T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYA HÜCRELERİNDE 1-BUTANOL ÜRETİLMESİ İLE İLGİLİ GENLERİN ANLATIMININ ARAŞTIRILMASI

Ebru KANIMDAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Ercan ARICAN

Şubat, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 04/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

Doç.Dr. Ercan ARICAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Bedia PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Yard. Doç.Dr. Semian KARAER UZUNER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33661 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmam boyunca değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, beni her zaman destekleyip yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Ercan ARICAN'a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım için her türlü imkanı sağlayan, yardım ve destekleri ile katkıda bulunan değerli Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine, çalışmalarım sırasında yardımlarını hep hissettiğim laboratuvarımızda çalışan tüm araştırmacı arkadaşlarıma, ayrıca bana her zaman destek olan çalışma arkadaşlarıma, ayrıca bana hep destek olan Araş. Gör. Merve YILMAZER ve Araş. Gör. Semih EKİMLER'e,

Tez çalışmamda materyal olarak kullandığım maya hücrelerini sağlayan değerli hocam Yard. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNERE'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemi sağlayan ve hayatımın her aşamasında bana destek olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili AİLEM'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Şubat, 2015 Ebru KANIMDAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **iii**
TABLO LİSTESİ ..... **v**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **vi**
ÖZET ..... **vii**
1.GİRİŞ **1**
2.GENEL KISIMLAR **3**
3. MALZEME VE YÖNTEM **24**
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ORGANİZMA 24
3.1.1. Organizma Üretimi, Saklanması ve Hücre Sayımı 24
3.2. MOLEKÜLER ANALİZLER 28
3.2.1. *S. pombe* 972 h$^-$ Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu 28
3.2.1.1.*S. pombe 972 h$^-$ Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA'ların Miktar ve Saflığının Belirlenmesi* 28
3.2.1.2.*S. pombe 972 h$^-$ Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi Analizi* 29
3.3.TERS TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR)…. 30
4. BULGULAR **33**
4.1. İZOLE EDİLEN TOTAL RNA'LARIN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE GÖRÜNTÜLENMESİ 34
4.2. *S. pombe* 972 h$^-$ HÜCRELERİNDEKİ *ADH1* GEN ANLATIMININ RT-PZR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ 35
5.TARTIŞMA VE SONUÇ **47**
KAYNAKLAR **50**
ÖZGEÇMİŞ **60**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: *S. pombe*'nin sistematik sınıflandırılması 4

Şekil 2.2: *S.pombe*'nin yaşam döngüsü 4

Şekil 2.3: *S. pombe*'nin kromozomlarının yapısı ve adlandırılması 5

Şekil 2.4: (Biyo) bütanol üretiminin dönüm noktaları.....8

Şekil 2.5: Bütanolün kimyasal sentezi gösterilmektedir.....11

Şekil 2.6: Alternatif hammadde ve teknikler ile 1-bütanol üretim süreçleri 12

Şekil 2.7: Clostridial fermentasyonun basitleştirilmiş metabolik yolu.....13

Şekil 2.8: Bazı bakteri ve maya hücrelerinde glikoz fermentasyonunda bütanediol biyosentezi. 14

Şekil 2.9: Maya metabolizmasında aerobik solunumun basit şematik gösterimi 17

Şekil 2.10: Alkol dehidrogenaz enziminin özellikleri 18

Şekil 2.11: *S. pombe'* de *ADH1* geninin III. kromozomdaki yeri.....20

Şekil 3.1: *S .pombe* 972 h^- hücrelerinde anlatım yapan *ADH1* geninin RT-PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primerlerin konumları.....30

Şekil 4.1: *S. pombe* 972 h^- hücrelerinden elde edilen total RNA agaroz jel görüntüsü.....35

Şekil 4.2: UV ışığa maruz bırakılan hücrelerde *ADH1* gen anlatımının agaroz jel görüntüsü....37

Şekil 4.3: UV ışığa maruz bırakılan hücrelerde *ADH1* gen anlatımının agaroz jel görüntüsü....38

Şekil 4.4: UV ışığa maruz bırakılan hücrelerin $YEPD_{0.1}$ besiyerinde *ADH1* gen anlatımının agaroz jel görüntüsü.....39

Şekil 4.5: $YEPD_{0.2}$ besiyeri içerisinde büyütülen UV'ye maruz kalan hücrelerdeki *ADH1* gen anlatımı 40

Şekil 4.6: UV ışığa maruz kaldıktan sonra $YEPD_3$ besiyerinde üretilen hücrelerdeki *ADH1* geninin anlatımı. 41

Şekil 4.7: UV ışığına maruz kalmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* geninin anlatımı. 42

Şekil 4.8: UV ışığa maruz kalmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* geninin anlatımı. 43

Şekil 4.9: UV ışığa maruz kalmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* geninin anlatımı. 43

Şekil 4.10: UV ışığa maruz kalmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde *ADH1* geninin anlatımı. . 44

Şekil 4.11: Hücrelerde *ADH1* gen anlatımının baskılandığı agaroz jel görüntüsü. 45

Şekil 4.12: *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde *ADH1* gen anlatımında meydana gelen değişimlerin grafiksel gösterilmesi. 46

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: *S. pombe*'ye ait gen ve genom özellikleri 5

Tablo 2.2: 1-Bütanol ve etanolün yakıt özelliklerinin karşılaştırılması. 7

Tablo 2.3: Bütanol izomerleri, formülleri ve moleküler yapıları. 8

Tablo 2.4: Bütanolün fiziksel ve kimyasal özellikleri.....9

Tablo 3.1: Maya özütlü zengin besiyeri içeriği ve maya özütlü peptonlu dekstroz içeren besiyeri.....25

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan farklı pH seviyelerindeki YEPD besiyerleri. 25

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan farklı $ZnSO_4$ konsantrasyonlarındaki YEPD besiyerleri.....25

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan farklı pH ve NaCI konsantrasyonlarındaki YEPD besiyerleri. 26

Tablo 3.5: Çalışmada kullanılan farklı NaCI ve $ZnSO_4$ konsantrasyonlarındaki YEPD besiyerleri. 26

Tablo 3.6: Çalışmada kullanılan farklı pH ve $ZnSO_4$ konsantrasyonlarındaki YEPD besiyerleri. 27

Tablo 3.7: Çalışmada kullanılan sadece NaCI içeren YEPD besiyerlerinin içeriği. 27

Tablo 3.8: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar. 29

Tablo 3.9: RT-PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları. 30

Tablo3.10:*S.pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* geninin anlatımının RT-PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primer çifti. 31

Tablo 3.11: Çalışmada uygulanan RT-PZR döngüleri. 31

Tablo 4.1:*S. pombe* 972 h^- hücrelerinden izole edilen total RNA konsantrasyonları ve Absorbans oranları. 33

Tablo 4.2: *S. pombe* 972 h^- hücrelerde *ADH1* gen anlatımında meydana gelen değişimler. 36

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

CO : Karbon monoksit
Co : Kobalt
CO_2 : Karbon dioksit
H : Hidrojen
H_2O : Su
NaCI : Sodyum klorür
^oC : Santigrad derece
ppm : Milyonda bir birim
$ZnSO_4$: Çinko sülfat

Kısaltmalar **Açıklama**

ABE : Aseton-Bütanol-Etanol
ACAT : Asetil-koenzim A asetil transferazlar
ADH : Alkol dehidrogenaz
diğ : Diğerleri
DNA : Deoksiribonükleik asit
dNTP : Deoksiribonükleozid trifosfat
g : Gram
kb : Kilobaz
kDa : Kilodalton
kg : Kilogram
L : Litre
M : Minus
Mb : Megabaz çifti
Mj : Megajoule
mM : Milimolar
MPa : Megapaskal
NAD : Nikotinamid adenin dinükleotit
nm : Nanometre
P : Plus
PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA : Ribonükleik asit
RT-PZR : Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
TAE : Tris-Asetat-EDTA
UV : Ultraviyole
v : Hacim
w : Ağırlık

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYA HÜCRELERİNDE 1-BUTANOL ÜRETİLMESİ İLE İLGİLİ GENLERİN ANLATIMININ ARAŞTIRILMASI

Ebru KANIMDAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ercan ARICAN

Bu çalışmada, ultraviyole ışığa maruz bırakılan ve bırakılmayan *S. pombe* 972 h^- hücreleri farklı içerikte (NaCI, $ZnSO_4$ ve pH) hazırlanan besiyerlerinde üretildikten sonra bu hücrelerdeki 1-bütanol üretimi ile ilişkili olduğu düşünülen *ADH1* gen anlatımının, RT-PZR yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; deney gruplarının yarısı ilk etapta 20, 25 ve 30 dakika süresince UV ışığa maruz bırakıldı. Daha sonra, bu grup ve UV ışığa maruz bırakılmayan hücreler farklı pH (1-3) aralığında, farklı NaCI (% 2, 4 ve 6) ve $ZnSO_4$ (10, 15 ve 20 mM) konsantrayonlarında hazırlanmış olan besiyerlerinde üretildi. Her iki grupta üretilen *S. pombe* 972 h^- hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı ve bu hücrelerdeki *ADH1* gen anlatımında meydana gelen değişimler moleküler düzeyde RT-PZR yöntemi kullanılarak belirlendi.

Sonuç olarak, $YEPD_4^{**}$ ve $YEPD_6$ besiyerinde üretimi gerçekleştirilen *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde ADH1 gen anlatımı aynı kalırken, $YEPD_5$ besiyerinde üretilen *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde ADH1 gen anlatımında artış meydana geldiği saptandı. Diğer besiyerlerinde üretilen *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde ise ADH1 gen anlatımında azalma olduğu tespit edildi.

Şubat 2015, 70 sayfa.

Anahtar kelimeler: *S. pombe* 972 h$^-$, 1-Bütanol, *ADH1* Geni, Ultraviyole, Çinko Sülfat.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

RESEARCH ON EXPRESSION OF THE RELATED GENES WITH 1-BUTANOL PRODUCTION IN YEAST CELLS

Ebru KANIMDAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Doç. Dr. Ercan ARICAN

In this study, it was aimed to understand the expression of ADH1 gene which is related to 1-butanol in cells via RT-PCR method applied to UV light-subjected and non-subjected S. pombe 972 h^- cells that were cultured in varius media with different compositions (pH, NaCI, $ZnSO_4$). With this perspective, first, half of the experimental groups were subjected to UV light for 20, 25, and 30 minutes. Later these groups and non-subjected groups were cultured in media that have different pH (1-3), NaCI concentration (% 2, 4 and 6) and $ZnSO_4$ (10, 15 and 20 mM). Total RNA isolation was performed for each group and alterations in gene expression levels of ADH1 gene were determined by RT-PCR in molecular level.

As a result, when the cells of *S. pombe* 972 h^- were produced in medium $YEPD_4$** and $YEPD_6$, the expresion of *ADH1* gene was no change, however, the cells of *S. pombe* 972 h^- were produced in medium $YEPD_5$ the expression of *ADH1* gene was induce. . Produced in other media, the cells of *S. pombe* 972 h^- were found to be decreased in *ADH1* gene expression.

February 2015, 70 pages.

Keywords: *S. pombe* 972 h^-, 1-Butanol, *ADH1* Gene, Ultraviolet, Zinc Sulfate.

1.GİRİŞ

Maya hücreleri ile ökaryotik hücrelerde, replikasyon, rekombinasyon ve hücre bölünmesi gibi temel hücresel süreçler birbirine çok benzemektedir. Bu benzerlikten dolayı, maya hücreleri birçok moleküler araştırmalar için model organizma olarak kullanılmaktadır. Genellikle, moleküler biyoloji laboratuvarlarında *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ve *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) en çok çalışılan maya hücreleridir. *S. pombe* hücreleri ile özellikle, mayoz, mitoz, hücre döngüsü kontrolü, rekombinasyon ve DNA onarımına ilişkin çalışmalar yapılmaktadır (Wood ve diğ., 2002). *S. cerevisiae* hücreleriyle ise, yaşam döngüsü, farklılaşmanın, rekombinasyon ve genetik materyalin aktarılması konularının anlaşılmasına yönelik çalışmalar yürütülmektedir (Leupold, 1993).

Dünyadaki petrol rezervlerinin aşırı kullanımı sonucu fosil yakıtların hızla tükenmekte olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, yenilenebilir ve alternatif enerji kaynaklarının üretimini artırmak ve gündelik yaşama hızlı bir şekilde adapte etmek gerekmektedir (Öğüt ve Kuş, 1999). Günümüzde bilinen alternatif yakıt kaynaklarından bazıları etanol, metanol ve bütanoldür (Demain, 2009; Qureshi ve diğ., 2013). Özellikle, alternatif bir yakıt kaynağı olan etanol ile 1-bütanol karşılaştırıldığında, benzin ve dizel yakıtlarla etanolden daha iyi karışabilmektedir. 1-Bütanolün enerji içeriği etanolden % 25 daha yüksektir ve % 22 oranında oksijen içerir, bu durum etanole göre daha temiz yanmasını sağlar (Akçay ve diğ., 2012). Bu sebeplerden dolayı, etanole göre, daha fazla fizikokimyasal avantaja sahip, 1-bütanol üretimine olan ilgi son yıllarda artmıştır (Qureshi ve diğ., 2000b; Ni ve Sun, 2009). Yapılan araştırmalarda, etanol üretiminden sorumlu olan *ADH1* geninin, 1-bütanol ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Si ve diğ., 2014). *S.cerevisiae* ile yapılan çalışmalar sonucunda, Adh1 enziminin 1-bütanol üretimi ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Niemistö ve diğ., 2013).

Bu araştırmada; farklı besiyeri koşulları altında (pH, $ZnSO_4$, NaCI ve UV ışığa maruz bırakılan) *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde 1-bütanol üretiminden sorumlu olduğu düşünülen *ADH1* geninin anlatımındaki değişimlerin ters transkriptaz polimeraz zincir

reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi kullanılarak saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 20, 25 ve 30 dakika boyunca UV ışığa maruz kalan *S. pombe* 972 h^- hücreleri, farklı pH (1, 2 ve 3) değerlerinde ve farklı konsantrasyonlarda $ZnSO_4$ (10, 15 ve 20 mM) ile NaCI (% 2, 4 ve 6) ilave edilerek hazırlanan besiyerlerinde üretimleri gerçekleştirildi. Buna ek olarak, UV ışığa maruz bırakılmayan *S. pombe* 972 h^- hücreleri aynı koşullardaki besiyerlerinde üretildi.

Sonuç olarak, UV ışık, farklı konsantrasyonlardaki $ZnSO_4$ ile NaCI ve pH değerleri *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* gen anlatımı üzerine etki ettiği saptandı.

2.GENEL KISIMLAR

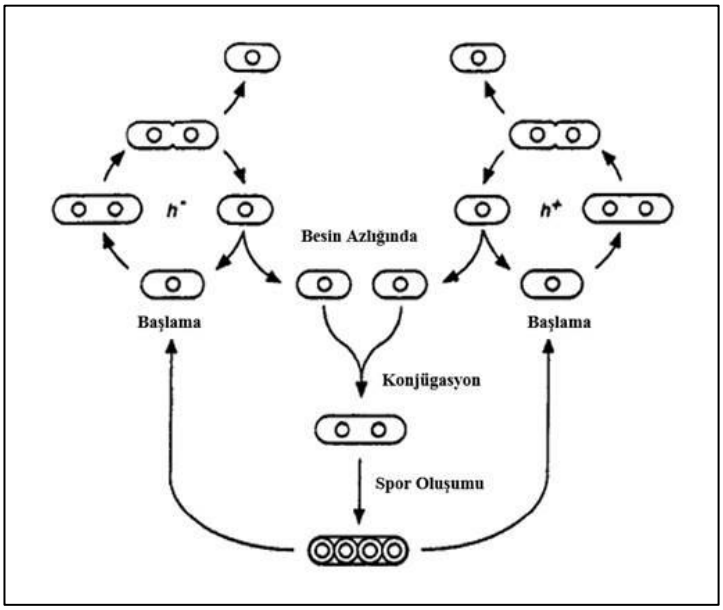
Mayalar, çok geniş bir yelpazeyi kapsayan tek hücreli mantarlardır. Moleküler biyoloji çalışmalarında en çok kullanılan türleri, tomurcuklanan ya da ekmek mayası olarak bilinen *Sacchoromyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ve fizyon ya da bölünen maya olarak isimlendirilen *Schizosaccharomyces pombe* (*S.pombe*)'dir (Forsburg, 2005). Genel olarak her ikisi de maya olarak adlandırılsalar da, bu iki türün evrimsel olarak birbirlerinden farklı oldukları ve ortak atadan 1 milyar yıldan daha fazla süre önce ayrıldıkları tahmin edilmektedir (Heckman ve diğ., 2001). *S. cerevisiae*, 1930'lu yıllarda laboratuvar çalışmalarında yer almaya başlamış ve bu yıllarda, yaşam döngüsünün ve farklılaşmanın anlaşılmasına yönelik çalışmalarda kullanılmıştır (Leupold, 1993). 1970'li yıllarda, rekombinasyon ve genetik materyalin aktarılması konularının anlaşılmasında model organizma olarak kullanılması ile *S. cerevisiae* moleküler çalışmalarda popülerlik kazanmaya başlamıştır (Forsburg, 2005). Ayrıca, 24 Nisan 1996 yılında ilk genomu dizilenen model organizma ünvanını almıştır (Goffeau ve diğ., 1996). *S. pombe'*nin ise, genetik çalışmalarda yer alması 1940'ların sonlarını bulmuştur. *S. pombe* ile yapılan ilk çalışmalarda, iki önemli isim makalelerde yer almaktadır. İlk isim, 1950'lerde *S. pombe*'nin genetiği ile ilgili çalışmalar yapmış olan Urs Leupold'tür. Diğer isim ise, 1970'li yıllarda Leupold'ün yapmış olduğu çalışmalar ile *S. pombe*'nin genetiği hakkında bilgi edindikten sonra, Edinburg'a *S. pombe'*yi getirip mitoz bölünme ve DNA sentezi çalışmalarında kullanan Paul Nurse'tür (Mitchison, 1957).

