

ESKİŞEHİR VE ÇEVRESİNDEN TOPLANAN EKŞİ HAMUR
ÖRNEKLERİNDE KATİL MAYALARIN VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI VE KATİL AKTİVİTEYE ETKİ EDEN
FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

NURAY KARAKAŞ

Doktora Tezi

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nuray Karakaş' ın Eskişehir ve Çevresinden Toplanan Ekşi Hamur Örneklerinde Katil Mayaların Varlığının Araştırılması ve Katil Aktiviteye Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 14.04. 2000 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Prof.Dr. Mehdi Kuvang	
Üye	Prof. Dr. Emel Canbaz	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Kıymet GÜVEN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
19.04.2000 tarih ve H/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Orhan ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

ESKİŞEHİR VE ÇEVRESİNDEN TOPLANAN EKŞİ HAMUR ÖRNEKLERİNDE KATİL MAYALARIN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE KATİL AKTİVİTEYE ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

NURAY KARAKAŞ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
2000

Eskişehir ve Bilecik’ ten toplanan ekşi hamur ve boza örneklerinde katil mayaların varlığı araştırılmıştır. 4 adet boza örneğinden 97, 31 adet ekşi hamur örneğinden 307, 3’ er adet ticari kuru ve yaş maya örneğinden 60 tane olmak üzere toplam 464 maya suşu izole edilmiştir. Boza izolatlarından 32 tanesi katil (% 32.98), 13 tanesi duyarlı (% 13.40), 52 tanesi nötral (% 53.60), ekşi hamur maya izolatlarının ise 12 tanesi katil (% 3.90), 79 tanesi duyarlı (% 25.73), 216 tanesi nötral izolat (% 70.35) olarak belirlenmiştir. Ticari yaş ve kuru maya izolatlarında ise katil fenotipe rastlanmamıştır. Katil mayalardan sadece 25.2 numaralı izolat *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanmıştır. Ekşi hamur katil mayalarında yüksek sıcaklık ve siklohekzimid varlığının katil aktiviteyi elimine ettiği ve UV’ nin bu aktivite üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Katil aktivite için optimum sıcaklık 21-30 °C, pH ise 4.2-5.0 olarak belirlenmiştir. Floresans boyama yöntemi ile katil toksinden etkilenerek ölen duyarlı maya hücrelerinin ayırt edilebileceği gösterilmiştir. Katil maya izolatlarının 2 adet ticari ekmek mayası suşuna karşı katil aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Katil izolat 25.2’ nin katil aktiviteden sorumlu olan proteini SDS-PAGE yöntemi ile belirlenememiştir.

Anahtar Kelimeler: Katil mayalar, katil aktivite, ekmek mayaları

ABSTRACT**Doctorate Thesis****OCCURRENCE OF KILLER YEASTS IN SOUR DOUGH SAMPLES
COLLECTED FROM ESKİŞEHİR PROVINCE AND DETERMINATION
OF THE FACTORS AFFECTING KILLER ACTIVITY****NURAY KARAKAŞ****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
2000**

Occurrence of killer yeasts in sour dough and boza samples from Eskişehir and Bilecik provinces was investigated. 464 yeast isolates, including 97 strains from 4 boza samples, 31 strains from sour dough samples, 60 strains from 3 commercial dry and 3 commercial wet yeast samples, were isolated. From the total of 97 boza isolates, 32 strains were killer (% 32.98), 13 strains were sensitive (% 13.40), 52 strains were neutral (% 53.60). Out of 307 sour dough isolates, 12 strains were killer (% 3.90), 79 strains were sensitive (% 25.73), 216 strains were neutral (% 70.35). Tested commercial dry and wet yeast isolates did not show killer activity. Only 25.2 killer yeast strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. It was determined that high temperature and presence of cycloheximide cured killer activity of sour dough killer yeasts. Moreover UV light treatment did not show any effect on killer activity of these isolates. Optimum temperature was 21–30 °C and optimum pH was 4.2–5.0 for killer activity. Dead sensitive yeast cells by killer toxin were distinguished using fluorescent dye method. Two killer yeasts showed killer activity on 2 commercial baker's yeast strains. The protein responsible for killer activity of 25.2 could not be determined by SDS-PAGE.

Keywords: Killer yeasts, killer activity, baker's yeasts

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Katil Mayalar.....	6
1.1.1. Katil maya suşlarının genetik özellikleri.....	10
1.1. 2. Katil toksinler.....	13
1.2. Katil Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Yöntemler.....	17
1.3. Katil Mayaların Önemi.....	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
2.1. Örneklerin Toplanması.....	22
2.2. Mikroorganizma Kültürleri.....	23
2.3. Besi Ortamları ve Kimyasal Çözeltiler.....	25
2.3.1. Besi ortamları.....	25
2.3.2. Kimyasal çözeltiler.....	30
2.4. Örneklerden Mikroorganizma İzolasyonu ve Sayımı.....	35
2.4.1. Örneklerden maya, bakteri ve küf izolasyonu.....	35
2.4.2. Örneklerden izole edilen maya, bakteri, küf ve referans maya suşlarının saklanması.....	36
2.4.3. Örneklerdeki maya, bakteri ve küf sayımı.....	36
2.5. Referans Suşların Büyüme Eğrilerinin Çıkarılması.....	37
2.6. Maya İzolatlarının Katil Aktivitelerinin Test Edilmesi.....	37
2.6.1. Referans suşlar ile katil aktivite testi.....	37
2.6.2. Maya izolatlarında katil aktivitenin belirlenmesi.....	39
2.7. Maya İzolatlarının Duyarlılık Testleri.....	39
2.8. Katil Oldukları Saptanan İzolatların Referans Katil Suşlara Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	40

2. 9. Katil Maya İzolatlarının Birbirlerine Karşı Olan Katil Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	41
2.10. Katil Maya İzolatlarının Toksin Tipinin Belirlenmesi.....	41
2. 11. Katil Maya İzolatlarının İdentifikasyonu.....	42
2.11.1. Karbon kaynaklarının asimilasyon testleri.....	42
2. 11. 2. Azot kaynaklarının asimilasyon testleri.....	43
2. 11. 3. Fermentasyon testleri.....	43
2. 11. 4. Vitamin gereksinim testleri.....	44
2. 11. 5. Yüksek glukoz konsantrasyonunda büyümenin test edilmesi.....	44
2. 11. 6. Sikloheksimid varlığında büyümenin test edilmesi.....	44
2. 11. 7. Üre hidroliz testi.....	44
2. 11. 8. Farklı sıcaklıklarda büyümenin kontrol edilmesi.....	45
2. 12. Katil Maya Suşlarında Katil Aktiviteye Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi İçin Uygun Yöntemin Seçilmesi.....	45
2. 12. 1. Katil aktivite için optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	46
2. 12. 2. Katil aktivite için optimum pH' nın belirlenmesi.....	47
2. 12. 3. Katil aktivite üzerine farklı antibiyotik konsantrasyonlarının etkisinin belirlenmesi.....	47
2. 12. 4. Toksin aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi.....	47
2. 12. 5. Katil aktivite üzerine UV' nin etkisi.....	48
2. 13. Floresans Boyama ile Toksinden Etkilenen Hücrelerin Belirlenmesi.....	48
2. 14. İzole Edilen 25.2 ve 25.5 Numaralı İzolatların Katil Toksinlerinin Etkisinin Belirlenmesi.....	50
2. 15. Protein Elektroforezi.....	51
2. 15. 1. Protein ekstresinin hazırlanması.....	51
2. 15. 2. Çöktürme işlemi.....	52
2. 15. 3. Diyaliz işlemi.....	52
2. 15. 4. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi.....	53
2. 15. 5. SDS-PAGE.....	55
3. BULGULAR.....	58
3.1. Örneklerdeki Mikroorganizma İzolasyonu ve Sayımı.....	58
3.2. Maya Suşlarının Büyüme Eğrileri.....	61

3.3. Katil Aktivite Testleri İçin En Uygun Yöntemin Belirlenmesi.....	61
3.4. Maya İzolatlarında Katil Aktivite.....	64
3. 5. Katil Maya İzolatlarının İdentifikasyonu.....	67
3.6. Katil Maya İzolatlarının Referans Katil Suşlara Karşı Duyarlılıkları.....	71
3.7. Katil Maya İzolatlarının Birbirlerine Karşı Olan Katil Aktiviteleri.....	73
3.8. Katil Maya İzolatlarının Toksin Tipi.....	74
3.9. Katil Aktivite Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisi.....	76
3. 10. Floresans Boyama.....	82
3.11. İzole edilen 25. ve 25.5 Numaralı İzolatların Katil Toksinlerinin MY1 ve MY2 Suşları Üzerine Etkisi.....	85
3.12. Protein Elektroforezi.....	90
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	93
5. KAYNAKLAR.....	110

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. İzolasyon için kullanılan örneklerin çeşidi ve toplandıkları yerler	22
2.2. Çalışmamızda kullanılan maya suşları, taşıdıkları suş özellikleri ve sağlandığı kurumlar	23
2.3. A_{280}/A_{260} oranına bağlı olarak, örnekteki nükleik asit oranı (%) ve düzeltme faktörlerinin yaklaşık değeri (91)	54
2.4. Modifiye edilmiş Laemmli metoduna göre SDS jel elektroforezinde kullanılan jel karışımlarını hazırlanması (91)	56
3.1. Örneklerdeki toplam bakteri, küf ve maya sayıları	59
3.2. Örneklerdeki toplam, katil, duyarlı ve nötral izolat sayıları ve % dağılım oranları	64
3.3. Örneklerden izole edilen maya suşlarının sayısı ve bunlarda tespit edilen katil, duyarlı ve nötral fenotip sayıları	65
3.4. İzole edilen mayaların fermentasyon ve asimilasyon testlerine göre belirlenen karakteristik özellikleri	69
3.5. İzole edilen mayaların diğer karakteristik özellikleri	70
3.6. Katil maya izolatlarımızın referans katil maya suşlarına karşı olan duyarlılıkları	72
3.7. Katil maya izolatlarının birbirlerine karşı katil aktiviteleri	73
3.8. Katil maya izolatlarının toksin tipi	75
3.9. Katil izolatların katil aktiviteleri için optimum sıcaklık ve pH değerleri	78
3.10. Katil aktivite üzerine farklı antibiyotik konsantrasyonlarının etkisi	79
3.11. Katil aktivite üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Amonyum sülfat
+	: Pozitif
-	: Negatif
α	: Alfa
A_{260}	: 260 nm' deki absorbans değeri
A_{280}	: 280 nm' deki absorbans değeri
A_{600}	: 600 nm' deki absorbans değeri
AgNO_3	: Gümüş nitrat
APS	: Amonyum persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
β	: Beta
BSA	: Bovin serum albümin
Ca	: Kalsiyum
CaCl	: Kalsiyum klorür
cm	: Santimetre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: Çift iplikli ribonükleik asit
E. R.	: Endoplazmik retikulum
FeCl_3	: Demir klorür
g	: Gram
g (RCF)	: Relative centrifugal force
H dsRNA	: Heavy (ağır) çift iplikli ribonükleik asit
HCl	: Hidrojen klorür
K-tartarat	: Potasyum tartarat
K1	: 1 tipinde katil toksin
K10	: 10 tipinde katil toksin
K2	: 2 tipinde katil toksin
K28	: 28 tipinde katil toksin
K3	: 3 tipinde katil toksin
K7	: 7 tipinde katil toksin
K8	: 8 tipinde katil toksin
kb	: Kilobaz
kbo/ml	: Koloni oluşturan birim/militre
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilodalton
kex	: Killer expression gen
kg	: Kilogram
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
KNO_2	: Potasyum nitrit
L dsRNA	: Light (hafif) çift iplikli ribonükleik asit
LU	: Lethal (öldürücü) ünite (birim)
M	: Molarite
M dsRNA	: Medium (orta) çift iplikli ribonükleik asit
mA	: Miliamper
MEA	: Malt ekstrakt agar
MEB	: Malt ekstrakt broth

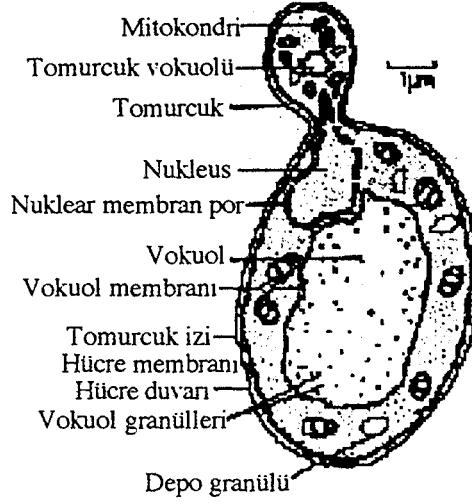
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
MgSO₄	: Mağnezyum sülfat
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MnSO₄	: Mangan sülfat
N	: Preparattaki boyanmış hücre sayısı
NA	: Nurtient agar
Na-tartarat	: Sodyum tartarat
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
Na₂SO₂O₃	: Sodyum tiyosülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaNO₃	: Sodyum nitrat
nm	: Nanometre
N_T	: Preparattaki toplam hücre sayısı
PBS	: Fosfat tampon tuz çözeltisi
PCA	: Plate count agar
PDA	: Patates glukoz agar
pI	: Proteinin izoelektrik noktası
PYG	: Pepton–yeast ekstrakt–glukoz besi ortamı
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Revolving per minute
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
sn	: Saniye
TCA	: Trikloroasetik asit
UV	: Ultraviyole
v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim
YEG	: Yeast ekstrakt-pepton-glukoz besi ortamı
YEPD	: Yeast ekstrakt-pepton-dekstroz besi ortamı
YEPD-MB	: Yeast ekstrakt-pepton-dekstroz–metilen mavisi besi– agar ortamı
YGC	: Yeast ekstrakt–glukoz–kloramfenikol besi ortamı
YM	: Yeast ekstrakt-malt ekstrakt-peptone-glukoz besi ortamı
YPDG	: Yeast ekstrakt-pepton-dekstroz–gliserol–agar besi ortamı

1. GİRİŞ

Ekmekçilik, biracılık ve şarap yapımında yaygın olarak kullanılan mayaların insanlar tarafından kullanılmasına ait ilk kayıtlara M. Ö. 6000' lerde rastlanmaktaysa da (1), bilimsel olarak ilk defa tanımlanmaları Antonie van Leeuwenhoek'a (1860) atfedilmiştir. 1866' da Etudes sur Vin'de yayınlanan Pasteur'ün çalışması ile mayaların şekerin alkole fermentasyonundaki rolü ortaya konulmuştur. 1881' de Hansen, biracılıkta kullanılan en önemli *Saccharomyces* türünü saf kültür olarak izole ederek *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekler olarak tanımlamıştır. Bundan sonra *S. cerevisiae* olarak sınıflandırılan suşlar ekmek mayası üretiminde, biracılıkta, distilasyon ve şarap yapımında geniş çapta kullanılmıştır (1). Bu çalışmaları takiben ekmekçilik, distilasyon ve şarap endüstrisinde suş koleksiyonculuğu ve endüstriyel fermentasyon prosesleri için suş iyileştirme çalışmaları da hız kazanmıştır. Böylece mayalar çok geniş ve çeşitli biyokimyasal-fizyolojik çalışmaların favori organizmaları haline gelmiştir. Mikrobiyal genetik alanındaki ilk çalışmalar da mayalar ile başlamıştır. Winge tarafından 1935 yılında *S. cerevisiae* ile başlatılan maya genetiği çalışmaları günümüzde baş döndürücü bir hızla ilerleyerek, ökaryotik organizmalarda genetik materyal ve kalıtım mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli mesafeler alınmasına neden olmuştur. Yine maya genetiği çalışmaları ile, bugün bilimsel çalışmalarda kullanılan birçok laboratuvar suşu geliştirilmiştir. Bu konudaki çalışmalar günümüzde de hızla devam etmektedir (2-6).

Mayalar, mantarların taksonomik ve filogenetik açıdan çeşitlilik gösteren grubuna dahil olan üyeler olup, çoğunluğu Ascomycetes ve Deuteromycetes sınıfı içinde yer almakla birlikte Basidiomycetes üyesi olan az sayıda maya da bulunmaktadır (7). Genel bir maya tanımı yapmak oldukça güçtür. Günümüzde geçerli olan tanıma göre maya; tomurcuklanma ya da bölünme ile çoğalan tek hücreli fungus, veya çok hücreli bir fungusun yaşam döngüsünde özel, tomurcuklanan tek hücreli durum olarak tanımlanmaktadır (8). Tipik bir *S. cerevisiae* hücresi yuvarlak, ovalimsi veya elipsoid, 2.5-10 µm genişliğinde ve 4.5-21 µm uzunluğundadır. Bir maya hücresinde plasmalemma, nukleus, mitokondri, endoplasmik retikulum, vakuoller, veziküller ve granüller bulunmaktadır (Şekil 1.1). Hücre duvarı 2.5 nm kalınlığında olup hücre kuru ağırlığının yaklaşık % 25' ini oluşturmaktadır. Yapılan kimyasal analizler hücre duvarının glukan ve mannandan oluştuğunu, ayrıca kitin ve proteinde içerdiğini ortaya koymuştur. Hücre duvarının tam yapısı anlaşılammakla birlikte günümüzde geçerli

olan modele göre içteki glukan tabaka, dıştaki mannan tabakadan proteince zengin bir tabaka ile ayrılmaktadır (1).



Şekil 1.1. Karakteristik bir maya hücresinin yapısı

Büyüyen maya hücre popülasyonlarının en belirgin özelliğini hücre bölünürken üretilen tomurcuklar oluşturmaktadır. Küçük bir tomurcuk olan yavru hücreler hücre döngüsü boyunca gelişerek ana hücre boyutuna ulaşmaktadırlar. Büyümenin büyük bir kısmı tomurcuk formasyonu süresince olmakta, yani tomurcuk ana hücreden ayrılmadan önce az çok ana hücre boyutuna ulaşmaktadır. Hücre ayrılmasının yeri ana hücrede tomurcuk izi (bud scar), yavru hücrede doğum izi (birth scar) olarak adlandırılan yapıları oluşturmaktadır (1).

Mayaların hücre membranı veya plazmalemması üç tabakalı ve hücre duvarının iç yüzeyi ile bağlantılı bir yapı göstermektedir. Plazmalemma az çok eşit oranlarda lipid ve protein bunlara ilaveten karbonhidratlardan oluşmaktadır. Hücrede geçirgenlik bariyeri olarak görev yapmakta ve madde alış-verişini kontrol etmektedir (1). Nukleus genellikle tomurcuk ile vakuol arasında yer almaktadır. İğ ipliği plakları adını alan nuklear membran ile birleşmiş ve hayvan hücrelerindeki sentriollere benzer görev yapan yapılar ise çok tabakalı diskler halinde bulunmaktadır (1, 9).

Haploid genomu 14 000 kilobaz çiftinden (kb) oluşan mayanın, durağan safhasındaki DNA' sında yaklaşık 8000 gen bulunduğu ve bu genlerin koordineli bir şekilde (mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte) hücresel faaliyetleri sürdürdüğü bilinmektedir. *S. cerevisiae'* nin nuklear DNA, sitoplazmada bulunan mitokondrial

DNA, viral DNA ve dairesel plazmid DNA olmak üzere 4 farklı ve birbirinden bağımsız genetik elemente sahip olduğu bilinmektedir. Plazmidlerin genetik yapıları genetik mühendisliği teknikleri ile kolayca değiştirilebilmekte ve yeni oluşturulan plazmidler sferoplastlar tarafından kolayca hücre içine aktarılabilmektedir (10). *S. cerevisiae*'nin 2 µm plazmidi mayaların moleküler teknoloji çalışmalarının gelişiminde oldukça önemli bir yere sahiptir. Maya plazmidleri filamentli fungi plazmidlerinden oldukça farklılık göstermektedir. Maya plazmidleri nükleus ve sitoplazma kaynaklı olmasına karşın, filamentli fungiden izole edilen tüm plazmidlerin mitokondrial kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yine filamentli fungiden izole edilen plazmid-benzeri elementlerinde mitokondrial DNA kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (11).

Yapılan genetik çalışmalar sonucunda *S. cerevisiae*'nin 14×10^3 kb'lik nükleer DNA'sında en az 17 kromozom bulunduğu rapor edilmiştir. Haploid maya hücresinin DNA içeriğinin insanınkinden 100 kat az, *Escherichia coli*'den ise 10 kat fazla olduğu bildirilmiştir (1, 9, 12). Mayalarda nükleer DNA replikasyonu diğer ökaryot canlılardakine benzerlik göstermektedir. Hücrede tomurcuğa benzer tek bir çıkıntının oluşmasıyla başlayan süreçte meydana gelen mitoz sırasında kromozomlar büyük yavru hücreye ve tomurcuk yapısıyla gelişen küçük yavru hücreye eşit biçimde paylaştırılmaktadır. *S. cerevisiae* hem haploid hem de diploid durumda bulunabilmektedir. Haploid hücreler iki farklı eşey tipinde (a ve α) olabilmekte ve uygun koşullarda bunların kaynaşmasıyla a/α diploid zigotlar meydana gelmektedir. Beslenme koşullarının uygun olmadığı durumda bu diploid hücreler mayoz geçirerek askus içinde bulunan 4 haploid hücreyi (askospor) oluşturmaktadır. Askus çeperinin patlamasıyla serbest kalan sporlar haploid hücrelerden oluşan yeni bir döl vermek üzere çoğalmaya başlamaktadırlar (1, 9, 12). Maya hücrelerinde de diğer organizmalarda olduğu gibi 3 tip RNA bulunmaktadır (1, 9). Mayalarda protein biyosentezi diğer ökaryotlardaki protein sentezi ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. *S. cerevisiae*'de mitokondri sayısının, büyüklüğünün ve şeklinin hücre döngüsünün farklı safhalarında ve kültür şartlarına bağlı olarak çok büyük çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir (1, 9). Maya hücresinde tipik bir endoplazmik retikulum (E.R.) gözlemlenemediği gibi, golgi aygıtı da kolaylıkla gözlenememektedir. E.R.'nin diğer organizmalarda olduğu gibi ribozomlar ve diğer birçok hücreysel aktivite ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Mayalarda golgi aparatı varlığı henüz kesinlik kazanmamıştır. E. R. kaynaklı gibi gözüken lipid granülleride sitoplazmada yer almaktadır. Vakuoller tomurcuklanan

mayaların en iyi gözlemlenebilen organelleri olarak bilinmektedir. Kültür ve hücrenel şartlara bağlı olarak sitoplazma içinde birçok küçük vezikül olarak yada birleşmiş tek bir büyük vakuol olarak bulunabilmektedir. Vakuolün görevi tam olarak anlaşılamamıştır. Vakuoller hidrolitik enzimleri, polifozfatları, metal iyonlarını, lipid ve düşük molekül ağırlıklı hücrenel elementleri içermektedirler. Ayrıca besinler ve hidrolitik enzimler için de depo görevi yapmaktadırlar (1, 9).

Özellikle fermentasyondaki rolleri ile bazı mayalar insan yaşamında önemli yer tutmaktadır. Mayalardan faydalanma asırlar boyunca devam etmiş ve geçen yüzyıldan itibaren hızlanan endüstriyel ve ticari ilerlemeye de önemli katkılar sağlanmıştır. Endüstriyel birçok proses için uygun ve verimli olmaları, bakteriler için optimum olan pH' lardan daha düşük pH' da aktif olarak gelişebilmeleri, büyük çaptaki kültürleri hızlı büyüyen kontaminant mikroorganizmalardan korumaları ve bakterilerden daha kolay ve ucuz ürün alınabilmesi nedeniyle mayaların endüstriyel amaçla kullanımı gün geçtikte artmaktadır (13).

