

Aromatik Halkalı Bazı Fosfazenerin *Saccharomyces cerevisiae* L. Kültüründe Biyokimyasal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ayşe Dilek ÖZŞAHİN^{1*}, Ayşe ERDOĞDU², Oğuz Ayhan KIREÇCI³, Ökkeş YILMAZ⁴

¹Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitlis, ^{2,4}Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Elazığ, ³Bitlis Eren Üniversitesi, Hizan MeslekYüksek Okulu, Bitlis

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1832-7082>, ²<https://orcid.org/0000-0001-5894-1442>, ³<https://orcid.org/0000-0003-2205-4758>

⁴<https://orcid.org/0000-0002-1832-7082>

✉: molekuler@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada; yeni sentezlenmiş aromatik halkalı fosfazenerin *S. cerevisiae* kültür ortamında toplam protein, glutatyon S-transferaz (GST) ve doymamış yağ asitleri üzerinde ki etkisi belirlendi. Farklı fosfazen molekülleri kullanıldı. Deney grupları kontrol grubu ve fosfazen molekülleri grupları şeklinde düzenlendi. Ardından, *S. cerevisiae* kültürünün kontrol grubu dışında diğer kültürlerle 20 µg fosfazen ilave edildi. 30 °C de 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücre pelletleri ayrıldı ve Tris-ETDA tamponu homojenize edildi. Homojenizattan Glutatyon S-Transferaz (GST) ile total protein düzeyleri belirlendi. Hekzan/izopropanol karışımı ile elde edilen homojenattan da yağ asidi analizi yapıldı. Deney sonuçlarına göre, fosfazen molekülü ilave edilen maya hücrelerinde total protein değerleri ile GST değerlerinde paralel bir şekilde artış gösterirken, bazı gruplarda protein miktarında artış gözlemlendiği halde GST düzeyinde azalma saptandı. *S. cerevisiae* yağ asidi bileşimi içinde doymamış yağ asitlerinden oleik asit ile palmitoleik asitlerin yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi. Fosfazenerin yağ asidi sentezi üzerinde hem azaltıcı yönde hem de artırıcı yönde etkili olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak; yeni sentezlenmiş fosfazen moleküllerinin *S. cerevisiae*'da biyokimyasal parametreler üzerinde farklı etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur. Bu farklı etkinin fosfazenerin moleküler yapılarında ki farklılığa bağlı olarak açığa çıktığı düşünülmektedir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 05.04.2021

Kabul Tarihi : 27.05.2021

Anahtar Kelimeler

Fosfazen molekülleri
Glutatyon S-Transferaz
Saccharomyces cerevisiae L.
Total protein
Yağ asiti

Determination of Biochemical Activities of Aromatic Cyclic Phosphatans in the Culture of *Saccharomyces cerevisiae* L.

ABSTRACT

In this study; the effect of newly synthesized different aromatic cyclic phosphazenes on total protein, glutathione S-transferase (GST) and unsaturated fatty acids in *S. cerevisiae* culture medium was determined. The experimental groups were organized as control group, and phosphazene molecules groups, then, 20 µg of phosphazene was added to other cultures, except for the control group of *S. cerevisiae* culture. All treatments were incubated for 72 hours at 30 °C. At the end of incubation, cell pellets were separated and Tris-ETDA buffer was homogenized. Total protein levels were determined from Glutatyon S-Transferase (GST) from homogenized. The fatty acid was analyzed from the homogenate obtained with the hexane/isopropanol mixture. According to the results of the experiment, while the total protein values and GST values increased in parallel in the yeast cells to which the phosphazene molecule was added, a decrease in the GST level was found in some groups although the protein amount was increased. It was observed that high levels of oleic acid and palmitoleic acids were among the unsaturated fatty acids in the *S. cerevisiae* fatty acid composition. It was observed that phosphazenes had both a decreasing and increasing effect on the

Research Article

Article History

Received : 05.04.2021

Accepted : 27.05.2021

Keywords

Fatty acid
GlutathioneS-Transferase
Phosphazene molecules
S. cerevisiae
Total protein

fatty acid synthesis compared to the molecular groups. It can be concluded that newly synthesized phosphosene molecules have different effects on biochemical parameters in *S. cerevisiae*. It was thought that this different effect occurs due to the difference in the molecular structure of the phosphocenes.

Atıf İçin: Özşahin AD, Erdoğan A, Kireççi OA, Yılmaz Ö 2022. Aromatik Halkalı Bazı Fosfazenlerin *Saccharomyces cerevisiae* L. Kültüründe Biyokimyasal Aktivitelerinin Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (2): 223-233. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.908393.
To Cite: Özşahin AD, Erdoğan A, Kireççi OA, Yılmaz Ö 2022. Determination of Biochemical Activities of Aromatic Cyclic Phosphatans in the Culture of *Saccharomyces cerevisiae* L. KSU J. Agric Nat 25 (2): 223-233. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.908393.

GİRİŞ

Fosfazenler; fosfor ve azotun bir araya gelmesiyle oluşan, kendilerine özgü moleküler yapıya sahip olan maddelerdir. Bu molekülleri oluşturan atomların arasında tekli ve çiftli bağlar bulunmaktadır. Fosfazenler; siklo, poli ve monofosfazenler olmak üzere üç kategoriye ayrılırlar. Daha kararlı yapıya sahip oldukları için, yoğun olarak monofosfazenler yapılan çalışmalarda tercih edilmiştir. Ancak içerik olarak en iyi tanımlanan siklo ve polifosfazen molekülleridir (Koran ve ark., 2014).

İnorganik yapılu fosfazen bileşikleri morfolojik olarak; lineer, halkalı veya polimerik olmak üzere 3'e ayrılır. Bu şekilde sınıflandırılmasının temel nedeni azot-fosfor atomlarının tekrarlı yapı oluşturmalarıdır. Ayrıca fosfora bağlanan organik yapılu bazı gruplarla oluşturmuş oldukları etkileşim ve yer değiştirmeler sonucu farklı özellikler ihtiva eden fosfazenler sentezlenebilmektedir (Gudasi ve ark., 2007). Fosfazenlerin birbirinden farklı özellikleri ve etkileşimleri bulunmaktadır. Yüksek ısıya karşı dayanıklılık, antimikrobiyal, yangına karşı geciktirici-söndürücü etki ve katalizör etkisi gibi özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler fosfazenlerin, endüstri ve tıp alanlarında kullanılmasını sağlamıştır (Atalan, 2016). Günümüzde kanser çalışmalarında kemoterapik ajan olarak fosfazenler kullanılmaktadır (Coşkun, 2011). Bazı fosfazenler de zararlıları bitkilerden uzaklaştırmak ve toprak verimini arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Özen ve ark., 2014).