S. pombe, Ascomycetes sınıfından patojen olmayan, tek hücreli bir mayadır (Şekil 2.1). Hücreler çubuk şeklinde olup, 3-4 µm çapında ve 7-14 µm boyundadırlar. Genelde, haploid yapılı, eşeysiz bölünen bir maya türüdür. Eşeysiz bölünmeden sonra, aynı boyutta iki kardeş hücre meydana gelmektedir. Ancak, ortamda besin eksikliği (özellikle nitrojen kaynağı eksikliğinde) olduğu zaman, zıt eşem tiplerine sahip haploid hücrelerin [*P* (*plus*) ve *M* (*minus*)], karyogami sonucunda meydana getirdiği iki çekirdekli hücreler, mayoz bölünme geçirerek zigotları oluşturur. Zigotlar, askuslardan gelişmektedir ve askuslar, 4 adet haploid askospor hücresinden oluşmaktadır. Bu

hücreler ortam şartları normale döndüğü zaman tekrar hücre döngüsüne devam etmektedirler (Egel, 2004). *S. pombe*'de, hücre döngüsü, G1, Sentez (S), G2 ve Mitoz (M) evrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Ayrıca, hücre döngüsü için toplam geçen zamanın %70'ni G2 oluşturmaktadır. Yüksek yapılı organizmalar ile karşılaştırıldığında ise, hücre döngüsünün süresi dışında, çok az farklılık bulunduğu belirtilmektedir (Tvegard, 2007).

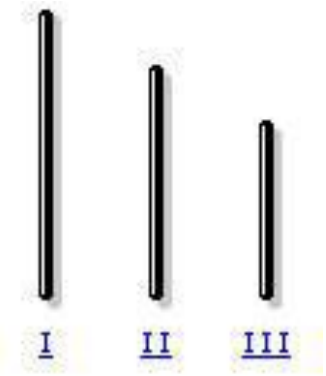
Alem: Fungi
Şube: Ascomycota
Sınıf: Schizosaccharomycetes
Takım: Schizosaccharomycetales
Familya: Schizosaccharomycetaceae
Cins: *Schizosaccharomyces*
Tür: *S. pombe*

Şekil 2.1: *S. pombe*'nin sistematik sınıflandırılması (Lindner, 1893).



Şekil 2.2: *S.pombe*'nin yaşam döngüsü (http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/main4.html).

S. pombe, küçük ve yoğun bir genoma sahip ve toplam 3 kromozom içermektedir. Genom boyutu yaklaşık olarak 14 milyon baz çiftidir; I. Kromozom 5.7 megabaz (Mb), II Kromozom 4.6 Mb ve III Kromozom 3.5 Mb boyutunda olup, yapıları doğrusaldır ve 4,940 gene sahiptir (Şekil 2.3) (Wood ve diğ., 2002). Gen yoğunluğu en az olan, kromozom III'tür (Egel, 2004).



Şekil 2.3: *S. pombe*'nin kromozomlarının yapısı (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects).

S. pombe'de bulunan genlerin yaklaşık olarak % 43'ü intron içermektedir ve genlerin büyük çoğunluğu (~ % 75) sadece bir ya da iki adet intron içermektedir (Tablo 2.1) (Wood ve diğ., 2002).

Tablo 2.1: *S. pombe*'ye ait gen ve genom özellikleri (http://www.sanger.acuk/Project/S_pombe/genome_stats.shtml).

Genom Yapısı ve Organizasyonu	
Genom Boyutu	12.57 Mbp
Kromozom Sayısı	3
Kromozomların Boyut Aralığı	2.45 Mbp - 5.58 Mbp
Gen Sayısı (Kromozom I,II ve III'te protein kodlayan)	5123
Gen yoğunluğu (Mb başına)	554.57
Mitokondriyal % GC içeriği	% 30.09
Mitokondriyal Genom Boyutu	19.43
İntron Sayısı	~ 4730
İntron içeren gen sayısı	~ 2230 (%43)
Sentromer Boyutu	35-110 kb

Basit laboratuvar koşullarında çalışılabilmesi, kolaylıkla üretilebilmesi, haploid genoma sahip olması ve mutasyon çalışmalarının kolaylıkla yapılabilmesi gibi özellikleri *S.pombe*'nin moleküler çalışmalar için uygun bir model organizma olarak seçilmesinde etkili olan etmenlerdir (Giga-Hama ve Kumagai, 1999). *S. pombe* ile özellikle, mayoz, mitoz, hücre döngüsü kontrolü, rekombinasyon ve DNA onarımına ilişkin çalışmalar yapılmaktadır (Wood ve diğ., 2002).

Dünya enerji ihtiyacının büyük bir kısmını kömür, petrol ve doğal gaz gibi fosil kaynaklı yenilenemeyen enerjilerden karşılamaktadır. Ancak, petrol rezervlerinin aşırı kullanımı sonucu hızla tükenmekte ve bunun yanı sıra sıvı ve katı yakıtların yanması sonucu ortaya çıkan çevre kirliliğindeki artış ile fosil yakıtlar ekolojik dengede geri dönülemeyecek bozukluklara neden olmaktadır. Bu olumsuzlukların azaltılabilmesi için mevcut enerji kaynaklarının etkin ve verimli kullanılması gerektiği gibi, güneş, rüzgar, nükleer, dalga jeotermal, hidrolik, hidrojen ve biyokütle gibi yenilenebilir ve alternatif enerji kaynaklarını hızlı bir şekilde gündelik yaşama adapte edip daha çok kullanılabilir konuma getirmek gerekmektedir (Öğüt ve Kuş, 1999). Bilinen bazı alternatif yakıt kaynakları ise; biyodizel, biyoalkol (metanol, etanol, butanol), bitkisel yağlar ve propandır (http://biofuel.org.uk/).

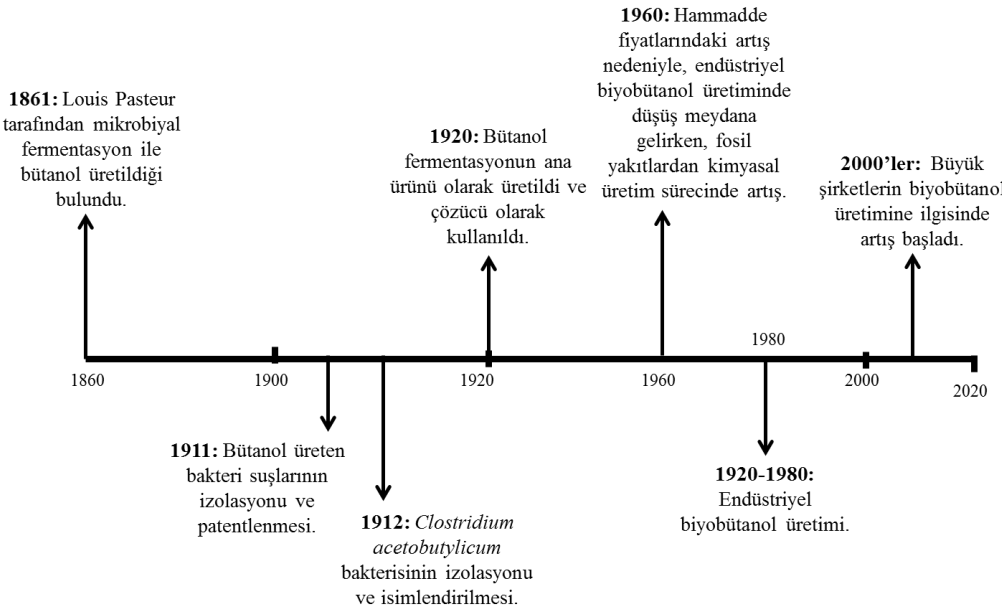
Son yıllarda, alternatif yakıt üretimi ile ilgili çalışmalarda, *S. cerevisiae* kullanılmaktadır. Özellikle, alternatif bir yakıt kaynağı olan etanol üretiminde *S. cerevisiae* tercih edilmektedir (Hong ve Nielsen, 2012). Etanol, iki karbonlu, kimyasal formülü C_2H_5OH olan, renksiz, uçucu, hafif kokulu, dumansız yanan bir alkoldür (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702?from=summary). Petrol türevlerinden veya arpa, buğday, mısır ve şeker kamışı gibi biyolojik hammaddelerden, fermentasyon yolu ile üretilebilmektedir. Üretilen etanol, kozmetik, boya, yapıştırıcılar, yağ asitleri, kauçuk, plastik yapımı gibi endüstriyel uygulamalarda, içki sanayisinde (Carvalho ve diğ., 2012) ve benzine çeşitli oranlarda karıştırılarak yakıt üretiminde kullanılmaktadır (Escobar ve diğ., 2009). Ancak, etanolün korozif olması, enerji içeriğinin düşük olması, kolay buharlaşabilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.Ayrıca, motorlu araçlarda % 85 oranında etanol kullanabilmek için araçların motorlarının modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu olumsuz yönlerinden dolayı, etanole göre, daha fazla fizikokimyasal avantaja sahip, 1-bütanol üretimine olan ilgi son yıllarda artmıştır (Qureshi, 2000b; Ni

ve Sun, 2009). Mükemmel yakıt özelliklerine sahip bir kimyasal olan bütanol, benzin ve dizel yakıtlarla etanolden daha iyi karışabilmektedir. Enerji içeriği etanolden % 25 daha yüksektir, % 22 oranında oksijen içerir, bu durum etanole göre daha temiz yanmasını sağlar ve buharlaşma oranı benzin ve etanolden daha düşüktür (Tablo 2.2) (Akçay ve diğ., 2012). Bütanolün enerji içeriği (105.000 Btu/galon) benzinin enerji içeriğine (114.000 Btu/galon) yakındır. Etanolün enerji içeriği (84.000 Btu/galon) ise bütanol ve benzine göre oldukça düşüktür (Demirbaş, 2008). Ayrıca, 1-bütanol etanole göre çok daha az korozif olduğu için güncel sistemdeki borularla taşınabilmekte ve dağıtılabilmektedir (Lee ve diğ., 2008; Thang ve diğ., 2010; Nigam ve Singh, 2011).

Tablo 2.2: 1-Bütanol ve etanolün yakıt özelliklerinin karşılaştırılması (Akçay ve diğ., 2012).

	Bütanol	**Etanol**
Enerji Yoğunluğu (Mj/L)	29,2	19,6
Oksijen İçeriği (% ağırlık)	21,6	34,8
Hava-Yakıt oranı	11,2	9
Buharlaşma Isısı (Mj / kg)	0,43	0,92
Oktan Sayısı	96	129
Motor Oktan Sayısı	78	102

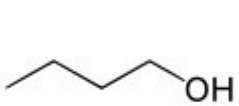
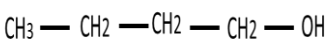
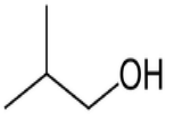
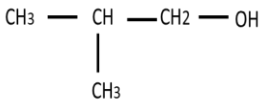
Bütanol, mikroorganizmalarda ilk olarak 1861 yılında, Louis Pasteur tarafından keşfedilmiştir (Gabriel, 1928). 1911 yılında Fernbach tarafından, patatesten bütanol üreten bir bakteri kültürü olduğu belirlenmiş ve 1912 yılında, Fernbach'in asistanı Weizmann tarafından bu bakterinin *Clostridium acetobutylicum* olduğu saptanmıştır (Gabriel, 1928; Jones ve Woods, 1986). 1945 yılında, Birleşik Devletler için Aseton-Bütanol-Etanol (ABE) fermentasyonu ile bütanol üretimi, endüstrinin büyük bir bölümünü oluştururken, 1960'larda hammadde fiyatlarındaki artış nedeniyle bütanole olan ilgi azalmıştır. Sadece, Rusya ve Güney Afrika'da, substrat ve iş gücü maliyetleri düşük olduğu için ABE fermentasyonu çalışmalarına 1990'ların başına kadar devam edilmiştir. 2006 yılında, Rusya ve Çin'de yeniden ABE fermentasyonu ile üretim yapmaya başlayan şirketlerin kurulması ile tarımsal atıkları kullanarak 1-bütanol üretimine yeniden hız kazanmıştır (Zverlov ve diğ., 2006; Ni ve Sun, 2009). Bütanol üretiminin tarihsel dönüm noktaları Şekil 2.4'te verilmektedir (Niemistö ve diğ., 2013).



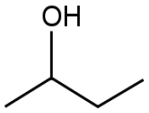
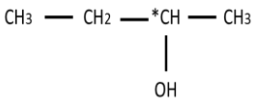
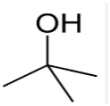
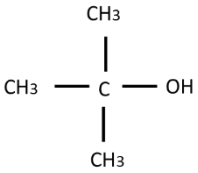
Şekil 2.4: (Biyo) bütanol üretiminin dönüm noktaları (Niemistö ve diğ., 2013).

Bütanol, bütil alkol veya biyokütlelerden oluşuyorsa, biyobütanol olarak adlandırılmaktadır. Bütanolün, *n*-bütanol, *iso*-bütanol, *sec*-bütanol ve *tert*-bütanol olarak adlandırılan dört adet izomeri bulunmaktadır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Bütanol izomerleri, formülleri ve moleküler yapıları (Hahn ve diğ., 2012).

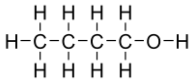
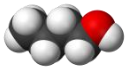
İzomer	Moleküler Yapısı	Kimyasal Formülü
n-bütanol 1-bütanol		
iso-bütanol 2-metil-1-propanol		

Tablo 2.3 (devamı): Bütanol izomerleri, formülleri ve moleküler yapıları (Hahn ve diğ., 2012).

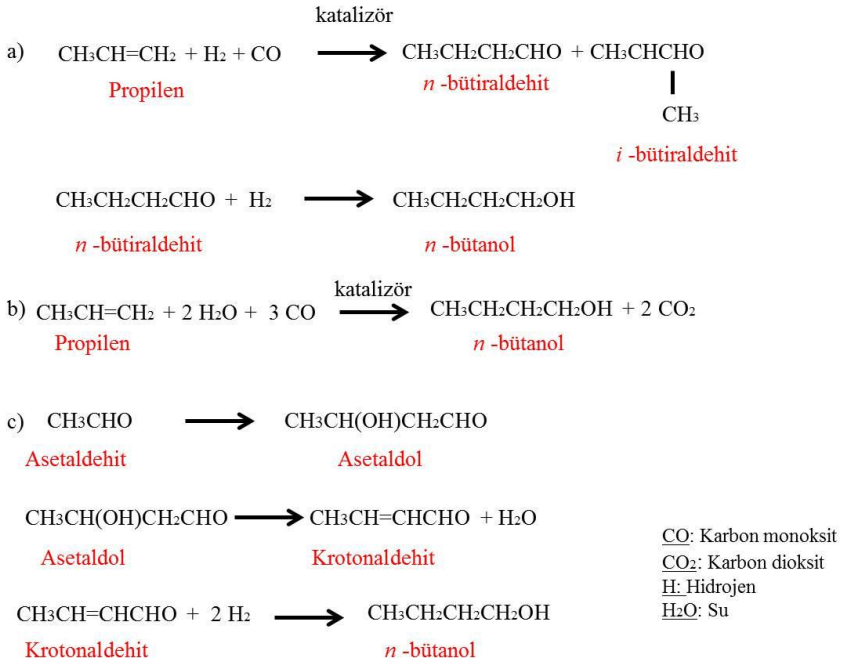
sec-bütanol 2-bütanol		
tert-bütanol 2-metil-2-propanol		

Bütanolün kimyasal formülü C_4H_9OH ve molekül ağırlığı 74.1216 g/mol olan düşük viskoziteli, renksiz, yanıcı ve muz-benzeri kokusu olan bir alkoldür (Tablo 2.4) (Dürre, 2008; Lee ve diğ., 2008). Suda çözünürlüğü 70 g/L olmasına rağmen, yaygın olarak kullanılan bütün organik çözücüler içinde bütanol çözünebilmektedir (Dürre, 2008).

Tablo 2.4: Bütanolün fiziksel ve kimyasal özellikleri (Lee ve diğ., 2008).

n-Bütanol (1-Bütanol, Bütil alkol, Metilol propan) Özellikleri	
Kimyasal Formülü	CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-OH
Kimyasal Yapısı	
3 Boyutlu Yapısı	
Moleküler Ağırlığı (g/mol)	74,1216
Kaynama Noktası (^oC)	116-118
Erime Noktası (^oC)	-89,5
Yoğunluk (g/cm^3) (20 ^oC)	0,81
Patlama Noktası (^oC)	34
Kendi Kendine Tutuşma Sıcaklığı (^oC)	345

Kimyasal yöntemler ile 1-bütanol üretimi, üç aşama ile gerçekleşmektedir. İlk aşama; okso sentezidir. Okso sentezi, hidroformilasyon olarak da bilinmektedir ve bu aşamada, yüksek basınç altında, kobalt (Co), rodyum (Rh) ve rutenyum (Ru) gibi katalizörler aracılığı ile alkenlerden, aldehit üretimi yapılmaktadır. Ortamda bulunan propilene, karbon monoksit (CO) ve hidrojen (H_2) eklenerek, *n*-bütiraldehit ve *iso*-bütiraldehit elde edilmektedir. Daha sonra, bu aldehit karışımlarının, hidrojenasyonu ile, *n*-bütanol ve *iso*-bütanol üretimi gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.5a) (Hahn ve diğ., 2012; Falbe, 1970). Okso sentezindeki katalizörler, farklı basınç ve sıcaklık koşullarına göre görev almaktadır. Örneğin, Co için sıcaklık 110-180^oC, basınç ise 5-35 MPa aralığında iken, Rh ve Ru için, bu değerler 70-120^oC ve 1.5-30 MPa olması gerekmektedir (Chauvel ve diğ., 1989). İkinci aşama ise, Reppe sentezidir. Bu aşama da, propilen, CO ve sudaki H_2 ile başlamaktadır ve katalizör aracılığı ile düşük basınç ve sıcaklık altında (100^oC ve 0.5-2MPa) reaksiyon gerçekleşerek, *n*-bütanol ve *iso*-bütanol üretilmektedir. Bu aşamada okso sentezinden farklı olarak, karbon dioksit (CO_2) açığa çıkmaktadır (Şekil 2.5b) (Hahn ve diğ., 2012; Niemistö ve diğ., 2013). Bu reaksiyon ile bütanol üretimi daha pahalı olduğu için tercih edilmemektedir (Hahn ve diğ., 2012; Chauvel ve diğ., 1989; Falbe, 1970). Üçüncü aşama da ise, krotonaldehit hidrojenasyonudur. Bu süreçte, asetaldehitden aldolizasyon ile asetaldol oluştuktan sonra dehidratasyon ile krotonaldehit elde edilir ve elde edilen krotonaldehitin hidrojenasyonu ile 1- bütanol oluşur (Şekil 2.5c) (Hahn ve diğ., 2012; Weissermel ve Arpe, 2003).