Mayalar endüstriyel gizemlerinin yanı sıra; laktozun etanole fermentasyonunda, alkanlar ve kağıt hamuru atıklarından protein üretiminde, gliserol ve D-glusitol gibi alditollerin üretiminde, β -D-galaktozidaz ve lipaz gibi çeşitli enzimlerin kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Kimyacılar ise mayaları, yeni karbon bağları, optik olarak aktif bileşikler, sekonder alkol türevleri ve biyolojik aktif moleküller üretmekte kullanmaktadırlar. *S. cerevisiae* haricinde *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Zygosaccharomyces bailii* gibi diğer maya türlerini de kimyacıların araştırmalarında yaygın olarak kullanmaktadır (13).

Ekmek mayası, nişastalı veya günümüzde daha çok şekerli ham maddelerden (melas) elde edilen üst fermentasyon tipi kültür mayasıdır (14). Çavdar ekmeği dışında tüm gelişmiş ülkelerde ekmekçilikte ticari olarak kullanılan maya grubu *S. cerevisiae'* dir. Günümüzde halen bazı yerel ve küçük fırın işletmelerinde ekmek yapımında kullanılan ekşi hamurun içinde *Saccharomyces* cinsi hakiki mayalarla birlikte, değişik sayıda laktik asit, bütirik asit, asetik asit bakterileri, koliform grubu bakteriler ve koklardan oluşan geniş bir flora bulunmaktadır (15). Bu bakteriler nedeni ile ekşi hamurdan mayalanan bir hamur iyi kabarmamakta, ayrıca ekmekte hoş olmayan tad ve kokular oluşturmaktadır. Buna karşın, sadece *S. cerevisiae* içeren paket ekmek mayası kullanıldığında, hamur daha iyi kabarmakta, ekmek daha iyi pişmekte ve hoş olmayan tad ve kokular oluşmamaktadır (14).

Ekmek mayası üretimi ve mayacılıkta kullanılan işletme kültürü saf bir maya kültüründen üretilen spor veya hücre kültürü ile olabilir. Bu endüstride alt türler arası farklar, türler arası farklılardan daha önem taşımaktadır. Özellikle yakın bir gelecekte patent korunması nedeni ile bu konunun daha da önem kazanacağı bildirilmektedir (16). Her yıl 1.8 milyon tondan fazla ekmek mayası üreten (16) ekmek mayası endüstrisinde üretim hücre kazanmaya yönelik olduğu için, şekeri biyokütleyle çeviren türler üreticiler tarafından tercih edilmektedir. Hızlı büyüme, yüksek verim, yeterli hamur performansı, ısıya dayanıklılık ve ekmeğe istenmeyen tad ve koku vermeme ticari olarak kullanılan ekmek mayasının sahip olması gereken karakterler olarak istenmektedir. Ayrıca, endüstriyel proseslerde kullanılan maya suşları, zayıf spor ve tetrad oluşturma özellikleri ve sporlarının çimlenme kabiliyetlerinin düşük olması nedeni ile laboratuvar suşlarından farklılık göstermektedirler. Son yıllarda birçok moleküler teknik endüstriyel kültürlerin geliştirilmesi amacıyla uygulama alanına sokulmuştur.

Günümüzde genetik mühendisliği teknikleri ile arzu edilen özelliklere sahip endüstriyel suşların elde edilmesi mümkün gözükmektedir. Ekmek mayacılığında kullanılacak suşların seçimi ve iyileştirilmesi çalışmalarında iki önemli amaç bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; suşun iyi kabarma-mayalanma aktivitesine sahip olması, ikincisi ise, ürün kalitesini etkilemeden az masraf ile iyi maya ürünü elde etmektir. Son yıllarda geniş ve yeni pazarlama stratejileri nedenleriyle ekmek mayacılığında kullanılan geleneksel maya suşları maya üreticisinin farklı ve kompleks isteklerine cevap verememektedir. Üretim piyasasında rekabet ortamından doğan gereksinimler sonucu, son yıllarda büyük bir ilerleme kaydedilen rekombinant DNA teknikleri kullanılarak yeni özelliklere sahip bira mayası suşlarının yapımı oldukça önem kazanmıştır. Sone ve ark. (17) *Enterobacter aerogenes*' ten izole ettikleri α -asetolaktat dekarboksilaz genini plazmid yardımı ile *S. cerevisiae*' ya aktarmışlardır. Elde ettikleri genetik olarak modifiye edilmiş bu yeni suşu pilot tesislerde test etmişler ve bira fermentasyonunda kullanılmak üzere bilim dünyasına kazandırmışlardır. Bira üretiminde kalite ve verimliliği arttırmak için Lancashire ve ark. (18) 1989' da, amiloglikosidaz üretiminden sorumlu geni *Schwanniomyces* suşlarından *Saccharomyces* suşlarına klonlamışlar ve elde ettikleri suşların fermentasyon endüstrisinde ümit vaat ettiğini bildirmişlerdir. Mayalarda fermentasyon oranı, flokulasyon, aroma bileşiklerinin üretimi gibi çeşitli fermentasyon özelliklerinin mitokondri genetik sisteminden etkilendiği bildirilmiştir (10). Değişik karbonhidratları fermente edebilen değiştirilmiş flokulasyon özelliklerine sahip ve değişik aromalar

üretebilen suşlar üretilmiş ve pilot tesislerde denemeleri yapılan birçok suş ticari üretim açısından uygun bulunmuştur (5).

Son yıllarda çeşitli araştırma laboratuvarlarında yürütülmekte olan maya genetiği ve moleküler biyolojisi çalışmalarından elde edilen bilgilerin ışığı altında maltozu kullanabilen mayalar, ozmotolerant mayalar, maya hücrelerinde trehaloz birikimini arttırma (19), invertaz enzimi ile ilgili çalışmalar, hızlı fermentasyon kinetiğinin sağlanması, donmaya dayanıklı, melibioz kullanabilen, lipoksigenaz geni taşıyan, laktozu fermente edebilen ekmek mayası üretimi ve katil plazmid (killer plazmid) taşıyan ekmek mayaları ile ilgili çalışmalar güngeçtikçe popüleritesi artan konular haline gelmektedir (6-7, 20).

1.1. Katil Mayalar

İlk defa 1963' de Oxford' ta bir katolik papaz olan Makeover tarafından gözlenen katil aktivite fenomeni mayalarda oldukça yaygın olarak görülmektedir. (21). Bu buluş günümüze kadar artan bir ilgi ile karşılanmış ve birçok araştırmacı tarafından üzerinde çalışılan bir konu haline gelmiştir. Makeover' ın çalışmasını takiben, çeşitli maya genuslarına ait katil suşlar birçok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir (22-27). Katil fenomen ilk defa *S. cerevisiae*' da tanımlanmış daha sonra çok çeşitli katil suşlar diğer maya genus ve türlerinde de tespit edilmiştir. Katil suşların ürettikleri protein veya glukoprotein yapısındaki katil toksinlerin bu toksinlere hassas maya suşlarını öldürdüğü saptanmış ve bu olayın mekanizması birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (22-25, 28-29). Pfeiffer ve ark. (30) duyarlı suşları inhibe eden *S. cerevisiae* KT28' in bazı patojenik fungiye ve *Trichomonas vaginalis*' e (protozoon) karşı etkili olmadığını ayrıca deneye tabi tutulan hayvanlar üzerinde de herhangi bir farmakolojik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Polinelli ve ark.' nın (31) 1989' da yaptığı çalışmada ise, dimorfik fungus olan *Sporothrix schenckii*' nin 4 izolatının misel ve maya formlarının çeşitli katil toksinlere (katil toksin 7, 8, 28 tipleri) karşı oldukça duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bu sonuçların ışığında katil toksinlerin veya türevlerinin sistemik mikosis vak'alarının tedavisinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Zhu ve Bussey (32) *S. cerevisiae* K1 toksininin *Candida*, *Kluyveromyces*, *Schwanniomyces* generinin sferoplastlarını öldürdüğünü, ancak bu organizmaların hücrelerinin toksine karşı duyarsız olduğunu bildirmişlerdir. Reed ve Nagodawithana (7) bu toksinin duyarlı maya suşları dışında bazı fungi ve

bakterilere karşı da etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalar sonucunda katil toksinlerin bugüne kadar sağlığa zararlı bir etkisi tespit edilememiştir (33). Ayrıca bu toksinlerin proteaz inaktivasyonları, sıcaklık ve pH' ya bağlı olan kararlılıkları nedeni ile terapötik olarak kullanımlarının da kısıtlandığı bildirilmiştir (34).

Katil suşlar ile ilgili yapılan ilk çalışmalar daha çok çeşitli ortamlardan izole edilen suşların bu aktivite için test edilmesi ve katil aktiviteye etki eden faktörlerin belirlenmesine yönelik olmuştur. Yapılan çalışmalarda çeşitli bitkisel materyallerden izole edilen maya suşlarının yaklaşık % 50' sinin katil aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (25, 28). Bunun yanı sıra bilinen genetik işaretlere sahip çok sayıda maya suşu da katil suş olarak belirlenmiştir. Radler ve ark. (25) 1982 sonbaharından 1984 yazına kadar çeşitli habitatlardan izole ettikleri *Pichia kluyveri* ve *Hanseniaspora uvarum* türlerine ait suşların katil aktiviteye sahip olup olmadığını ve buna etki eden faktörleri araştırmışlar, çalışmaları sonucunda doğal habitatlardan izole edilen katil mayalarda mevsimsel bir varyasyon tespit etmişlerdir. Shimizu ve ark. (35) özel bir şarap maya koleksiyonundan (Forschungsanstalt Geisenheim Şarap Maya Koleksiyonu) kontaminant bir mayayı ve ticari kuru şarap mayalarından 7 tanesini katil maya olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada izolatların katil aktivitelerine etki eden faktörleride incelemişlerdir. Starmer ve ark. (36) kaktüslerin çürüten gövde ve meyvelerinden ve ağaçların yapışkan sıvılarından izole ettikleri maya suşlarını katil aktivite ve buna etki eden faktörler yönünden araştırarak, katil mayaların doğal populasyonlardaki ekolojisini incelemişlerdir. Suzuki ve ark. (37) tarafından Japonya'da yürütülen bir çalışmada miso, soya sosu ve turşulardan izole edilen halotolerant maya suşlarında katil aktivite ve bu aktivitenin spektrumunu araştırmışlardır. Özçelik ve Dönmez (38) 1993 yılında yaptıkları bir çalışmada bölüm koleksiyonlarında bulunan mayaları katil aktiviteleri için test etmişler ve test ettikleri 78 maya suşundan sadece iki tanesinde katil aktivite belirlemişlerdir. İtalya'nın Tuscany Bölgesi şarap fermentasyon tesislerdeki katil maya suşları, bunların oluşum sıklığı, fermentasyon sırasındaki dinamikleri, katil ve duyarlı izolatların K1 ve K2 referans suşları ile olan ilişkileri Vagnoli ve ark. (39) tarafından araştırılmıştır. Katil fenomen ile ilgili başka bir çalışmada Hidalga ve Flores (40) İspanya' nın Madrid çevresindeki şarap üretimi yapan 11 farklı üretim tesisinden alınan örneklerden izole ettikleri maya suşlarında katil karakter varlığını test etmişlerdir. Llorente ve ark. (41) tarafından Portekiz' de yapılan başka bir araştırmada ise zeytin salamuralarından izole edilen maya

suşlarında sodyum klorürün katil aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada yaptıkları karyotip analizleri sonucunda karışık fermentasyon populasyonlarında katil suşların baskın olduğunu saptamışlardır.

Katil maya suşlarının izolasyonunu takip eden daha sonraki çalışmalarda şarap ve bira yapımında kullanılan suşlar ve bunların kontaminantlarının katil aktiviteleri ve katil suşların fermentasyon üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Kitano ve ark. (42) Japon şarap endüstrisindeki şıra ve elma püresinden izole ettikleri suşları katil aktivite yönünden incelemişler, 3 yeni katil tip belirlemişlerdir. Şıraların % 27' sinde kontaminantların katil aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. 1986 yılında Tredoux ve ark. (43) Viticultural ve Oenological Araştırma Enstitüsü' nün maya kültür kolleksiyonundaki suşları katil aktivite için test etmişlerdir. Katil suşların şarap pH' sına sahip katı besi ortamında katil aktivite göstermediklerini, üzüm suyu ile yapılan fermentasyon deneylerinde ise katil suş populasyonunun % 2.5' ten az olduğu deneylerde fermentasyonun etkilenmediğini, katil populasyonun yüksek olduğu bazı fermentasyon deneylerinde ise bu suşların fermentasyonu bozduğunu rapor etmişlerdir. Heard ve Fleet (44) 16 adet şarap maya suşunu katil aktivite yönünden incelemişlerdir. Bu aktiviteye sadece *S. cerevisiae* suşlarında rastladıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca katil suşların fermentasyon üzerine etkilerini de araştırmışlardır. 1990 yılında yayınlanan bir çalışmada ise, katil suşların endüstriyel sistemlerde klasik yöntemlere göre daha hızlı, basit ve ekonomik olarak belirlenmesi için yeni bir yöntem önerilmiştir (45). Jacobs ve Van Vuuren (46) 2 adet ticari şarap maya suşunun ellerinde bulunan 4 adet katil maya suşunun ürettiği toksine karşı duyarlılığını incelemişlerdir. Karışık kültürlerde yaptıkları fermentasyon deneyleri sonucunda K-103 katil suşunun fermentasyon ortamında % 0.1 oranında bulunması durumunda bile duyarlı şarap mayasını elimine ettiğini bildirmişlerdir. 1991 yılında Cansado ve ark. (47) alkol ve şıra fermentasyon ortamında katil karakterin ekolojisi, yayılımı ve önemi üzerine yaptıkları çalışmada bu fermentasyon ortamlarında çeşitli kriterlere bağlı olmak koşulu ile katil karaktere sahip maya suşlarının önemini ortaya koymuşlardır. Michalcakova ve ark. (48) ellerinde bulunan *Kluyveromyces*, *Hansenula* ve *Saccharomyces* genusuna ait maya suşlarının katil aktivite ve bağışıklık özelliklerini inceleyerek, fermentasyonda yapışmaya neden olan ve istenmeyen yabancı mayalara karşı katil aktiviteye sahip maya suşlarının belirlenmesini hedeflemişler, bu özelliklere sahip suşların biyoteknolojik uygulamalara katkılarını araştırmışlardır. Özçelik ve ark. (49) şarap üreticilerine katil veya nötral karakterli bir şarap mayası önerebilmek amacıyla Türkiye' nin değişik şarap

bölgelerinden izole edilen mayalarda öldürücü aktiviteye sahip şarap mayalarını tespit etmeye çalışmışlar ancak bu aktiviteye sahip maya suşu belirleyememişlerdir.

Günümüzde maya katil toksin sistemleri ile ilgili çok sayıda genetik ve moleküler çalışma yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmalar ile *S. cerevisiae* suşlarının ürettiği K1, K2 ve K28 toksinlerinin genetik ve moleküler temelleri büyük ölçüde ortaya konulmuş ayrıca maya plazmidleri ve kromozomları arasında gen değişimi olduğu da tespit edilmiştir (2). *K. lactis*' te katil fenomeninden sorumlu iki adet doğrusal DNA plazmidi ilk defa Gunge ve ark. (50) tarafından tespit edilmiştir. *K. lactis*' in doğrusal DNA katil plazmidinin *S. cerevisiae* suşlarına transformasyonu ise Gunge ve ark. (51) tarafından 1982 yılında yapılan başka bir çalışma ile denenmiş ve 2 adet katil transformant elde edilmiştir. Leibowitz (52) mayalarda protein sentezinde translokasyon basamağı inhibitörü olarak bilinen bir antibiyotik olan crytoleusine varlığında kültür edilen katil suşlarda katil aktivitenin elimine edildiğini saptamıştır. *P. kluyveri*' nin ürettiği toksin ve bunun etki mekanizması ile ilgili ayrıntılı bir çalışma Kagan (53) tarafından 1983 yılında yayınlanmıştır. Seki ve ark. (54) süper katil fenotipi kodlayan bir dsRNA' yı Montrachet suş 522 ve suş 694 isimli iki adet farklı şarap mayasına protoplast füzyon tekniği ile aktarmışlardır. Elde ettikleri katil şarap mayasının hem besi ortamında hemde üzüm suyunda yapılan deneylerde toksine karşı duyarlı suşların gelişmesini tamamen baskıladığını rapor etmişlerdir. Stark ve Boyd (55) *K. lactis*' in ürettiği katil toksinin karakterizasyonunu ve bunu kodlayan genlerin identifikasyonunu yapmışlardır. Radler ve Schmitt (56) *S. cerevisiae* suş 28' in ürettiği K28 toksininin maya hücre duvarı ve fraksiyonlarından protein adsorbe eden solüsyonlar ile uzaklaştırılmasını çalışmışlar, fermentasyon inhibitörlerini ve bunların adsorpsiyonunu test etmişlerdir. Zorg ve ark. (57) *H. uvarum* ve *P. kluyveri*' nin katil aktivitelerinin genetik temellerini yaptıkları çalışmalarla ortaya koymuşlardır. Wesolowski-Louvel ve ark. (58) *K. lactis*' te katil fenomenin ekspirasyonu ile ilgili nükleer genleri araştırmışlardır. Doğrusal DNA plazmidini hücrede koruyan ama katil fenotipini yitirmiş mutant suşlarda mutasyonun konukçunun kromozomunda tek bir lokusta bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu lokusu KEX1 olarak adlandırmışlardır. Yaptıkları klonlama çalışmaları sonucunda *K. lactis*' in *kex1* geni ile *S. cerevisiae*' nin *kex2* geni arasında fonksiyonel bir ilişkinin varlığını tespit etmişlerdir. Zhu ve Bussey (32) tarafından toksine özel hücre duvarı reseptörlerinin toksine karşı duyarlılıkta rol aldığı ve hücre duvarı yapısının modifikasyonu ile toksine duyarlı hücrelerin oluşturulabileceği öne sürülmüştür. Radler ve ark. (59) moleküler ve biyokimyasal

yöntemler kullanarak *H. uvarum* katil toksininin özelliklerini ve etki mekanizmasını ortaya koymuşlardır. *K. lactis*' in katil aktivitesi ile ayrıntılı bir derleme Stark ve ark. tarafından (60) yayınlanmıştır. Katil mayalarda dsRNA transkripsiyon ve translasyonları ile ilgili ayrıntılı çalışmalar Barbone ve Leibowitz (61) tarafından gerçekleştirilmiştir. İn vitro dsRNA vironlarının transkripsiyonu ise Welsh ve Leibowitz (62) ve Barbone ve ark. (63) tarafından çalışılmıştır. Tommasino (64) ve Schaffrath ve Meacock (65) Western blot ve Northern blot analiz yöntemleriyle *K. lactis*' in katil aktivitesinin moleküler temellerini açıklamışlardır. Petering ve ark. (3) *Escherichia coli*' deki β -glukuronidaz genini *S. cerevisiae* katil suşuna aktarmışlardır. Bu işaret (marker) geni karışık kültür fermentasyonlarında katil suşun takibinde kullanmışlardır. Araştırmacılar katil aktivitenin katil ve duyarlı suşların oranına bağlı olarak fermentasyon deneylerinde etkili olarak gözlemlendiğini belirtmişler ancak duyarlı suşların tamamen eliminasyonunu başaramamışlardır. Radler ve ark. (28) *Zygosaccharomyces bailii* suş 412' nin katil toksininin moleküler yapısını jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemlerini kullanarak saptamaya çalışmışlar ve katil aktivitenin moleküler temelini 1.9 kb.' lik dsRNA olduğunu tespit etmişlerdir. Pfeiffer ve Radler (66), Schmitt ve Radler (67), Schmitt ve Radler (68-69), Schmitt ve ark. (70), Schmitt ve Tipper (71) ve Schmitt ve Radler (72) yaptıkları çalışmalar ile *S. cerevisiae* suş 28' in ürettiği katil toksini saflaştırarak karakterizasyonunu ve toksin reseptörünün yapısını, toksinin etki mekanizmasını ortaya koymuşlardır. Mayalarda katil fenomeninden sorumlu dsRNA virusleri ile ilgili yayınlanan birçok ayrıntılı moleküler genetik çalışmalarla konu ile ilgili geniş çaplı bilgiler sağlanmışır (73-77).

1.1.1. Katil maya suşlarının genetik özellikleri

Saccharomyces genusunun ürettiği katil aktivitenin çift sarmallı RNA plazmid (dsRNA) varlığına bağlı olduğu ortaya konulmuştur (29). Bu plazmidler dsRNA virüsleri veya virüs benzeri partiküller olarak isimlendirilmiştir. *S. cerevisiae*' da L ve M olarak isimlendirilen iki adet dsRNA plazmidi tanımlanmıştır. 1.5 kb büyüklüğündeki M dsRNA' nın hem toksini kodladığı hemde kendi ürettiği toksinden hücreyi koruyan bağışıklık faktörünü kodladığı bulunmuştur. 4.6 kb' lik L dsRNA' nın ise, M dsRNA' yı çevreleyen kapsid proteinlerini kodladığı tespit edilmiştir. Uydu plazmid olarak isimlendirilen M dsRNA virüsü sadece öldürücü aktiviteye sahip

suşlarda bulunurken, L dsRNA virüsü birçok maya suşunda bulunmuştur (29). dsRNA virüsleri önce filamentli fungide tanımlanmış ve, maya dsRNA virüsleri *S. cerevisiae*'de katil fenomenin belirleyicisi olarak keşfedilmiştir. Bu virüsler ayrıca katil üyeleri içeren genelerde katil fenotip ile ilişkili olarak kabul edilmektedirler (78-79). Mayalardan izole edilen katil dsRNA türlerinin elektron mikroskobu ile heterodupleks analizi 1978 yılında Fried ve Fink (80) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada dsRNA'ların uç bölgelerinin aynı baz dizilimine sahip olduğu ve bu bölgenin RNA replikasyonunda önemli olduğunu öne sürülmüştür. Yapılan hibridizasyon çalışmaları sonucu, *S. cerevisiae* DNA genomu ile katil dsRNA'lar arasında bir homoloji ortaya çıkarılmamıştır (34).

Sitoplazmik kalıtım gösteren K1 fenotipi için hücrede 2 tane dsRNA bulunmaktadır. Bunlardan büyük olan L-A (4.5 kb) diğeri M1 (1.8 kb) olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bunların sitoplazmada bulunan ScV-L-A ve ScV-M1 olarak adlandırılan virüs benzeri partiküller içinde bulunduğu gösterilmiştir. Sitoplazmalarında dsRNA bulundurmayan veya sadece ScV-L-A bulunduran hücreler duyarlı-katil olmayan, sitoplazmalarında ScV-L-A ile birlikte ScV-M1 bulunduran hücreler ise katil olarak tanımlanmıştır. K1 ve K2 katil suşlarda L-A dsRNA, M1 veya M2 dsRNA'lar ile daima birlikte bulunmaktadır. Doğal *S. cerevisiae* izolatlarının birçoğunun L dsRNA taşıdığı, M dsRNA taşımadıkları, K2 ve K28 katil fenotip belirleyicilerinin de benzer şekilde M2 ve M28 dsRNA'lar olduğu bildirilmiştir (78). K1 katil sistemi *S. cerevisiae*'de ayrıntılı olarak çalışılmasına rağmen, katil suşlar tarafından üretilen toksin, toksinin etki mekanizması ve toksine karşı bağışıklık hala tam olarak anlaşılamamıştır. Aslında birkaç farklı M dsRNA bulunduğu (M1, M2, M3, M28 vb.), ve bunların herbirinin farklı toksin-bağışıklık spesifikliği kodladığı bilinmektedir. Bu toksinlerin üretimi, olgunlaşmaları, salgılanmaları ve etki mekanizmaları ayrıntılı bir şekilde çalışılmakta ve bu fenotip L-A virüs sistemlerinin genetik analizinde kullanılmaktadır (29).