1900'lü yılların sonlarına doğru fosfazen bileşikleriyle ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Halkalı fosfazenlerle başlanmış olan bu çalışmalar günümüzde geliştirilen tekniklerle artış göstermiştir (Dumanoğulları, 2006). Farklı özelliklere sahip olan fosfazenler yapılarındaki bağlamalara göre değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlikler fosfazenler için farklı kullanım alanı oluşturmaktadır. Fosfazenler ve ökaryotik hücre yapısında olan *S. cerevisiae* L. (ekmek mayası) ile çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarla; doymamış yağ asitleri, ergosterol ve diğer toksik maddelerin etkilerinin araştırılmasında ve incelenmesinde kolaylıklar sağlanmıştır (Ribeiro ve

ark., 2000; Cabral ve ark., 2003).

Bu çalışmada; yeni sentezlenmiş fosfazen gruplarının *S. cerevisiae* hücre modeli üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Farklı aromatik halka yapısına ve moleküllerine sahip olan bazı fosfazen gruplarının *S. cerevisiae* kültür ortamlarında yağ asidi, total protein ve Glutathion-S-Transferaz (GST) analizleri yapılmış, bu yeni sentez maddelerin biyokimyasal parametreler üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Fosfazen Molekülleri

Bu moleküllerin sentezi TÜBİTAK tarafından desteklenen TBAG-107T407 nolu proje ile yapılmıştır.

METOT

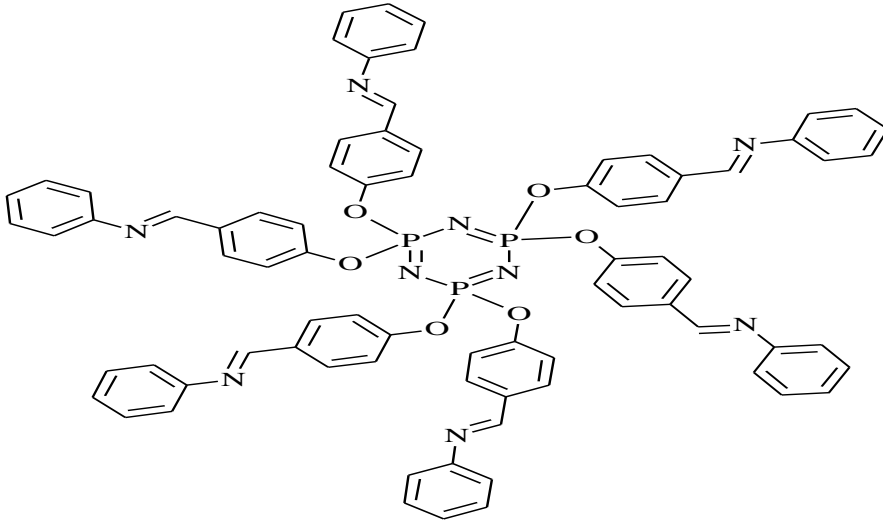
FM1= 18.8 mg; FM2= 19.5 mg; FM3= 20.9 mg; FM4= 20.9 mg; FM5= 20.4 mg; T2= 20 mg; T2A= 20 mg; T2B= 20 mg; T2C= 20 mg tartılarak 5 ml DMSO (dimetil sülfoksit)'da çözdürüldü. Kültür ortamına ekim yapılana kadar + 4 °C de bekletildi.

Maya Kültür Ortamının Hazırlanması

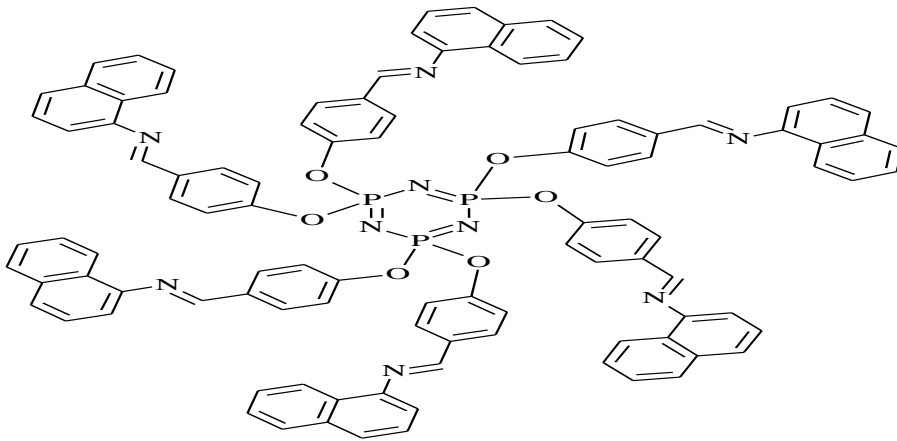
Deneyde kullanılacak olan *S. cerevisiae* gelişimi ve çoğalması için YEPD (200 mL için; 2 g maya ekstraktı, 4 g baktipepton, 4 g glukoz) besiyeri ortamı her grup için tekrar sayısı (n= 5) olacak şekilde hazırlandı (Dilsiz ve ark.,1997). Besiyeri ortamı hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplara ayrıldı:

Kontrol grubu: Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, YEPD besiyeri ortamı hazırlandı.

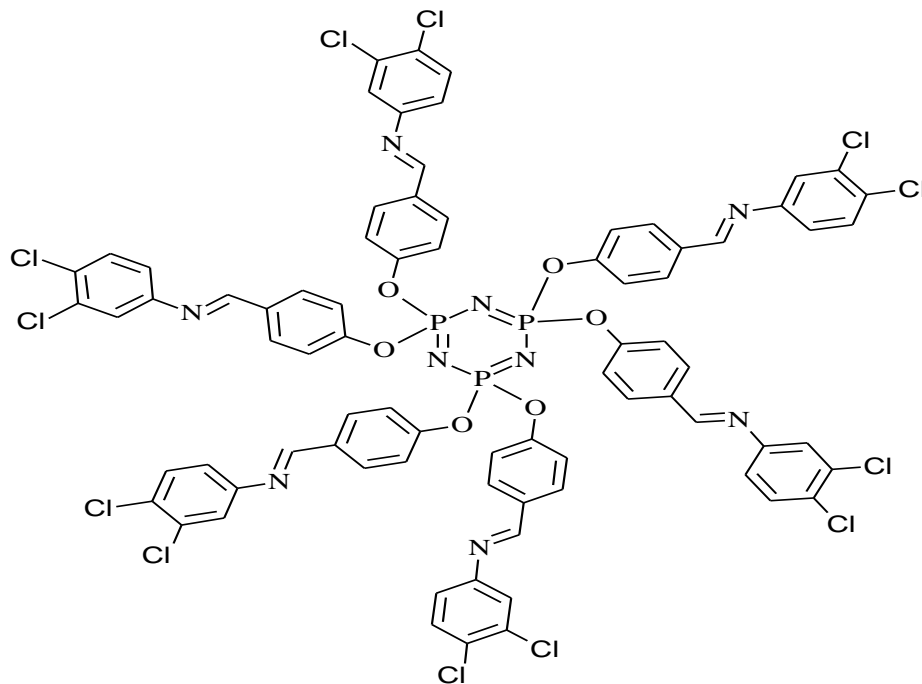
Fosfazen Uygulama Grupları: Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, YEPD besiyeri ortamı içerisine maya hücresi inoküle edildikten sonra OD600 değerleri 0.4-0.6 civarına [yaklaşık olarak 1-3 10⁷ hücre ml (Bergman, 2001) ulaşınca fosfazen maddelerin her birinden 20 µg miktarında eklenerek gruplar hazırlandı. Her fosfazen madde ayrı bir grup olarak belirlenip deneysel çalışma işlemi yürütüldü ve aşılama işleminden sonra kültürler 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda