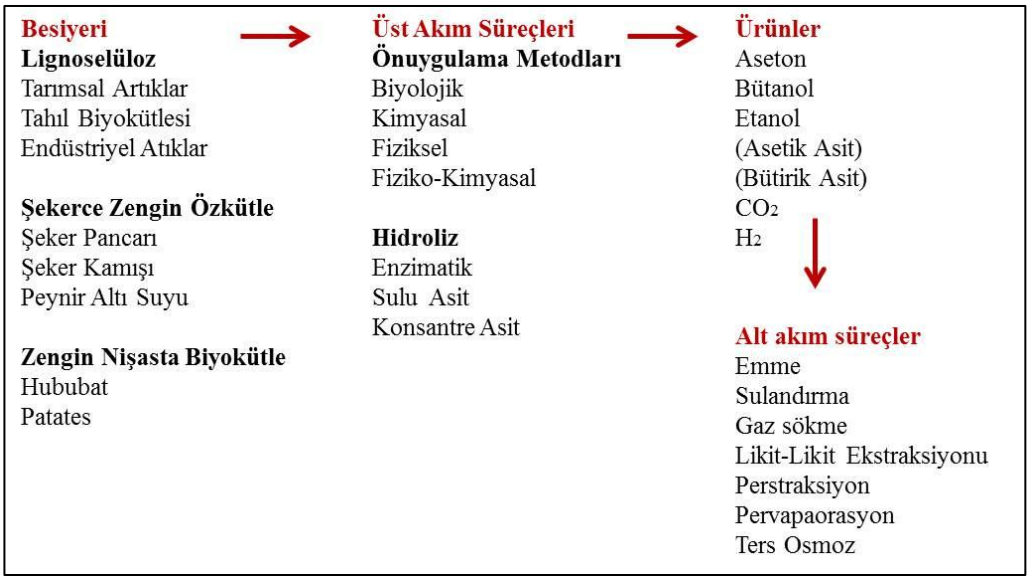
Şekil 2.5: Bütanolün kimyasal sentezi gösterilmektedir (Niemistö ve diğ., 2013).

1-Bütanol'ün biyokimyasal üretimi ise, fermentasyon veya ABE fermentasyonu olarak da bilinen süreç ile olmaktadır. Bu süreçte, tarımsal ve endüstriyel atıkların yan ürünleri ve kalıntıları hammadde olarak kullanılmaktadır ve bu süreç, Şekil 2.6'da gösterilmektedir (Qureshi ve diğ., 2013).

Fermentasyon ile 1-bütanol üretiminde ilk adım; hammadde seçimidir (Şekil 2.6). Seçilecek olan hammaddenin, fermentasyona uyumlu ve düşük maliyetli olmasına dikkat edilmelidir (Lynd ve diğ., 1999). Ayrıca, hammadde, ekinlerden seçiliyorsa, büyüme süreci de göz önünde bulundurulmalıdır. İlave olarak, lignoselüloz içeren hammaddeler daha karışık olduğundan, nişasta temelli hammaddelerden 1-bütanol üretimi endüstriyel üretim için daha uygun olduğu belirtilmektedir. Genellikle, melas, patatesten elde edilen nişasta ve mısır, 1-bütanol üretiminde çok sık kullanılan hammaddelerdir (Garcia ve diğ., 2011). Ayrıca, son yıllarda maliyeti düşürebilmek için bazı yeni hammaddelerle, ABE üretimi ile ilgili çalışmalar başlamıştır. Bu hammaddeler; manyok bitkisi (Thang ve diğ., 2010) ve mısır lifi (Qureshi ve diğ., 2008a; Qureshi ve diğ., 2006), arpa sapı (Qureshi ve diğ., 2010a), mısır koçanı (Qureshi ve diğ., 2010b), saman (Qureshi ve diğ., 2008b; Qureshi ve diğ., 2008c) ve dallı darı

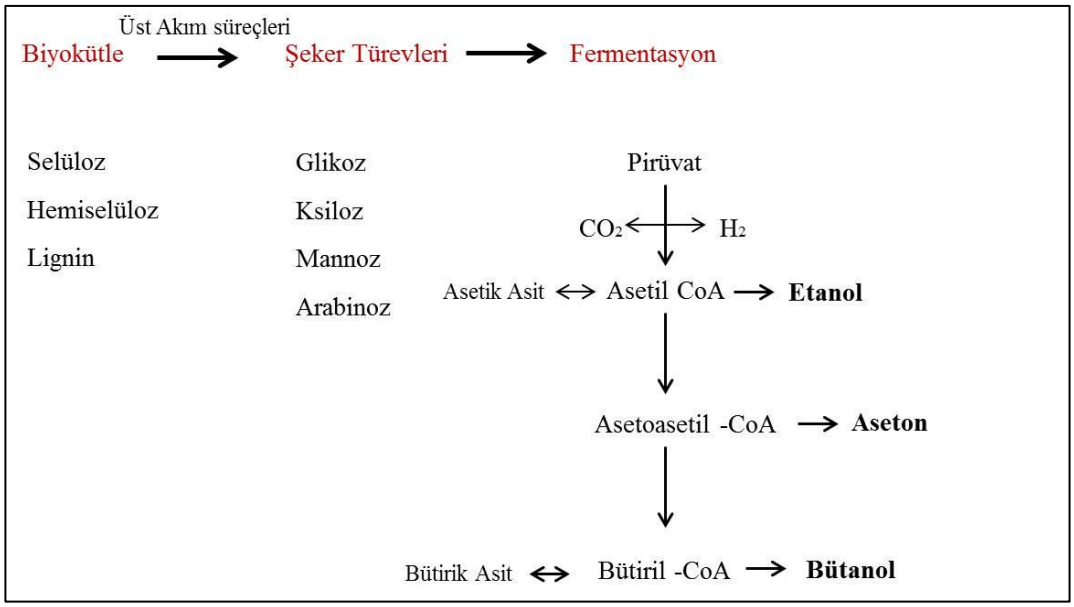
(Qureshi ve diğ., 2010b) gibi tarımsal atıklardır. Ayrıca, peynir altı suyu (Qureshi ve Maddox, 2005), pirinç ve buğday kepeği gibi endüstriyel yan ürünler de çalışmalar yapılmaktadır (Liu ve diğ., 2010). Uygun hammadde seçildikten sonra da hammaddenin fermentasyon için ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir. Örneğin, lignoselüloz; selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır (Cherubini, 2010). Selülozun yapısında glukoz bulunurken, hemiselülozun yapısında D-galaktoz, D-glukoz, D-ksiloz, D-mannoz ve L-arabinoz bulunmaktadır (Qureshi N. ve diğ., 2008a). Fermentasyon için gerekli olan glukozun açığa çıkarılması için bu hammaddelerin daha uzun süreli ön işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir (Niemistö ve diğ., 2013).

Fermentasyon öncesinde hammaddelere, fiziksel (ezme, öğütme veya ufalama), fiziko-kimyasal (buharla veya amonyum fiberle genleştirme ve sıcak su ile muamele), kimyasal (seyreltilmiş ya da konsantre asit hidrolizi, alkali hidroliz ve oksidatif delignifikasyon) ve biyolojik (mantarlar ile muamele) yöntemler gibi ön işlemler yapılmalıdır (Şekil 2.6) (Kumar ve diğ., 2009; Taherzadeh ve Karimi, 2008; Jorgensen ve diğ., 2007; Mosier ve diğ., 2005).

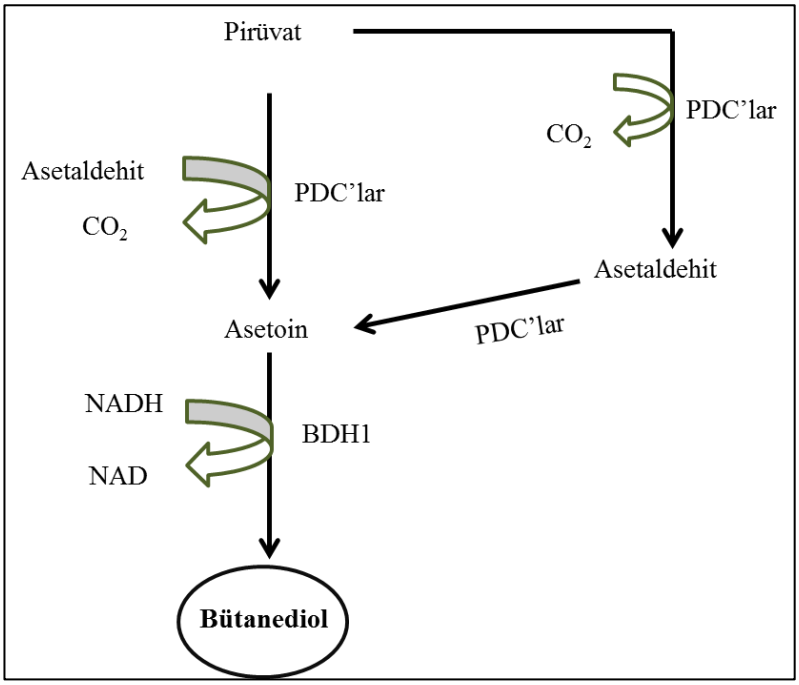


Şekil 2.6: Alternatif hammadde ve teknikler ile 1-bütanol üretim süreçleri (Niemistö ve diğ., 2013).

Ön işlemden sonra ancak fermentasyon süreci yapılabilmektedir. Fermentasyon, asidojenik faz ve solventojenik fazdan oluşmaktadır. Asidojenik fazda; bakteriler büyürken, 5 ve 6 karbonlu şekerlerden glikoliz sonucu oluşan pirüvattan, asetik ve bütirik asit, CO_2 ve H_2 oluşmaktadır (Şekil 2.7). Ayrıca, birçok bakteri ve maya türlerinde, alkolik fermentasyonda, glikozun fermentasyonu sırasında son ürün olarak bütanediol meydana geldiği bilinmektedir. Ancak henüz meydana gelen bu ürünün metabolik görevi tespit edilememiştir (Şekil 2.8). Logaritmik fazın sonunda meydana gelen asitler ortam pH'ını düşürdüğünden (Zheng ve diğ., 2014), bakteri, ortam koşullarına adapte olabilmek için, oluşan bu asitleri, aseton, bütanol ve etanole sırasıyla, 3:6:1 oranında dönüştürmektedir ve bu dönüşümün gerçekleştiği süreçte solventojenik faz olarak adlandırılmaktadır (Qureshi ve diğ., 2010a).



Şekil 2.7: Clostridial fermentasyonun basitleştirilmiş metabolik yolu (Qureshi ve diğ., 2010a).



Şekil 2.8: Bazı bakteri ve maya hücrelerinde glikoz fermentasyonun da bütanediol biyosentezi(http://pathway.yeastgenome.org).

Fermentasyondan sonra oluşan ürünleri ayırmak için alt akım (downstream process) yapılmaktadır. Geleneksel olarak oluşan ürüleri ayırmak için en çok kullanılan yöntemler içerisinde, adsorpsiyon (Qureshi ve diğ., 2005), sıvı-sıvı ekstraksiyonu (Groot ve diğ., 1990; Qureshi ve Maddox, 1995), pervaporasyon (Qureshi ve Blaschek, 2000; Qureshi ve Blaschek, 2001), perstraksiyon (Grobben ve diğ., 1993; Qureshi ve Maddox, 2005) ve ters osmoz bulunmaktadır (Garcia ve diğ., 1985).

1-bütanol üretiminin biyolojik sentezi olan ABE fermentasyonu, *Clostridium* bakterileri tarafından gerçekleştirilmektedir (Lee ve diğ., 2008). Bu bakteriler, gram pozitif, anaerobik bakterilerdir. Yavaş büyürler ve yaşam döngüsünde spor formda olmaları endüstriyel açıdan sorun yaratmaktadır. Ayrıca, fermentasyon sırasında meydana gelen, bütirat, aseton ve etanol gibi yan ürünler, 1-bütanol üretiminin kontrol edilmesini zorlaştırmaktadır (Jones ve Woods, 1986). İlave olarak, 1-bütanolü ve oksijeni tolere etme yeteneklerinin düşük olması bu organizmalarda ABE fermentasyonunun geliştirilmesini engellemektedir. Bu sebeple, endüstriyel açıdan bütanol üretimini destekleyici *Escherichia coli* (*E.coli*) veya *S.cerevisae* gibi başka organizmalar kullanılmaya çalışılmaktadır (Peralta-Yahya ve diğ., 2012). *S. cerevisae*; *E. coli* ve

Clostridium ile karşılaştırıldığında, daha az bütanol üretiyor olmasına rağmen (Krivoruchko ve diğ., 2013), düşük pH'tan etkilenmemesi (Hong ve Nielsen, 2012) ve bütanole karşı toleransının yüksek olması nedeniyle bütanol üretim çalışmalarında önemli bir avantaj sağlamaktadır (Gonzalez-Ramos ve diğ., 2013; Knoshaug & Zhang, 2009).

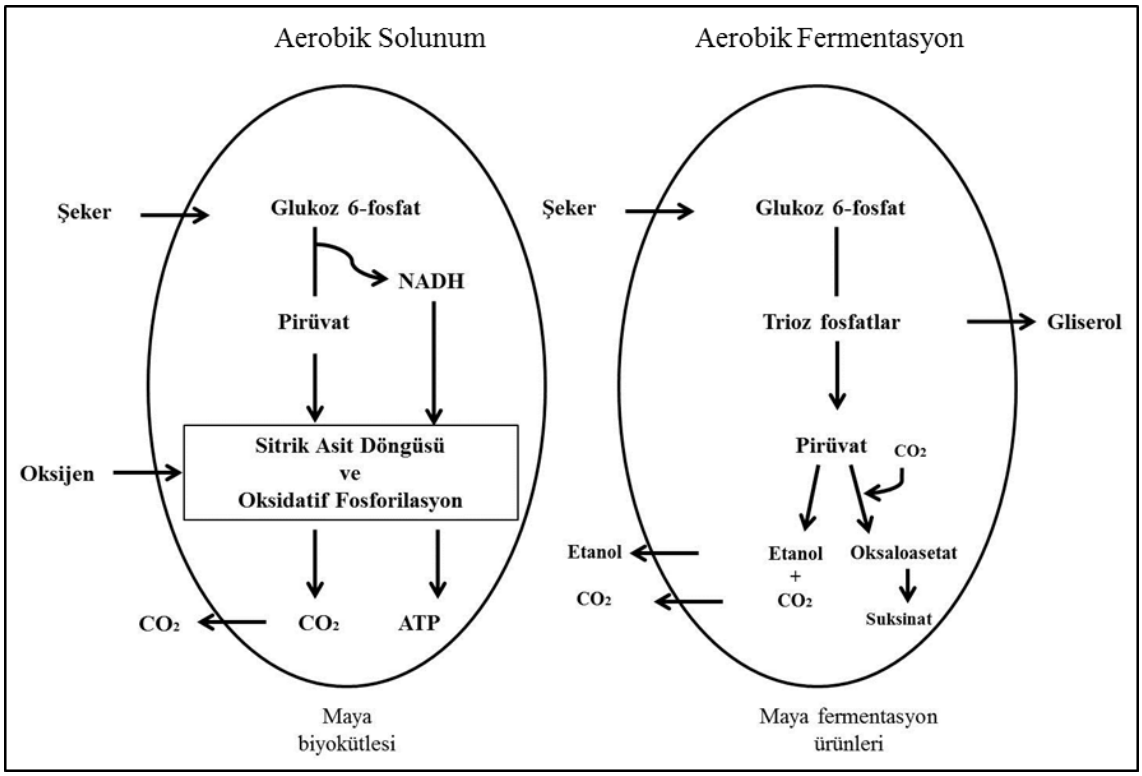
Genellikle bütanol, petrokimyasal hammaddelerden kimyasal yöntemler ile üretilmekte ve üretilen bütanolün çoğu, cila, boya ve sıva üretimi için gerekli olan bütil akrilat ve metakrilat esterleri oluşturmak için ara bileşik olarak kullanılmaktadır (Kirschner, 2006). Ayrıca, yakıt kullanımı dışında, endüstride bütanol, daha çok plastik, aside dayanıklı vernik ve çabuk kuruyan otomobil boyalarının üretiminde kullanılmaktadır. Bütanol ve türevleri boya inceltici ve çözücüsü, fren sıvıları, ilaç ve antibiyotik, hormon, vitamin gibi doğal maddelerin üretiminde de kullanılmaktadır (Gabriel, 1928; Jones ve Woods, 1986). Bütanolun son yıllarda gündeme gelen yeni ve önemli bir uygulaması da içten yanmalı motorlarda doğrudan veya benzinle çeşitli oranlarda karıştırılarak yakıt olarak kullanılmasıdır (Ni ve Sun, 2009).

Geçmişten günümüze kadar sanayileşmede meydana gelen artış ve motorlu araç kullanımının giderek yaygın bir hale gelmesi ile birlikte petrol bazlı yakıtların kullanımı giderek artmaktadır. Artan fosil yakıt kullanımına bağlı olarak, petrol rezervleri hızla azalmakta, sera gazı emisyonları artmakta ve bunun sonucunda küresel ısınma, iklim değişikleri, buzulların erimesi, deniz seviyesinin yükselmesi ve biyoçeşitliliğin azalması gibi pek çok olumsuz sonuç ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, dünyada petrol rezervlerinin olduğu bölgelerdeki savaş ve kargaşanın artması, fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak için alternatif, yenilenebilir ve atmosfere zarar vermeyen yeni enerji kaynakları arayışına neden olmuştur (Naik ve diğ., 2010; Thang ve diğ., 2010).

