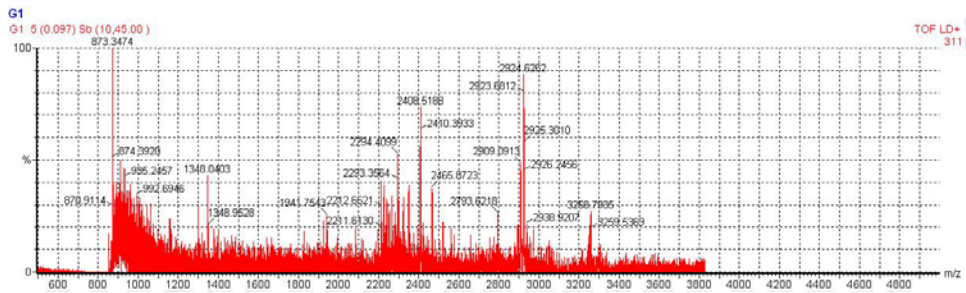
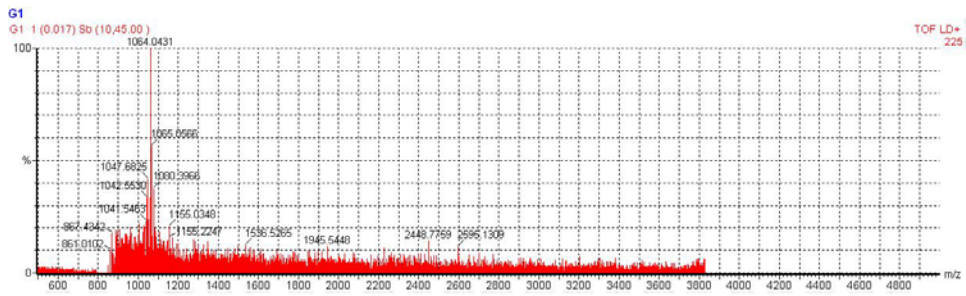




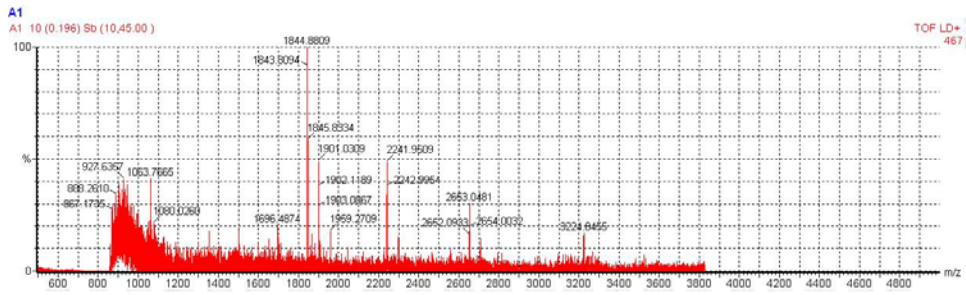
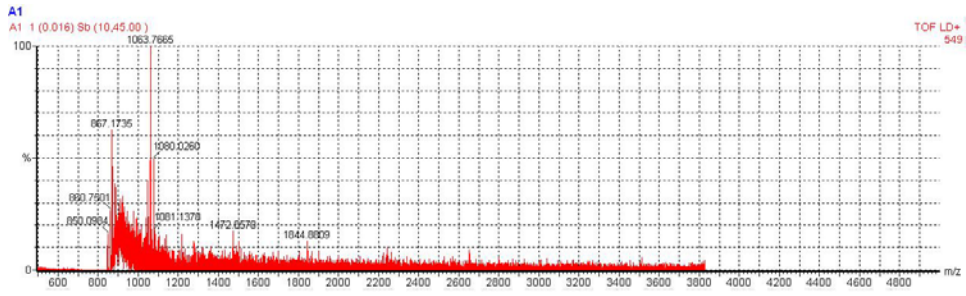
*WD tekrarı içeren protein JIP5*



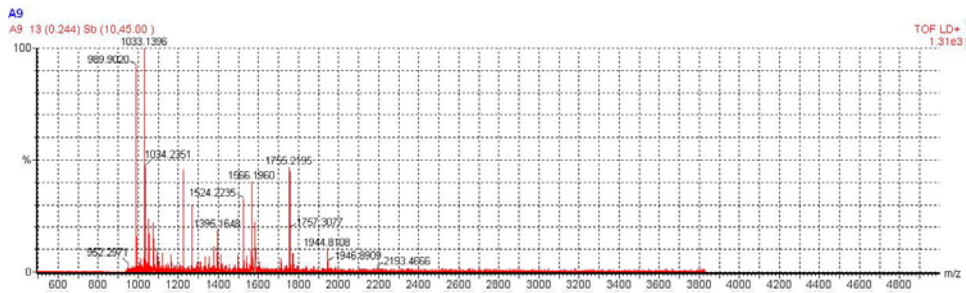
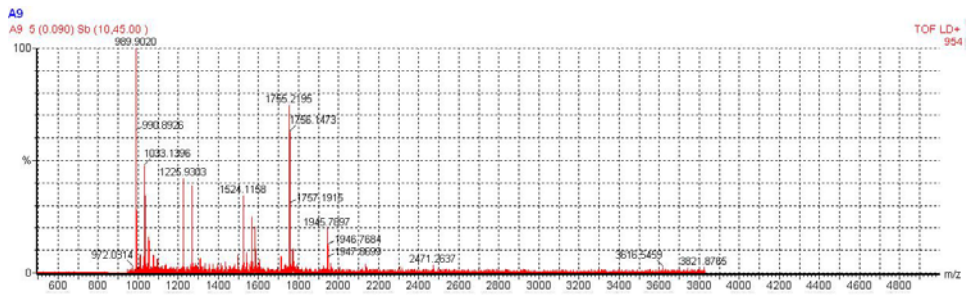
*Otofaj proteini 18*