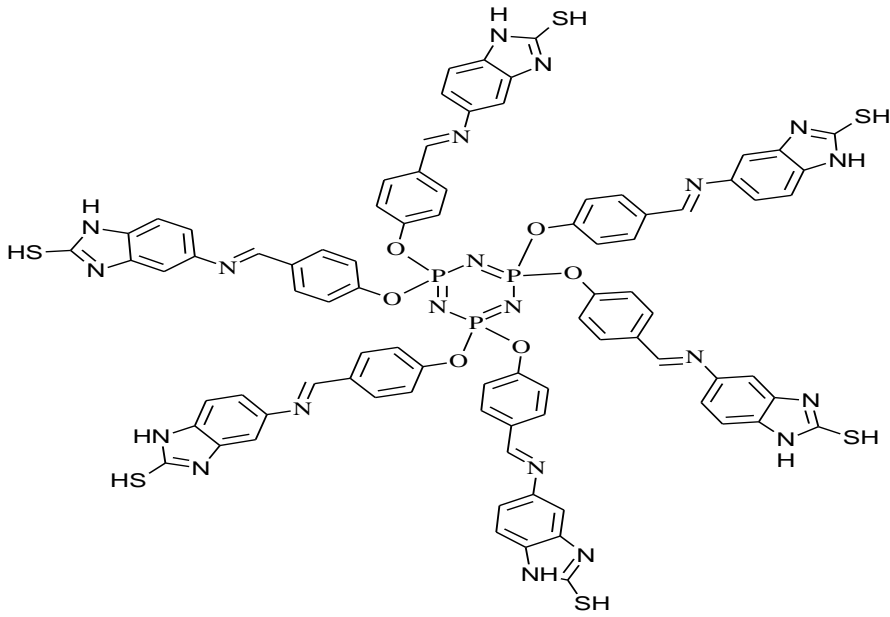
FM1= Hekza (4-fenil-iminometoksifenoksi) siklotrifosfazen, Molekül ağırlığı: 1312.288986



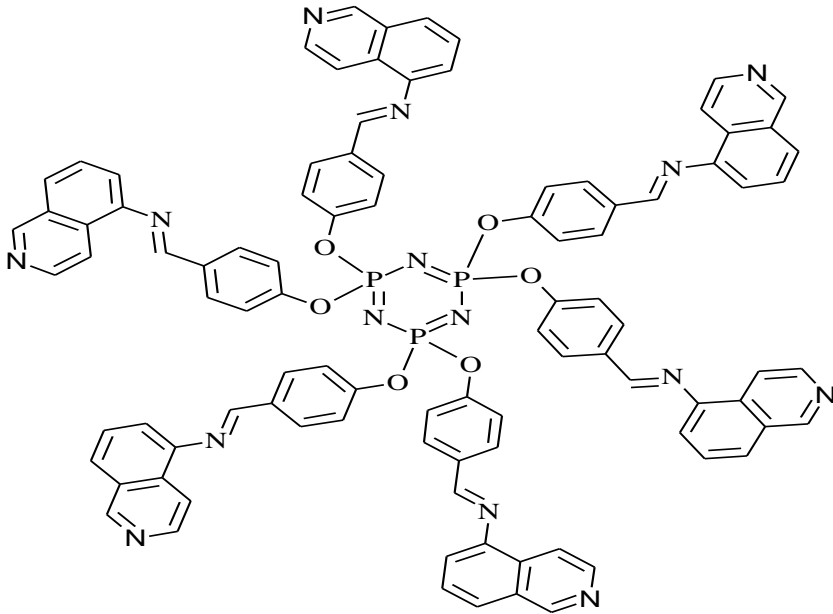
FM2= Hekza (4-naftil-iminometoksifenoksi) siklotrifosfazen, Molekül ağırlığı: 1612.641066



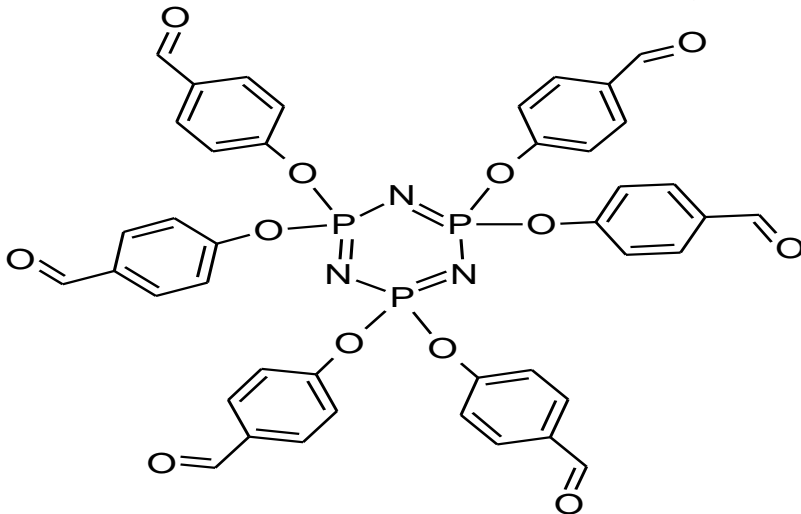
FM3= Hekza (biskloro-fenil-iminometilfenoksi) siklotrifosfazen, Molekül ağırlığı: 1725.629706