Bütanole olan bu ilginin artışı, araştırmacıları, alternatif bütanol üretim yolları ile ilgili araştırmalara yönlendirmektedir. Bütanol üretim yolağına bakıldığı zaman, Asetil Koenzim A (CoA)'yı, bütanole dönüştürmede altı adet temel enzimin görev aldığı belirtilmektedir. Bu enzimler; tiyolaz (thl), 3-hidroksibütiril-CoA dehidrogenaz (hbd), krotonaz (crt), bütiril-CoA dehidrogenaz (bcd), bütiraldehit dehidrogenaz ve bütanol dehidrogenaz (bdh)'dır (Huang ve diğ., 2010). Tiyolazlar, asetil-koenzim A

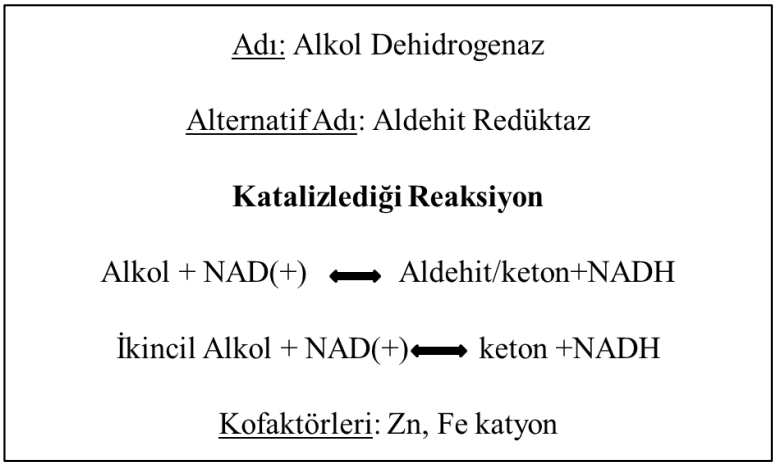
asetiltransferazlar (ACAT) olarakda bilinmektedirler ve asetil-CoA'yı asetoasetil CoA'ya dönüştürürler. 3-hidroksibütiril-CoA dehidrogenaz EC 1.1.1.157, 3-hidroksibütanol-CoA ve NADP'yi kullanarak, 3-asetoasetil-CoA'ya dönüştürmekte ve ilave olarakta NADPH ve H^+ oluşturmaktadır (Madan ve diğ., 1973). Bütiril CoA dehidrogenaz (EC 1.3.99.2), bütiril CoA'yı, 2-bütanol CoA'ya dönüştürmektedir (Engel ve Massey, 1971). *Bütanol dehidrogenaz*, bütanol oluşumunun son aşamasında görev alan bir enzimdir (Palosaari ve Rogers, 1988). Ayrıca, bütanol ve diğer alkollerin sentezinde görev alan anahtar enzimlerden ikisi de, alkol dehidrogenaz (Adh1) (EC 1.1.1.1, 1.1.1.2, veya 1.1.171) ve aldehit dehidrogenaz (EC 1.2.1.10)'dır (Krivoruchko, 2013).

Maya hücrelerinde alkol üretimi karbon katabolizma sürecinde elde edilmektedir. Maya hücrelerinin *in vitro*'da besiyerine doğrudan glukoz ekleyebilirken, doğal yaşam alanlarında, selüloz, nişasta ve diğer polisakkaritlerdeki veya endüstriyel subsratlardaki (maltoz, sukroz, fruktoz, ksiloz ve laktoz) şekeri karbon kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Karbon katabolizmasında; maya hücresinin sitoplazmasında, glikolizle, glukozdan pirüvik asit meydana gelmektedir ve meydana gelen pirüvik asit ortam koşullarına göre iki yola yönlendirilmektedir: Alkol fermentasyonu ve glukoz solunumu. Anaerobik koşullarda (ortamda oksijen yoksa), alkol fermentasyonu gerçekleşmektedir. Bu süreçte, ilk olarak Pirüvat Dekarboksilaz (PDC) enzimi tarafından reaksiyon başlatılmakta ve pirüvattan, asetaldehit elde edildikten sonra Adh1 enzimi ile etanol üretimi gerçekleştirilmektedir. Eğer ortamda oksijen varsa, oluşan pirüvik asit, mitokondri matriksine geçerek, asetil CoA'ya dönüştürüldükten sonra Sitrik Asit Döngüsüne (Krebs Döngüsü) girerek CO_2 ve H_2O'ya kadar parçalanmaktadır (Şekil 2.8) (Walker, 1998).



Şekil 2.9: Maya metabolizmasında aerobik solunumun basit şematik gösterimi (Walker, 1998).

İlk olarak Adh1, 1937 yılında, Negelein ve Wulff tarafından bira mayasından izole edilmiştir. Dehidrogenaz grubu enzimlerden oluşur ve bulunduğu birçok bitki, hayvan ve mikroorganizmada birincil görevi alkolü, aldehit veya ketona dönüştürmektir (Şekil 2.9) (Negelein ve Wullf, 1937). İkinci görevi de, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) rejenerasyonunu ve glikolizden solunum zincirine devam etmesini sağlamaktır (Lertwattanasakul ve diğ., 2007).



Şe**kil 2.10**: Alkol dehidrogenaz enziminin özellikleri (**http://www.ebi.ac.uk/intenz/query**).

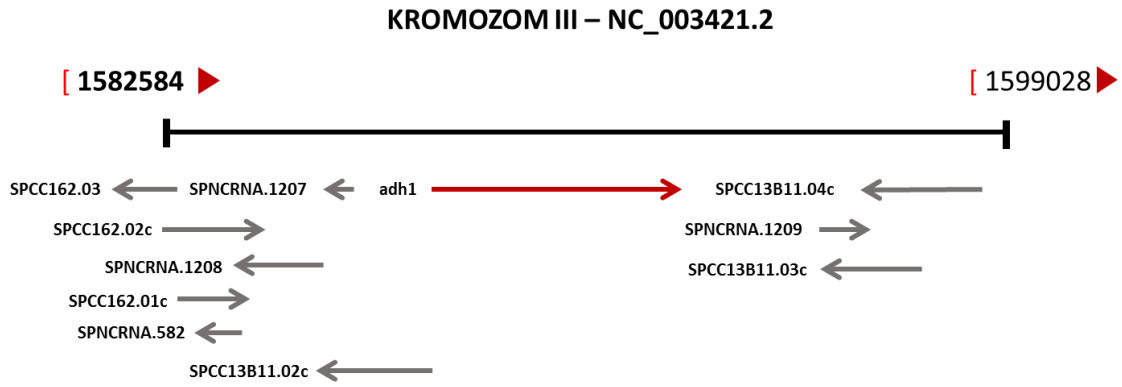
Mayalarda Adh1 enzimi, tetramer yapıda dört adet altüniteye sahiptir; her bir altünite 347 amino asitlik tek bir polipeptit ve 36 kilodalton (kDA) moleküler ağırlığındadır (Eklund ve Branden, 1987). Her bir altünitede katalizde görev alan koenzim bağlayıcı bölge ve 2 tane çinko bağlayıcı bölge bulunmaktadır (Leskovac ve diğ., 1976; Havlis ve Studnickova, 1997). Bu iyonlardan biri katalizlemede görev alırken, diğeri proteinin yapısında yer almaktadır (Leskovac ve diğ., 2002). Bakteri ve Adh1 enzimi, hayvanlarda ve mayalarda karşılaştırıldığı zaman, mayalardaki Adh1 enziminin diğer organizmalardakine göre yaklaşık iki kat daha büyük, 100 kat daha aktif ve daha spesifik olduğu saptanmıştır (Drewke ve diğ., 1990).

Son yıllarda, *ADH1* geninin bütanol ile olan ilişkisini saptamaya yönelik araştırmalar başlatılmıştır (Si ve diğ., 2014). *S.cerevisiae* ile yapılan çalışmalar sonucunda, Adh1 enziminin 1-bütanol oksidasyonundan sorumlu olduğu yayınlanmıştır (Niemistö ve diğ., 2013). Çalışmada, *S.cerevisiae* hücrelerinin *ADH1* geninde meydana getirilen mutasyon sonucunda, asetaldehitlerin etanole dönüşümünün azalması ile ortamda asetaldehit biriktiği gösterilmiştir. Mutant *S. cerevisiae* hücrelerinde büyümenin yavaş olduğu gözlemlenmiştir bunun sebebi olarak, asetaldehitlerin birikmesi sonucunda, NAD^+/NADH dengesinin bozularak büyüme üzerinde olumsuz etki yarattığı belirtilmektedir (Drewke ve diğ., 1990). İlave olarak, *ADH1* geni delesyonlu olmayan *S. cerevisiae*'lerde, ortamda 1-bütanol üretimi olmazken, *ADH1* geni delesyonlu hücrelerde 1-bütanol birikimi olduğu belirtilmektedir ve neden olarakda etanol üretimi

azaldığı zaman, 1-bütanol üretimine yönelimin arttığı düşünülmektedir (Si ve diğ., 2014).

S. cerevisiae'da, 7 tane *ADH* geni tanımlanmıştır: *ScADH1* geni, asetaldehiti, etanole dönüştürmeden sorumlu ana enzim olan ScAdh1'i sentezlemektedir (Leskovac ve diğ., 2002) ve öncelikle glukoz varlığında anlatımını gerçekleştirmektedir (Denis ve Young, 1983). Sc*ADH2* geni, büyüme sırasında etanolü karbon kaynağı gibi kullanabilmek için, reaksiyonu tersine katalizleyerek etanolü asetaldehite oksitleyen izoenzimin sentezinden sorumludur (Demain, 2009; Drewke ve Ciriacy, 1988; Russell ve diğ., 1983; Smith ve diğ., 2004; Bennetzen ve Hall, 1982; Young ve Pilgrim, 1985) ve glukoz yokluğunda Sc*ADH2'*nin anlatımı daha fazla iken, glukoz miktarının artmasıyla Sc*ADH2'*nin anlatımının baskılandığı saptanmıştır (Drewke ve Ciriacy, 1988). Sc*ADH3* tarafından şifrelenen ScAdh3 enzimi, mitokondride görev aldığı için solunum metabolizmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir ve glukoz varlığında anlatımı baskılanmaktadır (Young ve Pilgrim, 1985). Sc*ADH4* geni tarafından ScAdh4 enzimini sentezlemektedir (Drewke ve Ciriacy, 1988). Sc*ADH5*'ten sentezlenen ScAdh5, ScAdh1 izoenzimine %76 benzemektedir (Goffeau ve diğ., 1996). Sc*ADH6* ve Sc*ADH7*'den sentezlenen, ScAdh6 ve ScAdh7 enzimlerinin, NADP/$NADP^+$ dengesinde görev aldığı tahmin edilmektedir (Larroy ve diğ., 2002b).

S. pombe'de ise, III. kromozomda tek ekson içeren, bir adet *ADH1* (SPCC13B11.01) (*ADH*) geni bulunmaktadır (Şekil 2.10). *ADH1* geni, toplamda 3463 nükleotit dizisinden (1589427-1592889) oluşur ve kodlama yapan nükleotid dizisi 1053 baz çiftidir (1591359-1592411). Bu genin ürünü olan Adh1 enzimi 350 amino asit içerir ve 37.40 kDa'dır (http://www.pombase.org/spombe/result/SPCC13B11.01). *ADH1* geninin ürünü, asetaldehiti, etanole dönüştürmeden sorumlu ana enzimdir (Leskovac ve diğ., 2002) ve öncelikle glukoz varlığında anlatımı gerçekleştirir (Denis ve Young, 1983).



Şekil 2.11: *S. pombe'* de *ADH1* geninin III. kromozomdaki yeri (http://www.pombase.org/spombe/result/SPCC13B11.01).

Hücre içinde biyolojik süreçlerin anlaşılmasında, kimyasal elementlerin dağılımının bilinmesi önemli konulardan bir tanesidir. Bir hücre içerisinde yaklaşık 20 farklı kimyasal element bulunmaktadır. Organizmalar, temelde hidrojen, karbon, azot, oksijen, sodyum, magnezyum, silisyum, fosfor, klor, potasyum ve kalsiyum gibi elementlerden oluşmaktadırlar. Ayrıca, hücre içerisinde pek çok düzenleyici sistemlerde ve süreçlerde, mangan, demir, kobalt, bakır, çinko, molibden, selenyum ve iyot gibi elementlerin varlığı ya da eksikliği süreçler üzerinde etkili olmaktadır. Krom, arsenik, kadmiyum, baryum gibi ağır metaller konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre içerisinde fonksiyon bozukluklarına neden olabilmektedir (Ortega ve diğ., 2004).

Çinko, hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında görev alan en önemli ticari elementlerden birisidir ve çok sayıda transkripsiyon faktörünün, enzimlerin ve hücre sinyal proteinlerinin yapısında bulunmaktadır (Funktionen ve Beyersmann, 2002). Bu element, biyolojik yapıların serbest radikallerden zarar görmesini engellemek (Stefanidou ve diğ., 2006), homeoastaz, immün cevap, oksidatif stres, apoptoz ve yaşlanma gibi biyolojik süreçlere katılmaktadır (Funktionen ve Beyersmann, 2002; Kaegi ve Schaffer, 1988; Mocchegiani ve diğ., 2000b; Wellinghausen ve Rink, 1998). Ayrıca, bilinen insan proteinlerinin % 3'ünden fazlasında çinko bağlı motifler bulunduğu için (Close, 1997), pek çok hücresel süreç çinkoya bağlı olarak gerçekleşmekte (Berg ve Shi, 1996; Zverlov ve diğ., 2006) ve T-hücrelerinin olgunlaşması ve farklılaşması bu olaya örnek olarak verilebilir (Goldstein, 1984; Mocchegiani ve diğ., 2000a).

Mayalarda, *ADH1* geni ile çinko arasındaki ilişki son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. *S. pombe* ile yapılan çalışmalarda, sınırlı çinko olan ortamda, çinko eksikliğine cevap olarak doğal antisens kopyaların (NATs) sentezlendiği ve *Adh 1* mRNA'sına bağlanarak anlatımını baskıladığı saptanmıştır. *S. pombe* genomunda transkriptom profiline bakıldığı zaman, bu antisens kopyaların (*Adh1AS*), *adh1*'in aynı lokusundan kopyalandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, sınırlı çinko varlığında *Adh1AS* kopyalarının artığı belirtilmektedir (Ehrensberger ve Bird., 2011).

Canlı sistemler üzerinde güneşten gelen Ultraviyole (UV) ışığın birçok olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (Sinha and Hader, 2002). Ultraviyole, 1801 yılında, Johann Wilhelm Ritter tarafından bulunmuştur. İnsan gözü 400-700 nm dalga boyu arasındaki ışınıma duyarlıdır. Bu dalga boyları dışındaki ışınımı görememektedir (Hockberger, 2002). UV ışınları 3' ayrılmaktadır; UV A (dalga boyu ≤ 280nm), B (280-315 nm) ve C (315-400 nm) ve bu ışınların canlılar üzerinde etkilerinin de farklı olduğu bilinmektedir (Casati ve Walbot, 2003).

1. UV-A, en yaygın ışınlardır ve ozon tabakası tarafından bu ışınlar geçirilir.
2. UV-B, oldukça tehlikelidir ve bu ışınların büyük bir kısmı, ozon tabakası tarafından engellenmektedir ve dünyadaki radyasyonun % 4'ünü oluşturur.
3. UV-C, sağlık için en tehlikeli ışınlardır. Ozon tabakası bu ışınların bizlere ulaşmasını önlemektedir.

UV ışık canlılar üzerinde yarattığı olumsuz etkileri ise; (i) belli biyosentetik süreçler için temel olan alkilleyici ajanlardan kaynaklanan ve mutajenik, yanlış-kodlama yapan ya da ölümcül ve kodlama yapmayan lezyonların oluşumu, (ii) hidrolitik deaminasyon, tek baz değişimleri, (iii) fotokimyasal süreçlerle serbest radikal veya reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan çeşitli farklı tipte DNA hasarları belirtilmiştir (Sinha and Hader, 2002).

UV ışığa maruz bırakılan, *S. pombe* ile *S.cerevisiae* karşılaştırıldığında, *S. pombe*'nin, UV ışığına, *S.cerevisiae* kadar duyarlı olmadığı saptanmıştır. Bunun nedeni olarak *S. pombe*'nin G2 fazının daha uzun olması sonucunda, kontrolün daha etkili olduğu düşünülmektedir (McCready ve diğ., 2000). Ayrıca, UV ışığının *S. pombe*'de, onarım

mekanizmasını tamamen bozmadığı da gösterilmiştir (Birnboim ve Nasim, 1975). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda, UV ışığa maruz bırakılarak elde edilen rastgele mutantların, çinko sülfat ile hazırlanan besiyerlerinde etanol üretiminin arttığı tespit edilmiştir; *ADH1* dizisinde değişimler meydana getirilerek katalitik aktivitenin arttığı ve çinko sülfat olan ortamda, *Adh1* enziminin aktivitesini artırarak daha çok asetaldehiti etanole dönüştürdüğü ve etanol üretiminin artığı saptanmıştır. Bu nedenle, UV ışığın, 1-bütanol üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması gerekmektedir (Taloria ve diğ., 2012).

Moleküler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), *in vitro* koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanan, basit, spesifik ve hassas bir tekniktir (Saiki ve diğ., 1985) ve üç temel aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar;

1. DNA zincirinin açılması (Denatürasyon) : Kalıp DNA ("template DNA"), 92-95^{o}C'de 1-2 dakika tutularak, çift sarmal yapıdaki DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrıldığı aşamadır (Watson ve diğ., 1992; Hadidi ve diğ., 1995).
2. Primerlerin açılan DNA zincirlerine bağlanması ("Annealing"): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65^{o}C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin, açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye bağlandığı aşamadır. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak, 30-60 saniyede gerçekleşmektedir (Innis ve Gelfand 1990).
3. Primer uzaması (Primer Extesion): DNA zincirleri üzerine bağlanan primerlerin, DNA polimeraz enzimi (*Taq DNA polimeraz*) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polimeraz 72^{o}C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (Erlich ve diğ., 1991).

PZR tekniğinin ilk bulunduğu 1985 yılından bu yana (Innis ve Gelfand 1990; Henson ve French, 1993), teknolojide çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PZR metotları geliştirilmiştir. Bu PZR metotlarının adları aşağıda gösterilmektedir.

Çoğaltılması İstenen DNA Dizisinin Bilindiği Durumlarda Kullanılan PZR Metotları:

1. Klasik PZR (“Standart PZR”)
2. Ters Transkriptaz PZR (“Reverse Transkriptaz PZR”, RT-PZR)
3. Katlı PZR (“Multiplex PZR”)
4. Antiserumla Sabitleme PZR
5. İç içe PZR (“Nested PZR”)
6. Renkli PZR (Kolorimetrik PZR)
7. Kademeli Sıcaklık Düşürme PZR (“Touchdown PZR”)
8. Canlı Hücre Belirleyen PZR (Bio PZR)

Çoğaltılmak istenen DNA Dizilerinin bilinmediği durumlarda kullanılan PZR metotları:

1. Değişken DNA Dizilerinin Rastgele Çoğaltılması (“Random Amplified Polymorphic DNA”; RAPD PZR)
2. Ters PZR (“Inverse-PZR”)
3. Asimetrik PZR

Ters transkriptaz PZR yönteminde; çoğaltılması hedeflenen RNA (mRNA, tRNA, viral RNA veya viroid RNA’sı), ters transkriptaz enzimi ile tamamlayıcı DNA’ya çevrildikten sonra, klasik PZR kullanılarak çoğaltılmaktadır (Rowhani ve diğ., 1995; MacKenzie ve diğ., 1996; Chandler ve diğ., 1998).