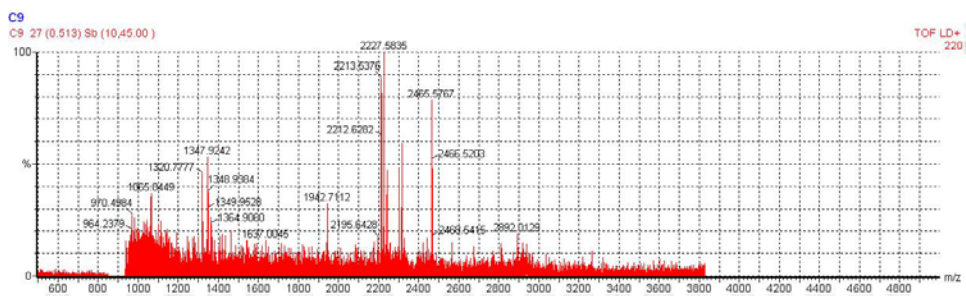
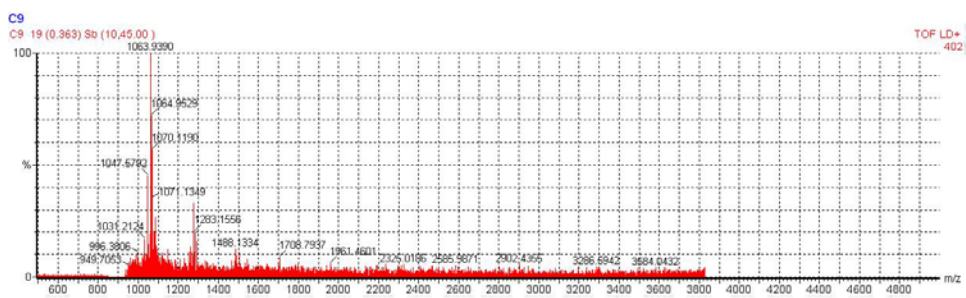
# Protein RAI1



# Bakır transport proteini 86



*Sinaptobrevin benzeri YKT6*



## EK 12 Tanımlanan proteinlerin jellerde bağıl bulunurluğu

<i>Protein</i>		<i>%1</i>	<i>%5</i>	<i>%10</i>	<i>%20</i>	<i>%30</i>
<i>No #</i>	<i>Protein Adı</i>	<i>glukoz,</i> <i>t=33. st</i>	<i>glukoz,</i> <i>t=33. st</i>	<i>glukoz,</i> <i>t=33. st</i>	<i>glukoz,</i> <i>t=33. st</i>	<i>glukoz,</i> <i>t=33. st</i>
1	Kromatin modifikasyon proteini EAF7	20784.2	8045.9	6824.0	22423.2	4469.5
2	RNA polimeraz II transkripsiyon alt ünite mediyatörü	82059.9	16192.2	16024.9	—	29780.7
3	WD tekrarı içeren protein JIP5	11846.4	15365.1	19857.4	17827.7	—
4	Otofaj proteini 18	33670.2	89498.8	23535.2	8210.2	33547.4
5	Protein RAI1	372593.0	61777.5	193004.0	25284.8	99294.3
6	Sinaptobrevin benzeri YKT6	14102.6	4562.2	16272.8	17667.2	20238.8

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Duygu Deniz Yürüt

Doğum Yeri :Ankara

Doğum Tarihi :11.10.1984

Medeni Hali :Bekar

Yabancı Dili :İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Gazi Anadolu Lisesi, 2002

Lisans :Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2007

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Başlama tarihi: Ekim 2007

### Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proje Asistanı -  
Sözleşmeli Personel, 2009

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kan ve Kan Ürünleri - Staj, 2005

### Yayınları:

Yürüt D.D., Demiralp D. Ö., Takaç S, 2009. Glukoz Derişiminin *Debaryomyces hansenii*'nin Hücre Dışı Protein Dağılımına Etkisi, 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Kongre Kitapçığı, 243-245.