L-A vironlarının 39 nm çapında herbiri tek bir 4.6 kb'lik dsRNA molekülü içeren icosahedral partiküller olduğu ortaya konmuştur. Virüsün 76 kDa'lık Gag (cap: kapsid) olarak adlandırılan tek bir büyük kılıf proteinine ve 180 kDa'lık Gag-Pol füzyon protein (cap-pol: kapsid polimeraz) olarak adlandırılan başka bir proteine de sahip olduğu bilinmektedir. Maya genomunda L ve M dsRNA'lar ile karşılıklı etkileşen birçok kromozomal gen bulunduğu bildirilmiştir. Bunlardan *mak* olarak isimlendirilen genlerin dsRNA'nın korunması ve otoreplikasyonu için gerekli olduğu, *kex* olarak

isimlendirilen genlerin toksinin öldürücü etkisinin ekspirasyonunda rol aldığı ve *rex* olarak isimlendirilen genlerin de toksine direnç için gerekli olduğu tespit edilmiştir (34, 78).

Aslında, maya suşlarının neredeyse tümünün birkaç RNA replikonu taşıdığı bilinmektedir. Birçok *S. cerevisiae* suşunda tanımlanan L-A ve L-BC dsRNA virüslerinin her birisinin yapısal ve fonksiyonel olarak farklı virüs ailelerine üye oldukları tespit edilmiştir (33). Bu virüslerin hücre içinde replike oldukları, hücreyi lize etmedikleri ve hücre büyümesine belirgin yavaşlatıcı bir etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. L-A taşıyan birçok suşun L-A' nın uydusu olan ve M dsRNA olarak adlandırılan dsRNA' ları da taşıdıkları belirlenmiştir. Bunların toksinin üretimi ve bu toksine bağışıklıktan sorumlu oldukları tespit edilmiştir. L dsRNA' nın konukçuya hiçbir fenotip sağlamadığı sadece M dsRNA' ların hücre içinde varlıklarının korunması için gerekli olduğu bilinmektedir. Bilinen bütün fungal virüsler gibi L-A ve L-BC virüslerinin de intraselüler rota ile veya vertikal transfer ile taşındıkları, bununda; eşleşme prosesi ve tomurcuklanma sonucu oluşan karışımla ya da doğal veya yapay hücre füsyonları sırasında oluştuğu bildirilmiştir (2, 34, 78, 80). Sadece *Helminthosporium victoria'* da ekstraselüler yayılma tespit edilmiştir (33). Haploid bir hücrede L dsRNA' nın 100 adet, M dsRNA' nın ise 1000 adet bulunduğu (34) bildirilmiştir. Hem L hem de M dsRNA' lar için kapsid polipeptitlerini L dsRNA' ların kodladığı, ancak, L ve M dsRNA' ların ayrı ayrı kapside oldukları belirlenmiştir (79).

dsRNA veya dsDNA plazmidlerine sadece bazı *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Pichia* generu suşlarında rastlanmaktadır. Diğer mayalarda gözlenen katil aktivitenin ise, kromozomal genler tarafından kodlandığı (22) düşünülmekte ise de; 1988' de Zorg ve ark. (57) *H. uvarum'* un katil fenotipinin dsRNA plazmidine bağlı olduğunu göstermişlerdir. Yine Z. *bailii* 412 suşunun katil aktivitesinin dsRNA plazmidine bağlı olduğunu Radler ve ark. (28) tarafından tespit edilmiştir. *Ustilago* generu üyelerinde katil sistem birbiri ile oldukça ilgili olan üç farklı katil faktör ile karakterize edilmektedir. Bunlar P1, P4 ve P6 olarak isimlendirilmiştir. Bunların izometrik virüs benzeri partiküller içinde tek tek kapside olmuş sitoplazmik dsRNA' larla birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Bu virüs benzeri partiküllerin H (ağır), M (orta) ve L (hafif) tipindeki dsRNA' lardan en az bir tanesini bünyesinde bulundurduğu ortaya konmuştur (34). *K. lactis'* te ise katil aktivitenin doğrusal DNA plazmidleri tarafından belirlendiği bildirilmiştir (50). *K. lactis* katil sisteminde iki tane doğrusal dsDNA plazmidinin rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu plazmidler pGKI-1 (8.9 kb) ve

pGKI-2 (13.4 kb) olarak adlandırılmış ve sitoplazmik kalıtım gösterdikleri, haploid hücrede 100 adet buldukları belirlenmiştir. pGKI-1 hem katil hemde bağışıklık fenotipini kodlarken, pGKI-2' nin her iki pGKI plazmidinin replikasyon ve hücrede korunmasını kontrol ettiği bulunmuştur (34). *Pichia* genusu üyelerinde gözlenen katil fenotip ile ilgili nükleus veya plazmid kaynaklı herhangi bir belirleyici unsur belirlenememiştir (34). Cong ve ark. (81) tarafından *P. etchellsii*, *D. hansenii* ve *Wingae robertsiae*' e ait doğrusal DNA plazmidleri araştırılmış ancak bunların katil aktivite ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir.

1.1.2. Katil toksinler

Saccharomyces genusu üyelerinde öldürme ve bağışıklık spesifikliğine göre K1, K2, K3, K28 gibi farklı tipte toksinler bulunmaktadır. K1 sistemi laboratuvar izolatlarında, K2 ve K28 sistemleri de şarap endüstrisi izolatlarında yaygın olarak görülmektedir. K1 tip katil suşlar ile K2 tip katil suşlar arasında çapraz-bağışıklılığın olmadığı yani K1 tiplerin K2 tipleri ya da K2 tiplerin K1 tipleri öldürdüğü tespit edilmiştir (78). K3 sistemi ise ilk olarak *S. capensis*' in 761 numaralı suşunda belirlenmiştir (34). Katil suşlar tarafından üretilen toksinler optimum pH' larına, sıcaklığa bağlı kararlılıklarına ve proteazlara karşı duyarlılıklarına göre birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Hepsinin proteaz duyarlı ve pH 5.0' ın altında aktif olduğu tespit edilmiştir. Katil mayalar, toksin ve bağışıklık spesifikliğine, duyarlı suşlara karşı katil aktivitenin spektrumuna veya katil mayaların çapraz reaksiyonlarına bağlı olarak en az 10 farklı grupta (K1-K10) sınıflandırılmışlardır (39). Bunlardan K1, K2 ve K3 tipi toksinlerin *Saccharomyces* genusuna ait suşlarda görüldüğü bildirilmiştir (33).

K1 ve K2 öncül toksinleri (protoksinleri) N-glikozlanmıştır. Her ikisinde de pI noktalarının 4.3-4.7 arasında değiştiği, yüksek pH ve sıcaklıklarda (23 °C' nin üzerinde) kararlı yapı göstermedikleri tespit edilmiştir (78). Fungal katil toksinlerin çoğunda olduğu gibi hem K1 hem de K2 toksinleri duyarlı hücrelerin plazma membranının geçirgenliğini bozarak etki göstermektedirler. Sonuçta potasyum iyonları ve ATP gibi düşük molekül ağırlıklı sitoplazmik komponentlerin hücre dışına sızması ile hücre ölümü gerçekleşmektedir (78). Her iki toksinde hücre membrandaki hedefine (reseptör; R1) ulaşmak için, M1 veya M2 dsRNA tarafından kodlanan toksin öncülünün β bölgesi ile maya hücre duvarının β -1,6 glukoz komponentine bağlanmaktadır. Bu basamak enerji gerektirmemektedir. Bundan sonra enerji gerektiren

ikinci basamakta toksinin α bölgesinin bir şekilde plazma membranındaki reseptöre yaklaşarak, intraselüler metabolitlerin hücre dışına akmasına neden olduğu ve bu olayın sonucunda da katil aktivitenin ortaya çıktığı bildirilmiştir (2, 34). Hücre duvarı glukan komponentinin sentezi ile ilgili olan *kre* genlerinin, fonksiyonel toksin reseptörünü oluşturmak üzere görev yaptığı ve bu genlerdeki mutasyonlar sonucunda toksine karşı direnç sağlandığı ortaya konmuştur (2). KRE1, KRE5 ve KRE6 lokuslarında mutant taşıyan hücrelerde, β -1,6 glukan komponent içeriği azaldığından, K1 ve K2 toksinine karşı tam bir direnç sağlanmadığı gösterilmiştir. Toksine bağışık hücrelerin sferoplastlarının K1 toksinine karşı dirençli olduğu ancak, hücre duvarında mutasyona sahip olan hücrelerin sferoplastlarının toksine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar buna bağlı olarak, membran özelliğinin bağışıklık üzerine etkisi olduğunu bildirmişlerdir. 23 °C' da K1 toksinin lethal dozu ile muamele edilen gelişmekte olan hücrelerin karakteristik terminal morfolojisi göstermeden oldukça hızlı bir şekilde öldüğü tespit edilmiştir. Ölümden sonra düşük molekül ağırlıklı sitoplazmik komponentlerin plazma membranından dışarıya akmasından dolayı hücrelerin büzüldüğü gözlenmiştir (78).

Yapılan çalışmalar sonucunda, toksine karşı bağışıklık ve toksin faaliyetinin α alt ünitenin birbirine benzer veya birbiri üzerine binmiş bölgeleri tarafından kodlandığı belirlenmiştir. Bağışıklığı sağlayan tam olgun bir protein henüz tespit edilememiştir ancak K1 toksinine bağışıklığın K1 pre-protoksin tarafından sağlandığı öne sürülmüştür. Toksin öncülünün veya türevlerinin bağışıklık komponenti olarak iş gördüğü düşünülmektedir. Bu moleküllerin reseptörü maskeleyerek, reseptörün toksin ile karşılıklı etkileşimini inhibe ederek, reseptörün yapısını veya lokasyonunun değiştirerek ya da reseptörü plazma membranından çıkararak iş gördükleri düşünülmektedir (2,78).

Toksinin hücre duvarındaki reseptörüne bağlanmasının toksinin spesifikliğini belirlediği ancak toksinin plazma membranında etkili olması için yeterli olmadığı düşünülmektedir (34). Toksinin maya hücre duvarındaki spesifik reseptöre bağlandığı kabul edilip, maya hücre duvarında kaç adet reseptör bulunduğu ve duyarlı maya hücrelerini öldürmek için kaç tane toksin molekülünün gerekli olduğu hesaplanmıştır. Buna göre her maya hücrelerinde reseptör sayısının 3.000-10.000.000 arasında değiştiği bulunmuştur. Büyüme şartlarının bu sayı üzerine etkili olduğu rapor edilmiştir. Reseptörlerin hücre duvarında çok sayıda olduğu ve toksinin bağlanması için gerektiği,

membranda ise az sayıda olduğu ve öldürücü etkinin oluşması için gerekli olduğu bildirilmiştir. Yapılan kinetik çalışmaları ile de tek bir toksin molekülünün bile hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (single hit hypothesis). Buna göre tek bir hücreyi öldürmek için gereken ortalama toksin miktarı lethal unite (L.U.) olarak tanımlanmıştır. Hücrenin fizyolojik durumunun, büyüme hızının toksinin etkili olmasında önemli olduğu ve maksimum duyarlılığın eksponansiyal fazda gözlemlendiği tespit edilmiştir (34).

K2 toksin aktivitesi ve K2 toksinine bağımlılığı kodlayan M2 dsRNA bölgesi kodlanmış, sıra analizi yapılmıştır. M2 dsRNA nükleik asit sırasının K1 toksinin nükleik asit sırası ile farklı olduğu ve bu farklılığın protein seviyesinde de geçerli olduğu rapor edilmiştir. Toksinlerin fizyolojik olarak ve duvar reseptörü seviyesindeki faaliyetinin benzerliği ile nükleik asit sıraları ve protein seviyesindeki farklılığı oldukça şaşırtıcı olarak karşımıza çıkmaktadır. K1 toksini ile yapılan çalışmalar sonucunda α altünitenin 103 aminoasitten, β altünitenin ise 83 aminoasitten oluştuğu belirlenmiştir.

Yapılan hesaplamalara göre olgun toksinin 20.658 moleküler ağırlığa sahip olduğu, α ve β dimerlerinin 2 disülfid bağı ile birbirine bağlandığı ve toksin pI' sının 4.34 olduğu tespit edilmiştir. Toksinin sıvı tamponlarda çözünebildiği bildirilmiştir (2). K2 öncülünün K1 öncülüne benzediği, sadece alt ünitelerinin temel 1 çift bölgede farklılık sergilediği belirlenmiştir. K2 toksininin moleküler ağırlığı 43.000 olduğu ve alt ünitelerin birbirine disülfid bağı ile bağlı olmadığı belirtilmiştir (2). Yapılan hibridizasyon deneylerinde katil dsRNA türleri ile *S. cerevisiae* DNA genomu arasında da hiçbir homolojiye rastlanmamıştır. (33).

K28 toksini ile diğer katil maya toksinleri arasında farklılık gözlenmiştir. Bu toksinin oldukça yüksek pH ve sıcaklıkta (23-25 °C) kararlı, pI' sının ise 4.4 olduğu, ve toksinin aktif formunun S-sefaroze gibi iyon değişim kolonlarından kararlı yapıda kolayca saflaştırılabileceği gösterilmiştir (67). Aktivite için optimum pH 5.0-5.8 olarak bildirilmiştir ancak K28 toksininin pH 3.5' te de aktif olduğu tespit edilmiştir (66). Toksin kararlılığının iyon bağlarının katlanması ile sağlandığı bildirilmiştir. Bu nedenle toksin fonksiyonunun ve kararlılığının sağlanması için ortamda Ca^{+2} iyonlarına veya sitrat tamponuna gerek olduğu ortaya konulmuştur (67). K28 toksin proteinin periodate-Schiff reagenti ile boyanmasının proteindeki karbonhidrat varlığına işaret ettiği bildirilmektedir. Aminoasit analizleri herbir polipeptid için 111 bölge göstermektedir. Buna göre proteinin hesaplanan moleküler ağırlık yaklaşık 14 kDa olarak tespit edilmiş, ancak K28 toksininin jel mobilitesine göre 16 kDa' lık bir büyüklüğe sahip

olduğu rapor edilmiştir. K28 toksininin asit hidrolizinden elde edilen tek şeker D-mannoz olarak bildirilmiştir (78). K28 toksin adsorbsiyonunun mannan komponenti ile ilgili olduğu ve DNA sentezini inhibe ederek etkisini gösterdiği tespit edilmiştir. M28 dsRNA tarafından kodlanan toksin öncülü henüz identifiye edilememiştir. Toksinin plasma membranındaki reseptörüne (R28) ulaşmak için hücre duvarındaki α -1,3 mannan komponentine bağlanarak, reseptörü ile ilişki sağladığı ve daha sonra, nüklear DNA sentezini inhibe ederek etkili olduğu rapor edilmiştir. Bu olayın direkt olarak toksinin alınması sonucu ya da dolaylı olarak açığa çıkarılmamış bir sinyal iletim yolu ile gerçekleşebileceği düşünülmektedir. M28 dsRNA tarafından belirlenen bağışıklığın, toksin ile reseptör ilişkisinin inhibisyonu, reseptör modifikasyonu veya DNA sentezinin inhibisyonundan sonraki basamaklarda gerçekleşebileceği bildirilmiştir (78). 23 °C' da K28 toksininin lethal dozu ile muamele edilen gelişmekte olan hücrelerde 1-2 saat sonra çok az ölü hücre gözleendiği, daha sonraki her 4 saatte bir büyüme eğrisinin tersi oranında hücre sayısının azaldığı ve hücrelerde ölümden sonra büzülme görülmediği tespit edilmiştir. Hücrelerin, hücre döngüsünün S fazındaki tipik morfolojilerini (anne hücrede tek bir nükleus ve her hücrede anne hücrenin büyüklüğüne yakın büyüklükte tomurcuk) korudukları bildirilmiştir (78).

Toksik gen ürünleri ile ilgili çalışmalarda *S. cerevisiae* model mikroorganizma olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun nedeni olarak *S. cerevisiae*' nin genetik çalışmalarda kullanılan klasik bir mikroorganizma olması, katil fenotipin çok kolay belirlenmesi ve katil virüslerin konukçu içinde korunması gösterilmiştir (2). Maya L-A virüs sistemleri; RNA transkripsiyonu ve replikasyonu, RNA paketlenmesi, virus yapısı, ribozomal çerçeve kayması, protein N-asetillenmesi, m-RNA' da baz kesilmesi, m-RNA poly (A) translasyonu, proteolitik proses ve diğer virüs-konukçu ve virüs-virüs ilişkilerinin aydınlatmasında önem taşımaktadır. Bu konularla ilgili fajlarla yapılan ilk çalışmalarda daha çok konukçuya ait prosese ışık tutulurken, mayalardan elde edilen sonuçlar yüksek ökaryotlarda geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Katil toksinlerin olgunlaşma mekanizmaları, salgılanmaları, duyarlı hücrelere bağlanmaları ve gösterdikleri aktiviteler hayvanlardaki nöropeptid ve hormonların üretim ve aktivitelerine oldukça yakın benzerlikler göstermektedir (34). Epidemiyolojik çalışmalarda katil toksinler standart faj tiplemesine ilaveten mayalar için spesifik işaretler olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Bu testlerde üretim ve duyarlılık temel alınmaktadır. Türler arası ve tür içinde güvenilir sonuçların elde edilmesi için bu tarz biyotiplemenin, faj ve serotipleme ile birlikte çeşitli kimyasallara karşı duyarlılık

testleriyle de desteklenmesi gerekmektedir. Katil toksinlere karşı duyarlılık kullanılarak yapılan epidemiyolojik tiplendirme çalışmaları *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, aktinomisetler, *Nocardia*, stafilokoklar, *Mycobacterium*, *Escherichia coli*, *Neisseria* türlerinde yapılmıştır. *S. cerevisiae*' da iyi karakterize edilmiş katil fenotip, moleküler ve hücre biyolojisi açısından konukçu-virüs ilişkileri, protein salgılanması, hücre yüzeyi yapısı gibi günümüzde hala tam olarak anlaşılmamış olan konularda önemli bilgiler sağlamaktadır. Yeni moleküler ve genetik metodların kullanılması ile katil sistemlerin endüstriyel fermentasyonlarda kontaminasyon riskini azaltabilecek yeni suşların oluşturulmasında kullanılabileceği bildirilmiştir (2). Yapılan genetik analizler, katil M dsRNA' ların ekspresyon edilmesi ve korunmasında rol alan plazmid-plazmid ve nükleus-sitoplazma ilişkilerinin kompleksliğini ortaya koymuştur (33). Mayalardaki protein salgılama mekanizması için uygun bir model teşkil eden pre-protoksinin olgunlaşması, sitoplazmik membran fonksiyonları ve transmembran iyonik por oluşumu için temel bir model olarak karşımıza çıkan toksin ve bağışıklık belirleyicileri, mayalarda gen ifade edilmesi ve bunların moleküler biyolojilerinin anlaşılmasında oldukça önem taşıyan M dsRNA' nın korunması ile ilgili olan *mak* ve *ski* genleri ve bu genlerin fonksiyonlarının analizleri, katil sistemleri ökaryotik mikroorganizmalar için primer bir model olarak ortaya koymaktadır (33).

1.2. Katil Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Yöntemler

Mayalarda katil aktivite ile ilgilenen araştırmacılar maya suşlarının katil aktivite yönünden test edilmesinde metilen mavisi içeren tamponlanmış zengin agarlı besi ortamları kullanmışlardır. Maya plak ölçümü (Yeast plate assay) olarak adlandırılan bu yöntem ilk kez 1986 yılında Russel (82) tarafından tanımlanmıştır. Russel (82) çalışmasında maya suşlarını yeast ekstrakt-pepton-glukoz (YEPD) besi ortamında geliştirmiş, pepton-yeast ekstrakt-glukoz-agar (PYG) temel besi ortamını da petrilerde taban olarak kullanmıştır. Araştırmacı duyarlı suşun yoğunluğunu Metilen mavisi içeren PYG besi ortamında 10^4 hücre/ml olacak şekilde ayarladıktan sonra PYG taban üzerine yaymıştır. Bu plaklar üzerine test edilecek suşlardan 0.01 ml damlatmış ve petrileri 21 °C' da 3 gün süre ile inkübe etmiştir. İnkübasyon periyodu sonunda meydana gelen inhibisyon zonlarını incelemiştir. Russel (82) katil toksin tarafından öldürülen duyarlı maya hücrelerinin üzerlerinde besi ortamında bulunan Metilen mavisinin biriktiğini ve bunun şeffaf inhibisyon zonu etrafında mavi hücrelerden oluşan ve çıplak gözle

kolaylıkla farkedilen bir halka oluşturduğunu bildirmiştir. Russel (82) bu yöntemi herhangi bir maya suşunun katil toksin üretip üretmediğini test etmek için kolay bir ölçüm yöntemi olarak tanımlamıştır. Daha sonra araştırmacılar bu yöntemi modifiye ederek çalışmalarında kullanmışlardır. Bu modifikasyonlarda farklı besi ortamları kullanılmış (36), duyarlı suşun konsantrasyonu değiştirilmiş (44-45), duyarlı suş ile inoküle edilmiş besi ortamı üzerine şüpheli suş yoğun bir şekilde steril kürdan ile çizgi şeklinde inoküle edilmiş (26), test için hücresiz kültür filtratları (0.2 µm' lik filtreden geçirilmiş) kullanılmış (41), inkübasyon sıcaklığı ve süresi değiştirilmiş (24, 42), pH' sı 4.2-4.8 arasında değişen ve Metilen mavisi içeren test ortamları kullanılmıştır (35). Ayrıca inhibisyon zonlarının ölçülmesine dayanan agar çukur tekniği de başarı ile uygulanan başka bir yöntem olarak görülmektedir (25). Bu testlerin hepsinde en az iki günlük bir inkübasyon periyodundan sonra oluşan ve çıplak gözle kolaylıkla saptanabilen inhibisyon zonları dikkate alınmıştır. Araştırmacılar canlı ve ölü maya hücrelerini birbirinden ayırmak ve katil toksin aktivitesi ile ilgili çalışmalarında daha kısa sürede ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için fluoresans boyaları da kullanmışlardır. Acridine orange ile fluoresanlarına bakarak ölü ve canlı maya hücrelerini birbirinden ayırt etmeye yönelik ilk çalışma 1940 yılında gerçekleştirilmiştir. Acridine orange ile muameleden sonra, canlı maya hücrelerinin yeşilden sarı-yeşile doğru bir fluoresan ışımaya başladığını, ölü maya hücrelerinin ise turuncu-kırmızı fluoresan ışımaya başladığını tespit etmiştir (83). Acridine orange protozoa, bakteriler ve fungi için önemli bir fluorokrom olarak kullanılmaktadır. Acridine orange ile elde edilen sonuçlar Janus green B ve Metilen mavisi gibi vital boyalarla edilen sonuçlara da uygunluk göstermiştir. Bununla birlikte yorumlarda ve sonuçlarda çeşitli farklılıklar bulunmuştur (83). *Paracoccidioides brasiliensis* 'in maya formundaki canlı hücreleri Fluorescein diasetat, Erythrosin B, Janus green ve Laktofenol pamuk mavisi ile boyandıktan sonra sayılmış ve bu sonuçlar katı besi ortamında elde edilen koloni oluşturan birim (kob) sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar arasında çok büyük farklılıklar belirlenememiştir (84). Araştırma sonuçları, katil toksinler tarafından öldürülen hücrelerin sitoplazma membranlarının büyümenin lag fazından sonra bazı boyaları da içeren çok sayıda maddeye karşı geçirgen hale geldiğini ortaya koymuştur (85). Evans' a (85) göre Vondrejs ve Palkova fluoresans boyaları düşük konsantrasyonlarda yüksek derecede resolüsyona izin verdiği için katil aktivitenin test edilmesinde kullanmışlardır. Araştırmacılar geliştirdikleri Rhodamine B ölçüm yöntemi ile sitoplazmik

membran geçirgenlik tezine dayanarak, *S.cerevisiae* T158C suşunun katil toksin aktivitesini birkaç saat içinde ölçmüşlerdir (85).