Moleküler çalışmalarda PZR tek başına bir yöntem olarak kullanıldığı gibi diğer yöntemler ile birlikte de kullanılabilmektedir. Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizminde (AFLP) (Semblat ve diğ., 1998; Vos ve diğ., 1995), PZR ürünlerinin enzimle kesilmesinde (PZR-RFLP) (Wetzel ve diğ., 1991), çoğaltılmış DNA dizilerinin enzimle kesilmesi (CAPS) ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA bantlarının spesifik primere dönüştürülmesi gibi yöntemler ile birlikte kullanılmaktadır (Hahn ve diğ., 1994).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ORGANİZMA

Bu çalışmada; İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan Ascomycetes sınıfından *Schizosaccharomyces pombe lindner str. Liquefaciens'in* yabani ırkı (972 h^-) kullanıldı.

3.1.1. Organizma Üretimi, Saklanması ve Hücre Sayımı

Çalışmada kullanılan *S.pombe* hücrelerinin üretilmesinde ve saklanmasında standart yöntemler kullanıldı (Gutz ve diğ. ,1974). *S. pombe* 972 h^- hücreleri +4 °C'da saklanan silika jel (çap: 0,2-0,5 mm) içerisinden alındı. Alınan *S. pombe* 972 h^- hücreleri Tablo 3.1'de gösterilen katı maya özütü zengin besiyerinde (Yeast Extract Agar, YEA) 2 gün kültürlendikten sonra tek koloni elde etmek için azaltma yöntemiyle YEA içeren petri kaplarına ekildi ve 37 °C'deki etüvde 2 gece üretildi, tek koloni elde edildikten sonra stok olarak +4 ^oC'de saklandı.

Çalışmada kullanılacak olan tüm besiyerleri ve stok çözelti olarak ayrı ayrı hazırlanan $ZnSO_4$ (1 M) ve NaCI (% 10), otoklavda 121^oC'de (1.2 atmosfer basınç altında), 20 dakika bekletilerek steril edildi. +4^oC'da saklanan *S. pombe* hücreleri, bir gece 20 mL maya özütü peptonlu dekstroz içeren besiyerinde (YEPD,YPD) 180 devir/dakika, 30 ^oC'deki çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı. Üreyen hücrelerden 10^7 hücre/mL olacak şekilde hücreler alındı, Tablo 3.2-3.6'da verilen farklı pH, NaCI, $ZnSO_4$ konsantrasyonlarındaki besiyerlerine ekilerek, 2 gün boyunca 180 devir/dakika, 30^oC'de çalkalamalı etüvde çoğalmaya bırakıldı.

Tablo 3.1: Maya özütlü zengin besiyeri içeriği ve maya özütlü peptonlu dekstroz içeren besiyeri.

Besiyeri*	İçerik	1 Litredeki Miktar
Maya Özütlü Zengin Besiyeri (YEA)	Maya özütü	5 g/L
	Glukoz	30 g/L
	Agar	20 g/L
Maya Özütü Peptonlu Dekstroz İçeren Besiyeri (YEPD,YPD)	Maya özütü	10 g/L
	Pepton	20 g/L
	Dekstroz	20 g/L

*Besiyeri pH değeri 6.8 ± 0.2'dir.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan farklı pH seviyelerindeki YEPD besiyerleri.

Besiyeri	pH Değeri
$YEPD_1$	1
$YEPD_2$	2
$YEPD_3$	3

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan farklı $ZnSO_4$ konsantrasyonlarındaki YEPD besiyerleri.

Besiyeri*	İçerik	Miktarı
$YEPD_4$	$ZnSO_4$	10 mM
$YEPD_5$	$ZnSO_4$	15 mM
$YEPD_6$	$ZnSO_4$	20 mM

* Besiyeri pH değeri 6.8 ± 0.2'dir.

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan farklı pH ve NaCI konsantrasyonlarındaki YEPD besiyerleri.

Besiyeri	**pH**	**NaCI konsantrasyonu % (w/v)**
$YEPD_{1.1}$	1	2
$YEPD_{2.1}$	2	2
$YEPD_{3.1}$	3	2
$YEPD_{1.2}$	1	4
$YEPD_{2.2}$	2	4
$YEPD_{3.2}$	3	4
$YEPD_{1.3}$	1	6
$YEPD_{2.3}$	2	6
$YEPD_{3.3}$	3	6

Tablo 3.5: Çalışmada kullanılan farklı NaCI ve $ZnSO_4$ konsantrasyonlarındaki YEPD besiyerleri.

Besiyeri*	**$ZnSO_4$ konsantrasyonu (mM)**	**NaCI konsantrasyonu % (w/v)**
$YEPD_{4.1}$	10	2
$YEPD_{5.1}$	15	2
$YEPD_{6.1}$	20	2
$YEPD_{4.2}$	10	4
$YEPD_{5.2}$	15	4
$YEPD_{6.2}$	20	4
$YEPD_{4.3}$	10	6
$YEPD_{5.3}$	15	6
$YEPD_{6.3}$	20	6

* Besiyeri pH değeri 6.8 ± 0.2'dir.

Tablo 3.6: Çalışmada kullanılan farklı pH ve $ZnSO_4$ konsantrasyonlarındaki YEPD besiyerleri.

Besiyeri	**pH**	**$ZnSO_4$ konsantrasyonu (mM)**
$YEPD_{1.4}$	1	10
$YEPD_{1.5}$	2	15
$YEPD_{1.6}$	3	20
$YEPD_{2.4}$	1	10
$YEPD_{2.5}$	2	15
$YEPD_{2.6}$	3	20
$YEPD_{3.4}$	1	10
$YEPD_{3.5}$	2	15
$YEPD_{3.6}$	3	20

Tablo 3.7: Çalışmada kullanılan sadece NaCI içeren YEPD besiyerlerinin içeriği.

Besiyeri*	**NaCI konsantrasyonu % (w/v)**
$YEPD_{0.1}$	2
$YEPD_{0.2}$	4
$YEPD_{0.3}$	6

* Besiyeri pH değeri 6.8 ± 0.2'dir.

Hücrelerin sayımında Thoma Lamı (0.0025 mm^2 Superior, Marienfeld) kullanıldı. Hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Mililitredeki hücre sayısı (hücre/mL); Ortalama hücre sayısı X sulandırım faktörü X10^4

Bu çalışmada, UV'nin 1-bütanol üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla, Tablo 3.2, 3.3'te verilen besiyerleri ile birlikte farklı konsantrasyonlarda NaCI ile

hazırlanmış YEPD besiyerlerindeki (Tablo 3.7) *S. pombe* 972 h^- hücreleri 20, 25 ve 30 dakika boyunca 257.3 nanometre dalga boyundaki UV ışığa maruz bırakıldı.

3.2. MOLEKÜLER ANALİZLER

Farklı koşullarda kültürlenen *S.pombe* 972 h^- hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı ve *Alkol Dehidrogenaz* geninin (*ADH1*) anlatımının moleküler düzeyde analizi amacıyla ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi kullanıldı.

3.2.1. *S. pombe* 972 h^- Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

S. pombe 972 h^- hücreleri sıvı azot yardımıyla havanda ezildikten sonra, ticari total RNA izolasyon kiti (IDPure^{Tm} Spin Column Total RNA Mineprep Kit, IDBB2042) protokolüne göre RNA izolasyonu yapıldı.

3.2.1.1. *S. pombe 972 h^- Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA'ların Miktar ve Saflığının Belirlenmesi*

Sıvı YEPD besiyerinde 2 gün boyunca 180 devir/dakika ve 30°C'da çalkalamalı etüvde tutulan hücreler 7 dakika, 7000 devir/dakikada santirfüjlenerek çöktürüldü ve üst sıvı döküldükten sonra çöken hücreler vorteksle 1 dakika karıştırıldı ve steril havan içine alınarak ve sıvı azot eklenerek parçalandı. Parçalama işleminden sonra örnek üzerine kit içerisindeki RLT solüsyonundan 450 µL eklendi 1 dakika vorteksle karıştırıldı. 50^{o}C'deki etüvde 10 dakika bekletildikten sonra örnek üzerine 330 µL % 100 (v/v) etanol eklendi. Örnek, spin kolon içeren 2 mL'lik toplama tüplerine aktarıldı. Toplama tüpleri içerisindeki örnek üzerine 500 µL RW solüsyonu eklenerek ve 6000 x g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra tüp içindeki alt sıvı döküldü ve spin kolon üzerine 500 µL RPE solüsyonu eklendi ve tekrar 6000 x g'de 2 dakika santirfüjlendi. Spin kolon, 1.5 µL'lik steril tüpe alındıktan sonra üzerine 40 µL RNaz içermeyen H_2O eklendi ve 2 dakika 50^{o}C'deki etüvde bekletildikten sonra 8000 x g'de 1 dakika santirfüjlendi. Elde edilen total RNA örnekleri -70^{o}C'de saklandı. Total RNA'ların miktarı ve varlığı jel elektroforezi ve nanodrop 2000 (Thermo Scientific) aleti aracılığla tespit edildi.

Örneklerden izole edilen total RNA'ların miktarları nanodrop 2000 (Thermo Scientific) aletinde okunan A_{260} değerinin aşağıdaki formülde yerine konulmasıyla hesaplandı.

RNA (µg/mL) = A_{260} x sulandırma oranı x katsayı (40)

RNA'ların saflıklarının kontrolü amacıyla 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığını soğurma değerlerinin oranı (A260/A280) kullanıldı. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında ise total RNA'ların saf olduğu, değer aralığının dışında ise total RNA'ların saf olmadığı kabul edildi (Maniatis ve diğ., 1982).

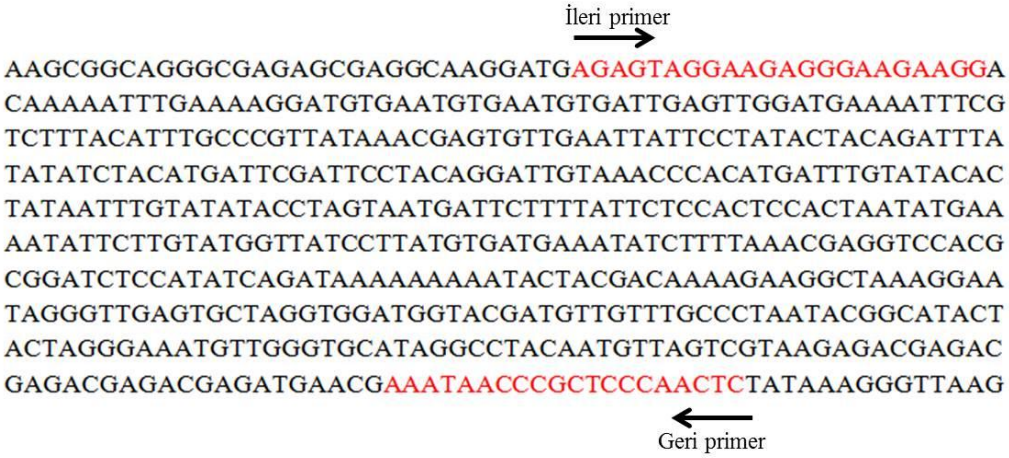
3.2.1.2. *S. pombe 972 h⁻ Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi Analizi*

Total RNA'ların elektroforetik analizi için % 2 (w/v)'lik agaroz jel kullanıldı. % 2 (w/v)'lik jel için, 0.8 g agaroz tartılıp üzerine 50X TAE tamponun (Tablo 3.8) sulandırılmasıyla hazırlanan 40 mL 1X TAE tamponu eklenerek mikrodalga fırında 2 dakika süre ile çözündürüldü. Oda sıcaklığında yaklaşık 60ºC'ye kadar soğutulan agaroz çözeltisi içerisine son konsantrasyonu 0.5 ng/µL olacak şekilde 2 µL etidyum bromür (EtBr, 10 mg/mL) eklenip, karıştırıldı. Agaroz çözeltisi, tarağın yerleştirilmiş olduğu yatay elektroforez kasedine dökülerek 30 dakika boyunca polimerize olması için bekletildi. Katılaşan agaroz jel, 1X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi. RNA ladder 3 µL (Thermo Scientific RiboRuler low range 100-1000 bç, 2X yükleme boyası ile birlikte) yüklendi. Daha sonra, (5 µL örnek, 1 µL yükleme tamponu (Biomatik, #DS0114C) ile karıştırıldıktan sonra taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklenerek 70 volt sabit akımda 45 dakika yürütüldü. Total RNA boyutlarının belirlenmesi için 100 baz çiftlik markır DNA Ladder (Biomatik, M7123) kullanıldı. Yürütme işleminden sonra total RNA'lar UV transillüminatör (Avegene, X-lite 200) ile görüntülendi.

Tablo 3.8: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.

Tampon	Bileşenler	Final Konsantrasyonu
Tris-Asetat (TAE) Tamponu	Tris bazı	2 M
	Glasiyal asetik asit	% 0.0571 (v/v)
	EDTA (pH:8)	50 mM
6X Elektroforez Yükleme Tamponu	Yükleme Boyası (Biomatik, #025)	1X

ADH1 geni FASTA formatına göre Oligo Analyzer 3.1 programı ile ileri ve geri primerlerinin tasarımı yapıldı ve primerlerin konumu Şekil 3.1'de verildi.



Şekil 3.1: *S. pombe* 972 h$^-$ hücrelerinde anlatım yapan *ADH1* geninin RT-PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primerlerin konumları gösterildi.

3.3. Ters (Revers) Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Bu çalışmada RT-PZR tek aşamalı olarak (Biomatik, A4226) kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre hazırlanan polimeraz zincir reaksiyonunun içeriği ve çalışmada kullanılan primer çiftleri Tablo 3.9 ve 3.10'da gösterildi.

Tablo 3.9: RT-PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	**Hacim/Reaksiyon**	**Final Konsantrasyonu**
	10 µl	
Total RNA	Değişken	2 pg-0.2 µg/reaksiyon hacmi 0.01 pg-2 ng/reaksiyon hacmi
Igreen mastermix	5 µl	1 X
Qrt-pzr enzim mix (50X)	0.2 µl	1 X
İleri primer (6µM)	0.5 µl	300 nM
Geri primer (6µM)	0.5 µl	
Nükleaz içermeyen H_2O	10 µl tamamlandı	-

Tablo 3.10: *S. pombe* 972 h$^-$ hücrelerindeki *ADH1* geninin anlatımının RT-PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primer çifti.

Primer adı	**Primer dizisi**	**Ürün boyutu (bç)**	**Tm**
ADH F ADH R	5'AGAGTAGGAAGAGGGAAGAAGG 3' 5'GAGTTGGGAGCGGGTTATTT 3'	505	62 ^oC

RT-PZR koşulları Tablo 3.9'da gösterildiği gibi hazırlandıktan sonra G-Storm cihazına konuldu ve Tablo 3.11'de belirtilen döngüler programlanarak RT-PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3.11: Çalışmada uygulanan RT-PZR döngüleri.

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
cDNA sentezi	45 ^oC	30 dakika	1
Ilk denatüraasyon	95 ^oC	10 dakika	1
Denatürasyon	95 ^oC	15 saniye	40
Bağlanma	55 ^oC	60 saniye	
Uzama	72 ^oC	1 dakika	
Son uzama	72 ^oC	15 dakika	1
Bekleme	4 ^oC	∞	

Total RNA'lardan elde edilen RT-PZR ürünleri % 1.5'luk agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. % 1.5'lik jel için 2.25 g agaroz (Multicell, 800-015-EG) tartılıp üzerine 150 mL 1 X TAE tamponu eklenerek mikrodalga fırında 2 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında yaklaşık 60 ºC'ye kadar soğutulan agaroz çözeltisine son konsantrasyonu 0.5 ng/µL olacak şekilde 2 µL EtBr (10 mg/mL), eklenip, karıştırıldı. Agaroz çözeltisine, tarağın yerleşmiş olduğu yatay elektroforez kasedine dökülerek 30 dakika boyunca polimerize olması için bekletildi. Polimerize olan jel 1 X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi. 5 µL örnek 1 µL yükleme tamponu

(Biomatik, #DS0114C) ile karıştırıldıktan sonra jeldeki kuyucuklara yüklenerek 70 volt sabit akımda, markır (Biomatik 100 bp DNA Ladder, M7123) ile birlikte 70 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra RT-PZR ürünleri, jel dökümantasyon sistemi olan UV transillüminatör (Avegene, X-lite 200) ile görüntülendi.

4. BULGULAR

UV ışığa maruz bırakılan (20, 25ve 30) ve UV' ye maruz bırakılmayan *S. pombe* 972 h^- hücreleri, farklı koşullarda hazırlanan YEPD besiyerlerinde (Tablo 3.1-3.3 ve 3.7) üretildikten sonra, bu hücrelerden total RNA izole edilerek saflık ve miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen total RNA'ların miktarları ve saflıkları, *S. pombe* 972 h^- hücrelerinin üretilmeleri için hazırlanan besiyeri koşullarına ve maruz kaldıkları UV sürelerine göre farklılık gösterdi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: *S. pombe* 972 h^- hücrelerinden izole edilen total RNA konsantrasyonları ve Absorbans oranları.

Örnek	**Total RNA Konsantrasyonu (ng/µL)**	**$A_{260/280}$**
1) YEPD	2056	2.18
2) $YEPD_4$	291.8	1.97
3) $YEPD_5$	409.6	2.03
4) $YEPD_6$	292.7	2.14
1) $YEPD_1$	9.3	1.49
5) $YEPD_2$	39.7	1.52
6) $YEPD_3$	180	2.02
7) $YEPD_{2.4}$	50	1.83
8) $YEPD_{2.5}$	54.9	1.88
9) $YEPD_{2.6}$	52.9	2.01
10) $YEPD_{3.4}$	345.3	2.17
11) $YEPD_{3.5}$	70.7	2.03
12) $YEPD_{3.6}$	31.9	1.83
13) $YEPD_{2.1}$	30.7	2.14
14) $YEPD_{2.2}$	14.2	1.97
15) $YEPD_{2.3}$	23.7	2.13
16) $YEPD_{3.1}$	241.1	2.04
17) $YEPD_{3.2}$	83.1	2.02
18) $YEPD_{3.3}$	148.8	2.0
19) $YEPD_{6.1}$	82.9	1.95
20) $YEPD_{6.2}$	242.8	2.04
21) $YEPD_{6.3}$	297.1	2.23
22) $YEPD_{4.1}$	17.7	1.79
23) $YEPD_{4.2}$	87.4	1.82
24) $YEPD_{4.3}$	584	2.16
25) $YEPD_{5.1}$	14,6	1.35
26) $YEPD_{5.2}$	379.8	2.15
27) $YEPD_{5.3}$	770.3	2.09

Tablo 4.1 (devam): *S. pombe* 972 h⁻ hücrelerinden izole edilen total RNA konsantrasyonları ve Absorbans oranları.