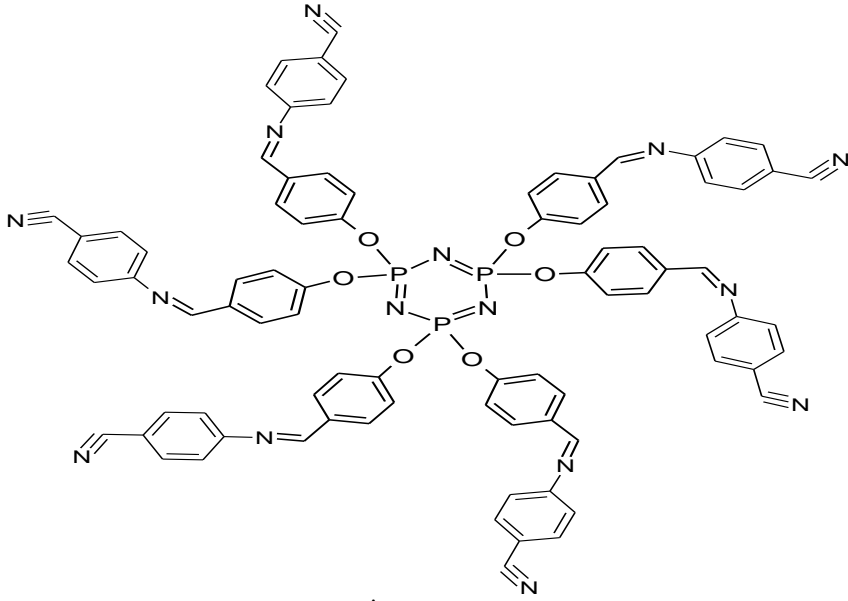
FM4= Hekza (iminometilfenoksi) siklotrifosfazen, Molekül ağırlığı:1744.823586



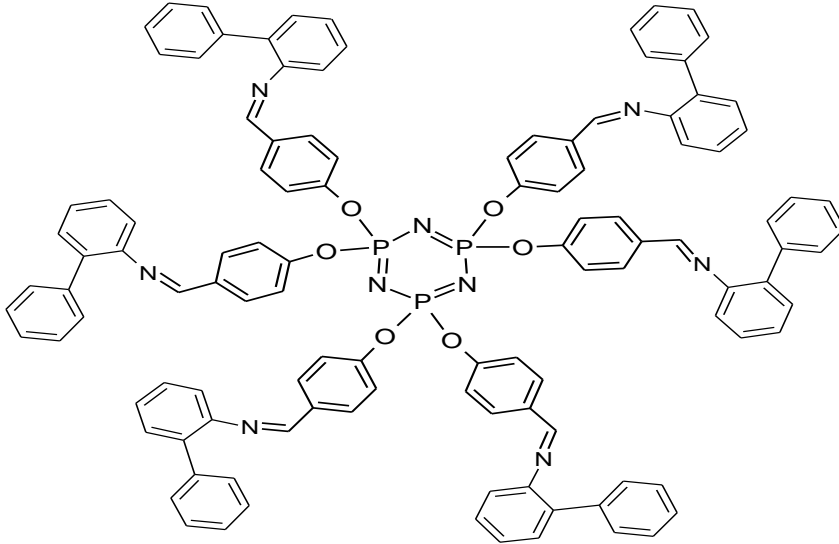
FM5= Hekza (indaziliminometilfenoksi) siklotrifosfazen, Molekül Ağırlığı: 1618. 569426



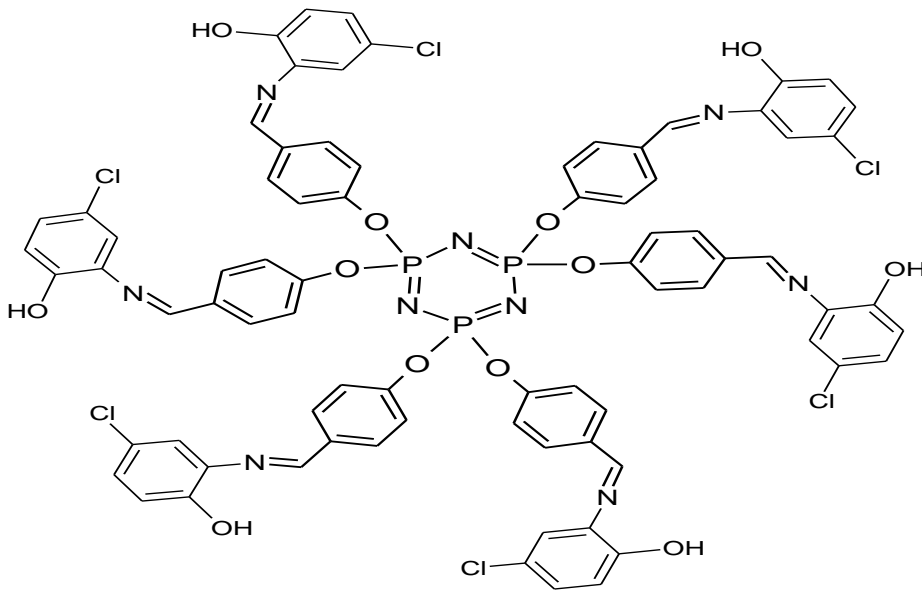
T2= Fenoksisiklotrifosfazen, Molekül ağırlığı:861.621786



T2A= 4-aminobenzonitril (PHİDF1), Molekül ağırlığı:1462.345746



T2B= 2-aminobifenil (PHİDF2), Molekül ağırlığı:1768.864746

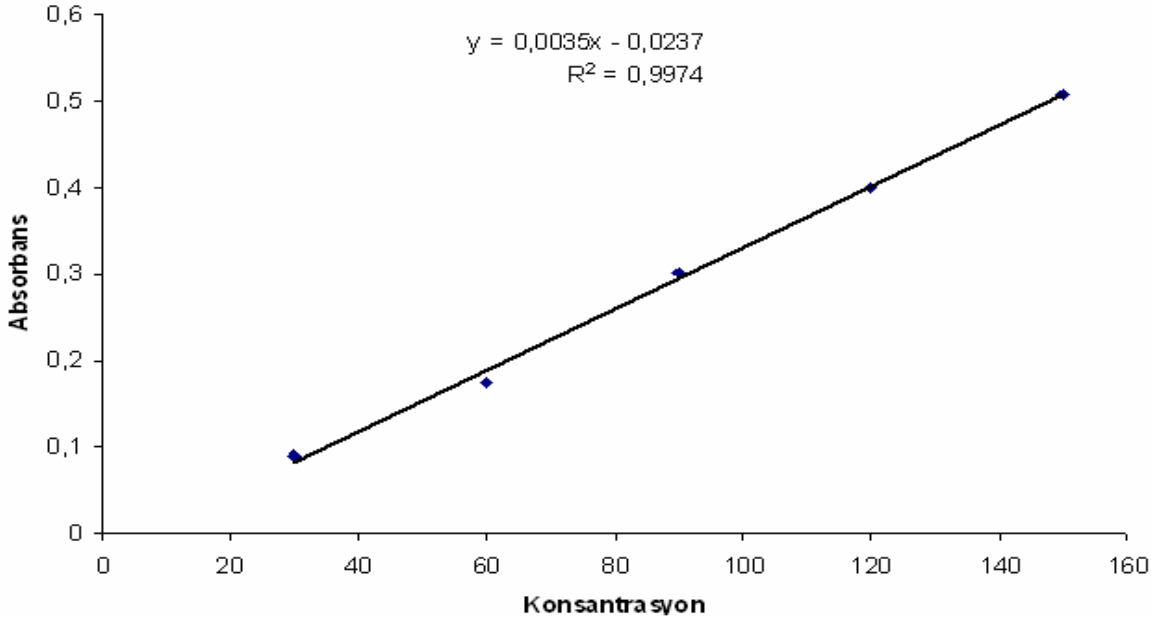


T2C= 2-amino-4-klorofenol (PHİDF3), Molekül ağırlığı:1614.955746

kültürler laboratuvar şartlarında 517 nm'de hücre yoğunlukları ölçüldükten sonra, 6000 rpm'de 5 dakika süreyle +4 °C'de santrifüj edilerek hücreler toplandı. Hücreler pellet olarak toplandıktan sonra yağ ağırlıkları belirlendi. Hücre pelletleri, 20 mM Tris HCl-baz (pH= 7.4) ve 20 mM EDTA karışımı ile homojenize edilip santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı ile GST, pelet kısmı ile total protein ve yağ asidi ölçümleri yapıldı.