Son yıllarda floresans mikroskoplarda sağlanan başarılı gelişmeler sayesinde konu ile ilgili çalışmalarda da birçok kolaylık sağlanmıştır. Maya hücrelerine uygulanan floresans maddelerle yapılan çalışmalarda birçok maya türü için önemli olan otofluoresanın kontrol edilmesinin öncelikli olarak dikkate alınması gerektiği vurgulanmaktadır. Maya hücrelerinde sitoplasmanın zayıf mavi floresan yaydığı, granüllerin ise sarı floresan yaydığı bilinmektedir. Otofluoresanın uygun filtreler kullanılarak veya mayaların kültür edilme şartlarının ayarlanması ile bertaraf edilebileceği bildirilmiştir (85). Özellikle maya sitolojisi ile ilgili çalışmalarda Berberin sulfate, Aurophospin, Coriphospin, Thioflarin S ve Natural red gibi parlak floresan veren fluorokromların kullanıldığı bilinmektedir. Birçok çalışmada hücresel seviyede çeşitli makromoleküllerin lokalizasyonunu belirlemede fluorokrom-işaretlenmiş antikörlerin kullanıldığı dikkat çekmektedir. İndirekt immunofluoresans yöntemi işaretlemeye daha yüksek duyarlılık sağladığı için bu konuda en uygun yöntem olarak bildirilmiştir. İndirekt immunofluoresans yönteminde konjugat preparasyonu için Fluorscein isothiocyante ve Tetramethylrhodamine isothiocyante iyi etiketler olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Her iki fluorokromun da uygun spektral resolusyona sahip olduğu için tercih edildiği ve Fluorsceinin güçlü yeşil-sarı, Rhodamine B' nin ise kırmızı-turuncu floresan verdiği bildirilmiştir (85). Katil aktiviteye sahip mayalarda gerek floresans mikroskopi gerekse indirekt immunofluoresans teknikleri kullanılarak toksinin etki mekanizması, katil aktivitenin moleküler temeli, toksin reseptörü, toksinin ince yapısı belirlenmeye çalışılmıştır (27, 51, 70, 72, 86). Murai ve ark. (6) hücre yüzey mühendisliği ile yaptıkları nişasta kullanabilen maya suşlarında, transforme hücreleri immunofluoresans işaretlemişler ve füzyon proteininin lokalizasyonunu immunoelektronmikroskopiyle belirlemeye çalışmışlardır.

1.3. Katil Mayaların Önemi

Katil mayalar bira fermentasyonunda hem kesikli hem de sürekli kültürlerde kontaminant olarak rapor edilmiştir. Bira fermentasyonunun katil maya ile enfeksiyonu fermentasyon için kullanılan mayanın ölümü ile sonuçlanmakta ve elde edilen ürün istenilenden oldukça farklı olmaktadır. Yapılan çalışmalarda şarap yapımında kullanılan suşların birçoğunun katil mayalara karşı duyarlı olduğu ve katil maya kontaminasyonun

fermentasyon ortamında % 0.1' den daha az olduğunda 24 saat içinde şarap mayasının total eliminasyona neden olduğu rapor edilmiştir (46).

Ekmek mayası endüstrisinde steril olmayan tip açık fermentasyonlar kullanıldığı için yabancı mayaların kültür ortamına kontaminasyonu kaçınılmazdır. Ayrıca sistem daima şeker limitasyonunda çalıştığı için yabancı maya için avantajlı bir durum sağlanmaktadır. Arzu edilmeyen maya suşlarının ortama kontaminasyonu verimi düşürmekte ve ürünün kalitesinin de bozulmasına neden olmaktadır. Yabancı mayaların kültür ortamına kontaminasyonunun fermentasyon endüstrisinde çok önemli bir probleme neden olduğu bildirilmiştir (26, 87). Katil maya suşları ürettikleri katil toksinler ile hassas maya suşlarını öldürmektedir. Katil aktiviteye sahip maya suşlarının starter suş olarak kullanımı yabancı mayaların kontaminasyonunu önleme açısından önem taşımaktadır. Katil plazmid taşıyan maya suşlarının kültür ortamına girmesi, katil toksine hassas olan starter suşa zarar vererek fermentasyon ve sonrasında istenmeyen sonuçlar doğurmaktadır. Böyle bir olayda katil suşlar doğal maya populasyonlarındaki rekabet avantajları sayesinde katil olmayan mayalar ile etkili bir yarışa girebilmekte, antikonaminant olarak görev yapabilmektedirler (2). İlk defa 1963 yılında Bevan ve Mackower tarafından bira kontaminantlarından izole edilen katil maya suşları, salgıladıkları toksinle duyarlı suşları öldürürken, kendilerinin bu toksine dirençli olması, küçük bir kontaminantın endüstriyel çapta bir fermentasyonu gasp edebileceğini göstermiştir (78). Günümüzde aynı türün pek çok alt türü seleksiyon veya genetik manipülasyonlar kullanılarak, seçilmiş starter suşlar olarak görev yapmaktadır. Moleküler biyoloji teknikleri ile katil aktiviteye sahip maya suşları geliştirilebilmektedir. *S. cerevisiae* K3, *H mrakii* CCY 38-7-1 ve *H. saturanus* var. *subsufficiens* CCY-38-4-2' nin bu konuda ümit vaadedici olduğu Michalcakova ve ark. (48) tarafından bildirilmiştir. Gerek şarapçılıkta gerekse ekmek mayası üretiminde katil aktiviteye sahip ve/veya yabancı organizmaların ürettiği katil toksinlere karşı bağışıklık kazanmış, kendi ürettiği toksin ile geniş bir yelpazedeki diğer maya, bakteri ve funguslara karşı etkili bir maya suşunun starter kültür olarak kullanımı yukarıda değinilen problemlerin çözümü için ümit vaad etmektedir. Ayrıca bu yolla fermentasyon endüstrisinde maliyetin düşürülebileceği, starter kültürün bozulması ya da kaybedilmesi riskinin elimine edilebileceği ve daha da önemlisi patent korunması sağlanabileceği düşünülmektedir.

Mayalarda katil suşların araştırılması ile ilgili yurt dışında birçok çalışma yapılmasına rağmen, henüz Türkiye' de bu konu ile ilgili birkaç çalışma mevcut olup, bunlarda sadece şarap fermentasyonu ile ilgili katil maya suşlarının araştırılması ile

sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızda ekşi hamurda bulunan ve mayalanma olayında rol alan, aynı zamanda katil aktiviteye sahip mayaların varlığı ve bu suşların katil aktivitelere etki eden faktörlerin incelenmesi hedeflenmiştir. Elde edilecek sonuçların hem gelecek yıllarda bu konuda yapılacak çalışmalar için örnek oluşturması hemde ekme mayası üretim endüstrisi için yeni ufuklar açacağı düşünülmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmamızda Eskişehir merkezindeki 22, Bilecik merkezindeki 1 fırından ve Eskişehir'e bağlı Çukurhisar, Alpu, İnönü İlçeleri ile Kümbet, Çavlum ve Üçbaşı Köy' lerinden 29, Eskişehir' deki ve Pazaryeri' ndeki birer evden 2 adet ekşi hamur örneği toplanılmıştır. Dört adet boza örneği ise Eskişehir' in farklı semtlerinde bulunan pastanelerden alınmıştır. Farklı firmaların üretip satışa sunduğu 3 adet yaş maya örneği ile 2 adet ticari kuru maya örneği yine Eskişehir' deki değişik marketlerden sağlanmıştır. Ticari kuru maya örneğinin bir tanesi ise İngiltere'den getirilmiştir (Çizelge 2.1). Boza örnekleri satış yerlerinden alınan 1 kg'lık paketler halinde laboratuvara getirilmiştir. Ekşi hamur örnekleri fırıncılar ve evlerden direkt olarak mayalılık hamurdan, steril cam kavanozlar içine alınmıştır. Ticari olarak satışa sunulan yaş ve kuru maya örnekleri ise, marketlerden ambalajları zarar görmemiş ve son kullanım tarihi dolmamış ürünlerden seçilerek alınmış ve laboratuvara getirilmiştir. Hemen işleme alınamayan örnekler buzdolabında + 4 °C' da bir gece saklanmıştır.

Çizelge 2.1. İzolasyon için kullanılan örneklerin çeşidi ve toplandıkları yerler

Örnek Çeşidi	Örnek sayısı	Örneğin alındığı yer
Boza Pastanelerden	4	<u>Eskişehir</u> : Vişhelik mah., Köprübaşı 1, Köprübaşı 2, Yediler.
Ticari kuru maya Marketlerden	3	<u>Eskişehir</u> : 2 farklı market, <u>İngiltere</u> : 1 market.
Ticari yaş maya Marketlerden	3	<u>Eskişehir</u> : Hamamyolu 1, Hamamyolu 2, Kütahya Cad.
Ekşi hamur Fırınlardan ve evlerden	29	<u>Eskişehir' in çevresi</u> : Çukurhisar, Alpu, Kümbet Köyü, İnönü, Çavlum, Üçbaşı Köyü. <u>Eskişehir ve Bilecik ekmek fırınları</u> : Tepebaşı, Deliklitaş, Odunpazarı 1, Muttalip Cad., Çifteler Cad.1, Yıldıztepe 1, Yıldıztepe 2, Yunusemre Cad., Ziyapaşa Cad., Çifteler Cad.2, Yeşiltepe, Yenikent 1, Yenikent 2, Sütluce Mah., Yunusemre Kampüsü, Tunalı Mah.1, Vişnelik Mah.1, Vişnelik Mah.2, Çifteler Cad. 2, Alanönü, Odunpazarı 2, Tunalı Mah. 2, Bilecik merkez Mah. <u>Evler</u> : Pazaryeri, Eskişehir

2.2. Mikroorganizma Kùltürleri

Çalışmamızda kullanılan Maya I (MY1) ve Maya II (MY2) suşları Pak-Gıda Üretim ve Paz. A.Ş.' den, *Debaryomyces hanseneii* TK-type V suşu Japonya'daki Kumamoto Institute of Technology' den, *Saccharomyces cerevisiae* K1 ve *Saccharomyces cerevisiae* K2 suşları Japonya'daki Industrial Technology Centre of Okayama Prefecture' dan, *Saccharomyces cerevisiae* K7, *Saccharomyces cerevisiae* 1385, *Saccharomyces cerevisiae* 28, *Saccharomyces cerevisiae* S6 suşları Almanya' daki Universitat Des Saarlandes' ten, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 232, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 suşları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakùltesi Gıda Mühendisliği Bölümü' nden, *Pichia anomala* CYC 1027 ve *Pichia membranaefaciens* CYC 1106 suşları ise Portekiz' de bulunan Gulbenkian Institute of Science' dan kişisel ilişkiler sonucu temin edilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Çalışmamızda kullanılan maya suşları, taşıdıkları suş özellikleri ve sağlandığı kurumlar

Maya Suşları	Maya Suşunun Özelliği	Maya Suşlarının Sağlandığı Kurum
MAYA I	Ticari olarak üretimde kullanılan ekmek mayası suşu	Pak-Gıda Üretim ve Paz.A.Ş. Pak-Biomer (Ar-Ge) İzmit-KOCAELİ
MAYA II	Ticari olarak üretimde kullanılan ekmek mayası suşu	Pak-Gıda Üretim ve Paz. A.Ş. Pak-Biomer (Ar-Ge) İzmit-KOCAELİ
<i>Debaryomyces hanseneii</i> TK-type V	Katil suş	Kumamoto Institute of Technology JAPONYA
<i>Hansenula anomala</i> NFRI-1702	Katil suş	Kumamoto Institute of Technology JAPONYA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K1	K1 tip katil maya suşu	Industrial Technology Centre of Okayama Prefecture JAPONYA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K2	K2 tip katil maya suşu	Industrial Technology Centre of Okayama Prefecture JAPONYA

Çizelge 2.2. (Devam) Çalışmamızda kullanılan maya suşları, taşıdıkları suş özellikleri ve sağlandığı kurumlar

Maya Suşları	Maya Suşunun Özelliği	Maya Suşlarının Sağlandığı Kurum
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K7	K7 tip katil maya suşu	Universität Des Saarlandes ALMANYA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1385	K2 tip katil maya suşu	Universität Des Saarlandes ALMANYA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 28	K28 tip katil maya suşu	Universität Des Saarlandes ALMANYA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S6	Duyarlı, katil olmayan maya suşu	Universität Des Saarlandes ALMANYA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 232	K1 tip katil maya suşu	Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği ANKARA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 738	K2 tip katil maya suşu	Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği ANKARA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	Duyarlı maya suşu	Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği ANKARA
<i>Candida boidinii</i> IGC 3430	Duyarlı maya suşu	Gulbenkian Institute of Science PORTEKİZ
<i>Saccharomyces exiguus</i> ICG 4612	Duyarlı maya suşu	Gulbenkian Institute of Science PORTEKİZ
<i>Klyveromyces lactis</i> IGC 4358	Duyarlı maya suşu	Gulbenkian Institute of Science PORTEKİZ
<i>Pichia anomala</i> CYC 1027	Katil maya suşu	Gulbenkian Institute of Science PORTEKİZ
<i>Pichia membranaefaciens</i> CYC 1106	Katil maya suşu	Gulbenkian Institute of Science PORTEKİZ

2.3. Besi Ortamları ve Kimyasal Çözeltiler

2.3.1. Besi ortamları

Çalışmamızda kullanılan besiy ortamları aşağıda verilmiştir.

Malt-Yeast-Glukoz-Pepton Agar Besi Ortamı (YM)

Malt ekstrakt	3.0 gr
Yeast ekstrakt	3.0 gr
Pepton	5.0 gr
D-glukoz	10.0 gr
Agar	20.0 gr
Distile su	1000 ml
pH ~ 5.5	

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Yeast ekstrakt-Pepton-Glukoz-Agar (YEP-Glukoz agar)

Yeast ekstrakt	5.0 gr
Glukoz	10.0 gr
Mikolojik pepton	5.0 gr
Agar	15.0 gr
Distile su	1000 ml
pH ~ 5.5	

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Malt ekstrakt	30.0 gr
Mikolojik pepton	5.0 gr
Agar	15.0 gr

Distile su	1000 ml
pH ~ 5.5	

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Malt Ekstrakt Broth (MEB)

Malt ekstrakt	30.0 gr
Mikolojik pepton	5.0 gr
Distile su	1000 ml
pH ~ 5.5	

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Yeast ekstrakt-Pepton-Dekstroz Besi Ortamı (YEPD BROTH)

Yeast ekstrakt	10.0 gr
Dekstroz	20.0 gr
Pepton	10.0 gr
Distile su	1000 ml
pH ayarı yapılmaz.	

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Yeast ekstrakt-Pepton-Dekstroz-Agar Besi Ortamı (YEPD AGAR)

Yeast ekstrakt	10.0 gr
Dekstroz	20.0 gr
Pepton	10.0 gr
Agar	12.0 gr
Distile su	1000 ml
pH ayarı yapılmaz.	

Besi ortamı 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Yeast ekstrakt-Pepton-Dekstroz-Metilen Mavisi-Agar Besi Ortamı (YEPD-MB)

Yeast ekstrakt	10.0 gr
Dekstroz	20.0 gr
Pepton	10.0 gr
Agar	12.0 gr
Metilen Mavisi	0.03 gr
Distile su	1000 ml

Bu besi ortamı ve agarı ayrı ayrı hazırlanmıştır. Otoklava koymadan önce YEPD-MB besi ortamının pH' sı 5N HCl ile 4.5' e ayarlanarak 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Besi ortamı 45 °C' a kadar soğutulmuş ve agar ile karıştırılmıştır.

Yeast ekstrakt-Glukoz Besi Ortamı (YEG)

% 10 (w/v) glukoz	10.0 ml
% 5 (w/v) yeast ekstrakt	10.0 ml
Distile su	100 ml
pH ayarı yapılmaz.	

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Medium J

% 5 (w/v) yeast ekstrakt	50.0 ml
% 5 (w/v) pepton	50.0 ml
% 10 (w/v) glukoz	50.0 ml
% 20 (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄	10.0 ml
% 8 (w/v) KCl	5.0 ml
% 5 (w/v) MgSO ₄ .7H ₂ O	5.0 ml
% 3 (w/v) CaCl ₂ .2H ₂ O	5.0 ml
% 0.05 (w/v) FeCl ₃ .6H ₂ O	5.0 ml

% 3 (w/v) $MnSO_4$ 5.0 ml
 0.1 M sitrik asit (50.0 ml) + 0.2 M Na_2HPO_4 (24.0 ml)
 26.0 gr gliserol/253.0 ml distile su 265.0 ml
 pH ayarı yapılmaz.

Bu besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilerek oda sıcaklığında saklanmıştır.

Yeast ekstrakt-Glukoz-Kloramfenikol Besi Ortamı (YGC)

Yeast ekstrakt	5.0 g
D (+) glukoz	20.0 g
Kloramfenikol	0.1 g
Agar	14.9 g
Distile su	1000 ml

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Yeast Nitrojen Base Ortamı (10X)

6.7 g Difco nitrojen base 100 ml distile su ile karıştırılıp, 0.20 μm ' lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Steril besi ortamı 150 ml' lik erlen içinde 2-8 °C da saklanmıştır. Testler için 0.5 ml 10X besi ortamı 4.5 ml steril distile su ile seyreltilerek tüplere aktarılıp kullanılmıştır.

Yeast Karbon Base Ortamı (10X)

11.7 g Difco karbon base 100 ml distile su ile karıştırılıp, 0.20 μm ' lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Steril besi ortamı 150 ml' lik erlen içinde 2-8 °C' da saklanmıştır. Testler için 0.5 ml 10X besi ortamı 4.5 ml steril distile su ile seyreltilerek tüplere aktarılıp kullanılmıştır.

Difco Bacto Urea R Broth

Hazır besi ortamı oda sıcaklığına getirildikten sonra 38.7 g Difco Bacto Urea R Broth 1000 ml distile su ile karıştırılıp, 0.20 µm' lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Test için 0.5 ml tüplere aktarılmıştır.

Yeast ekstrakt-Pepton-Dekstroz-Gliserol-Agar Besi Ortamı (YPDG)

Yeast ekstrakt	10.0 g
Pepton	20.0 g
Dekstroz	1.0 g
Agar	20.0 g
Distile su	970 ml
Gliserol	30.0 ml

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Patates Dekstroz Agar (PDA)

Patates ekstraktı	4.0 g
Dekstroz	20.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Plate Count Agar (PCA)

Tripton	5.0 g
Yeast ekstrakt	2.5 g
Dekstroz	1.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Nutrient Agar (NA)

Et ekstresi	1.0 g
Yeast ekstrakt	2.0 g
Pepton	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

Besi ortamı 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2.3.2. Kimyasal çözeltiler

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar aşağıda verilmiştir.

McIlvains Tamponu (pH 4.7)

0.1 M sitrik asit	26.0 ml
0.2 M Na ₂ HPO ₄	24.0 ml
Distile su	50.0 ml

Bu tampon 121 °C' da 15 dakika otoklavda steril edilerek oda sıcaklığında saklanmıştır.

% 15' lik Gliserol (v/v)

Gliserol	15.0 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

% 30' luk Gliserol (v/v)

Gliserol	30.0 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

5 N HCl

HCl (d= 1.18 gr/ml)	44.20 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

% 10' luk Glukoz Çözeltisi

Glukoz	10.0 gr
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

Fluorescein 10X (stok solüsyonu)

Fluorescein	1.0 g
BSA	0.1 g
PBS 1X	10 ml

Yukarıdaki reçete uygulanıp, 0.20 μm ' lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Steril stok solüsyon koyu renkli cam şişede -20 °C' da saklanmıştır. Boyama işlemlerinde kullanmak için PBS ile 10 kez dilüe edilmiştir. Her boyamada yeni çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

PBS 1X Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
15 mM KH_2PO_4
8 mM Na_2HPO_4
pH 7.3

Monomer (akrilamid/bis) Çözeltisi (% 30 T, % 2.7 C_{bis}) (A)

Akrilamid	29.2 g
Bis	0.8 g
H ₂ O	100 ml'ye tamamlanır.

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edildikten sonra karanlıkta +4 °C' da saklanmıştır. Akrilamid nörotoksik bir maddedir. Kullanırken eldiven ve maske takılmalıdır.

4X Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris, pH 8.8) (B)

Tris	18.15 g
H ₂ O	100 ml' ye tamamlanır.
3 N HCl ile pH 8.8' e ayarlanır.	

Tampon deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edildikten sonra karanlıkta +4 °C' da saklanmıştır.

4X Yükleme Jeli Tamponu (0.5 M Tris, pH 6.8) (C)

Tris	3.0 g
H ₂ O	50 ml' ye tamamlanır.
5 N HCl ile pH 6.8' e ayarlanır.	

Tampon deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edildikten sonra karanlıkta +4 °C' da saklanmıştır.

% 10 SDS (D)

SDS	10.0 g
H ₂ O	100 ml' ye tamamlanır.

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

% 10 Amonyum Persülfat (APS; polimerizasyon başlatıcı) (E)

Amonyum persülfat	0.5 g
H ₂ O	5.0 ml' ye tamamlanır.

Bu çözelti kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır.

2X Örnek Uygulama Tamponu (0.125 M Tris, % 4 SDS, % 20 gliserol, % 10 2-merkaptoetanol, pH 6.8) (F)

Tris (C)	2.5 ml
SDS (D)	4.0 ml
Gliserol	2.0 ml
2-merkaptoetanol	1.0 ml
Bromphenol blue	0.01 g
H ₂ O	10.0 ml' ye tamamlanır.

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edildikten sonra kullanılacak hacimlere bölünerek -20 °C' da saklanmıştır.

5X Tank Tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M glisin, % 0.1 SDS, pH 8.3) (G)

Tris	15.0 g
Glisin	72.0 g
SDS	5.0 g
H ₂ O	1000 ml' ye tamamlanır.

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edildikten sonra +4 °C' da saklanmıştır. Bu çözeltinin pH'sını ayarlamaya gerek yoktur.

Formaldehit Fiksatif Çözeltisi (A)

% 40 (v/v) Metanol	1000 ml
% 37 Formaldehit	0.5 ml

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

0.2 g/l Sodyum Tiyosülfat (B)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.2 g
H_2O	1000 ml' ye tamamlanır.

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

% 0.1 Gümüş Nitrat (C)

AgNO_3	1.0 g
H_2O	1000 ml' ye tamamlanır.

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış, filtre edilerek ışığa duyarlı olduğu için koyu renk şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

Görüntü Oluşturma (tiyosülfat developing) Çözeltisi (D)

Na_2CO_3	30.0 g
B çözeltisi	20.0 ml
H_2O	1000 ml' ye tamamlanır.

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış ve filtre edilmiştir. Kullanılacağı zaman her 100 ml' sine 50 μl % 37' lik formaldehit eklenmiştir.

2.3 M Sitrik Asit (E)

Sitrik asit	22.1 g
H_2O	50 ml' ye tamamlanır.

Çözelti deiyonize distile su kullanılarak hazırlanmış ve filtre edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.4. Örneklerden Mikroorganizma İzolasyonu ve Sayımı

2.4.1. Örneklerden maya, bakteri ve küf izolasyonu

Evans (85) ve Barnett ve ark. (13) tarafından genel olarak maya izolasyonlarında kullanılan yöntemler, laboratuvara getirilen örnek özelliğine göre modifiye edilerek izolasyon işlemlerinde uygulanmıştır.