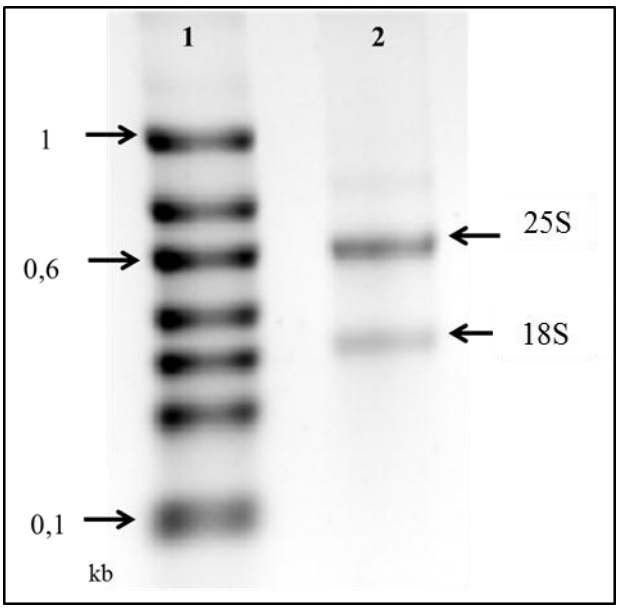
Örnek	Total RNA Konsantrasyonu (ng/µL)	$A_{260/280}$
28) $YEPD_{0.1}$***	446.9	2.11
29) $YEPD_{0.2}$*	643.8	2.25
30) $YEPD_{0.2}$**	117.8	2.26
31) $YEPD_{0.2}$***	522	2.11
32) $YEPD_{0.3}$*	149	2.15
33) $YEPD_{0.3}$**	112	2.14
34) $YEPD_{0.3}$***	42.3	2.11
35) $YEPD_{1.4}$	12.5	2.13
36) $YEPD_{1.5}$	14.7	1.7
37) $YEPD_{1.6}$	7.6	1.61
38) $YEPD_{1.1}$	9.1	2.28
39) $YEPD_{1.2}$	7.4	2.30
40) $YEPD_{1.3}$	9.2	2.25
41) YEPD*	404	2.04
42) YEPD**	192	1.97
43) YEPD***	652	2.14
44) $YEPD_4$*	963	2.03
45) $YEPD_4$**	136.2	1.78
46) $YEPD_4$***	348	2.33
47) $YEPD_5$*	1051	2.08
48) $YEPD_5$**	271.6	2.06
49) $YEPD_5$***	191.1	2.23
50) $YEPD_6$*	78.9	2.22
51) $YEPD_6$**	44.7	2.09
52) $YEPD_6$***	112.2	2.13
53) $YEPD_1$*	25.7	1.52
54) $YEPD_1$**	31.4	1.56
55) $YEPD_1$***	44.5	1.46
56) $YEPD_2$*	66.1	1.87
57) $YEPD_2$**	43.6	1.52
58) $YEPD_2$***	54.8	1.90
59) $YEPD_3$*	109.8	2.23
60) $YEPD_3$**	107,9	2.12
61) $YEPD_3$***	115	2.14
62) $YEPD_{0.1}$*	225	2.2
63) $YEPD_{0.1}$**	559	2.03

*; 20 dakika, **:25 dakika ve ***;30 dakika UV ışık.

4.1. İZOLE EDİLEN TOTAL RNA'LARIN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE GÖRÜNTÜLENMESİ

Bu çalışmada kullanılan tüm deney gruplarındaki *S. pombe* 972 h ⁻ hücreleri, sıvı azot ile dondurulduktan sonra ezildi ve ticari total RNA izolasyon kiti (IDPure TM Spin Column Total RNA Mineprep Kit, IDBB2042) protokolüne göre total RNA'lar izole

edildi. Elde edilen total RNA'lar % 2 (w/v)'lik agaroz jelde 70 voltta 45 dakika boyunca yürütüldü. Yürütme işleminden sonra total RNA'lar UV transillüminatörde (Avegene, X-lite 200) görüntülendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: *S. pombe* 972 h⁻ hücrelerinden elde edilen total RNA agaroz jel görüntüsü. 1) RNA Markır , 2) total RNA.

4.2. *S. pombe* 972 h⁻ HÜCRELERİNDEKİ *ADH1* GEN ANLATIMININ RT-PZR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Tüm deney gruplarından izole edilen total RNA'lar kullanılarak, 1-bütanol üretimi ile ilişkili olduğu düşünülen *ADH1* gen anlatımı RT-PZR yöntemi kullanılarak belirlendi. Elde edilen RT-PZR ürünleri % 1.5' luk agaroz jele yüklenerek 70 voltta 70 dakika yürütüldü ve hücrelerin *ADH1* gen anlatımında meydana gelen değişimler Şekil 4.2-4.11'de verildi.

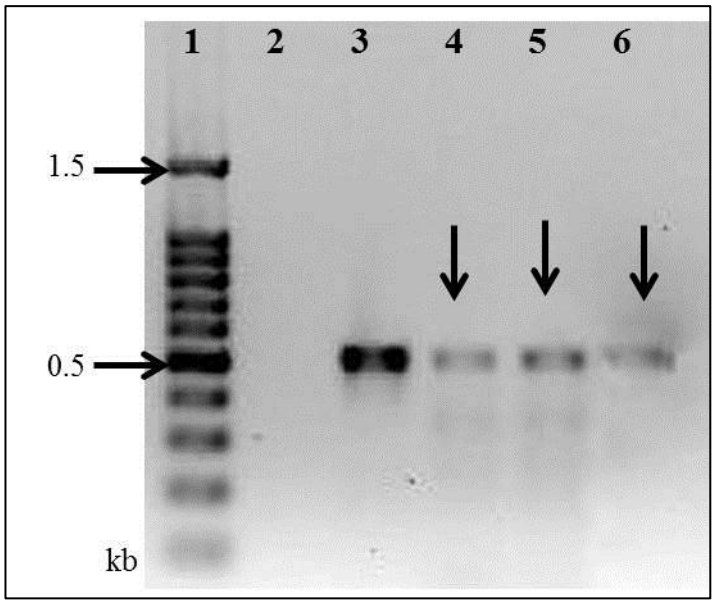
Çalışmada elde edilen verilere göre, UV ışığa maruz kalan ve kalmayan *S. pombe* 972 h⁻ hücrelerindeki *ADH1* gen anlatımının, besiyeri koşullarına göre değişimleri Tablo 4.2 de verilmektedir.

Tablo 4.2: *S. pombe* 972 h⁻ hücrelerde *ADH1* gen anlatımında meydana gelen değişimler.

Be siyeri	UV (dk)			Çinko (mM)			NaCI (%)			pH			*ADH1* Gen anlatımı
	20	25	30	10	15	20	2	4	6	1	2	3	
YEPD*	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
YEPD**	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
YEPD***	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_4$*	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_4$**	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	AYNI
$YEPD_4$***	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_{0.1}$*	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_{0.1}$**	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_{0.2}$*	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_{0.2}$**	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_{0.2}$***	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_3$*	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	AZALMA
$YEPD_4$	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_5$	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ARTMA
$YEPD_6$	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	AYNI
$YEPD_{4.2}$	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_{6.2}$	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	AZALMA
$YEPD_{4.3}$	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	AZALMA
$YEPD_{3.4}$	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	AZALMA
$YEPD_{3.5}$	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	AZALMA

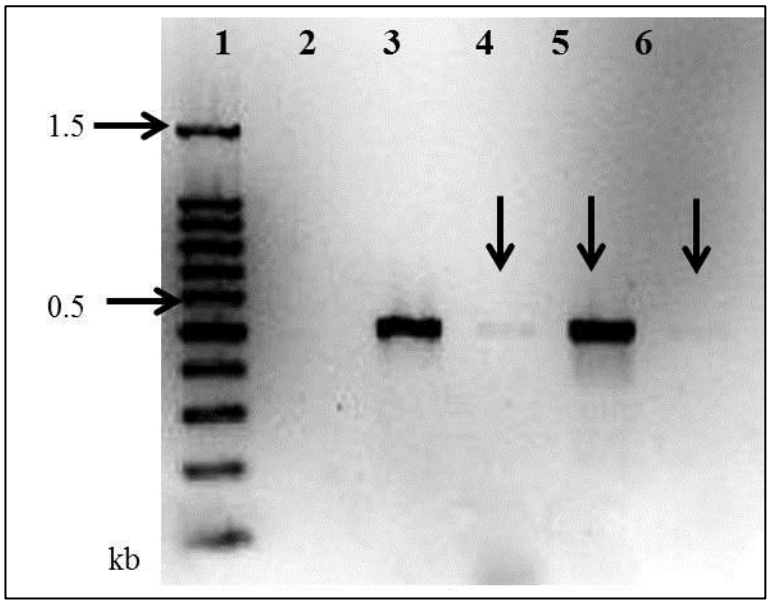
UV ışığa maruz bırakılan *S. pombe* 972 h⁻ hücreleri YEPD*, YEPD** ve YEPD*** besiyerlerinde üretildi (Tablo 3.3) ve üretilen bu hücrelerin *ADH1* gen anlatımı kontrol

ile karşılaştırıldığında; bu besiyerleri içerisinde üretilen hücrelerde *ADH1* geninin anlatımında azalma saptandı (Şekil 4.2).



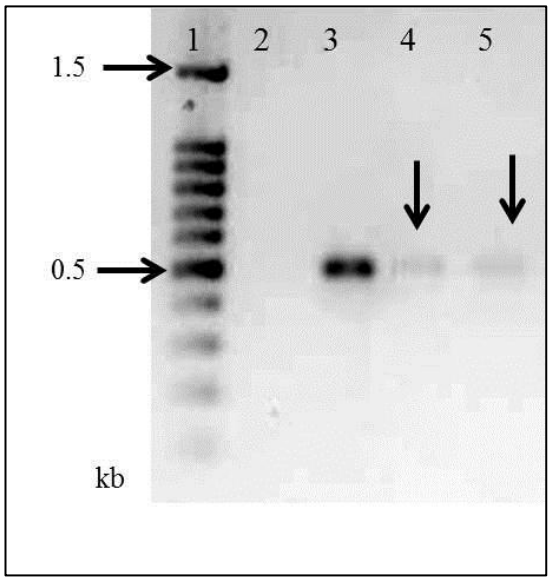
Şekil 4.2: UV ışığa maruz bırakılan hücrelerde *ADH1* gen anlatımının agaroz jel görüntüsü 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) YEPD*, 5) YEPD** ve 6) YEPD***.

Farklı süreler (20, 25 ve 30 dk) UV ışığa maruz bırakılan *S.pombe* 972 h $^{-}$ hücreleri, $YEPD_4$ besiyerlerinde üretildi (Tablo 3.2) ve bu koşullar altında hücrelerin *ADH1* gen anlatımında meydana gelen değişimler kontrol grubu ile karşılaştırıldı (Şekil 4.3). Elde edilen verilere göre; $YEPD_4$* besiyeri içerisinde üretilen hücrelerin *ADH1* gen anlatımında azalma, $YEPD_4$** besiyerinde üretilen hücrelerin *ADH1* gen anlatımının değişmediği, $YEPD_4$*** besiyerindeki hücrelerin *ADH1* gen anlatımının kontrole göre azaldığı belirlendi (Şekil 4.3).



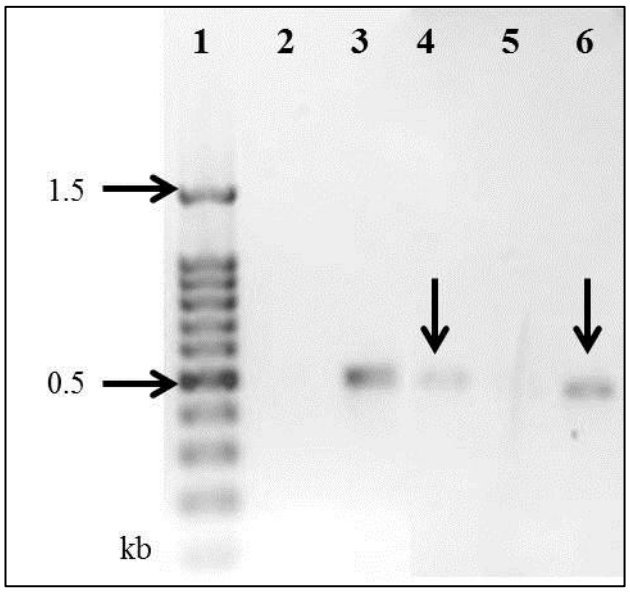
Şekil 4.3: UV ışığa maruz bırakılan hücrelerde *ADH1* gen anlatımının agaroz jel görüntüsü 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) $YEPD_4$*, 5) $YEPD_4$** ve 6) $YEPD_4$***.

S. pombe 972 h^- hücreleri, farklı sürelerde UV ışığa maruz bırakıldıktan sonra $YEPD_{0.1}$ besiyerinde üretildi (Tablo 3.6) ve bu hücrelerde *ADH1* gen anlatımın seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; $YEPD_{0.1}$* ve $YEPD_{0.1}$** besiyerindeki hücrelerin gen anlatımında azalma meydana geldiği saptanırken, $YEPD_{0.1}$***'de *ADH1* gen anlatımı tespit edilemedi (Şekil 4.4).



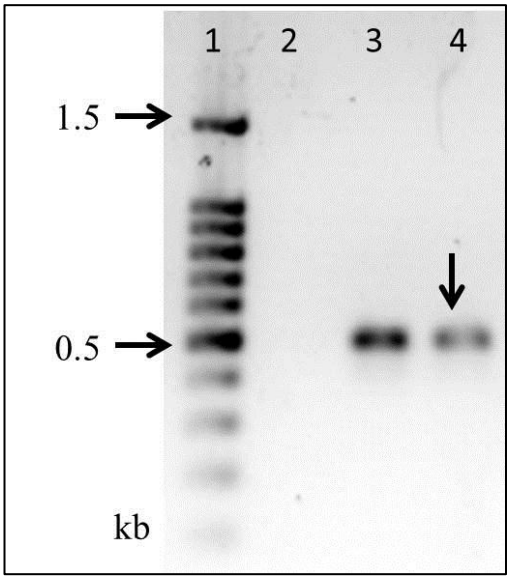
Şekil 4.4: UV ışığa maruz bırakılan hücrelerin $YEPD_{0.1}$ besiyerinde *ADH1* gen anlatımının agaroz jel görüntüsü. 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) $YEPD_{0.1}$* ve
5) $YEPD_{0.1}$**.

$YEPD_{0.2}$ besiyeri içerisinde üretilen (Tablo 3.6) UV'ye maruz kalan hücrelerdeki *ADH1* gen anlatımında kontrole göre meydana gelen değişimler incelendiğinde; $YEPD_{0.2}$* ve $YEPD_{0.2}$***'de üretilen hücrelerde *ADH1* gen anlatımında azalma olduğu, $YEPD_{0.2}$** ise anlatımın olmadığı saptandı (Şekil 4.5).



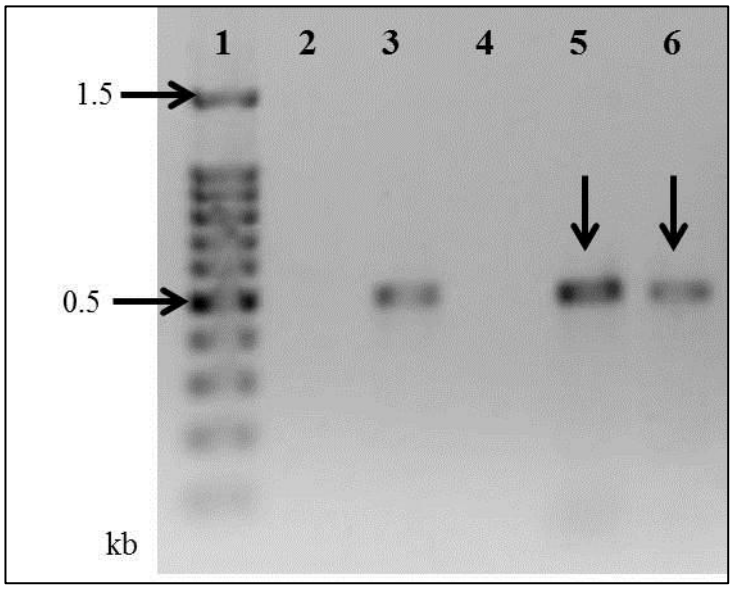
Şekil 4.5: $YEPD_{0.2}$ besiyeri içerisinde büyütülen UV'ye maruz kalan hücrelerdeki *ADH1* gen anlatımı. 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) $YEPD_{0.2}$* ve 5) $YEPD_{0.2}$**, 6) $YEPD_{0.2}$***.

UV ışığa maruz kaldıktan sonra $YEPD_3$ besiyerinde üretilen (Tablo 3.1) *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* gen anlatımı kontrol ile karşılaştırıldığında, $YEPD_3$*'deki besiyeri içerisinde üretilen hücrelerde *ADH1* gen anlatımında azalma olduğu saptandı (Şekil 4.6).



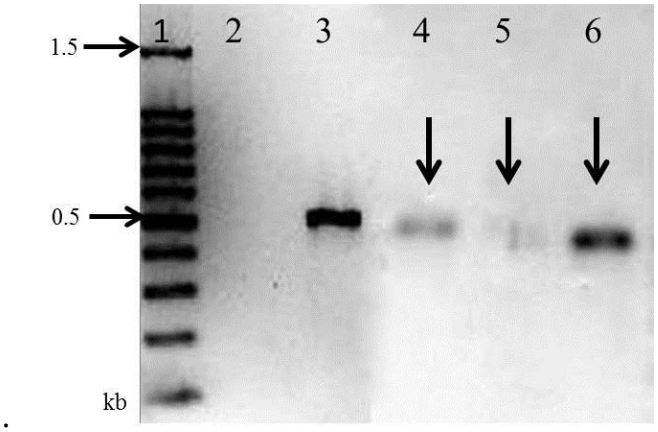
Şekil 4.6: UV ışığa maruz kaldıktan sonra $YEPD_3$ besiyerinde üretilen hücrelerdeki *ADH1* geninin anlatımı. 1) 100 bç'lik DNALadder,2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol ve 4) $YEPD_3$*.

UV ışık uygulanmayan *S. pombe* 972 h^- hücreleri, $YEPD_4$, $YEPD_5$ ve $YEPD_6$ besiyerlerinde üretildikten sonra, bu hücrelerde *ADH1* gen anlatımı ile kontrol grubu arasındaki değişim incelendiğinde, $YEPD_4$ besiyerinde üretilen hücrelerde *ADH1* gen anlatımı olmadığı, $YEPD_5$'de ise gen anlatımının kontrole göre arttığı ve $YEPD_6$ besiyerinde *ADH1*geninin anlatımının kontrol ile aynı olduğu belirlendi (Şekil 4.7).