Maya Hücresinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi

Örneklerin total protein miktarlarının ölçümü Lowry (1950) yöntemine göre yapıldı. Gruplar 750 nm'de blank'a karşı okundu ve okunan değerlere göre Şekil 1'deki kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Örneklerin protein miktarları elde edilen bu kalibrasyon eğrisindeki denklem vasıtasıyla hesaplandı, sonuçlar (mg/g) şeklinde verildi.



Şekil 1. Protein kalibrasyon eğrisi
Figure 1. Protein calibration curve

Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesi Tayini

Glutasyon S-transferaz tayini Habig (1974) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. GST'nin bütün izozimleri için 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CdNB) substrat olarak kullanılır. GST enzimi tarafından CdNB, indirgenmiş glutasyon (GSH) ile konjuge edilerek glutasyonun oksidasyonuna bağlı olarak 340 nm'de absorbans yükselmektedir. Enzim aktivitesinin tayini için 3 dakika boyunca 340 nm'de yükselen absorbanslar okunarak 340 nm'de ($\epsilon=340: 9,6 \text{ mM cm}^{-1}$) 1 dakikada supernatantta bulunan 1 mg toplam protein başına oluşturulan tioeter miktarı belirlenmiştir.

Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Hücre peleti örneklerinde yağ asidi ekstraksiyonu Hara ve Radin tarafından tanımlanan yöntemle yapıldı (Hara ve Radin, 1978). Doku örnekleri 3:2 (v/v) oranında heksan-isopropanol karışımı ile homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası bu homojenat +4 °C'de 9050 x g'de 10 dk. santrifüj edilerek elde edilen üst kısımdan yağ asidi analizi yapıldı.

Yağ asidi bileşimini belirlemek için ayrılan örneklerin üzerine %2'lik metanolik sülfürik asitten ilave edildi, iyice karıştırılarak 55 °C'de 15 saat etüvde metilleşmeye bırakıldı (Christie, 1999). Süre sonunda tüpler etüvden çıkarıldı, soğuduktan sonra %5'lik NaCl ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri heksan ile ekstrakte edildi ve heksan fazı üstten pipetle alınarak %2'lik potasyum bikarbonat (KHCO_3) ile muamele edildi ve fazların ayrılması için 10 saat beklendi. Süre sonunda metil esterlerini içeren karışımların, 45 °C'de ve azot gaz akımı altında çözücülerini uçuruldu, 1 mL n-heptan ile çözüldü ve yağ asidi metil esterleri gaz kromatografisinde analiz edildi. Bu analiz için SPTM-2380 kapiler GC kolon (L×ID. 30 m × 0,25 mm, df 0,20 µm) (Sigma) kullanıldı.

Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi

Lipit ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra Shimadzu marka GC 2001 Plus gaz kromatografisi ile analiz edildi. Analiz sırasında kolonun sıcaklığı 148–218 °C, enjeksiyon sıcaklığı 245 °C ve dedektör sıcaklığı 290 °C olarak

tutuldu. Kolon sıcaklık programı 148 °C'den 218 °C'ye kadar programlandı. Sıcaklık artışı 180 °C'ye kadar 5 °C dk⁻¹ ve 200 °C'den 218 °C'ye kadar 4 °C dk⁻¹ olarak ayarlandı. 218 °C'de 4 dakika tutulacak ve toplam süre 28 dakika olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanıldı. Analiz sırasında örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemten sonra gerekli programlamalar yapılarak örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizleri yapıldı (Tvrzicka ve ark., 2002).

İstatistiksel Analizler

İstatistik analizleri için, SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırmada ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi ve grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise LSD testi kullanıldı. Sonuçlar; ortalama ± SEM olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi için p değerleri dikkate alınarak p<0.05 olarak kabul edildi.

Çizelge 1. FM grubu fosfazenlerin GST ve total protein değerlerinin kontrol grubuna göre değişimi

Table 1. Changes in GST and total protein values of FM group phosphasens compared to the control group.

	Kontrol	FM1	FM2	FM3	FM4	FM5
Total Protein (mg/g pellet)	19.80±14.74	24.72±27.19 ^b	31.08±0.40 ^c	35.32±0.76 ^c	59.65±0.64 ^d	69.10±0.36 ^d
GST (ug/g)	0.28±0.00	0.55±0.00 ^d	0.42±0.01 ^c	0.44±0.00 ^c	0.45±0.00 ^c	0.47±0.00 ^c

b: p<0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p<0.001 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

Çizelge 2. T2 grubu fosfazenlerin GST ve total protein değerlerinin kontrol grubuna göre değişimi

Table 2. Changes in GST and total protein values of T2 group phosphazens compared to the control group

	Kontrol	T2	T2A	T2B	T2C
Total Protein (mg/g pellet)	54.61±0.67	76.75±1.02 ^d	84.31±1.25 ^d	79.41±0.37 ^d	101.86±0.63 ^d
GST (ug/g)	0.45±0.00	0.48±0.00 ^a	0.65±0.01 ^d	0.59±0.00 ^d	0.24±0.00 ^d

a: p>0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

d: p<0.001 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

Fosfazen moleküllerinin moleküler yapıları incelendiğinde yan zincirlerinde; FM1 ve FM2'de sadece aromatik halkalar, FM3'de aromatik halkaya bağlı Cl molekülleri, FM4'de SH grupları, FM5'de ise aromatik halkada NH grubunun bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 1-5). Bu maddelerin ilave edildiği kültür ortamlarındaki biyokimyasal parametreleri incelendiğinde; total protein düzeylerinde kontrol grubuna göre artış gözlenmiş ve buna paralel olarak da GST miktarı da yükselmiştir (Tablo 1). Total protein artışının GST düzeyi artışına etkisi olduğu söylenebilir. Bu maddelerin moleküler yapıları kimyasal olarak incelendiğinde yalnızca FM4'ün elektron verici özellikte olduğu görülmektedir, ancak maya hücresi moleküler farklılığı dikkate alınmadan

BULGULAR ve TARTIŞMA

Fosfazen Gruplarının *Saccharomyces cerevisiae* Hücrelerinin Total Protein ve GST Seviyesi Üzerindeki Etkisi

Farklı özellikte aromatik halka taşıyan fosfazenlerin; *S. cerevisiae*'de total protein miktarının kontrol grubuna göre bütün fosfazen moleküllerinde yüksek olduğu tespit edildi (p<0.05, p<0.01, ve p<0.001). Artışın en yüksek olduğu fosfazen moleküllerin FM2-FM3'de önemli düzeyde (p<0.01) ve FM4'de ise belirgin düzeyde yüksek olduğu saptandı (p<0.001). GST enzim sonuçlarının da kontrol grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi (p<0.01 p<0.001) (Çizelge 1).