Boza örnekleri: Satış noktalarından 1' er kg' lık paketler halinde alınan boza örnekleri laboratuvara getirildikten hemen sonra işleme alınmıştır. Steril şartlar altında 10 gr' lık boza örnekleri içinde 90 ml steril distile su bulunan behere alındıktan sonra 1' er dakika elle çalkalanarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra steril distile su ile örneklerin 10 katlı dilüsyonları hazırlanmıştır. 10^{-1} den 10^{-8} e kadar hazırlanan her bir dilüsyondan çift paralel olarak 0.5 ml örnek mikroorganizma izolasyonları için uygun besi ortamlarına yayma ekim yapılmıştır. Maya için YM, bakteri için PCA, küf için PDA besi ortamı kullanılmıştır. YM petripleri 25°C ' da 3 gün, PCA petripleri 28°C ' da 2 gün, PDA petripleri ise oda sıcaklığında 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda YM, PCA ve PDA petriplerinde gelişen, farklı morfolojiye sahip en az 10 koloni seçilmiştir. Seçilen izolatların saflık kontrolleri maya izolatları için MEA, bakteri izolatları için NA, küf izolatları için PDA besi ortamları kullanılarak aynı inkübasyon şartları altında yapılmış ve stoklanmıştır.

Ekşi hamur örnekleri: Steril kavanozlara alınarak laboratuvara getirilen ekşi hamur örneklerinden alınan 10 gr örnek, 90 ml steril distile su ile waring blenderda 90 sn orta hızda homojenize edilmiştir. Daha sonra steril distile su ile 10^{-1} den 10^{-8} e kadar 10 katlı dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir dilüsyondan çift paralel olarak 0.5 ml örnek maya izolasyonu için YM, bakteri izolasyonu için PCA ve küf izolasyonu için PDA besi ortamlarına boza örneklerinde olduğu gibi ekilmiştir. YM petripleri 25°C ' da 3 gün, PCA petripleri 28°C ' da 2 gün, PDA petripleri ise oda sıcaklığında 7 gün inkübe edilmiştir. Petriplerde gelişen farklı morfolojiye sahip en az 10 koloni seçilerek aynı besi ortamları ve inkübasyon şartlarında saflık kontrolleri yapılmış ve stoklanmıştır.

Yaş ve kuru maya örnekleri: Marketlerden alınan yaş ve kuru maya örnekleri laboratuvara getirildikten sonra ambalajları % 70' lik alkol ile silinmiştir. Steril şartlar altında yaş maya örnekleri 1:1, kuru maya örnekleri ise 1:9 oranında steril distile su ile waring blenderda orta hızla homojen hale getirilmiştir. Bu homojenattan 10^{-7} ye kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Örneklerden maya, bakteri ve küf izolasyonu ve saflaştırma işlemleri boza ve ekşi hamur örneklerinde uygulanan yöntemlere göre yapılmıştır.

2.4.2. Örneklerden izole edilen maya, bakteri, küf ve referans maya suşlarının saklanması

Örneklerden izole edilen ve saflaştırılan maya izolatları 2' şer adet yatık YEP-glukoz, bakteri izolatları yatık NA, küf izolatları ise yatık PDA tüplerine çekilerek, tüplerin ağızları parafilm ile kapatılmış ve tüpler buzdolabında +4 °C' da saklanmıştır (85, 88). Stoklar altı ayda bir yenilenmiştir.

Yurt dışından, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm'ünden ve Pak-Gıda Üretim ve Pazarlama A.Ş.' den kişisel ilişkiler sonucu sağlanan referans maya suşlarının MEA petrilerinde çizgi ekim ile saflıkları kontrolleri yapıldıktan sonra 3-5 adet koloni steril kürdan yardımı ile alınarak, steril şartlar altında MEA petrilerine ve MEB tüplerine aktarılmıştır. Bütün tüp ve petriler 25 °C' da 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda katı besi ortamından steril kürdan yardımı ile alınan 5-10 koloni % 15' lik 1 ml steril gliserol içeren eppendorf tüplerine aktarılıp - 80 °C' da uzun süreli olarak stoklanmıştır. Sıvı besi ortamında gelişen kültürlerden ise 0.5 ml kültür 0.5 ml % 30' luk steril gliserol içeren eppendorf tüplerine aktarılarak uzun süreli saklamak için -80 °C derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Bütün eppendorf tüpleri derin dondurucuya yerleştirilmeden önce tüp içinde homojenizasyonu sağlamak için iyice çalkalanmıştır. Her bir suş için 2' şer adet stok eppendorf tüpü hazırlanmıştır (88). Katil aktivitesi tespit edilen maya izolatları da aynı şekilde uzun süreli olarak stoklanmıştır.

2.4.3. Örneklerdeki maya, bakteri ve küf sayımı

Örneklerdeki maya ve bakteri sayımları için Miles ve Misra' nın damla plak yöntemi kullanılmıştır (89). Mayalar için YM, bakteriler için PCA besi ortam bulunan

petri kutularının alt kapakları dıştan dört bölüme ayrılmıştır. Ayrılan alanlara örneklerden hazırlanan her bir dilüsyondan, 20'şer μl ' lik üç damla bırakılmıştır. Damlaların kurumması için petri kutuları steril kabin içinde 30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 20-200 adet koloni gözlenen petri kutularında koloni sayımları yapılarak örneklerdeki toplam mikroorganizma sayıları militrede koloni oluşturan birim (kob/g) olarak hesaplanmıştır. Her bir sayım için çift paralel olarak ekim yapılmıştır. Örneklerdeki küf sayımları için uygun dilüsyonlardan 0.5 ml örnek PDA içeren petrilere yayma ekim yapılmıştır. Petriler oda sıcaklığında 7 gün süresince inkübe edilmiş ve oluşan küf kolonileri uygun dilüsyonlarda sayılarak örneklerdeki küf sayıları belirlenmiştir.

2.5. Referans Suşların Büyüme Eğrilerinin Çıkarılması

Aseptik şartlarda $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' da gliserolde saklanan *S. cerevisiae* S6, *S. cerevisiae* NCYC 1006, referans suşları, 25.2, 25.5 numaralı izolatlarımız, MY1 ve MY2 suşları ayrı ayrı MEA üzerinde steril kürdanlar ile çizgi ekim yapılarak, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' da 48 saatlik inkübasyon ile canlandırılmıştır. Bu kültürlerden bir öze dolusu kültür ya da 10-15 tek koloni 150 ml' lik erlen içindeki 50 ml YEPD broth besi ortamına aktarılmıştır. Kültürler $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' da 190 rpm' de bir gece inkübe edilmiştir (90). Referans yöntemine göre bir gecelik kültürlerdeki hücre sayısı yaklaşık 5×10^7 hücre/ml olarak kabul edilerek her bir kültürden 25 μl örnek 250 ml YEPD brotha aktararak, 250 ml içinde yaklaşık 5×10^3 hücre/ml hücre yoğunluğu elde edilmiştir. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' da 150 rpm' de inkübe edilen kültürlerden 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30 ve 36 saat sonra örnekler alınarak 600 nm' deki absorbans (A_{600}) değerleri ölçülmüş ve bu örneklerden ayrıca damlatma plak yöntemine göre ekim yapılan petriler $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' da kapakları altta olacak şekilde inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda damlalarda oluşan koloniler sayılarak ilgili absorbanstaki canlı maya sayısı belirlenmiş ve bu değerlerden faydalınılarak kültürlerin büyüme eğrileri çıkarılmıştır. Bütün ölçümler için çift paralel çalışılmıştır.

2.6. Maya İzolatlarının Katil Aktivitelerinin Test Edilmesi

2.6.1. Referans suşlar ile katil aktivite testi

Örneklerden izole edilen maya suşlarının katil aktivite yönünden test edilmesi işlemlerine başlamadan önce stoklarımızda bulunan referans suşlar ile daha önce

araştırmacılar tarafından bu özelliğin tespit edilmesinde kullanılan yöntemler (22, 24, 26, 39, 49) denenerek, çalışmamız için en uygun test tipinin seçilmesi amacı ile aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

Referans katil suşlar *S. cerevisiae* K1, *S. cerevisiae* K2, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738, *S. cerevisiae* NCYC 232 ve duyarlı suş *S. cerevisiae* NCYC 1006 ile duyarlı-katil olmayan *S. cerevisiae* S6 yatkı agar stoklarından YEPD petrilere aktararak 25 °C' da 3 gün inkübe edilmiştir. Kültürler daha sonra 150 ml' lik erlenler içindeki 50 ml YEPD broth besi ortamına aktarılarak, 21 °C' da 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. *S. cerevisiae* K1, *S. cerevisiae* K2, *S. cerevisiae* 738 ve *S. cerevisiae* 232 suşları pozitif kontrol, *S. cerevisiae* S6 suşu ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Yayma Plak Yöntemi: Duyarlı suş *S. cerevisiae* NCYC 1006' nın spektrofotometrede 600 nm' deki (A_{600}) okunma değeri belirlenerek, hücre yoğunluğu 10^2 , 10^4 ve 10^5 olacak şekilde YEPD brothda dilüsyonları hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan 1'er ml daha önceden hazırlanan ve kurutulan YEPD-MB (pH 4.5) petrilere aktararak, kültürün tüm agar yüzeyine yayılması sağlandıktan sonra petriyer üst kapakları yarı açık şekilde 30 dakika steril kabinde kurumaya bırakılmıştır.

Dökme Plak Yöntemi: Duyarlı suş *S. cerevisiae* NCYC 1006' nın spektrofotometrede 600 nm' deki (A_{600}) okunma değeri belirlenmiştir. 45 °C'daki YEPD-MB (pH 4.5) besi ortamına agarı ilave edildikten sonra *S. cerevisiae* NCYC 1006 kültürü son hücre yoğunluğu 10^2 , 10^4 ve 10^5 olacak şekilde besi ortamına aktarılmıştır. Besi ortamı iyice çalkalandıktan sonra steril petrilere 15'er ml olacak şekilde aktararak, petriyer üst kapakları yarı açık vaziyette katılaşımları için steril kabinde 30 dakika bekletilmiştir.

Hem yayma plak hem de dökme plak yönteminde % 1,2, 1,5 ve 2' lik agar konsantrasyonları denenmiştir. YEPD-MB (pH 4.5) besi ortamı agarın hidrolizini önlemek için besi ortamı ve agar ayrı ayrı hazırlanarak steril edilmiş ve kullanılmadan hemen önce karıştırılmıştır.

Katılaşılan agar yüzeylerine steril kürdan yardımı ile referans suşları *S. cerevisiae* K1, *S. cerevisiae* K2, *S. cerevisiae* NCYC 738, *S. cerevisiae* NCYC 232 ve *S. cerevisiae* S6' dan yaklaşık 10 mm uzunluğunda ve yoğun olarak çizilerek inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Test YEPD agar petriyeri 21 °C' da 48 saat inkübe

edilmiştir. Bunlara ilaveten, ayrıca sıvı besi ortamında aynı şartlar altında inkübe edilen test kültürlerinden de duyarlı suş ile inoküle edilmiş plaklara katı yüzey üzerine 10' ar µl damlatılmıştır. Damlalar kuruduktan sonra bütün petri ler ters çevrilmiş konumda 21 °C' da 3 gün inkübe edilmiştir. Sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılarak daha sonraki testler için uygun koşullar tespit edilmiştir.

2.6.2. Maya izolatlarında katil aktivitenin belirlenmesi

Test edilecek maya izolatları, pozitif ve negatif kontrol referans suşlar ve duyarlı referans suş stok yatık agar petri lerinden alınarak YEPD agarda pasajlanmıştır. Sadece duyarlı suş 50 ml YEPD brotha, diğer kültürler ise YEPD agara ve YEPD broth besi ortamına aktarılarak, 21 °C' da 48 saat inkübe edilmiştir. İzolatların katil aktivitesi YEPD-MB agar besi ortamında test edilmiştir. Referans duyarlı suş YEPD-MB (pH 4.5) besi ortamı içeren petri kutusunda (9 cm çaplı) son konsantrasyonu 10⁴ kob/ml olacak şekilde steril distile suda seyreltildikten sonra, önceden hazırlanan ve yüzeyi steril kabinde kurutulan YEPD-MB (pH 4.5) plaklarına yayma plak yöntemine göre aşılansmıştır. Bir petriye bir pozitif kontrol (*S. cerevisiae* NCYC 232), bir negatif kontrol (*S. cerevisiae* S6) ve 3 tane test edilecek izolat kültürü yaklaşık 10 mm uzunluğunda çizgi ekim şeklinde ve ayrıca 10' ar µl damlatılarak inoküle edilmiştir. Petri ler ters çevrilmiş durumda 21 °C' da 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda duyarlı suş üzerinde mavi renkte boyanmış hücrelerle çevrili inhibisyon zonları oluşturan test izolatları katil aktivite gösteren mayalar olarak kaydedilmiştir.

2.7. Maya İzolatlarının Duyarlılık Testleri

MEB besi ortamı deney tüplerine 10' ar ml aktararak otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra test edilecek izolatlar ve *S. cerevisiae* NCYC 1006, *S. cerevisiae* NCYC 232, *S. cerevisiae* NCYC 738 suşları steril şartlar altında bu tüplere aşılansarak 21 °C' da 2-3 gün yoğun bir gelişme sağlanıncaya kadar (bulanıklık kontrol edilerek) inkübe edilmiştir. Daha önce hazırlanan ve steril halde olan YEPD-MB (pH 4.5) besi ortamı 5-6 cm çaplı küçük steril petri kutularına 5' er ml olarak dökülmüş ve petri kutularının yüzeyleri steril kabinde 30 dakika kurutulmuştur. Test izolatlarının agar

plakları üzerine çok yoğun olmayacak şekilde yayılması için 2-3 günlük test suşlarının kültürlerinden gelişmenin yoğunluğuna göre 1:1, 2:5, 2.5:2.5, 1.5:4.5' lik dilüsyonlar hazırlanmıştır. Kuru YEPD-MB (pH 4.5) plakları üzerine bu dilüsyonlardan 300 µl yayılmıştır. Petriler kurutulduktan sonra referans katil suşun 10 mm uzunluğunda ve yoğun olarak petri kutusunun ortasında olacak şekilde çizgi ekimi yapılmıştır. Bütün petriler ters çevrili konumda 21 °C' da 2-3 gün inkübe edilmiştir. Katil suşlar etrafında inhibisyon zonu oluşan petrilerin test suşları duyarlı suşlar, oluşturmayanlar ise nötral suş olarak kaydedilmiştir.

2.8. Katil Oldukları Saptanan İzolatların Referans Katil Suşlara Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzole edilen maya suşlarından katil aktivite gösterenler stoklarından alınarak MEA veya YGC agarda 25 °C' da 48 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır. Canlandırılan her bir izolattan bir öze dolusu kültür, steril 10 ml MEB içeren tüplere aktarılarak, tüpler 21 °C' da 3-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir kültürden alınan 1'er ml örnek, daha önceden 9 cm çaplı petrilere hazırlanıp kurutulan YEPD-MB (pH 4.5) agar plaklarına yayılmıştır. Petri kutuları steril kabinde 30 dakika kapakları yarı açık şekilde kurutulmuştur. Kurutulan bu plaklar üzerine daha önceden MEA veya YGC agarda 21 °C' da 3-5 günlük inkübasyonu takiben canlandırılan *Debaryomyces hanseneii* TK-type V, *S. cerevisiae* K2, *S. cerevisiae* K7, *S. cerevisiae* 1385, *S. cerevisiae* K28, *S. cerevisiae* NCYC 232 (K1 tip), *S. cerevisiae* NCYC 738 (K2 tip), *Pichia anomala* CYC 1027 (katil suş), *Pichia membranaefaciens* CYC 1106 (katil suş) referans katil suşları ve negatif kontrol olarak *S. cerevisiae* NCYC 1006 (stv-85, Duyarlı) suşu steril kürdan yardımı ile 10 mm uzunluğunda besi ortamı üzerine sürülmüştür. Petriler 21 °C' da 3-5 gün inkübe edilmiştir. Referans kültürlerin etrafında oluşan inhibisyon zonlar kontrol edilerek izole ettiğimiz suşların referans katil suşlara karşı duyarlı olup olmadığı belirlenmiştir. Bu test için kullanılan petri kutularının altına petri kutusu çapında kesilmiş ve üzerinde 10 adet 10 mm' lik çizgi (9 tanesi referans katil suş, bir tanesi negatif kontrol ekimi için) bulunduran kurutma kağıdından hazırlanılmış bir şablon kullanılmıştır.

2. 9. Katil Maya İzolatlarının Birbirlerine Karşı Olan Katil Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzole ettiğimiz katil maya suşları yatık agar tüplerindeki stoklarından MEA veya YGC besi ortamı üzerinde 25 °C' da 48 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır. Herbir izolattan bir öze dolusu kültür 100 ml' lik erlenler içindeki 50 ml YEPD broth besi ortamına aşılanmıştır. 25.2 ve 25.5 numaralı suşlar 21 °C'da 3 gün, diğer 10 suş (18.1, 19.2, 24.A, 24.B, 23.1, 26.1, 23.14, 27.23, 36.1 ve 36.3 numaralı suşlar) 30 °C' da 4 gün inkübe edilerek kültürlerdeki hücre yoğunluklarının yaklaşık olarak 10^7 kob/ml olması sağlanmıştır. Ayrıca bütün izolatlar YGC agar besi ortamında da yukarıdaki sıcaklık ve inkübasyon sürelerine göre geliştirilmişlerdir. Sıvı kültürlerin hücre yoğunluğu 10^4 kob/ml olacak şekilde seyreltikten sonra daha önceden hazırlana YEPD-MB (pH 4.5) besi ortamı içeren petri kutularına yayma plak yöntemiyle ekilmiştir. Test suşları kurutma kağıdından hazırlanan şablon yardımı ile agar üzerine 10 mm uzunlukta çizilerek inoküle edilmiştir. Petriler 21 °C' da 3 gün inkübe edildikten sonra çizilen kültürlerin etrafında oluşan inhibisyon zonları kontrol edilerek izolatlarımızın birbirlerine karşı olan katil aktiviteleri belirlenmiştir.

2.10. Katil Maya İzolatlarının Toksin Tipinin Belirlenmesi

Suzuki ve ark.' na (37) göre YEPD-MB (pH 4.5) agar plakları üzerine her bir *S. cerevisia* NCYC 232, *S. cerevisia* NCYC 738, *S. cerevisiae* 28, *S. cerevisiae* K7 referans katil suşundan steril kürdan yardımı ile petri kutusunun ortasına gelecek şekilde bir çizgi çekilmiştir. Daha sonra yine steril kürdan yardımı ile test suşları çizginin her iki yanına referans çizgiye dik ve birbirlerine paralel olacak şekilde çizilmiştir. Herbir çizginin standart referans çizgiye çok yakın ancak birbiri üzerine temas etmemesine dikkat edilmiştir. Petriler 20 °C' da 3 gün inkübe edilerek, çizgilerin çakıştığı bölgelerdeki mavi koloniler veya inhibisyon zonları kaydedilmiştir. Bu testin doğrulamasını yapmak için aynı referans katil suşlar ve 25.2, 25.5, MY1, MY2, *S. cerevisia* NCYC 1006 YEPD broth besi ortamında 21 °C' da 2 gün inkübe edilmişlerdir. Kültürlerin 600 nm' deki okunma değerleri ölçülerek 10^4 kob/ml' lik konsantrasyonlarından 1' er ml YEPD-MB (pH 4.5) besi ortamına yayılmıştır. Petriler steril kabinde 30 dakika kurutulduktan sonra her bir suştan her bir petriye 10 mm' lik

çizgiler çizilmiştir. 21 °C' da 2-3 günlük inkübasyon süresi sonunda mavi renkli koloniler ile çevrili inhibisyon zonları kaydedilmiştir.

2. 11. Katil Maya İzolatlarının İdentifikasyonu

Katil aktiviteye sahip maya izolatlarımızın identifikasyonu Barnett ve ark.' na (13) göre yapılmıştır. İdentifikasyon testlerinde bazı şekerlerin fermentasyonu, karbon veya azot kaynakları için asimilasyon testleri, çeşitli vitaminlere gereksinim, yüksek konsantrasyondaki D-Glukoz varlığında ve 37 °C' da gelişme, sikloheksimid varlığında büyüme ve üreyi hidrolize etme gibi bazı fizyolojik özellikler temel alınmıştır.

2.11.1. Karbon kaynaklarının asimilasyon testleri

Bu test için D-glukoz, D-galaktoz, L-sarboz, D-riboz, L-arabinoz, sellobioz, D (+) laktoz, arbutin, melibioz, salicin, dulcitol (galaktitol), D (+) glukozamin, D (+) ksiloz, D (+) maltoz, sukroz, D (+) trehaloz, mannitol, myo-inositol karbon kaynakları olarak test edilmiştir. Karbon kaynakları 50 mM' lık stoklar olarak hazırlanarak, 0.2 µm' lik filtrelerden süzölmüş ve buzdolabında + 4 °C' da saklanmıştır. İçinde 4.5 ml steril distile su bulunan deney tüplerine 10 kat derişik (10X) olarak hazırlanan (Difco) nitrojen base besi ortamından 0.5 ml aktarılmıştır. MEB besi ortamında 30 °C' da bir gece inkübe edilen test suşları tüplere yoğunlukları yaklaşık 10⁶ kob/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra Herbir tüpe 50 mM standart karbon kaynağı solüsyonundan 100 µl ilave edilmiştir. Tüpler 25 °C' da inkübe edilerek 1 hafta süreyle günde 3-5 kez elle çalkalanarak büyüme kontrol edilmiştir. Pozitif kontrol tüpleri aynı şekilde hazırlanmış ve karbon kaynağı olarak glukoz kullanılmıştır. Negatif kontrol tüplerine ise karbon kaynağı ilave edilmemiştir. Pozitif ve negatif kontrol tüplerindeki bulanıklık karşılaştırılarak büyüme izlenmiştir. Bir haftalık inkübasyon süresinde bulanıklık gözlenen tüpler test için pozitif, gözlenmeyen tüpler ise negatif sonuç olarak kaydedilmiştir. Negatif sonuç veren tüpler ek 3 haftalık inkübasyon periyodu süresince haftada birkez olmak üzere kontrol edilmiştir.

2. 11. 2. Azot kaynaklarının asimilasyon testleri

Bu test için kreatin, NaNO_3 , KNO_2 , L-lizin, kreatinin ve glukozamin azot kaynakları olarak test edilmiştir. Azot kaynağı solüsyonları 200 mM'lık stok solüsyon olarak hazırlanıp, 0.2 μm 'lik filtrelerden süzülerek buzdolabında + 4 °C' da saklanmıştır. İçinde 4.5 ml steril distile su bulunan deney tüplerine 10 kat derişik (10X) olarak hazırlanan (Difco) karbon base besi ortamından 0.5 ml aktarılmıştır. MEB besi ortamında 30 °C' da bir gece inkübe edilen test suşları tüplere yoğunlukları yaklaşık 10^6 kob/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Herbir tüpe daha sonra test edilecek azot kaynağı solusyonundan son konsantrasyonu 4 mM olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüpler 25 °C' da 1 hafta süresince hergün 3-5 kez elle çalkalarak inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol tüpleride aynı şekilde hazırlanmıştır. Negatif kontrol tüplerine ise azot kaynağı ilave edilmemiştir. Büyüme pozitif ve negatif kontrol tüpleri ile karşılaştırılarak, bulanıklık esasına göre değerlendirilmiştir. Bir haftalık inkübasyon süresinde bulanıklık gözlenen tüpler test için pozitif, gözlenmeyen tüpler ise negatif sonuç olarak kaydedilmiştir.