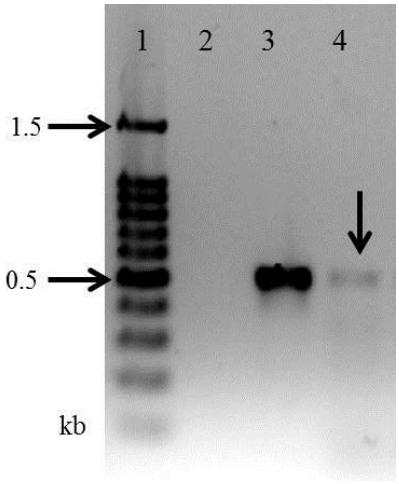


Şekil 4.7: UV ışığına maruz kalmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* geninin anlatımı. 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) $YEPD_4$, 5) $YEPD_5$ ve 6) $YEPD_6$.

UV ışığa maruz bırakılmayan *S. pombe* 972 h^- hücreleri, $YEPD_{4.2}$, $YEPD_{5.2}$, $YEPD_{6.2}$ ve $YEPD_{4.3}$'deki besiyerlerinde üretildikten sonra (Tablo 3.5), bu hücrelerde *ADH1* gen anlatımında meydana gelen değişimler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $YEPD_{6.2}$ hariç diğer besiyerlerinde üreyen hücrelerde *ADH1* gen anlatımında azalma olduğu saptandı. $YEPD_{6.2}$'deki koşullar altında üretilen hücrelerde *ADH1* gen anlatımının kontrol ile aynı olduğu gözlendi (Şekil 4.8 ve 4.9)

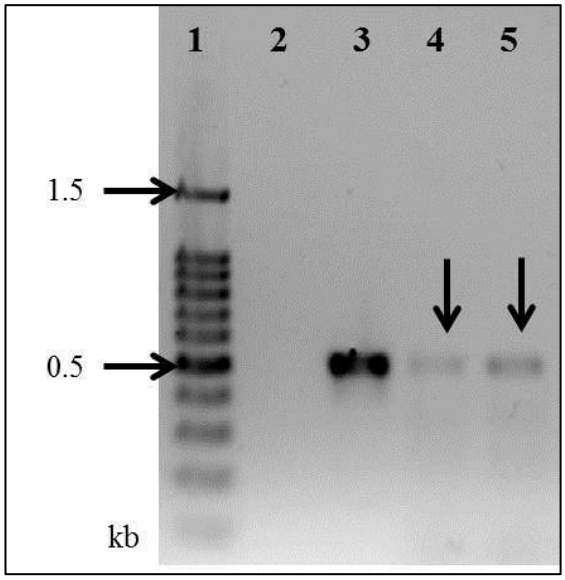


Şekil 4.8: UV ışığa maruz kalmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* geninin anlatımı. 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) $YEPD_{4.2}$, 5) $YEPD_{5.2}$ ve 6) $YEPD_{6.2}$.



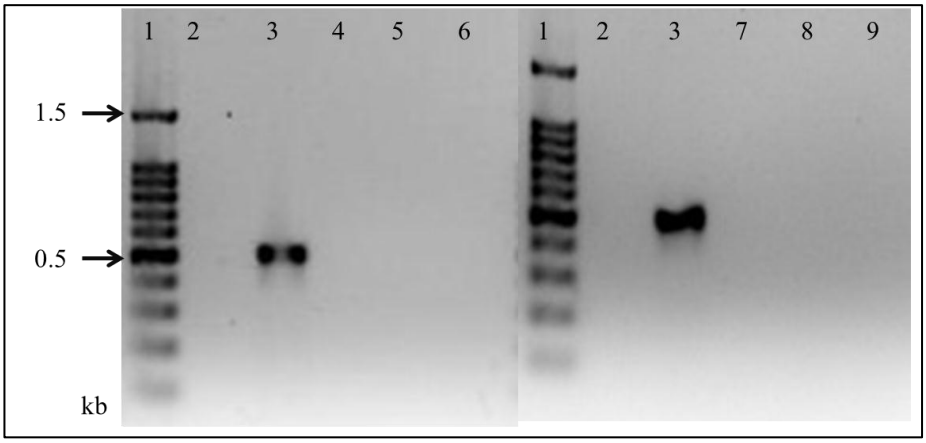
Şekil 4.9: UV ışığa maruz kalmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* geninin anlatımı. 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol ve 4) $YEPD_{4.3}$.

UV ışığa maruz bırakılmayan *S. pombe* 972 h^- hücreleri $YEPD_{3.4}$ ve $YEPD_{3.5}$ besiyerleri içerisinde üretildi ve bu hücrelerde *ADH1* gen anlatımı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, her iki besiyerindeki hücrelerinde *ADH1* gen anlatımında azalma meydana geldiği saptandı (Şekil 4.10).



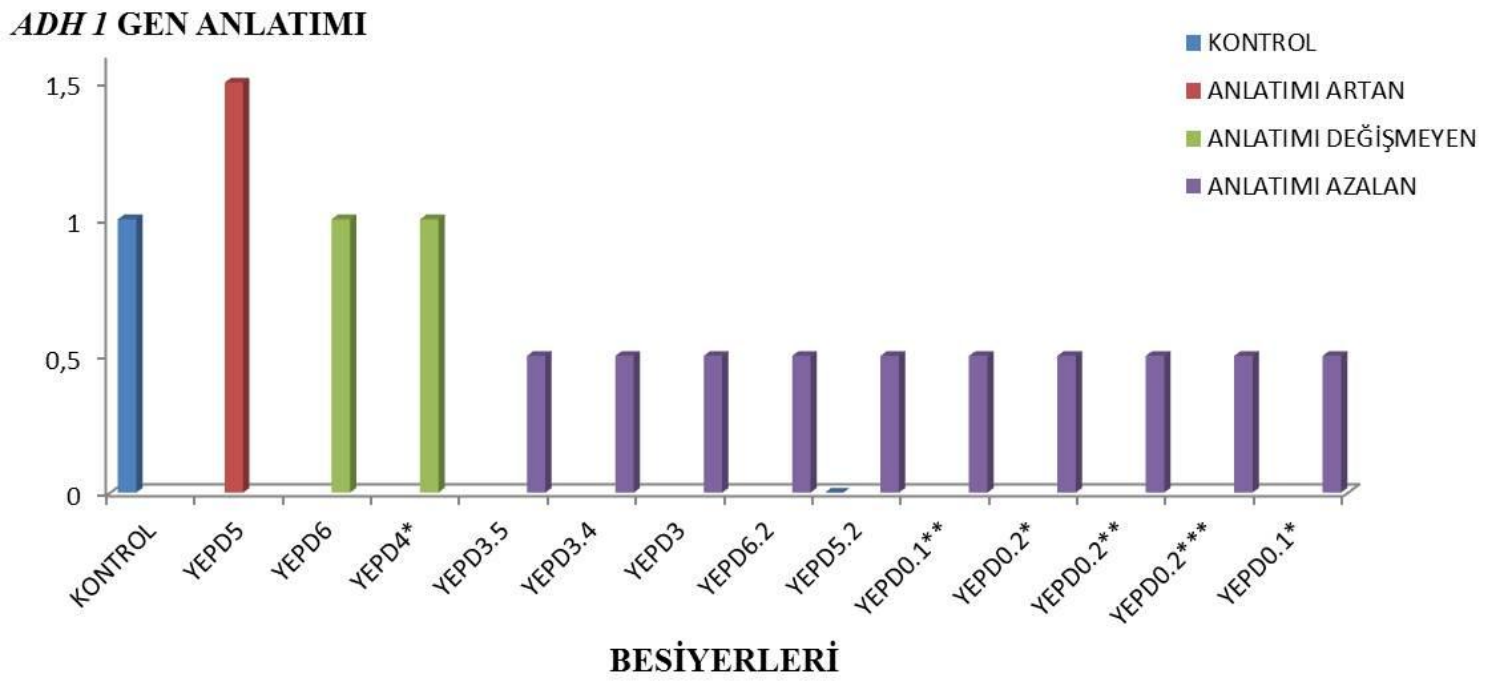
Şekil 4.10: UV ışığa maruz kalmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde *ADH1* geninin anlatımı. 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) $YEPD_{3.4}$, 5) $YEPD_{3.5}$.

Elde edilen bulgulara ek olarak, çalışmada kullanılan pH<4 ve NaCI<6 olan deney gruplarında üretilen *S. pombe* 972 h$^-$ hücrelerinde ise, *ADH1* gen anlatımı saptanmadı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Hücrelerde *ADH1* gen anlatımının baskılandığı agaroz jel görüntüsü. 1) 100 bç'lik DNA Ladder, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) $YEPD_{1.1}$, 5) $YEPD_{1.2}$, 6) $YEPD_{1.3}$, 7) $YEPD_{2.1}$, 8) $YEPD_{2.2}$ ve 9) $YEPD_{3.2}$.

Ayrıca, bütün deney gruplarında *S. pombe* 972 h$^-$ hücrelerinde *ADH1* geninde meydana gelen değişimler grafiksel olarak gösterildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: *S. pombe* 972 h⁻ hücrelerinde *ADH1* gen anlatımında meydana gelen değişimlerin grafiksel gösterilmesi.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada; hazırlanan farklı besiyeri koşulları (pH, NaCI, $ZnSO_4$ ve UV) altında *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde 1-bütanol üretiminden sorumlu olduğu düşünülen *ADH1* geninin anlatımındaki değişimlerin RT-PZR tekniği kullanılarak saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk etapta, *S. pombe* 972 h^- hücreleri farklı sürelerde (20, 25 ve 30 dakika) UV ışığa maruz bırakıldıktan sonra, farklı pH (1, 2 ve 3) aralığında ve farklı konsantrasyonlarda $ZnSO_4$ (10, 15 ve 20 mM) ile NaCI (% 2, 4 ve 6) ilave edilerek hazırlanan besiyerlerinde (Tablo 3.1-3.7) üretildiler. Buna ek olarak, *S. pombe* 972 h^- hücreleri UV ışığa maruz bırakılmadan da ve aynı koşullardaki besiyerlerinde üretildi (Tablo 4.2).

Çalışma süresince, pH 1-2 olan besiyerlerine ekimleri yapılan *S. pombe* 972 h^- hücrelerinin üremediği saptandı. Dolayısıyla bu besiyerlerindeki hücrelerden istenilen miktarda total RNA izole edilemezken bu besiyerlerinde az miktarda izole edilen total RNA'lar nedeniyle RT-PZR ürünleri saptanamadı (Şekil 4.11). Queiroz ve Pareilleux (1990)'un yaptığı çalışmada *S. pombe* hücreleri için gerekli olan pH değerinin 3.5-4.0 arasında olması gerektiği belirtilmektedir. Ayrıca, Fleet ve Heard'in (1993), yılında yapmış olduğu çalışma sonucunda, *S. cerevisiae* hücrelerinin yaşayabilmesi ve büyüyebilmesi için uygun pH aralığının 2,75-4.25 olması gerektiği belirtilmiştir. Schoondermark-Stolk ve diğ. (2006)'nin yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise pH<4.0 olan ve NaCI içeren besiyerlerinde *S. cerevisiae* hücrelerinde büyümenin önemli oranda düştüğü gösterilmiştir.

UV ışığa maruz bırakılan ve YEPD besiyerinde (Tablo 3.1) üretilen *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde *ADH1* gen anlatımlarıında kontrole göre bir azalma olduğu saptandı (Şekil 4.2). Taloria ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışma sonucunda, 25 dakika UV ışığa maruz bırakılan *S. cerevisiae* hücrelerinde etanol üretiminin arttığını tespit edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında *S.pombe* hücrelerinde UV ile etanol üretimi hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Elde edilen bulgular, *S. pombe* 972 h^-

hücrelerinde UV ışığa maruz bırakılması sonucunda *ADH1* gen anlatımının azaldığını göstermektedir. Dolayısıyla, bu hücrelerde *ADH1* gen anlatımının azalması etanol üretiminin düşmesi anlamına gelmektedir. Bu bulgular, UV ışığa maruz bırakılan *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde azalan etanol üretimine karşın 1-bütanol birikiminin artabileceği yorumunu getirmektedir.

UV ışığa maruz bırakılmayan $YEPD_4$ besiyerinde üretilen *S. pombe* 972 h^- hücrelerindeki *ADH1* geni anlatımı, kontrole göre azalırken, $YEPD_5$ besiyerinde üretilen hücrelerde *ADH1* geni anlatımının kontrole göre arttığı tespit edildi (Şekil 4.7). Son yıllarda *S. pombe* hücreleri ile yapılan çalışmalarda, fermentasyon sırasında asetaldehitin etanole dönüşümünü katalizlemek için Adh1 enziminin bol miktarda çinkoya gereksinimi olduğu ve bu koşullarda, *ADH1* geninin anlatımının arttığı, çinkonun sınırlı olduğu ortamda ise *ADH1* gen anlatımının azaldığı saptanmıştır (Ryu ve diğ, 2008; Jackson ve diğ., 2008). İlave olarak, ortamdaki aşırı çinko miktarının hücre için toksik etki yaratabileceği belirtilmiştir, ancak bu mekanizmanın tamamı henüz aydınlatılamamıştır (Jackson ve diğ., 2008). Talori ve diğ. (2012)'nin yaptığı araştırmada 20 mM $ZnSO_4$ konsantrasyonu ile hazırlanan besiyerinde üretilen *S.cerevisiae* hücrelerinin etanol miktarının arttığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, çalışmamızda *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde *ADH1* gen anlatımının 10 mM $ZnSO_4$ konsantrasyonunda azaldığı, 15 mM $ZnSO_4$'da arttığı 20 mM $ZnSO_4$ içerisinde ise değişmediği tespit edildi (Şekil 4.7). Dolayısıyla çalışmamızda elde edilen bulgular, besiyerindeki $ZnSO_4$ konsantrasyonundaki değişimler ile etanol üretiminin değişebildiği ve bununla birlikte ortamdaki $ZnSO_4$ konsantrasyonu ile 1-bütanol üretiminin ayarlanabileceğini göstermektedir (Talori ve diğ., 2012).

Farklı pH aralığında ve farklı konsantrasyonlarda NaCI ilave edilerek hazırlanan besiyerlerinde (Tablo 3.4) kültürlenen *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde *ADH1* gen anlatımı tespit edilemedi (Şekil 4.11). Schoondermark-Stolk ve diğ, (2006)'nin *S. cerevisiea* ile yapmış olduğu çalışma sonucunda, pH<4 olan ve NaCI konsantrasyonu % 6'dan az olan besiyerinde 3-metil-1-bütanol üretiminin baskılandığı, 3-metil-1-bütiraldehit'in, Adh1 enzimi ile birlikte aldehiti, 3-metil-1-bütanole dönüştürmede görev aldığı rapor edilmektedir. Bu sonuç doğrultusunda, çalışmamızda, pH<4 olan ve NaCI konsantrasyonu % 6'dan az olan besiyerlerinde, *ADH1* gen anlatımı saptanmamıştır.

Yapılan literatür araştırmalarında ise *S. pombe* hücrelerinde farklı pH ve NaCI konsatrasyonları ve *ADH1* gen anlatımı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu araştırmada; farklı besiyeri koşulları altında UV ışığa maruz bırakılan *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde ve UV ışığa maruz bırakılmayan *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde, 1-bütanol üretiminden sorumlu olduğu tahmin edilen *ADH1* gen anlatımındaki değişimler ortaya konmuştur.

Elde edilen verilere ışığında, çalışmamız sonucunda, UV ışık ile birlikte farklı besiyeri içerikleriklerinin (pH, NaCI ve $ZnSO_4$) *S. pombe* 972 h^- hücrelerinde *ADH1* gen anlatımına etki ederek 1-Bütanol üretimini arttırabileceği söylenebilir. Bu yüksek lisans tezi, son yıllarda fosil yakıt kaynaklarının azalması sonucu, 1-bütanol gibi enerji değeri yüksek, çevreye zararı olmayan alternatif yakıt kaynaklarının *S. pombe* gibi model organizmalarda üretilmesine yönelik öncü bir araştırma niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Akçay, M., Gölcü, M., Yazıcı, H., 2012, Tek silindirli benzinli bir motorda kısmi yüklerde bütanol ilavesinin performansa ve emisyonlara etkisi, *Journal of thermal science and technology*, 32(29):55–62.

Bennetzen, J.L. ve Hall, B.D., 1982, The Primary Structure of the *Saccharomyces cereuisiae* Gene for Alcohol Dehydrogenase I, *Federation of european microbiological societies*, 257:3018-3025.

Berg, M., J. and Shi, Y., 1996, The Galvanization of Biology: A Growing Appreciation for the Roles of Zinc, *Science*, 1081-1085.

Birnboim, H.C. ve Nasim, A., 1975, Excision of Pyrimidine Dimers by Several UV-Sensitive Mutants of *Schizosaccharomyces pombe. Molecular genetics and genomics*, 136:1-8.

Carvalho, D.L., de Avilles, R.R., Rodrigues, M.T., Borges, L.E., Appel, L.G., 2012, Mg and Al mixed oxides and the synthesis of n-butanol from ethanol *Applied catalysis* 41-416:96–100.

Casati, P. Ve Walbot, V., 2003, Gene Expression Profiling in Response to Ultraviolet Radiation in Maize Genotypes with Varying Flavonoid Content, *American society of plant biologists*, 103.02287,1739-1754.

Chandler, D. P., Wagnon, C.A. ve Bolton, H., Reverse Transcriptase (RT) Inhibition of PCR at Low Concentrations of Template and its Implications for Quantitative RT-PCR, *Applied and environmental microbiology*, 2:669-677.

Chauvel, A., Lefebvre, G., Marshall, N., 1989, *Petrochemical processes* 2: major oxygenated, chlorinated and nitrated derivatives, Paris: Technip, 2710805618 9782710805618 2710805626 9782710805625 2710805634 9782710805632.

Cherubini, F., 2010, The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals, *Energy conversion and management* 51 1412–1421, 1412-1421.

Close, T.J., 1997, Dehydrins: A Commonalty İn The Response of Plants to Dehydration and Low Temperature, *Physiologia plantarum* 100.291-296.

De, Smidt O., du Preez J.C., Albertyn J., 2008, The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisia*, *Federation of european microbiological societies*, 8(7):967–78.

Demain, A., 2009, Biosolutions to the energy problem, *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 1367-5435, 319-332.

Demirbaş, A., 2008, Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections, *Energy conversion and management* 49 2106–2116.

Denis, C.L. ve Young E.T., 1983, Isolation and Characterization of the Positive Regulatory Gene ADRI from *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and cellular biology*, 360-370.