T2 grubu fosfazenlerin GST ve total protein değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, fosfazen ilave edilen bütün gruplarda total protein miktarının yüksek olduğu belirlendi (p<0.001). GST düzeyinin ise, T2A-T2B gruplarında yüksek olduğu halde (p<0,001), T2C grubunda belirgin düzeyde azaldığı belirlendi (p<0.001) (Çizelge 2).

bütün maddelere aynı tepkiyi vermiştir. GST enziminin toksik etkili molekülleri temizleme özelliği dikkate alınırca, bu enzim miktarının artması moleküllerin maya hücresi için zararlı etki yaptığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Nedjoud ve ark., (2013) yaptıkları bir araştırmada çinko uygulamasının *S. cerevisiae* mayasında GST enzim aktivitesini kontrol grubuna göre artırdığını ortaya koymuşlardır. *S. cerevisiae*'nin gelişme ortamına ağır metallerin uygulanması sonucu biyokimyasal parametrelerindeki değişiklikleri belirlemek için yapılan bir çalışmada; ağır metal uygulamalarının GST enzim aktivitesini belirgin oranda arttırdığı saptanmıştır (Kireççi 2018).

Yapılan araştırmada; total protein miktarı üzerine

fosfazen gruplarının önemli düzeyde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Oksidatif stres karşısında sentezlenen proteinlerin ya da hasara uğramış proteinlerin hücrede birikimine sebep olabileceğini daha önce yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Vincent ve ark., 2004). Kullanılan fosfazenlerin etkisi ile hücrede anormal protein birikimi oluşabilir. Bu birikim hücrede protein düzeyinin artışı ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte oksidatif strese karşı hücrelerde yeni proteinlerin sentezi de protein düzeyinde artışa neden olabilmektedir. Bu hipotez literatürde bazı araştırmacılar tarafından desteklenmektedir. Tamarit ve ark., (1998), oksidatif strese bağlı olarak bir grup oksitlenmiş proteinin ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Fosfazen Gruplarının *Saccharomyces cerevisiae* Hücresinin Yağ Asidi Profili Üzerindeki Etkisi

Aromatik halka taşıyan fosfazenlerin *S. cerevisiae*'nin yağ asidi bileşimi üzerine etkilerine bakıldığında;

Tablo 3. FM grubu fosfazen moleküllerin yağ asidi sonuçlarının kontrol grubuna göre değişimi (%)

Table 3. Change of fatty acid results of FM group phosphase molecules compared to the control group (%)

Yağ asitleri	Kontrol	FM1	FM2	FM3	FM4	FM5
8:0	1.89±0.01	1.75±0.02 ^a	3.63±0.21 ^d	3.21±0.03 ^d	5.17±0.08 ^d	2.07±0.04 ^a
12:0	4.15±0.13	6.13±0.17 ^d	3.52±0.26 ^a	4.31±0.11 ^a	5.32±0.54 ^a	6.19±0.21 ^d
14:0	6.74±0.22	6.60±0.14 ^a	5.430±0.40 ^b	7.42±0.39 ^a	7.30±0.50 ^a	7.21±0.39 ^a
16:0	43.02±0.28	41.98±0.63 ^a	36.60±0.93 ^d	42.01±0.68 ^a	39.25±0.99 ^c	42.73±0.63 ^a
16:1, (n-7)	6.89±0.28	7.47±0.20 ^a	6.27±0.21 ^a	6.07±0.24 ^b	5.71±0.18 ^c	6.88±0.29 ^a
17:0	0.10±0.00	0.10±0.00 ^a	0.13±0.01 ^a	0.12±0.00 ^a	0.12±0.02 ^a	0.19±0.12 ^a
17:1	0.37±0.03	0.04±0.00 ^d	0.06±0.00 ^d	0.08±0.00 ^d	0.05±0.00 ^d	0.05±0.00 ^d
18:0	11.87±0.54	12.45±0.39 ^a	14.03±0.39 ^c	14.52±0.45 ^c	11.51±0.20 ^a	13.34±0.19 ^b
18:1, (n-9)	15.44±0.28	15.97±0.18 ^a	17.69±0.18 ^c	16.11±0.21 ^b	14.64±0.19 ^b	15.49±0.27 ^a
18:2, (n-6)	1.46±0.01	1.87±0.03 ^c	1.49±0.03 ^a	1.80±0.02 ^c	1.68±0.03 ^b	1.24±0.03 ^b
18:3, (n-3)	1.73±0.02	3.69±0.14 ^d	3.28±0.08 ^d	3.78±0.22 ^d	4.81±0.39 ^d	2.69±0.19 ^b
20:0	0.17±0.01	0.15±0.00 ^a	0.40±0.06 ^d	0.14±0.01 ^a	0.15±0.00 ^a	0.16±0.00 ^a
20:1	0.11±0.00	0.13±0.00 ^a	1.09 ±0.02 ^d	0.07±0.08 ^a	0.99±0.00 ^b	0.15±0.00 ^a
Σ Doymuş	67.60	69.16	63.74	71.64	71.82	71.89
Σ Doymamış	32.40	30.84	36.26	28.36	28.18	28.11

a: p>0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: p<0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p<0.001 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