2. 11. 3. Fermentasyon testleri

Bu test için şeker kaynağı olarak D-glukoz, ksiloz, sukroz, galaktoz, melibioz, maltoz, laktöz, trehaloz ve sellobioz kullanılmıştır. Şeker solüsyonları 1 M'lık stoklar olarak hazırlanıp, 0.2 μm 'lik filtrelerden süzülerek buzdolabında + 4 °C' da saklanmıştır. Bu test için 10' ar ml % 0.5' lik (w/v) yeast ekstrakt besi ortamı ve büyük boy Durham tüpleri kullanılmıştır. Tüplere son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde şeker solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra Yeast ekstrakt broth içinde 10^7 hücre/ml yoğunluğunda olan kültürlerden tüplere 100' er μl inoküle edilmiştir. Tüpler 25 °C' da yaklaşık bir hafta hergün elle çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. Durham tüpleri içindeki gaz oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. Şeker solüsyonu ilave edilmeyen tüpler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

2. 11. 4. Vitamin gereksinim testleri

Bu testte nitrojen base besi ortamına litrede myo-inositol 10 mg, pentotenat (Ca) 2 mg, biotin 20 µg, thiamin HCl 400 µg, pyridoxine HCl 400 µg, nikotikasit 400 µg olarak ayrı ayrı, biotin (20 µg)+thiamin (400 µg) ve pyridoxine (400 µg) +thiamin (400 µg) olacak şekilde ilave edilmiştir. Kontrol tüplerine vitamin ilave edilmemiştir. Tüpler 25 °C' da 1 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Test tüpleri kontrol tüpleri ile karşılaştırılarak, büyüme bulanıklık esas alınarak değerlendirilmiştir.

2. 11. 5. Yüksek glukoz konsantrasyonunda büyümenin test edilmesi

% 50 ve 60 D-glukoz içeren yatık MEA tüpleri test edilecek suşlar ile çok hafif şekilde inoküle edilmiştir. 25 °C' da 4 hafta süresince tüplerdeki gelişme izlenerek sonuçlar kaydedilmiştir. Tüplerin içindeki besi ortamının kurumasını engellemek için tüplerin ağzı parafilm ile kapatılmıştır.

2. 11. 6. Sikloheksimid varlığında büyümenin test edilmesi

Bu testte 50 mM D-glukoz içeren Yeast nitrojen base besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamına 0.20 µm' lik filtre ile steril edilmiş sikloheksimid, son konsantrasyonu % 0.1 ve 0.01 olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüpler test suşları ile inoküle edildikten sonra 25 °C' da inkübe edilmiş ve gelişme kontrol edilerek sonuçlar kaydedilmiştir.

2. 11. 7. Üre hidroliz testi

Bacto urea R broth (Difco) tüplere 0.5 ml olarak aktarılmış ve tüpler 1 öze dolusu 2 gecelik mikroorganizma kültürü ile aşılacaktır. Tüpler 37 °C' da 4 saat boyunca her 30 dakikada bir besi ortamındaki renk değişikliği kontrol edilerek inkübe edilmiştir. Besi ortamının sarı renginin kırmızıya dönmesi pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir.

2. 11. 8. Farklı sıcaklıklarda büyümenin kontrol edilmesi

YEPD agar besi ortamına inoküle edilen katil suşları 25, 30, 35, 37 ve 40 °C' da inkübe edilerek bu sıcaklıklardaki büyümeleri kontrol edilmiştir.

2. 12. Katil Maya Suşlarında Katil Aktiviteye Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi İçin Uygun Yöntemin Seçilmesi

Bu deneylerde Shimizu ve ark. (35), Radler ve ark. (25), Michalcakova ve ark. (48) ve Llorente ve ark.'nın (41) kullandığı yöntemler bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Ekşi hamur örneklerinden izole edilen 12 adet katil maya suşun toksin aktivite yelpazesini belirlenmek için bu suşlar ve pozitif kontrol olarak *S. cerevisiae* NCYC 738 ve *S. cerevisiae* NCYC 232 , negatif kontrol olarak ise *S. cerevisiae* S6 YGC agar petrilere ekilmiş ve 48 saat 25 °C' da inkübe edilerek canlandırılmıştır. Steril şartlar altında, bir öze dolusu kültür 250 ml' lik erlenler içindeki steril 150 ml YEPD sıvı besi ortamına aktarılmıştır. 25.2 ve 25.5 numaralı suşlar çabuk gelişim gösterdikleri için 3 gün, diğer katil suşlar ise yavaş gelişim gösterdikleri için 5 gün 21 °C' da inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültürler 3000 g' de (=1240 rpm) +4 °C 'da 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen süzüntü 0.2 µm' lik selüloz asetat filtrelerden geçirilmiştir.

Aynı besi ortamında 21 °C' da 3 gün inkübe edilen duyarlı referans suş *S. cerevisiae* NCYC 1006 son konsantrasyonu 10⁴ kob/ ml olacak şekilde 45 °C' daki YEPD-MB (pH 4.5) besi ortamına inoküle edilmiştir. Bu besi ortamı petrilere 20' şer ml olarak aktarılmıştır. Steril kabinde 30 dakika kurutulan petrilere katılaşmaları için +4 °C' da 2 saat bekletilmiştir. % 70' lik alkol ile steril edilen 0.7 cm çaplı mantar delici ile petrilere 5 tanesi test izolatları, 1 tanesi pozitif kontrol diğeri ise negatif kontrol suşu için olmak üzere 7 adet çukur açılmıştır. Herbir çukura 40 µl steril süzüntü bırakılmıştır. Petrilere +4 °C' da 1 saat bekletildikten sonra ters çevrili olarak 21 °C' da 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda katil izolatların oluşturduğu inhibisyon zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Ayrıca süzüntü 40 µl olacak şekilde steril disklerle emdirilmiş ve petrideki besi ortamı üzerine bırakılmıştır. Petrilere 21 °C' da 3-5 gün inkübe edilmiştir. Bunlara ilave olarak, steril 40 µl süzüntü

besi ortamı üzerine damlatılarak işlem tekrarlanmıştır. Bu üç işlem hem dökme plak hemde yayma plak yöntemleriyle yapılmıştır. Ayrıca yukarıdaki her üç işlem kültürler santrifüj edilmeden ve filtreden süzmeden tekrarlanmıştır.

Yukarıdaki deneylerden elde edilen sonuçlara göre toksin aktivite yelpazesinin belirlenmesi için en uygun yöntem seçilmiştir. Bundan sonraki deneylere dökme plak yöntemi ile 0.7 cm çaplı deliklere 40 µl (yaklaşık olarak 10^6 kob/ml) sıvı kültür bırakılarak devam edilmiştir. Herbir etki faktörü için bütün deneyler 2 tekerrür ve 5 paralel olarak çalışılmıştır. Ayrıca toksin aktivitesinin test edilmesi için geliştirilen kültürlerden herbir test ekiminin önce, kültür içindeki kob/ml değerinin belirlenmesi için, damla plak yöntemine göre MEA veya YPDG besi ortamları kullanılarak ekim yapılmıştır. Böylece çukurlara damlatılan 40 µl sıvı kültürün mililitresindeki canlı maya sayısı tesbit edilmiştir.

2. 12. 1. Katil aktivite için optimum sıcaklığın belirlenmesi

Katil aktivitenin sıcaklığa bağlı stabilitesini belirlemek için önce katil maya izolatları ve pozitif kontrol suşu olarak *S. cerevisiae* NCYC 738 YGC agar petrilere ekilerek 25 °C' da da 48 saat inkübe edilmiştir. Steril şartlar altında, bir öze dolusu kültür 100 ml'lik erlenler içindeki steril 50 ml YEPD sıvı besi ortamına aktarılmıştır. 25.2 ve 25.5 numaralı suşlar çabuk gelişim gösterdikleri için 3 gün, diğer katil suşlar ise yavaş gelişim gösterdikleri için 5 gün 21 °C' da inkübe edilmiştir. Aynı besi ortamında 21 °C' da 3 gün inkübe edilen *S. cerevisiae* NCYC 1006, 45 °C' daki YEPD-MB (pH 4.5) besi ortamına son konsantrasyonu 10^4 kob/ml olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra bu besi ortamı petrilere 20' şer ml olarak aktarılmış ve petrilere steril kabinde 30 dakika kurutulmuştur. Kuruyan petrilere buzdolabında +4 °C' da 1 saat bekletilmiştir. 0.7 cm çaplı steril mantar delici ile petrilere izolatlar için 5, pozitif kontrol için 1 çukur olmak üzere toplam 6 çukur açılmıştır. Her bir izolat için tek bir petri kutusu kullanılmış ve testler çift tekerrürlü yapılmıştır. Çukurlara 40 µl (yaklaşık olarak 10^6 kob/ml) sıvı kültürlerden bırakılmıştır. Petrilere buzdolabında +4 °C' da 1 saat bekletildikten sonra 21, 25, 30 ve 35 °C' da 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda katil izolatların oluşturduğu zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

2. 12. 2. Katil aktivite için optimum pH' nın belirlenmesi

Farklı pH değerlerinin toksin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için otaklavlanmadan önce pH' ları 5N HCl ile 2.9, 3.3, 3.7, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4 ve 5.8' e ayarlanan YEPA-MB (pH 4.5) besi ortamları kullanılarak yukarıda açıklandığı gibi ekimler yapılmıştır. Petri kutuları katil izolatların bu aktiviteleri için belirlenen optimum sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Buna göre 25.2 ve 25.5 numaralı suşlar 21 °C' da 4 gün, diğer suşlar ise (18.1, 19.2, 24.A, 24.B, 23.1, 26.1, 23.14, 27.23, 36.1 ve 36.3 numaralı suşlar) 30 °C' da 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda katil izolatların oluşturduğu zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

2. 12. 3. Katil aktivite üzerine farklı antibiyotik konsantrasyonlarının etkisinin belirlenmesi

Farklı sikloheksimid konsantrasyonlarının toksin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, sikloheksimid 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.3 mg/ml olacak şekilde 45 °C' daki steril YEPA-MB (pH 4.5) besi ortamına ilave edilmiştir. Yine aynı şekilde 25.2 ve 25.5 numaralı suşlar 21 °C' da 4 gün, 18.1, 19.2, 24.A, 24.B, 23.1, 26.1, 23.14, 27.23, 36.1 ve 36.3 numaralı diğer suşlar ise 30 °C' da 4 gün petri kutuları ters çevrili konumda inkübe edilerek inhibisyon zonları ölçülmüştür.

2. 12. 4. Toksin aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi

Farklı tuz konsantrasyonlarında toksin aktivitesini test etmek için Llorente ve ark.' nın (41) 1997 yılında uyguladığı yöntem temel alınarak; % 0, 0.3 ve 0.6 NaCl içeren YEPA sıvı besi ortamında 25.2, 25.5 numaralı izolatlar ve duyarlı suş *S. cerevisiae* NCYC 1006 21 °C' da 3 gün, diğer 10 izolat ise 30 °C' da 4 gün inkübe edilerek geliştirilmiştir. Test suşlarının katil aktivitesi yukarıda belirtildiği gibi % 0, 0.3 ve 0.6 NaCl içeren YEPA-MB (pH 4.5) besi ortamları kullanılarak belirlenmiştir.

2. 12. 5. Katil aktivite üzerine UV' nin etkisi

İzolatlarda katil aktivite üzerine UV' nin etkisi Michalcakova ve ark.' na (48) göre test edilmiştir. Katil izolatlar YEPD agar besi ortamında optimum şartlarda canlandırıldıktan sonra, YEPD broth besi ortamında aynı şartlar altında yaklaşık 10^7 kob/ml hücre yoğunluğuna erişene kadar inkübe edilmiştir. Herbir kültürden steril distile suya 10^5 kob/ml olacak şekilde seyreltmeleri hazırlandıktan sonra, buradan 1'er ml hücre kültürü önceden hazırlana YEPD agar plaklarının yüzeyine yayılmıştır. Petriler kapakları açık şekilde steril kabin içinde UV (260 nm) kaynağından 20 cm uzaklıkta 0, 15, 30 ve 45 sn olmak üzere UV' ye maruz bırakılmıştır. Daha sonra optimum şartlarda inkübe edilen petrilerden, herbir UV' ye maruz kalma süresi için 10 koloni rastgele seçilerek katil aktivite yönünden test edilmiştir. Bütün testler çift paralel çalışılmıştır.

2. 13. Floresans Boyama ile Toksinden Etkilenen Hücrelerin Belirlenmesi

Sitoplazmik membrandan geçebilen katil toksin aktivitesini belirlemek için Evans' a (85) göre Vondrej ve Palkova tarafından önerilen Rhodamine B ölçüm tekniği bazı modifikasyonlar ile uygulanmıştır. Bu deneyler için 25.2 ve 25.5 numaralı suşlar ile pozitif kontrol olarak *S. cerevisiae* NCYC 232 (K1tip), negatif kontrol olarak *S. cerevisiae* 28 (K28 tip), duyarlı suş olarak *S. cerevisiae* NCYC 1006 suşları kullanılmıştır. Floresan boya olarak Fluorescein (Sigma F-6377) boyası 10 kat derişik şekilde (10X) stok olarak hazırlanmıştır.

Kültürler -80 °C' daki stoklarından YEPG besi ortamında 25 °C' da canlandırılmıştır. Pasajlanan duyarlı suşdan steril kürdan yardımı ile alınan 5-10 koloni 50 ml YEG besi ortamı içine aktararak, 30 °C' da 150 rpm' de bir gece kültür durgun faz safhasına gelene kadar inkübe edilmiştir. Spektrofotometrede A_{600} değeri ölçülerek durgun faza geldiği saptanan kültürden 35 µl, 20 ml YEG besi ortamına aşılmiştir. Bu kültür 120 rpm' de 25 °C' da 16-20 saat A_{600} da optik yoğunluğu 0.1-0.5 değerine ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Referans yöntemine göre bu absorbans okunma değerini veren kültürdeki hücre sayısı yaklaşık olarak 10^7 kob/ml olarak kabul edilmiştir. Bu kültürden, 1.5 ml' lik eppendorf tüpleri içine 900 µl YEG+100 µl kültür ilave ederek hücre yoğunluğu 10^6 kob/ml olan süspansiyonlar hazırlanmıştır. Herbir toksin dilüsyonu için çift paralel olarak çalışılmıştır. Tüpler 5 dakika $15\ 000$ g' de (= 6200

rpm) +4 °C' da santrifüj edildikten sonra süzüntü uzaklaştırılmıştır. Elde edilen çöküntü aşağıdaki şekilde hazırlanan toksin dilüsyonları ile birlikte kullanılmıştır.

Toksinin hazırlanması: Katil toksin elde edilmesinde kullanılacak olan 25.2 ve 25.5 numaralı suşlar ile *S. cerevisiae* NCYC 232 (K1tip) ve *S. cerevisiae* 28 (K28 tip) suşları stoklarından canlandırıldıktan sonra, steril kürdan ile 100 ml medium J içine aktarılmış ve toksin üretimi için 21 °C' da 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben kültürler 1240 rpm' de +4 °C' da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süzüntünün yarısı 0.45 µm' lik disposable filtreden süzülerek, diğer yarısı ise filtreden geçirilmeden steril erlenmayerlere alınmıştır.

Toksin dilüsyonlarının hazırlanması: Medium J içinde hazırlanan katil suşların filtre edilmiş ve edilmemiş toksinlerinden McIlvains tamponu içinde % 0, 0.1, 10, 30, 50, 80 ve 100' lük dilüsyonları hazırlanmıştır.

Fluoresans boyama işlemi: Hazırlanan duyarlı hücre çöküntüsüne tampon içinde hazırlanan toksin dilüsyonlarından 1' er ml aktarılmış ve eppendorf tüpleri vorteks ile 5-10 sn karıştırılmıştır. Daha sonra herbir örneğe 100 µl % 10' luk (w/v) glukoz ve 100 µl Fluorescein çalışma solüsyonu ilave edilmiştir. Tüpler elle çalkalandıktan sonra +2 °C' da karanlıkta 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücreler 6200 rpm'de +4 °C' da 5 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve süzüntü uzaklaştırılmıştır. Ortamda bulunan fluoresan boyayı tamamen uzaklaştırmak ve fotoğraf çekimlerinde fluoresan ışımaya karşı koyu bir zemin elde etmek için hücre çöküntüsü üç kez 6200 rpm' de +4 °C' da 5 dakika olmak üzere yıkanmıştır. Çöküntü mikroskobik inceleme için 250 µl steril distile su içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Tüpler hiç ışık almadan derhal mikroskobik incelemeye alınmıştır.

Mikroskopi: Bölümümüzde bulunan Olympus BX50 araştırma mikroskobunun ışık aparatı kullanılarak Thoma lamının 4, 10, 20 ve 40X' lik objektiflerdeki görüntüsü Kodak 100 ASA' lık film ile Olympus PM-30 otomatik fotomikrografi aracı ile fotoğraflanmıştır. Bundan sonraki çalışmalar karanlık ortamda

gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan hücre solüsyonundan 100 µl, % 70' lik alkol ile temizlenen Thoma lamına aktarılmıştır. Preparatın 40X' lik objektifte önce fluoresans ataçmanlı Olympus BX50 araştırma mikroskobu ile daha sonra da ışık mikroskobunda Olympus PM-30 otomatik fotomikrografi aracı ile fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen fluoresans mikroskopi fotoğraflarından katil toksin tarafından öldürülmüş ve sarı fluoresan ışıma veren hücrelerin sayısı ile aynı preparatın ışık mikroskobu ile elde edilen fotoğrafından da toplam hücre sayısı belirlenmiştir. Sayımlarda Thoma laminın ışık mikroskobu ile 40X' lik objektifte çekilmiş fotoğrafının asetat aktarılmış master çizgilerinden faydalanılmıştır. Master çizgiler ile fotoğraflar üst üste çakıştırılarak sayımlar aynı görüntü alanı içinde gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Herbir preparattan elde edilen boyanmış hücre sayısının (N) toplam hücre sayısına (N_T) oranı toksinin dilüsyon oranına karşı grafiklendirilmiştir. Toksinin lethal dozu $0.5 N/N_T$ oranına karşılık gelen konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

2. 14. İzole Edilen 25.2 ve 25.5 Numaralı İzolatların Katil Toksinlerinin Etkisinin Belirlenmesi

Kültür ortamında katil toksin aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak canlı maya populasyonları üzerine etkisini belirlemek için 25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatların toksinleri ile Pak-Gıda ve Pazarlama A.Ş.' den sağlanan MY1 ve MY2 suşları kullanılmıştır. Maya populasyonları üzerine katil toksin aktivitesi kuantitatif olarak Portugal ve ark.' nın (87) geliştirdiği metoda göre araştırılmıştır. Toksin solüsyonu hazırlamak için 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlar YEPD broth besi ortamında 21 °C' da eksponansiyal faza gelene kadar (48 saat) inkübe edildikten sonra 2 defa 1240 rpm' de +4 °C' da 15 dakika santrifüj edilerek süzüntü steril kaplara aktarılmıştır. 250 ml' lik erlenlerde 3 farklı toksin konsantrasyonu çalışılmıştır. Herbir erlene 50 ml 3 kez konsantre olarak hazırlanan YEPD broth besi ortamı konulmuştur. Bu hacim toplam çalışma hacminin % 33' lük kısmını temsil etmektedir. 15, 30 ve 50 ml toksin solüsyonu farklı erlenlere aktarıldıktan sonra, herbir karışım 50 ml eksponansiyal fazda duyarlı kültür (MY1 ve MY2) ile aşılacaktır. Erlenlerde toplam 150 ml çalışma hacmine ulaşmak için 2. ve 3. erlenlere sırasıyla 35 ve 20 ml steril distile su ilave edilmiştir. Referans deneylerde toksin içermeyen kültür ortamları kullanılmıştır. Test ve referans kültürler 21 °C ' da 12 saat inkübe edilmiştir. 3' er saat ara ile örnekler alınarak hücre yoğunluğu (A_{600}), canlı hücre sayısı (damla plak yöntemiyle) belirlenmeye

çalışılmıştır. 12. saat sonunda kültürler filtrelerden (0.08 mg/circle) geçirilerek oda sıcaklığında 2 gün kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları tayin edilmiştir.

Deneyler çift paralel olarak çalışılmıştır. Katil toksin aktivitesi test ve referans fermentasyonları arasındaki canlı biyomastaki azalma yüzdesine göre hesaplanmaya çalışılmıştır.

$$\% \text{ katil aktivite} = \frac{[(\text{kuru ağırlık})(\text{canlı hücre sayısı})\text{Referans} - (\text{kuru ağırlık})(\text{canlı hücre sayısı})\text{Test}]}{(\text{kuru ağırlık})(\text{canlı hücre sayısı})\text{Referans}}$$

formülünden hesaplanmıştır.

2. 15. Protein Elektrofrez

Katil izolat 25.2' nin salgıladığı ve katil aktiviteden sorumlu olan protein varlığının moleküler seviyede belirlenmesi ve moleküler ağırlığının tespiti için, kesikli SDS jel elektroforez tekniklerinden biri olan SDS-PAGE yöntemi Temizkan ve ark. (91) tarafından modifiye edilmiş şekli ile uygulanmıştır. SDS-PAGE yönteminin uygulanmasında *S. cerevisiae* NCYC 232 (K1 tip) pozitif kontrol, *S. cerevisiae* NCYC 1006 (duyarlı suş) negatif kontrol ve 25.2 numaralı izolatta test suşu olarak kullanılmıştır.

2. 15. 1. Protein ekstresinin hazırlanması

İlgilendiğimiz proteinin ekstrasellüler yani sentezlendikten sonra hücre dışına salınan bir protein olduğunu bildiğimiz için izolatlar YM besi ortamında optimum şartlarda üretilmiş ve hücreler santrifüj işlemi ile besi ortamından ayrılarak işlemlerde süzüntü kullanılmıştır. Bu işlemler için önce yatık agar tüplerindeki stoklardan alınan *S. cerevisiae* NCYC 1006, *S. cerevisiae* NCYC 232 ve katil izolat 25.2 YM broth besi ortamında canlandırılmıştır. Kültürlerin 25 °C' daki inkübasyonuna hücre yoğunluğu yaklaşık 10^8 hücre/ml olana kadar devam edilmiştir. Buradan herbir suşun 1000 ml YM broth besi ortamına son hücre konsantrasyonu 10^6 hücre/ml olacak şekilde inkübasyonu yapıldıktan sonra 25 °C' da 150 rpm' de 48 saat inkübe edilmiştir. Kültürlerin hücre yoğunluğu $5-8 \times 10^7$ hücre/ml değerine ulaştığında inkübasyon sona erdirilerek, sıvı kültürlerden maya hücreleri 1240 rpm' de 4 °C' da 15' er dakika 2 kez santrifüj edilerek toplanmıştır.

2. 15. 2. Çöktürme işlemi

Besi ortamına salgılan proteinleri süzüntüden ayırmak amacıyla 3 farklı çöktürme yöntemi uygulanmıştır. Bunlar trikloroasetik asit (TCA) çöktürmesi, aseton ile çöktürme ve tuzla çöktürme (amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$ ile çöktürme) işlemleridir (91).

Trikloroasetik asit çöktürmesi: 400 ml süzüntü eşit hacimde % 20' lik TCA eklenerek, soğukta (+4 °C) manyetik karıştırıcı üzerinde bir gece bekletilmiştir.

Aseton ile çöktürme: Buzdolusu bir kabın içinde manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen 100 ml' lik süzüntü üzerine, yavaş yavaş ve karıştırarak 200 ml soğuk (-20 °C) aseton katılmıştır. Karıştırma işlemine 30 dakika devam edildikten sonra çöktürme işlemine -20 °C' da bir gece beklenerek devam edilmiştir.

$(NH_4)_2SO_4$ ile çöktürme: Soğukta (4 °C) 100 ml süzüntü içeren bir beher, manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilerek, çözeltilde % 80 $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğuna ulaşmak için 52.3 gr $(NH_4)_2SO_4$ sürekli karıştırılarak ve yavaş yavaş ortama ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerinde çöktürme işlemine soğukta bir gece beklenerek devam edilmiştir.

Çöktürme işlemleri sona erdikten sonra çözeltiler 14.000 g hızda 4 °C' da 30 dakika santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Çökelti kendi hacminin 1-2 katı fosfat tamponunda (pH 7.3) çözündürülmüştür. Elde edilen protein solüsyonu plastik steril tüplere aktarılmıştır. Diyaliz işlemine hemen geçilmeyecekse sadece aseton çöktürmesi uygulanan örnekler -20 °C' da diğerleri ise 4 °C' da saklanmıştır. Bütün işlemler 4 °C' da yapılmıştır.