Drewke, C. ve Ciriacy M., 1988, Overexpression, Purification and Properties of Alcohol Dehydrogenase IV From *Saccharomyces cerevisiae*, *Elsevier*, 54-60.

Drewke, C., Thielen J.ve Ciriacy M., 1990, Ethanol Formation in adh Mutants Reveals the Existence of aNovel Acetaldehyde-Reducing Activity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of bacteriology*, 0021-9193,3909-3917.

Dürre, P., 2008, Fermentative Butanol Production Bulk Chemical and Biofuel, *Annals of the new york academy of sciences*, 1125: 353–362, 353-362.

Egel, R., 2004 *The Molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*, (ed) Egel R., *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, New York, 978-3-642-05631-4.

Ehrensberger, M.K. ve Bird, A.J., 2011, Hammering Out Details: Regulating Metal Levels In Eukaryotes, *Trends in biochemical sciences*, 09680004, 524-531.

Eklund, H. and Branden, C., 1987, Alcohol Dehydrogenases. In. Biological Makromolecules and Assembleslies: Active Site Of Enzymes, *Wiley New York*, 73-142.

Engel, P.C. ve Massey, V., 1971, Green Butyryl-Coenzyme A Dehydrogenase An Enzyme-Acyl-Coenzyme A Complex, *Biochemistry journal*, 125, 889-902.

Erlich, H.A., Gelfand, D.H. ve Sninsky, J.J., 1991, Recent Advances in polymerase Chain Reaction, *Science*, 1643-1650.

Escobar, J. C., Lora, E.S., Venturini, O. J., Castillo E.F., Almazand O., 2009, Biofuels: Environment, Technology and Food Security, *Journal of renewable and sustainable energy*,13,1275–1287.

Falbe, J. 1970. Carbon monoxide in organic synthesis S*pringer* Verlag. ISBN 978-3-642-85857-4.

Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993, Yeasts-growth during fermentation. Wine Microbiology and Biotechnology In: Fleet, G.H. (Ed.),. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Forsburg, L.S., 2005, The Yeasts *Saccharomyces cerevısıae* and *Schızosaccharomyces pombe*: Models for Cell Biology, *Gravitational and space biology* 18(2) 3-10.

Funktionen, Z. ve Beyermann, D., 2002, Homeostasis and Cellular Functions of Zinc, *Materialwissenschaft und werkstofftechnik*, 09335137, 764-769.

Gabriel, C. L., 1928, Butanol Fermentation Process, *Industrial and engineering chemistry*,1063-1067.

Garcia, A., Eugene, L., Fischer, J.L., 1985, Butanol fermentation liquor production and separation by reverse osmosis, *Biotechnology and bioengineering*, 28(6):785-791.

Garcia, V., Pakkila, J., Ojamo, H., Muurinen, E., Keiski, R.L., 2011, Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency, *Renewable and sustainable energy*, 15(2):964–980.

Giga-Hama, Y., Kumagai, H., 1999, Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Biotechnology and applied biochemistry*, 30(3):235–244.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G., 1996, Life with 6000 genes, *Science*, 274(5287):546-567.

Goldstein, A.L., 1984, Thymic Hormones and Lymphokines. Plenum Press, New York.

Gonzalez-Ramos, D., van den Broek, M., Maris, A.J.A., Pronk J.T., Daran J.M.G., 2013, Genome-scale analyses of butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* reveal an essential role of protein degradation, *Biotechnology for biofuels*, 6:48.

Grobben, N.G., Eggink, G., Cuperus, F.P.,Huizing H.J., 1993, Production of acetone, butanol, and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with integrated membrane extraction, *Apply microbiol. biotechnolgy.*, 39:494–498.

Groot, W.J., Soedjak, H.S., Donck, P.B., Van der Lans R.G.J.M., Luyben K.C.A.M., Timmer J.M.K., 1990, Butanol recovery from fermentations by liquid—liquid-extraction and membrane solvent- extraction, bioprocess engineering 5 1615-7605 ,203–216.

Gutz, H, Heslot, H, Leupold, U, Loprieno, N., 1974, *Schizosaccharomyces pombe*. In: King RC (ed) Handbook of genetics, vol 1. Plenum Press, New York, pp 395-446.

Hadidi, A., Levy, L., Podleskis, E. V., 1995, Polymerase Chain Reaction Technology in Plant Pathology. *Molecular methods in plant pathology*, (ed) Singh R.P., Singh U. S., CRC Press, 0-87371-877-1, 167-187.

Hahn, H.D., Dambkes, G., Rupprich N., Bahl H., 2010, Butanols, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6:417-430.Jarvis P., Lister C., Szabo V., Dean C., 1994, Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant imbred lines of *Arabidopsis thaliana*, *Plant molecular biology*, 24:685–687.

Havlis, J., Studnickova M., 1997, Zinc centres in alcohol dehydrogenase from horse liver and from bakers yeast are metal dithiolenes, *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 43:157-159.

Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell B.R., Stauffer R.L., Kardos N.L., Hedges S.B., 2001, Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants, *Science*, 293(5532):1129–1133.

Henson, J. M. ve Frech, R., 1993, The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis, *Annual Review of phytopathology*, 81-109.

Hockberger, P.E., 2002, A History of Ultraviolet Photobiology for Humans, Animals and Microorganisms, *Photochemistry and photobiology*, 76(6):561–579.

Hong, K.K., Nielsen, J., 2012, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: A key cell factory platform for future biorefineries, *Cellular and molecular life sciences*, 69(16):2671–2690.

Huang, H., Liu, H., Gan, Y.R., 2010, Genetic modification of critical enzymes and involved genes in butanol biosynthesis from biomass, *Biotechnology advances*, 28(5):651–657.

Innis, M.A. ve Gelfand, D.H., 1990, Optimization of PCRs, in: *PCR Protocols*, A guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, 3-12.

Jackson, K.A., Valentine, R.A., Coneyworth, L.J., Mathers J.C. and Ford D., 2008, Mechanisms of mammalian zinc-regulated gene expression, *Biochemical society transactions* 36, 1262–1266.

Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C.F., Ji J., 2011, Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and sustainable energy*, 15(8):4080–4106.

Jones, D.T., Woods, D.R., 1986, Acetone-Butanol Fermentation Revisited, *Microbiological*, 50(4):484–524.

Jorgensen, H., Kristensen, J.B., Felby C., 2007, Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities, *Society of chemical ındustry*, 1(2):119–134.

Kaegi, J.H.R., Schaeffer, A., 1988, Perspectives in Biochemistry: Biochemistry of Metallothionein, *Biochemistry*, 27(23):8509–8515.

Kirschner, M. 2006. n-Butanol. Chemical Market Reporter January 30– February 5, Abı/Inform Global, p42.

Knoshaug, E.P., Zhang, M., 2009, Butanol tolerance in a selection of microorganisms, *Applied biochemistry and biotechnology*, 153(1-3):13–20.

Krivoruchko, A., Serrano-Amatriain, C., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen J., 2013, Improving biobutanol production in engineered Saccharomyces cerevisiae by manipulation of acetyl-CoA metabolism, *Journal of ındustrial microbiology and biotechnology*, 40(9):1051–6.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve P., 2009, Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, *Industrial and engineering chemistry*, 48(8):3713–3729.

Larroy, C., Fernandez M.R., Gonzalez E., Pares X. ve Bıosca J.A., 2002, Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (*ADH6*) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction, *Biochemistry*, 163-172.

Larroy, C., Pares X., Biosca, J.A., 2002(b), Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family, *European journal of biochemistry*, 269(22):5738–5745.

Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jung, K.S., 2008, Fermentative butanol production by Clostridia, *Biotechnology and bioengineering*, 101(2):209–28.

Lertwattanasakul, N., Sootsuwan K., Limtong S., Thanonkeo P., Yamada M., 2007, Comparison of the gene expression patterns of alcohol dehydrogenase isozymes in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and their physiological functions, *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 71(5):1170–1182.

Leskovac, V., Trivic, S., Latkovska, M., 1976, State and Accessibility of Zinc in Yeast Alcohol Dehydrogenase, *Biochemistry journal*, 155:155–161.

Leskovac, V., Trivic, S., Pericin, D., 2002, The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae, Federation of european microbiological societies*, 2(4):481–494.

Leupold, U., 1993, The origin of *Schizosaccharomyces pombe* genetics. In The Early days of yeast genetics, M. N. Hall, and P. Linder, eds. New York, Cold Spring Harbor Press., 125-131.

Liu Z., Ying, Y., Li F., Ma, C., Xu P., 2010, Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran, *Journal of ındustrial microbiology and biotechnology*, 37(5):495–501.

Lynd, L., Wyman, C., Gerngross, T., 1999, Biocommodity engineering, *biotechnology progress*, 15(5):777–793.

MacKenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. and Green, M., 1996, Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Revers Transcription Polymerase Chain Reaction, *Plant disease*, 81:222-226.

Madan, V.K., Hillmer, P., Gottschalk, G., 1973. Purification and properties of NADP-Dependent L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*, *Eur. Biochemistry*, 32: 51–56.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., 1982, Molecular Cloning. *Cold spring* , 0-87969-136-0.

McCready, S.J., Osman, F., Yasui, A., 2000, Repair of UV damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 451(1-2):197–210.

Mıtchıson, J. M., 1957, The growth of single cells. 1. *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental cell*, 13, 244-262.

Mocchegiani, E., Muzzioli, M., Giacconi, R., 2000(a), Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing, *Biogerontology*, 1:133–143.

Mocchegiani, E., Muzzioli, M., Giacconi, R., 2000(b), Zinc and immunoresistance to infection in aging : new biological tools, *Trends Pharmacology scient*, 21(6):205–208.economicsec

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch M., 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource technology*, 96(6):673–86.

Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K.,. Dalai, A.K, 2010, Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2):578–597.

Negelein, E. and Wulff H., 1937, Diphosphopyridinproteid Alcohol, Acetaldehyd. Biochemistry. 293, 351-389.

Ni, Y., Sun, Z., 2009, Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China, *Applied microbiology and biotechnology*, 83(3):415–23.

Niemistö, J., Saavalainen, P., Isomaki, R., Kolli, T., Huuhtanen, M. ve. Keiski R.L., 2013, *Biobutanol production from biomass*, Biofuel Techonologies: Recent Developments, in: Gupta K.V. ve Tuohy M.G. chapter 17, Springer, 978 -3642-34519-7,443-470.

Nigam, P.S., Singh, A., 2011, Production of liquid biofuels from renewable resources, *Progress in energy and combustion science*, 37(1):52–68.

Ortega, R., Bohic, S., Somogyi, A., Deve, G., 2004, Microchemical Element Imaging of Yeast and Human Cells Using Synchrotron X-ray Microprobe with Kirkpatrick - Baez Optics, *Analysis Chemistry*, 76(2):309–314.

Öğüt, H. ve Kuş R., 1999, Motorlu Taşıtlarda Alternatif Yakıt Kullanımı, *II. Ulaşım ve Trafik Kongresi – Sergisi Bildiriler Kitabı*, 29 Eylül 02 Ekim 1999, Ankara, Ostim Sergi Sarayı, Detamat, ISBN 975 - 395 - 367 – 4, 149-161.

Palosaari, N.R., Rogers P., 1988, Purification and Properties of the Inducible Coenzyme A-Linked Butyraldehyde Dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*, *Bacteriology*, 170(7):2971–2976.

Peralta-Yahya, P.P., Zhang F., del Cardayre S.B., Keasling J.D., 2012, Microbial engineering for the production of advanced biofuels, *Nature*, 488(7411):320–328.

Queiroz, H. De, Pareilleux A., 1990, Growth kinetics of Schizosaccharomyces pombe under various culture conditions: Influence of pH, malate, ethanol and oxygenation, *Applied microbiology and biotechnology*, 33:578–581.

Quereshi, N., Blaschek H.P., 2000a, Economics of butanol fermentation using hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101, *Trans IChem*, 78:139-144.

Qureshi, N., Blaschek H., 2001, Evaluation of recent advances in butanol fermentation, upstream, and downstream processing, *Bioprocess and biosystems engineering*, 24(4):219–226.

Qureshi, N., Blaschek H.P., 2000b, Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation, *Applied biochemistry and biotechnology*, 84(4):225–235.

Qureshi, N., Ezeji T.C., Ebener J., Dien B.S., Cotta M.A, Blaschek H.P., 2008a, Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber, *Bioresource technology*, 99(13):5915–5922.

Qureshi, N., Li X.L., Hughes S., Saha B.C., Cotta M.A, 2006, Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*, *Biotechnology progress*, 22(3):673–680.

Qureshi, N., Liu S., Ezeji T.C., 2013, *Advanced biofuels and bioproducts* J. W. Lee, (ed.), chapter 15, ISBN 978-1-4614-3348-4, 247-265.

Qureshi, N., Maddox I.S., 1995, Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction, *Journal of fermentation and bioengineering*, 80(2):185–189.

Qureshi, N., Maddox I.S., 2005, Reduction in Butanol Inhibition by Perstraction, *food and bioproducts processing*, 83(1):43–52.

Qureshi, N., Saha B.C., Cotta M.A, 2008b, Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part II—Fed-batch fermentation, *Biomass and bioenergy*, 32(2):176–183.

Qureshi, N., Saha B.C., Dien B., Hector R.E., Cotta M.A, 2010a, Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate, *Biomass and bioenergy*, 34(4):559–565.

Qureshi, N., Saha B.C., Hector R.E., Dien B., Hughes S.R., Liu S., Iten L., Bowman M.J., Sarath G., Cotta M.A,n 2010b, Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II – Use of corn stover and switchgrass hydrolysates, *Biomass and bioenergy*, 34(4):566–571.

Qureshi, N., Saha B.C., Hector R.E., Hughes S.R., Cotta M.A, 2008c, Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii:* Part I—Batch fermentation, *Biomass and bioenergy*, 32(2):168–175.

Rowhani, A., Maningas L.S., Daubert S.D. ve Golino D.A., 1995, Development of a Detection System for Viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions, *Plant disease*, 82:1-15.

Russell, D.W. and Smith M.., 1983. Nucleotide Sequence of the Yeast Alcohol Dehydrogenase I1 Gene, *The Journal of bioloigical chemıstry*, 2674-2682.

Ryu, M.S., Louis A. Lichten, Juan P. Liuzzi, and Robert J., Cousins, 2008, Zinc transporters ZnT1 (Slc30a1), Zip8 (Slc39a8), and Zip10 (Slc39a10) in mouse red blood cells are differentially regulated during erythroid development and by dietary zinc deficiency, *Journal of nutrition*, 138, 2076–2083.

Saiki, R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., 1985, Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, *Science*, 2999980, 1350-1354.

Schoondermark-Stolk, S., Jansen, M., Veurink, J.H., Verkleij, A.J., Verrips, C.T., Euverink, G.J.W., Boonstra, J., Dijkhuizen, L., 2006, Rapid identification of target genes for 3-methyl-1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(2):237–46.

Semblat, J.P., Wajnberg E., Dalmasso A., Abad P., Castagnone-Sereno P., 1998, High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis, *Molecular ecology*, 7(1):119–125.

Si, T., Luo, Y., Xiao, H., Zhao, H., 2014. Utilizing an endogenous pathway for 1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae. Metabolic engineering*, 22:60–8.

Sinha, RP. and Hader Dp., 2002, UV-Induced DNA Damage and Repair, *Photochem photobiol science*, 12661961, 225-236.

Smith, M.G., Des Etages S.G., Snyder M., 2004, Microbial Synergy via an Ethanol-Triggered Pathway, *Molecular cell biology*., 24(9):3874-3884.

Stefanidou, M., Maravelias C., Dona A., Spiliopoulou C., 2006, Zinc: A multipurpose trace element, *Archives of toxicology*, 80(1):1–9.

Svensson, U. and Tannock, G., 1999. Industrial perspectives. *Probiotics.*

Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008i, *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production.*

Taloria, D., Samanta, S., Dasa, S. and Pututunda, C., 2012, Increase in Bioethanol Production by Random UV Mutagenesis of S.cerevisiae and by Addition of Zinc Ions in the Alcohol Production Media, *Sciverse sciencedirect*, 2 (2012) 43 – 49.

Thang, V.H., Kanda K., Kobayashi G., 2010, Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161(1-8):157–70.

Tvegard, T., 2007, Effects of UV light on cell cycle regulation in fission yeast, Yüksek Lisans, Department of Cell Biology Institute for Cancer Research

Vallee, B.L., Hoch F.L., 1955, Zinc, A component of yeast alcohol dehydrogenase, *Proceedings of the national academy of sciences*, 41(6):327–338.

Vos, P. and et all., 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. , 23(21), pp.4407–4414.

Walker, G.M., 1998, *Yeast metabolism*, In: Yeast Physiology and Biotechnology, (ed) Wiley, J., Chapter 5, Wiley, New York, 978-0471964469, 203-215.

Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M., 1992, *The polymerase chain reaction In: Recombinant DNA*, New York, 78-79.

Weissermel, K., Arpe, H.J., 2003, *Alcohols*, Industrial Organic Chemistry, 4th edition, (Wiley)-VCH GmbH & Co. Weinheim, Germany, ISBN:3-527-30578-5, 193-216.

Wellinghausen, N., Rink, L., 1998, The significance of zinc for leukocyte biology, *Journal of leukocyte biology*, 64:571–577.

Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Dunez J., 1991, A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of virological methods*, 33(3):355–365.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne M., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe, Nature*, 415:871-880.

Young, E.T., Pilgrim, D., 1985i. Isolation and DNA Sequence of ADH3 , a Nuclear Gene Encoding the Mitochondrial Isozyme of Alcohol Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*, 5(11):3024–3034.

Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., Sonomoto, K., 2014, Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic engineering and fermentation technology, *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(1):1-9.

Zverlov, V.V., Berezina, O., Velikodvorskaya, G.A., Schwarz, W.H., 2006, Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: Use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery, *Applied microbiology and biotechnology*, 71(5):587–97.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi [16.Ağustos.2014].

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702?from=summary [7.Kasım.2014].

http://www.ebi.ac.uk/intenz/query?cmd=SearchECveec=1.1.1.1 [1.Ekim.2014].

http://www.biofuel.org/ [23.Ocak.2013].

http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/main4.html [4.Nisan 2014].

http://www.pombase.org/spombe/result/SPCC13B11.01 [11.Eylül.2014].

http://www.sanger.acuk/Project/S_pombe/genome_stats.shtml [13.Ağustos.2014].

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702?from=summary [27.Eylül.2014].

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Ebru KANIMDAN
Uyruğu	T.C
Doğum Yeri	İSTANBUL
Telefon	(554) 445 99 51
E-mail	ebrukanimdan@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Lisans	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2006-2010
Lise	Fatih Gelenbevi Anadolu Lisesi	2001-2005