T2 grubu fosfazenlerin yağ asidi değerleri kontrol grubu karşılaştırıldığı zaman, kaprilik asitin (8:0), T2A ve T2C gruplarında (p<0.05, p<0.001), laurik asit (12:0)'in ise T2A – T2C gruplarında yüksek olduğu (p<0.01) bulundu. Miristik asitin (14:0), T2 grubunda, pentadekanoik asitin (15:0) ise fosfazen gruplarının hepsinde azaldığı saptandı (p<0.05, p<0.001). Yağ asidi sentetaz enziminin son ürünü olan palmitik asit (16:0), T2A ve T2C gruplarında (p<0.001, p<0.05); delta 9 desaturaz enzim ürünü olan palmitoleik asit (16:1, n-7) miktarının bütün fosfazen grubu maddelerde yükseldiği belirlendi (p<0,05). Delta 9

kısa zincirli yağ asitlerinden kaprilik asitin (8:0); FM2, FM3 ve FM4 gruplarında, 12:0 (laurik asit) yağ asidinin ise FM1 ile FM5'de yüksek olduğu belirlendi (p<0.001) (Tablo 3). Orta zincirli yağ asitlerden miristik asitin (14:0), FM2 grubunda (p<0.05), uzun zincirli yağ asitlerden palmitik asitin (16:0), FM2 ve FM4 gruplarında (p<0.001; p<0.01), palmitoleik asitin ise FM3 ile FM4 gruplarında azaldığı belirlendi (p<0.05; p<0.01) (Tablo 3). Stearik asit miktarının (18:0) FM 1-4 no'lu gruplar ile kontrol grubu arasında farklılık göstermediği halde, FM 3, 4 ve 5. grup fosfazenlerde artışlar olduğu belirlendi (p<0.01; p<0.05). Oleik asit (18:1,n-9) miktarında FM1 ve FM5 gruplarında kontrol grubuna göre fark gözlenmedi. Ancak miktarda FM2 ile FM3 gruplarında artış (p<0.01; p<0.05) ve FM4'de azalış olduğu saptandı (p<0.01). Linoleik asit (18:2,n-6) düzeyinin; FM1, 3 ve 4'de yüksek, FM5' de ise azaldığı belirlendi (p<0.01; p<0.05).

desaturaz enziminin substratı olan stearik asit (18:0) ile delta 9 desaturaz enziminin ürünü olan oleik asitin (18:1, n-9) T2A, T2B ve T2C gruplarında azaldığı belirlendi (p<0.05) (Tablo 4).

Maya hücresi moleküler biyoloji ile biyokimya biliminin gelişimiyle biyologlar arasında daha popüler bir mikroorganizma haline gelmiştir. Maya hücresinin iyi bir ökaryotik hücre modeli olduğunu ve mayada meydana gelen moleküler ve biyokimyasal mekanizmaların karmaşık yapıları ökaryotlarda da meydana geldiğine dair kanıtlar bulunduğu vurgulanmıştır.

Tablo 2. T2 grubu fosfazenerin yağ asidi değerlerinin kontrol grubuna göre değişimi (%)

Table 4. The change in fatty acid values of T2 group phosphazens compared to the control group (%)

Yağ asitleri	Kontrol	T2	T2A	T2B	T2C
8:0	1.37±0.29	1.34±0.07 ^a	1.75±0.04 ^b	1.46±0.15 ^a	2.59±0.11 ^d
12:0	1.59±0.26	1.34±0.12 ^a	1.79±0.13 ^c	1.98±0.14 ^a	1.84±0.02 ^c
14:0	3.15±0.29	2.23±0.10 ^b	3.39±0.22 ^a	3.75±0.21 ^a	3.73±0.27 ^a
15:0	0.83±0.03	0.66±0.00 ^b	0.44±0.02 ^d	0.55±0.00 ^d	0.53±0.03 ^d
16:0	42.95±0.75	42.29±0.93 ^a	45.13±0.23 ^b	43.50±0.71 ^a	46.67±1.09 ^b
16:1, (n-7)	6.95±0.24	8.00±0.35 ^b	8.70±0.09 ^b	8.04±0.28 ^b	7.90±0.35 ^b
18:0	23.51±0.24	24.21±0.47 ^a	19.47±0.38 ^d	19.73±0.29 ^d	20.13±0.21 ^d
18:1, (n-9)	14.14±0.18	13.75±0.43 ^a	13.06±0.32 ^b	12.41±0.04 ^c	11.09±0.22 ^c
18:1, (n-7)	1.50±0.08	1.40±0.09 ^a	1.30±0.07 ^a	2.28±0.06 ^d	1.49±0.11 ^a
18:2, (n-6)	2.60±0.13	2.51±0.11 ^a	2.64±0.10 ^a	2.55±0.11 ^a	2.02±0.11 ^b
18:3, (n-3)	1.08±0.06	1.12±0.08 ^a	1.29±0.21 ^a	1.39±0.20 ^a	1.28±0.15 ^a
20:0	0.33±0.01	0.86±0.08	0.88±0.06	0.79±0.11	0.60±0.06
20:1	0.18±0.26	0.32±0.43 ^d	0.49±0.13 ^d	0.35±0.16 ^c	0.48±0.12 ^d
Σ Doymuş	73.73	72.93	72.85	71.76	76.09
Σ Doymamış	26.27	27.07	27.15	28.24	23.91

a: p>0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: p<0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p<0.001 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

Yapılan çalışmalarla; maya genomu dizilimi tamamen çözümlenerek, maya hücresi ile ilgili araştırmalarda çığır açılmıştır. Bu araştırmaların sonucunda maya hücresi, hücrel ve moleküler biyolojinin farklı alanlarında biyokimyasal ve genetik analizle pek çok moleküler detayın açıklandığı ökaryotik hücre modeli haline gelmiştir (Fernandes, 2001).

Maya hücresi metabolik olarak hem aerobik solunum hem de anaerobik solunum yapmaktadır. Bu hücre, endüstriyel alanda daha çok anaerobik solunum yapan şartlarda kullanılmaktadır. Anaerobik şartlarda 1 mol glukoz molekülünden glikoliz yoluyla net olarak 2 ATP, 2 NADH+H ve 2 piruvat molekülü sentezlenmektedir. Hücre metabolik faaliyetlerini sürdürebilmek için glikolizde elde ettiği net 2 ATP moleküllerini kullanır. Ortamda yeterli miktarda glukoz var ise yaşamsal faaliyetini devam ettirebilmek için tekrar glukoz alması gerekir. Bu devamlılığı ise bir önceki glikoliz olayında indirgen yapıda olan NADH+H molekülünü kullanmak durumundadır (Voet ve ark., 1999; Nelson ve Cox, 2000).

Glikoliz olayının gerçekleştiği sırada sahip olduğu piruvat dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla 1 mol CO₂ çıkışı 1 mol asetaldehid meydana gelir. Asetaldehit, alkol dehidrogenaz enzimi tarafından NADH+H molekülü koenzim olarak kullanılarak etil alkole dönüştürülür. NADH moekülü okside forma dönüştüğü zaman ve hücre içerisine tekrar glukoz girişi sağlanır (Kruckeberg ve Dickinson, 2004; Barnet ve Entian, 2005). Glikoliz olayı ortamdaki

glukoz molekülü bitene kadar devam eder. Bu çalışmada da deney şartları 30 °C'de inkübatörde bu süre 72 saat içerisinde sonlandırılmıştır. Bu süre içinde hücre tomurcuklanarak çoğalır ve membran yapısındaki yağ asitlerinin miktarında değişim gerçekleşir. Maya hücresi glikoliz metabolizması sırasında ortama etil alkol salınımı gerçekleştiği için, maya hücresindeki, membran yapısı moleküler düzeyde etil alkole karşı veya hiperosmolariteye karşı koruyucu özelliktedir. Stres durumlarında membran yapısındaki doymamış yağ asitleri sentezi düzenlenerek sıvı mozaik yapı korunmaktadır (Singh ve ark., 2013).