Süzüntünün 10 ml' si hiçbir çöktürme işlemine tabi tutulmadan eşit hacimlerde eppendorf tüplerine aktarılarak -20 °C' da saklanmıştır.

2. 15. 3. Diyaliz işlemi

Protein çözeltilesindeki TCA ve amonyum sülfatın uzaklaştırılması için Temizkan ve ark.' na (91) göre diyaliz yöntemi uygulanmıştır. Diyaliz tüpü (Sigma D-9527) kullanılmadan önce distile su ile iyice yıkanmıştır. Daha sonra tüpün ucu

zedelenmeyecek şekilde bağlanmıştır. Bu işlem için diyaliz tüpünün bir ucu kendi etrafında birkaç kez döndürülmüştür. Bu şekilde kalınlaştırılmış yüzey üzerinden ince bir ip birkaç kez dolanarak sıkı birkaç düğüm atılmıştır. Bu sırada ipin tüpü kesmemesine dikkat edilmiştir. Protein çözeltisi bir pipet yardımıyla tüpe doldurulmuştur. Tüpün içindeki hava çıkarıldıktan sonra, az bir boşluk bırakılarak diğer ucuda bağlanmıştır. Diyaliz işlemi için hazır hale gelen tüp en az 10 katı hacimde diyaliz tamponu (distile su) içine atılmıştır. Diyaliz sıvısı birkaç kez yenilenerek 4 °C' da en az bir gece manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra tüpün bir ucu kesilerek içindeki örnek eşit hacimlerde eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu işlemlerin herbir basamağı 4 °C' da gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemine kadar tüpler -20 °C' da saklanmıştır.

2. 15. 4. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Protein çözeltilerindeki protein miktarını belirlenmesi için 280 ve 260 nm' deki absorbans değerlerinin oranı (A_{280}/A_{260}) (Warburg ve Christian Yöntemi) ve Lowry Yöntemi olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler Temizkan ve ark.' na (91) göre uygulanmıştır.

Warburg ve Christian Yöntemi (A_{280}/A_{260} oranı): -20 °C' da saklanan protein örnekleri oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Daha sonra tüpler içi buz dolu bir kabın içine alınmış ve bütün işlemlerde bu sıcaklığın korunmasına çalışılmıştır. Protein örnekleri, süzüntü örnekleri hariç 10 kez sulandırılarak 280 nm ve 260 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Daha sonra A_{280}/A_{260} oranı hesaplanarak, aşağıdaki çizelgedeki (Çizelge 2.3) değerlerden hata düzeltme faktörü bulunmuştur. Faktör Protein konsantrasyonu(mg/ml)= Faktör x A_{280} formülünde yerine konularak, örneklerdeki protein konsantrasyonu dilüsyon faktöründe gözönüne alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 2.3. A_{280}/A_{260} oranına bağlı olarak, örnekteki nükleik asit oranı (%) ve düzeltme faktörlerinin yaklaşık değeri (1 cm ışık yolu için geçerlidir) (91)

A_{280}/A_{260} oranı	Nükleik asit (%)	Faktör
1.75	0.00	1.116
1.63	0.25	1.081
1.52	0.50	1.054
1.40	0.75	1.023
1.36	1.00	0.994
1.30	1.25	0.970
1.25	1.50	0.944
1.16	2.00	0.899
1.09	2.50	0.852
1.03	3.00	0.814
0.979	3.50	0.776
0.939	4.00	0.743
0.874	5.00	0.682
0.846	5.50	0.656
0.822	6.00	0.632
0.804	6.50	0.607
0.784	7.00	0.585
0.767	7.50	0.565
0.753	8.00	0.545
0.730	9.00	0.508
0.705	10.00	0.478
0.671	12.00	0.422
0.644	14.00	0.377
0.615	17.00	0.322
0.595	20.00	0.278

Lowry yöntemi: Örneklerin hepsi çok temiz cam tüpler içinde hazırlanmıştır ve işlemler eldiven kullanılarak yapılmıştır. Bovin serum albumin (BSA) kullanılarak 1 mg/ml' lik hazırlanan stok çözeltilerden 25, 50, 100, 200, 259 $\mu\text{g/ml}$ BSA içeren standart örneklerin toplam hacimleri 0.4 ml' ye distile su ile tamamlanmıştır. Kör örnek için BSA içermeyen 0.4 ml distile su içeren tüp kullanılmıştır. Protein örnekleride süzüntü örnekleri dışında 10 kez sulandırılarak 0.4 ml hacimde tüplere aktarılmıştır. Tüm örnekler 2' şer ml taze hazırlanmış C belirteci (50 ml 0.1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na_2CO_3 ve 1 ml % 1 (w/v) Na veya K-tartarat içinde % 0.5 (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ile karıştırılmıştır. Vorteks ile karıştırılan örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, 0.5 ml 1 hacim Folin belirteci: 1 hacim sudan oluşan karışım hızla ve vorteks ile karıştırılarak örneklere eklenmiştir. Örnekler 30

dakika karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm' de absorbansları ölçülmüştür. Absise standart protein çözeltisinin absorbans değerleri, ordinata ise bunlara karşılık gelen absorpsiyon değerleri yerleştirilerek oluşan grafikten bizim protein örneklerimizin içerdikleri protein değerleri sulandırma faktöründe göz önüne alınarak tespit edilmiştir.

2. 15. 5. SDS-PAGE

Modifiye edilmiş Laemmli metoduna göre 15.5 cm x 14.0 cm ebadında ve 1.5 mm kalınlığındaki jel ve ayarlanabilir dikey elektroforez aleti ("EC 175 Adjustable Vertical Gel System") kullanılmıştır.

Ayırma jelinin hazırlanması: Jel dökme aparatı hazırlandıktan sonra, 125 ml' lik bir erlende ayırma jelini (% 12T) oluşturan çözeltiler, APS (E) hariç Çizelge 2.4 'deki oranlara göre sırası ile karıştırılarak karışımın havası en az 5 dakika süre ile vakumlu desikatörde bekletilerek alınmıştır. APS (E) eklendikten sonra karışım hava kabarcığı oluşturmada yavaşça çalkalanarak bir enjektör yardımıyla jel kasetine üstten 2-3 cm boşluk bırakılarak doldurulmuştur. Jelin yüzeyini düzleştirme için, yaklaşık 0.3 ml su ile doyurulmuş n-bütanol çözeltisi bir enjektör yardımı ile jel kasetinin heriki kenarından dökülmüştür. Jel en az 1 saat polimerizasyona bırakılmıştır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, üst yüzeydeki butanol dökülerek jel yüzeyi distile su ile birkaç kez yıkanmıştır.

Yükleme jelinin hazırlanması: 20 ml' lik bir erlende, yükleme jeli (% 5T) için gereken çözeltiler, APS (E) hariç olmak üzere Çizelge 2.4' deki oranlarda karıştırılmıştır. Karışımın havası vakumlu desikatörde 5 dakika süre ile alındıktan sonra, APS (E) eklenmiş ve hava kabarcığı oluşturmada çözeltiler karıştırılmıştır. Ayırma jelinin üst kısmına yükleme jeli jel kasetinin üst sınırına kadar doldurulmuştur. Tarak (15 cepli) yerleştirildikten sonra jel en az yarım saat polimerizasyona bırakılmıştır.

Örneklerin hazırlanması: Protein örnekleri -20 °C' den çıkarılarak oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Örnekler daha sonra içi buz dolu bir kaba alınmıştır. Süzüntü örnekleri için 8 µg, amonyum sülfat çöktürmesi uygulanan örnekler için 20 µg, aseton çöktürmesi uygulanan örnekler için 30 µg protein içeren hacimdeki

örnekler 10 µl 2X örnek uygulama tamponu (F) ile eppendorf tüplerinde karıştırılmıştır. Örnekler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletilerek elektroforeze uygulanana kadar buz dolu bir kabın içinde bekletilmiştir. -20 °C' dan çıkarılan örnekler kullanıldıktan hemen sonra tekrar derin dondurucuya (-20 °C) konulmuştur. Bu işlemler protein standart mixture IV (Merck) (12 300, 16 949, 30 000, 42 700, 66 250, 78 000 dalton büyüklüğündeki protein markerlarını içerir) içinde uygulanmıştır.

Çizelge 2.4. Modifiye edilmiş Laemmli metoduna göre SDS jel elektroforezinde kullanılan jel karışımlarını hazırlanması (91)

	Ayırma jeli			Yükleme jeli
	% 10 T	% 12 T	% 16 T	% 5 T
Monomer (A)	9.975 ml	12 ml	15.975 ml	1.6 ml
Tampon (B) veya (C)	7.5 ml (B)	7.5 ml (B)	7.5 ml (B)	2.5 ml (C)
% SDS (D)	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.1 ml
H ₂ O	11.925 ml	10.2 ml	5.925 ml	5.63 ml
TEMED	15 µl	30 µl	15 µl	5 µl
Karışımın havası alınır				
APS (E)	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Jel kasetine dökülür				

Örneklerin uygulanması ve elektroforez: Polimerizasyonu tamamlanan jelden tarak, ceplerin sırasının bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça kaldırılmıştır. Cepler distile su ile yıkanmıştır. 5X tank tamponu (G), 5 kez sulandırılarak aletin alt bölmesine elektrodun temas edeceği seviyeye kadar doldurulmuştur. Polimerize jeli taşıyan kaset, jelin alt kısmında hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde elektroforez aletine yerleştirilmiştir. Aletin üst bölmeside 5 kez sulandırılmış G tamponu ile doldurulmuştur. 5 kez sulandırılmış G tamponu ile bir kez yıkanmış ceplere Hamilton şırıngası ile 40 µl hacimdeki örnekleri yüklenmiştir. Elektroforez aletinin üst kapağı yerleştirilmiş ve sistem "Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS 500/400" güç kaynağına bağlanmıştır. 16 mA sabit akım örnekler yükleme jelinden çıkana kadar

uygulanmıştır. Örnekler ayırma jeline girdiğinde işlem sonuna kadar 25 mA sabit akım 4-5 saat süresince uygulanmıştır. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin alt ucuna 0.5 cm kalana dek yürüdüktan sonra akım kesilmiştir. Elektroforez aleti açılarak jel kasetinden çıkarılmıştır. İlk uygulanan cebin olduğu tarafın ucu bir parça kesilerek örneklerin ceplere uygulanma sırasının karışmaması sağlanmıştır.

Jelin boyanması: Jelin boyanmasında hızlı gümüş boyama tekniği Temizkan ve ark.' na (91) göre uygulanmıştır. Kasetinden çıkarılan jel, 200 ml formaldehit fiksatif çözeltisi (A) içeren plastik kaba alınarak en az 20 dakika orbital karıştırıcıda çalkalanmıştır. Fiksatif solusyonu döküldükten sonra, jel distile su ile 2 kez 10'ar dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Son yıkama suyu uzaklaştırıldıktan sonra, 100 ml 0.2 g/l Sodyum tiosülfat (B) solüsyonuna alınan jel 1-2 dakika çalkalanarak bekletilmiştir. B solusyonu uzaklaştırıldıktan sonra 2 kez 40'ar saniye distile su ile yıkanan jel, son yıkama suyu uzaklaştırıldıktan sonra 100 ml % 0.1'lik $AgNO_3$ (C) çözeltisine alınmıştır. C çözeltisinde en az 10 dakika hafifçe çalkalanarak bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda C çözeltisi uzaklaştırılmış ve jel distile su ile yıkanmıştır. Jel 100 ml taze hazırlanmış görüntü oluşturma (tiosülfat developing) çözeltisine (D) alınıp kahve renkli bantlar oluşuncaya kadar hafifçe çalkalanıp 3- 5 dakika bekletilmiştir. Jelin boyandığı kaba 5 ml 2.3 M sitrik asit (E) eklenerek pH nötrleştirilmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. Bant oluşumunun tamamlanması için jel bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Jelin görüntülenmesi: Bant oluşumu tamamlandıktan sonra kaptaki çözelti dökülmüş ve jel distile su içine alınarak saklanmıştır. Jelin görüntülenmesinde Kodak 100 ASA' lık film ve Canon EOS1000F marka fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Örneklerdeki Mikroorganizma İzolasyonu ve Sayımı

Toplanan örneklerdeki toplam bakteri, toplam maya ve küf sayıları kob/g olarak Çizelge 3.1' de verilmiştir. Bu çizelgeye göre boza örneklerindeki toplam bakteri sayısının 1.24×10^8 - 2.12×10^8 kob/g, maya sayısının ise 1.26×10^8 - 3.02×10^8 kob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Boza örneklerinde en fazla bakteri ve maya sayısına 3. örnekte rastlanırken en az sayı 2. örnekte bulunmuştur. İkinci örnekte hiç küfe rastlanmazken, en fazla küf 3. örnekte sayılmıştır. Örneklerdeki ortalama küf sayısının ise 2.80×10^2 kob/g ile 4.00×10^2 kob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Otuzbir adet ekşi hamur örneğinin 10' unda bakteri ve küf tespit edilememiştir. Örneklerde tespit edilen toplam bakteri sayısı 1.6×10^6 ile 2.31×10^8 kob/g arasında değişmiştir. Ekşi hamur örneklerinin sadece 6' sında küfe rastlanmıştır. Bu örneklerin gramındaki en az küf sayısı 6.0×10^1 , en çok küf sayısı ise 2.60×10^2 olarak belirlenmiştir. Ekşi hamur örneklerinin 11 tanesinde toplam bakteri sayısı 10^7 , 7 tanesinde 10^6 ve 3 tanesinde 10^8 seviyelerinde tespit edilmiştir.

Otuzbir adet ekşi hamur örneğindeki toplam maya sayısının toplam bakteri sayısına oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Örneklerin 8' inde 10^6 , 10' unda 10^7 , 12 örnekte 10^8 ve sadece bir örnekte 10^5 seviyesinde toplam maya sayısı belirlenmiştir. En düşük toplam maya sayısı 9.25×10^5 kob/g, en yüksek maya sayısı ise 6.0×10^8 kob/g' dir.

Ticari yaş maya örneklerindeki maya sayısı 7.2×10^9 - 9.5×10^9 kob/g arasında değişmiştir. Bu örneklerde küfe rastlanmamıştır. Bakteri sayısının ise 9.32×10^9 kob/g ile 11.0×10^9 kob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Ticari kuru maya örneklerinde bakteri ve küfe rastlanmazken, toplam maya sayısı 2.58×10^9 - 2.48×10^{10} kob/g olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklerdeki toplam bakteri, küf ve maya sayıları

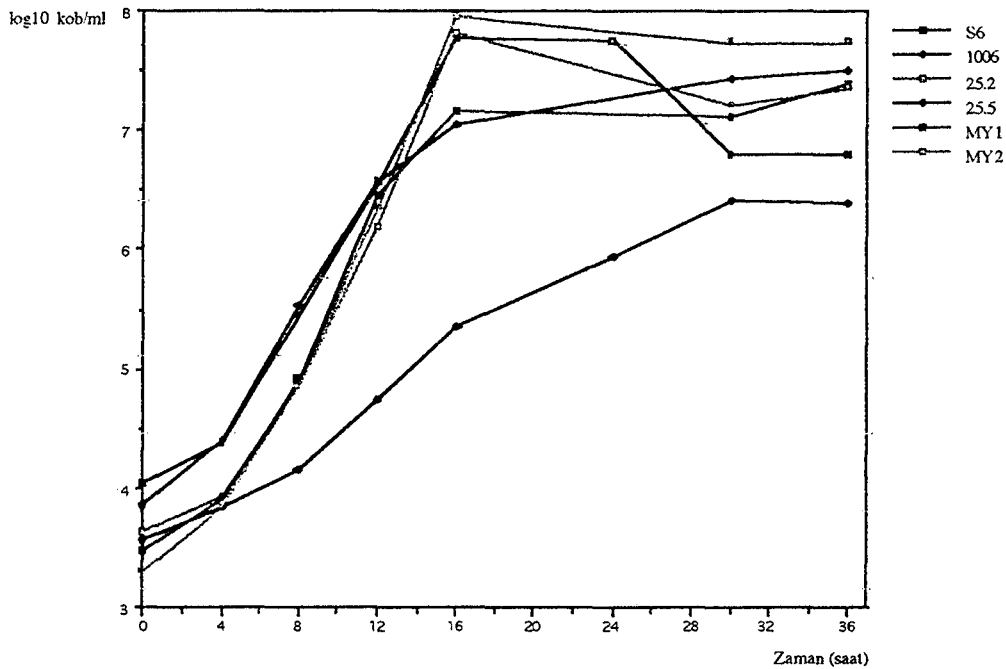
ÖRNEK	Toplam bakteri sayısı (kob/g)	Toplam maya sayısı (kob/g)	Toplam küf sayısı (kob/g)
1. Örnek BOZA	1.80×10^8	1.65×10^8	3.0×10^2
2. Örnek BOZA	1.24×10^8	1.26×10^8	-
3. Örnek BOZA	2.12×10^8	3.02×10^8	4.00×10^2
4. Örnek BOZA	1.69×10^8	1.79×10^8	2.80×10^2
5. Örnek EKŞİ HAMUR	1.03×10^7	1.04×10^7	2.60×10^2
6. Örnek EKŞİ HAMUR	2.31×10^8	1.95×10^8	6.0×10^1
7. Örnek EKŞİ HAMUR	4.83×10^7	8.50×10^7	1.80×10^2
8. Örnek EKŞİ HAMUR	3.58×10^6	3.58×10^6	2.50×10^2
9. Örnek EKŞİ HAMUR	1.65×10^7	1.48×10^7	2.00×10^2
10. Örnek EKŞİ HAMUR	3.42×10^7	2.0×10^7	2.60×10^2
11. Örnek EKŞİ HAMUR	1.42×10^6	1.13×10^6	-
12. Örnek YAŞ MAYA	11.0×10^9	7.2×10^9	-
13. Örnek YAŞ MAYA	9.6×10^9	9.5×10^9	-
14. Örnek YAŞ MAYA	9.32×10^9	7.46×10^9	-
15. Örnek KURU MAYA	-	3.41×10^9	-
16. Örnek KURU MAYA	-	2.48×10^{10}	-
17. Örnek KURU MAYA	-	2.58×10^9	-
18. Örnek EKŞİ HAMUR	7.83×10^6	1.04×10^8	-
19. Örnek EKŞİ HAMUR	-	2.23×10^8	-
20. Örnek EKŞİ HAMUR	1.21×10^8	8.75×10^7	-
21. Örnek EKŞİ HAMUR	-	1.21×10^8	-
22. Örnek EKŞİ HAMUR	2.08×10^7	9.46×10^6	-

Çizelge 3.1. (Devam) Örneklerdeki toplam bakteri, küf ve maya sayıları

ÖRNEK	Toplam bakteri sayısı (kob/g)	Toplam maya sayısı (kob/g)	Toplam küf sayısı (kob/g)
23.Örnek EKŞİ HAMUR	2.30×10^7	1.05×10^8	-
24.Örnek EKŞİ HAMUR	1.98×10^7	2.83×10^7	-
25.ÖRNEK EKŞİ HAMUR	1.38×10^6	1.05×10^6	-
26. Örnek EKŞİ HAMUR	2.0×10^6	7.33×10^6	-
27. Örnek EKŞİ HAMUR	1.90×10^8	4.73×10^7	-
28.Örnek EKŞİ HAMUR	2.83×10^7	4.66×10^7	-
29. Örnek EKŞİ HAMUR	9.26×10^7	1.21×10^8	-
30. Örnek EKŞİ HAMUR	-	1.35×10^8	-
31. Örnek EKŞİ HAMUR	-	1.08×10^8	-
32. Örnek EKŞİ HAMUR	-	1.0×10^8	-
33. Örnek EKŞİ HAMUR	3.5×10^6	3.66×10^6	-
34. Örnek EKŞİ HAMUR	3.83×10^7	6.0×10^8	-
35. Örnek EKŞİ HAMUR	-	1.08×10^8	-
36. Örnek EKŞİ HAMUR	-	1.48×10^8	-
37. Örnek EKŞİ HAMUR	2.25×10^7	9.25×10^5	-
38. Örnek EKŞİ HAMUR	-	7.66×10^6	-
39. Örnek EKŞİ HAMUR	1.6×10^6	2.33×10^6	-
40. Örnek EKŞİ HAMUR	-	9.41×10^7	-
41. Örnek EKŞİ HAMUR	-	9.41×10^7	-

3.2. Maya Suşlarının Büyüme Eğrileri

25.2, 25.5, MY1, MY2, *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve *S. cerevisiae* S6'nın büyüme eğrileri incelendiğinde, *S. cerevisiae* NCYC 1006 hariç hepsinin ilkdört saat içinde lag fazını sürdürdükleri 4. saatten itibaren logaritmik faza geçtikleri ve 16. saatten sonra durgunluk fazına ulaştıkları tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* NCYC 1006 ise lag fazından 8. saat sonunda çıkmış, logaritmik fazı 30. saate kadar sürmüştür ve bu saatten sonra durgunluk fazına girmiştir (Şekil 3.1).

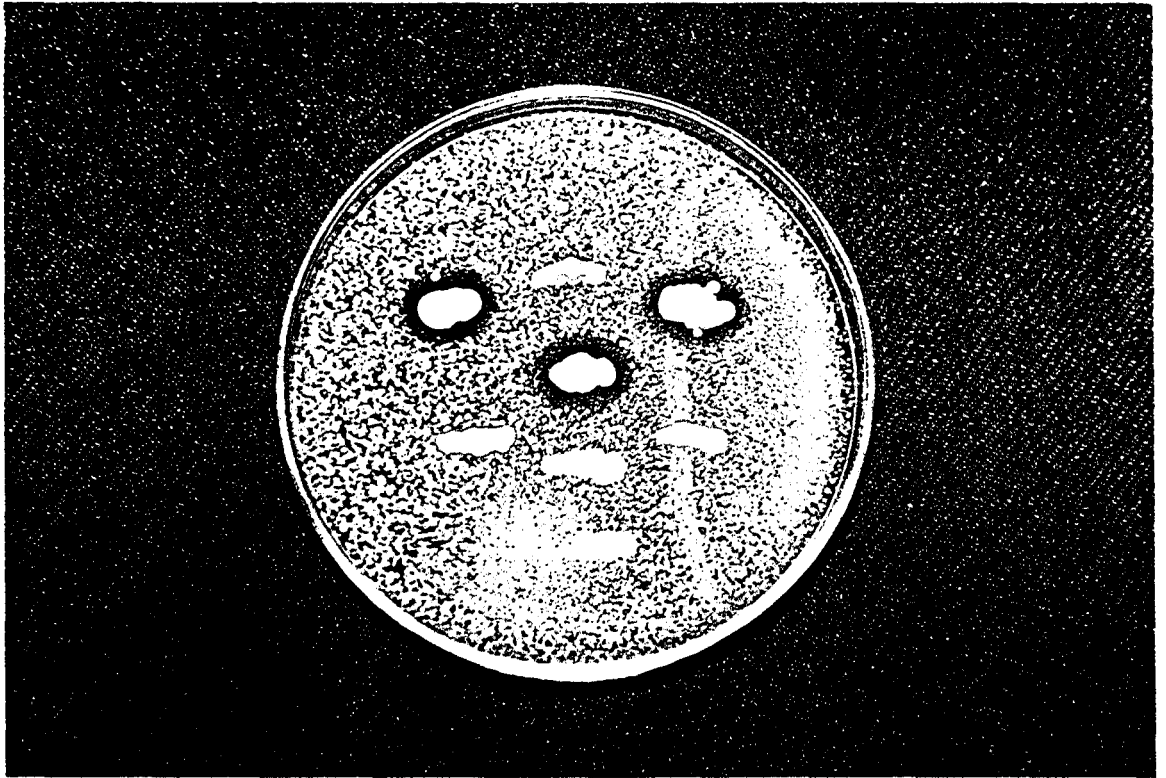


Şekil 3.1. Maya suşlarının büyüme eğrileri.