Palmitoleik ve oleik asitler maya hücresinde en çok bulunan doymamış yağ asitlerdir. Palmitoleik asit palmitik asitten (16:0), oleik asit ise stearik asitten (18:0) Delta 9 Desaturaz enzimi vasıtasıyla sentezlenir. Palmitoleik asitin FM3 ve FM4'de azalması bu moleküllerin palmitik asitten palmitoleik asitin sentezlendiği basamağı yavaşlatmasından kaynaklanabilmektedir. Diğer bir basamakta ise stearik asitten oleik asit sentez basamağında ise FM2 ve FM3 artış, FM4'de ise yine azalma meydana gelmiştir. FM2 ve FM3 gruplarında oleik artışına paralel olarak stearik asit miktarının da yüksek olduğu gözlenmiştir.

Yağ asidi miktarlarındaki bu değişimin yağ asidi sentezinden sorumlu olan enzimlerin sentezlerinde görülen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. *S. cerevisiae* mayasının yağ asidi profili üzerine daha önce yapılan çalışmalarla da mayanın gelişme ortamına ilave edilen maddelerin

yağ asidi sentetaz (FAS) ve Δ^9 desaturaz enzim aktivitelerini etkilediği belirlenmiştir (Ntambi 1999; Rimoldi ve ark., 2001).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışma sonucunda; biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda en önemli modellerden biri olarak kullanılan *S. cerevisiae* kültür ortamına biyolojik etkinliği yüksek olan fosfazen moleküllerin eklenmesinin total protein, GST ve yağ asidi düzeylerinde önemli varyasyonlara neden olduğunu belirlenmiştir. Elde edilen bulgularla; yeni sentezlenmiş fosfazelerin *S. cerevisiae*'nin biyokimyasal ve savunma sistemi üzerinde farklı etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçların hem pozitif yönde hem de negatif yönde yürüdüğü saptanmıştır. *S. cerevisiae* kültür ortamına fosfazelerin eklenmesi; yağ asidi sentezi, yağ asidi zincir uzaması, yağ asitlerinin hidrokarbon zincirine çift bağ girişi yapan enzimlerin son ürünlerinde artışlara ya da azalışlara neden olmuştur.

Bu veriler doğrultusunda; biyoteknolojide sıklıkla kullanılan fosfazen bileşiklerin *S. cerevisiae* hücreleri üzerindeki biyokimyasal değişimlerinin belirlenmesi ve etkilerinin ortaya konulmasına olumlu katkıda bulunulmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Bitlis Eren Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından BEBAP 2019.008 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

Atalan M 2016. Diaminospiro Siklotetrafosfazen Türevlerinin DNA Ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.

Barnett JA, Entian KD 2005. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism, *Yeast*, 22(11): 835-894.

Bergman LW 2001. Growth and Maintenance of Yeast. 2001. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 177, TwoHybrid Systems: Methods and Protocols Edited by: P. N. MacDonald © Humana Press Inc., Totowa, NJ

Cabral Luís MB, José Mata, J 2003. On the Evolution of the Firm Size Distribution: Facts and Theory.

American Economic Review, 93 (4): 1075-1090.

Christie WW 1992. *Gas Chromatography and Lipids*. Glaskow, The Oil Press.

Dilsiz N, Çelik S, Yılmaz Ö, Dıgrak M 1997. The effects of selenium, vitamin E and their combination on the composition of fatty acids and proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochemistry and Function*, 15: 265-69.

Dumanogulları F 2006. Bs (Fenoks) Fosfazen Türevlerinin Sentez ve Yapıları. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.

Fernandes PMD 2001. How does yeast respond to pressure? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 1239-1245.

Gudasi KB, Vadavi RS, Sreedhar B, Sairam M, Shelke NB, Mallikarjuna NN, Kulkarni PV, Aminabhavi TM 2007. Synthesis and characterization of some organopolyphosphazenes and their controlled-release characteristics. *Designed Monomers and Polymers*, 10 (3): 235–251.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22):7130-7139.

Hara A, Radin NS 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90(1): 420–426.

Kirecci OA 2017. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Gelişme Ortamına İlave Edilen Ağır Metallerin (Mn, Mg, Cd, Fe) Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 20(3): 175-184.

Koran K, Özen F, Torğut G, Pıhtılı G, Çil E, Görgülü AO, Arslan M 2014. Synthesis, characterization and dielectric properties of phosphazenes containing chalcones. *Polyhedron*, 79: 213–220.

Kruckeberg AL, Dickinson JR 2004. Carbon metabolism, The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. CRC, London

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *The Journal of Biochemistry*, 193: 265-277.

Nedjoud G, Houria B, Rachid R, Amira A, Reda D 2009. Impact of pollution by industrial metallic dust on bio-accumulator organism *Helix aspersa*. *Global Vet*, 3: 276-280.

Nelson DL, Cox MM 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth publishers, Third Edition, p. 1152, New York

Ntambi, JM 1999. Regulations of Stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of lipid research*, 40:1549-1558.

- Özen F, Koran K, Aslan F, Arslan M 2014. Hekza-(2-Formil-5-Metoksifenoksi) Siklotrifosfazen'in Schiff Bazı Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu, *European Journal of Science and Technology*, 18(3): 69-75.
- Ribeiro IC, Verissimo I, Moniz L, Cardoso H, Sousa MJ, Soares AMVM, Leão C 2000. Yeasts as A Model for Assessing The Toxicity of The Fungicides Penconazol, Cymoxanil and Dichlofluanid. *Chemosphere*, 41: 1637-1642.
- Rimoldi OJ, Finarelli GS, Brenner RR 2001. Effectes of diabetes and insulin on hepatic Delta 6 desaturase gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(2), 323-326.
- Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, Thompson, DC, Vasiliou V 2013. Aldehyde Dehydrogenases in Cellular Responses to Oxidative/Electrophilic Stres. *Free Radical Biology and Medicine*, 56: 89-101.
- Tamarit J, Cabisco E, Ros J 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in Escherichia coli cells exposed to oxidative stres. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 3027 – 3032.
- Tvrzicka E, Vecka M, Stankova B, Zak A 2002. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography flame ionisation detection quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta*, 465:337-350.
- Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL 2004. Oxidative Stres in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Journal of Endocrinology Revision*, 25(4): 612-28.
- Voet, D, Voet JG, Wiley J, Pratt CW 1999. *Fundamentals of Biochemistry*, NY: John Wiley & Sons, Inc New York.