3.3. Katil Aktivite Testleri İçin En Uygun Yöntemin Belirlenmesi

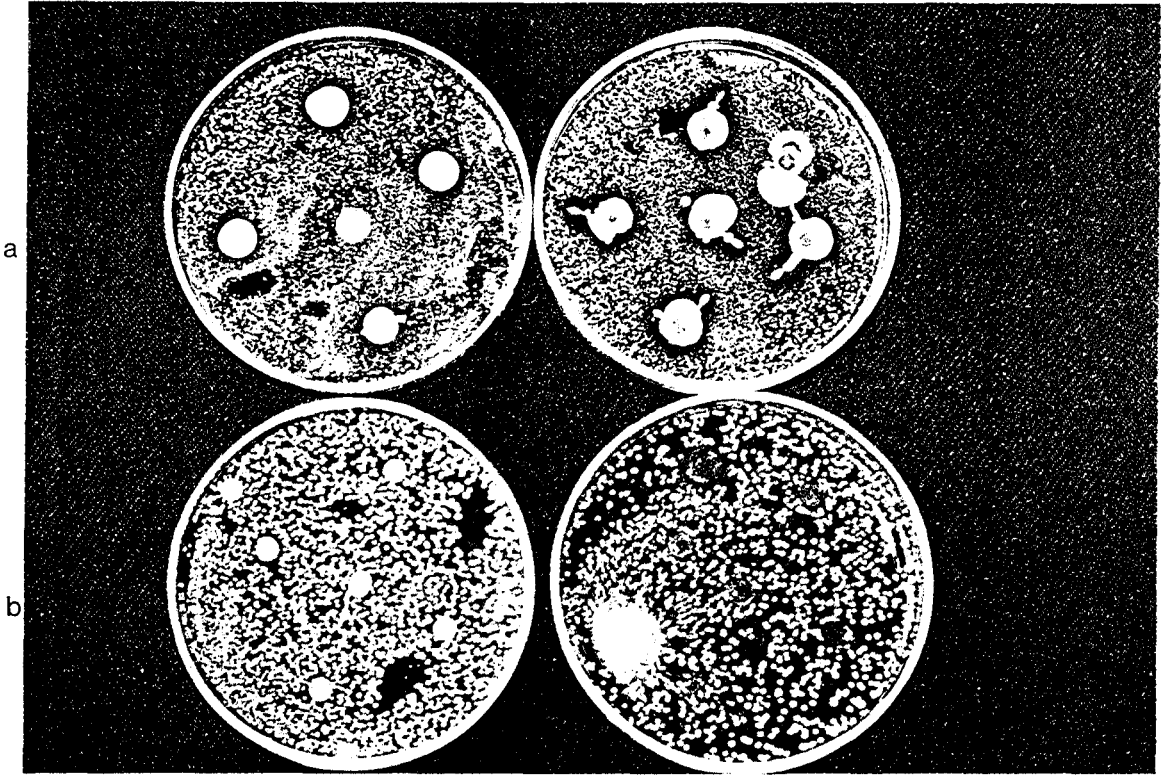
Referans katil suşlar ile yapılan katil aktivitenin belirlenmesi deneylerinde en iyi gözlemlenebilen, net ve kolay bir şekilde ölçümü yapılabilen inhibisyon zonlarının % 1.2' lik agar içeren besi ortamında ve 10^4 kob/ml duyarlı suş konsantrasyonunda gözlemlendiği tespit edilmiştir. Yayma plak yöntemi kullanılarak uygulanan testlerde dökme plak yöntemine göre yapılan testlerden daha net ve iyi farkedilebilen inhibisyon

zonlarının oluştuğu belirlenmiştir. Yine bu testlerde test suşu kurdan ile duyarlı suş üzerine çizildiğinde oluşan inhibisyon zonunu şekil ve bđyüklüđünün çizgi şekil ve bđyüklüđüne göre değiştiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra sıvı besi ortamında geliştirilen test suşu kđltüründen duyarlı suş üzerine damlatıldığında oluşan inhibisyon zonu sınırlarının daha düzgün olarak oluştuğu çalışmalarımızda saptanmıştır. Bđtün deneme testlerinde 2 gđnlük inkübasyon sonunda duyarlı suş üzerindeki katil suşların etrafında şeffaf bir inhibisyon zonu oluştuğu, bunu takip eden 3. gđnün sonunda ise besi ortamında bulunan Metilen mavisi boyasının ölen duyarlı hücrelerin üzerinde birikmesi sonucu inhibisyon zonunun i sınırlarında mavi renkli kolonilerden oluşan net bir hat gözlenmiştir (şekil 3.2). Bu sonuçlara göre % 1.2' lik agar konsantrasyonun, 10^4 kob/ml duyarlı suş konsantrasyonun ve yayma plak yönteminin izole ettiğimiz mayaların katil aktivitelerinin belirlenmesinde en uygun yöntem olduğu tespit edilmiştir. Test izolatları için çizgi ve damla testlerinden birtanesi seçilerek uygulanmıştır.



şekil 3.2. Katil izolatların duyarlı suş üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları

Katil izolatlarda toksin aktivitesi üzerine etki eden çeşitli faktörlerin belirlenmesinde, hücresiz kültür filtratları 0.2 μm ' lik selüloz asetat filtreden geçirilip 0.7 cm' lik çukurlara 40 μl bırakıldığında, aynı miktarda disklere emdirilerek yada direkt olarak yayma ve dökme plak yöntemlerine göre hazırlanmış duyarlı suş plakları üzerine uygulandığında inhibisyon zon oluşumu hiçbir deneme sonucunda tespit edilememiştir. Bütün bu işlemler katil izolatın sıvı kültürü santrifüj edilmeden ve filtreden geçirilmeden tekrarlandığında inhibisyon zonları net bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 3.3). Bu nedenle dökme plak yöntemi ile 40 μl sıvı kültürün 0.7 cm çaplı deliklere bırakılması toksin aktivitesine etki eden faktörlerin belirlenmesinde uygulanacak yöntem olarak seçilmiştir. Dökme plak yöntemi uygulama kolaylığı ve zamandan kazandırdığı, 0.7 cm çaplı delikler de ölçüm kolaylığı sağladığı için tercih edilmiştir.



Şekil 3.3. Filtre edilmiş ve edilmemiş kültür filtratları ile katil aktivite testi
a. Filtreden geçirilmemiş sıvı kültür ile yapılan katil aktivite testi
b. Filtreden geçirilmiş sıvı kültür ile yapılan katil aktivite testi

3.4. Maya izolatlarında Katil Aktivite

Eskişehir ve ilçeleriyle Bilecik'ten sağlanan toplam 4 adet boza örneğinde 97, 31 adet ekşi hamur örneğinde 307, 3 adet ticari kuru maya örneğinden 30 ve 3 adet yaş maya örneğinde 30 tane olmak üzere toplam 464 maya suşu izole edilmiştir (Çizelge 3.2). Daha sonra bu izolatlarda katil, duyarlı ve nötral fenotip varlığı test edilmiştir. Boza izolatlarından 32 tanesi katil (% 32.98), 13 tanesi duyarlı (% 13.40), 52 tanesi ise nötral izolatlar (% 53.60) olarak belirlenmiştir. Ekşi hamur maya izolatlarının 12 tanesi katil aktiviteye (% 3.90) sahipken, 79 tanesi duyarlı (% 25.73), 216 tanesi ise nötral izolat (% 70.35) fenotipi göstermiştir. Ticari yaş ve kuru maya izolatlarının hiçbirisinde katil veya nötral izolat (% 0) fenotipine rastlanmamıştır. Bu örneklerdeki maya izolatlarının hepsi duyarlı fenotip (% 100) göstermiştir (Çizelge3.2).

Çizelge 3.2. Örneklerdeki toplam, katil, duyarlı ve nötral izolat sayıları ve % dağılım oranları

Örnek tipi	Toplam izolat sayısı	Katil izolat sayısı ve % oranı	Duyarlı izolat sayısı ve % oranı	Nötral izolat sayısı ve % oranı
Boza	97	32 (% 32.98)	13 (% 13.40)	52 (% 53.60)
Ekşi hamur	307	12 (% 3.90)	79 (% 25.73)	216 (% 70.35)
Ticari kuru maya	30	0 (% 0)	30 (% 100)	0 (% 0)
Ticari yaş maya	30	0 (% 0)	30 (% 100)	0 (% 0)
Toplam izolat sayıları	464	44	152	268

Çizelge 3.3' de örneklerden izole edilen toplam izolat sayısı ile bu izolatlarda belirlenen katil, duyarlı ve nötral fenotip gösteren izolat sayılarının örneklere göre dağılımı görülmektedir. Üçüncü boza örneğinden izole edilen toplam 29 izolatın 17 tanesi katil aktiviteye sahip olarak belirlenmiştir. Yirmisekiz izolatın değerlendirmeye alındığı 2. boza örneğinde 7 tane katil izolat, 23 izolatın test edildiği 4. örnekte ise 5 katil maya izolatı belirlenirken, 17 izolatın incelendiği 1. boza örneğinde 3 tane katil aktiviteye sahip maya izolatı tespit edilmiştir. Katil izolat sayısına dayanılarak yapılan bu sıralama örneklerin sahip olduğu duyarlı izolat sayısı bakımından da aynı olarak

karşımıza çıkmaktadır. Buna göre 3. örnekte 5, 2. örnekte 4, 3. örnekte 3 ve 1. örnekte 1 izolat duyarlı maya fenotipi göstermiştir. Örneklerdeki nötral izolatlar ise örnek numara sırasına göre 13, 17, 7 ve 15 adet olarak karşımıza çıkmaktadır. Otuzbir adet ekşi hamur örneğine ait 307 izolattan sadece 12 tanesi katil izolat özelliği göstermiştir. Bunlardan 18. örneğin 2 izolatından 1, 19. örneğin 3 izolatından 1, 23. örneğin 13 izolatından 1, 24. örneğin 16 izolatından 3, 25. örneğin 6 izolatından 2, 26. örneğin 3 izolatından 1, 27. örneğin 14 izolatından 1, 36. örneğin 3 izolatından 2 tanesi katil izolatlar olarak belirlenmiştir. Herbir örnekteki duyarlı izolat sayısı 0-13 arasında değişmekle beraber, 307 izolattın 79 tanesi duyarlı izolat olarak tesbit edilmiştir. 10., 18., 27., 30., 34., 37. ve 40. örneklerde hiç duyarlı izolata rastlanmazken; 5., 8., 9., 21., 32., 36. ve 39. örneklerde 1'er tane; 19., 23., 26., 29., 30. ve 35. örneklerde 2'şer tane; 20., 24. ve 41. örneklerde 3'er tane; 25., 33. ve 38. örneklerde 4'er tane; 22. ve 31. örneklerde 5'er tane; 7. örnekte 7; 11. örnekte 9 ve 6. örnekte 13 tane duyarlı izolat belirlenmiştir. Örneklerde katil ve duyarlı izolat sayısına göre daha fazla sayıda nötral izolat fenotipine rastlanmıştır. Nötral izolat sayısı örneklerde 0-23 arasında değişmiştir. En çok sayıda nötral izolata 9. örnekte rastlanırken; 19., 20., 25., 26. ve 36. örneklerde nötral izolata rastlanmamıştır.

Çizelge 3.3. Örneklerden izole edilen maya suşlarının sayısı ve bunlarda tespit edilen katil, duyarlı ve nötral fenotip sayıları

Örneklerin kaynağı	Test edilen izolat sayısı	Katil izolat sayısı	Duyarlı izolat sayısı	Nötral izolat sayısı
Boza 1	17	3	1	13
Boza 2	28	7	4	17
Boza 3	29	17	5	7
Boza 4	23	5	3	15
Ekşi hamur 5				
Çukurhisar	19	0	1	18
Ekşi hamur 6				
Alpu	27	0	13	14
Ekşi hamur 7				
Kümbet	28	0	7	21
Ekşi hamur 8				
İnönü	15	0	1	14
Ekşi hamur 9				
Pazaryeri	24	0	1	23
Ekşi hamur 10				
Çavlum	10	0	0	10

Çizelge 3.3. (Devam) Örneklerden izole edilen maya suşlarının sayısı ve bunlarda tespit edilen katil, duyarlı ve nötral fenotip sayıları

Örneklerin kaynağı	Test edilen izolat sayısı	Katil izolat sayısı	Duyarlı izolat sayısı	Nötral izolat sayısı
Ekşi hamur 11				
Mihallıçık	16	0	9	7
Yaş maya 12				
Ticari	10	0	10	0
Yaş maya 13				
Ticari	10	0	10	0
Yaş maya 14				
Ticari	10	0	10	0
Kuru maya 15				
Ticari	10	0	10	0
Kuru maya 16				
Ticari	10	0	10	0
Kuru maya 17				
Ticari	10	0	10	0
Ekşi hamur 18				
Tepebaşı	2	1	0	1
Ekşi hamur 19				
Deliklitaş	3	1	2	0
Ekşi hamur 20				
Odunpazarı	3	0	3	0
Ekşi hamur 21				
Muttalıp	3	0	1	2
Ekşi hamur 22				
Çifteler Cad.	7	0	5	2
Ekşi hamur 23				
Yıldıztepe I	13	1	2	10
Ekşi hamur 24				
Yıldıztepe II	16	3	3	10
Ekşi hamur 25				
Yunusemre Cad.	6	2	4	0
Ekşi hamur 26				
Ziyapaşa Cad.	3	1	2	0
Ekşi hamur 27				
Çifteler Cad.	14	1	0	13
Ekşi hamur 28				
Yeşiltepe	3	0	2	1
Ekşi hamur 29				
Yenikent I	4	0	2	2
Ekşi hamur 30				
Yenikent II	4	0	0	4
Ekşi hamur 31				
Sütlüce	6	0	5	1
Ekşi hamur 32				
Anadolu Üniv.	3	0	1	2

Çizelge 3.3. (Devam) Örneklerden izole edilen maya suşlarının sayısı ve bunlarda tespit edilen katil, duyarlı ve nötral fenotip sayıları

Örneklerin kaynağı	Test edilen izolat sayısı	Katil izolat sayısı	Duyarlı izolat sayısı	Nötral izolat sayısı
Ekşi hamur 33 Tunalı Mah.	5	0	4	1
Ekşi hamur 34 Vişnelik I	12	0	0	12
Ekşi hamur 35 Vişnelik II	8	0	2	6
Ekşi hamur 36 Çifteler Cad.II	3	2	1	0
Ekşi hamur 37 Alanönü	10	0	0	10
Ekşi hamur 38 Odunpazarı	7	0	4	3
Ekşi hamur 39 Tunalı	8	0	1	7
Ekşi hamur 40 Akarbaşı	15	0	0	15
Ekşi hamur 41 Bilecik	10	0	3	7

3. 5. Katil Maya İzolatlarının İdentifikasyonu

İzole ettiğimiz katil maya suşlarının identifikasyonunda kullanılan testlerin sonuçları Çizelge 3.4 ve 3.5' te özetlenmiştir. İzolatlar fermentasyon ve asimilasyon reaksiyonlarına göre 6 farklı gruba ayrılmışlardır. Birinci ve 2. grupta yer alan 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlar glukoz, galaktoz ve sukrozu hem fermente hem de asimile etmişlerdir. 25.5 numaralı izolat maltozu sadece asimile etmiş ancak fermente edememiştir. 25.2 numaralı izolat maltoz hem asimile hem de fermente etmiştir. Bu iki izolat laktoz ve ksilozu sadece asimile etmiş, trehaloz, melibioz ve sellobiozu ne fermente ne de asimile etmişlerdir. Laktoz bu iki izolat tarafından fermente edilmemesine rağmen asimile edilmiştir. Salisin ve arbutin ise sadece asimile edilirken, sarboz, glukozamin, riboz ve arabinoz asimile edilememiştir. Üçüncü grup izolatı olan 36.1 ise; trehaloz ve melibiozu fermente ve asimile edememiş; glukoz, galaktoz, maltoz, sukroz, laktoz, sellobioz ve ksilozu fermente etmemiş fakat asimilasyonunu gerçekleştirmiştir. Asimilasyon testlerinde ise bu izolatın, salisin ve arbutin dışındaki diğer karbon kaynaklarını asimile ettiği tespit edilmiştir. Dördüncü. grupta yer alan 36.3

ve 23.1 numaralı izolatlar melibiozu fermente ve asimile etmemişlerdir. Bu izolatlar glukoz, galaktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, laktoz, sellobioz ve ksilozu fermente edememiş ancak bu karbon kaynaklarının asimilasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu grubun izolatları asimilasyon deneylerinde salicin dışındaki diğer karbon kaynaklarını asimile etmişlerdir. Beşinci grupta yer alan 24.14 numaralı izolatın glukoz, galaktoz ve sukrozu hem fermente hem asimile ettiği, maltoz, trehaloz, melibioz, laktoz ve ksilozu fermente edemediği fakat asimile ettiği belirlenmiştir. Sellobioz ise hem fermente hemde asimile edilmiştir. Asimilasyon testlerinde ise birtek salisin asimilasyonu için negatif sonuç alınırken, diğer testler için pozitif sonuç alınmıştır. Altıncı grupta yer alan 24.A, 24.B, 18.1, 19.2, 26.1 ve 27. 23 numaralı izolatlar karbon kaynaklarını fermente edememiş ancak bunların asimilasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Asimilasyon testlerinde ise arbutin ve salisin dışında, sarboz, glukozamin, riboz ve arabinoz bu grup izolatlar tarafından asimile edilmiştir.

Nitrat 3., 4. ve 5. grup tarafından azot kaynağı olarak kullanılırken, nitrit 3. ve 5. grup için azot kaynağı olarak tespit edilmiştir. 1., 2. ve 6. grupta nitrat ve nitrit azot kaynağı olarak kullanılamamıştır. Glukoz amin ve kreatinin 3., 4., 5. ve 6. gruplar için azot kaynağı olarak kullanılmış, 1. ve 2. grup izolatlar bu azot kaynaklarını gelişmeleri için kullanamamışlardır.

Birinci ve 2. grup hem 35 hem de 37 °C' da, 3. grup sadece 35 °C' da gelişebilirken, diğer gruplar bu iki sıcaklıkta gelişme gösterememişlerdir.

1., 2. ve 5. grup % 0.01 ve % 0.1' lik siklohekzimid konsantrasyonunda gelişemezken 3., 4. ve 6. grup üyeleri için bu konsantrasyonlarda gelişme kaydedilmiştir.

Bütün gruplar % 50-D-glukozda gelişme yönünden pozitif sonuç vermişlerdir.

3. grup üreyi hidroliz edebilen tek grup olarak belirlenmiştir.

Maya izolatlarının vitamin gereksinimlerini belirlemek için yapılan testlerden gruplar için belirleyici ve ayırt edici bir sonuç elde edilememiştir.

Çizelge 3.4. İzole edilen mayaların fermentasyon ve asimilasyon testlerine göre belirlenen karakteristik özellikleri

İzolat grubu	Glukoz	Galaktoz	Maltoz	Sukroz	Trehaloz	Melibioz	Laktöz	Sellobioz	Ksiloz	Sarboz	Glukoz amin	Riboz	Ara bin oz	Sali sin	Ar butin
I. grup	FA	FA	FA	FA	-	-	-A	-	-A	A-	A-	A-	A-	A+	A+
II. grup	FA	FA	-A	FA	-	-	-A	-	-A	A-	A-	A-	A-	A+	A+
III. grup	-A	-A	-A	-A	-	-	-A	-A	-A	A+	A+	A+	A+	A-	A-
VI. grup	-A	-A	-A	-A	-A	-	-A	-A	-A	A+	A+	A+	A+	A-	A+
V. grup	FA	FA	-A	FA	-A	-A	-A	-	-A	A+	A+	A+	A+	A-	A+
VI. grup	-A	-A	-A	-A	-A	-A	-A	-A	-A	A+	A+	A+	A+	A-	A-

FA : Fermentasyon ve asimilasyon pozitif
 -A : Fermentasyon negatif asimilasyon pozitif
 - : Fermentasyon ve asimilasyon negatif
 A- : Sadece asimilasyon negatif
 A+ : Sadece asimilasyon pozitif

I. grup 25.2
 II. grup 25.5
 III. grup 36.1
 IV. grup 36.3, 23.1
 V. grup 24.14
 VI. grup 24.A, 24.B, 18.1, 19.2, 26.1, 27.23

Çizelge 3.5. İzole edilen mayaların diğer karakteristik özellikleri

İzolat grubu	Nitrat	Nitrit	Glukozamin	Kreatinin	35 °C' da gelişme	37 °C' da gelişme	% 0.01 sikloheksimid varlığında gelişme	% 0.1 sikloheksimid varlığında gelişme	% 50 D-glukozda gelişme	Üre hidrolizi
I. grup	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
II. grup	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
III. grup	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
IV. grup	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
V. grup	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
VI. grup	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-

I. grup 25.2

II. grup 25.5

III. grup 36.1

IV. grup 36.3, 23.1

V. grup 24.14

VI. grup 24.A, 24.B, 18.1, 19.2, 26.1, 27.23

3.6. Katil Maya İzolatlarının Referans Katil Suşlara Karşı Duyarlılıkları

Ekşi hamur örneklerinden izole edilen 18.1, 19.2, 23.1, 24.A, 24.B, 24.14, 25.2, 25.5, 26.1, 27.23, 36.1 ve 36.3 numaralı katil izolatlarımız ile MY1 ve MY2' nin *S. cerevisiae* NCYC 232, *S. cerevisiae* NCYC 738, *S. cerevisiae* K28, *S. cerevisiae* K7, *Debaryomyces hanseneii* TK-type V, *S. cerevisiae* 1385, *Pichia membranaefaciens* CYC 1106 ve *P. anomala* CYC 1027 referans katil maya suşlarına karşı duyarlılıkları test edilmiştir. Bu testin sonuçlarına göre; 18.1, 19.2, 23.1, 24.B, 24.14 ve 26.1 numaralı izolatlar referans katil suşların hepsine karşı dirençli olarak belirlenmiştir. 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlar ise, *S. cerevisiae* NCYC 232, *S. cerevisiae* 1385 ve *P. anomala* CYC 1027' ye karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae* K28 bu izolatlarda zayıf bir inhibisyon etkisi göstermiştir. 24.A sadece *P. anomala* CYC 1027'ye karşı duyarlı, diğer referans katil suşlara karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. 27.23 numaralı izolat ise sadece *S. cerevisiae* NCYC 738' e karşı duyarlı iken diğer referans suşlara karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Bütün referans katil suşlara karşı duyarlılık gösteren izolatlar 36.1 ve 36.3 numaralı izolatlar olarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae* NCYC 738 ve *S. cerevisiae* NCYC 232, MY1 ve MY2 için etkin bir katil aktivite sergilerken, *S. cerevisiae* 1385 ve *P. anomala* CYC 1027 bu izolatlarda zayıf bir inhibisyon etkisi göstermiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Katil maya izolatlarımızın referans katil maya suşlarına karşı olan duyarlılıkları

Test suşu	<i>S.cerevisiae</i> NCYC 738	<i>S.cerevisiae</i> NCYC 232	<i>S.cerevisiae</i> K28	<i>S.cerevisiae</i> K7	<i>D.hanseneii</i> TK-type V	<i>S.cerevisiae</i> 1385 (K2)	<i>P.membranaefaciens</i> CYC 1106	<i>P.anamola</i> CYC 1027
18.1	-	-	-	-	-	-	-	-
19.2	-	-	-	-	-	-	-	-
23.1	-	-	-	-	-	-	-	-
24.A	-	-	-	-	-	-	-	+
24.B	-	-	-	-	-	-	-	-
24.14	-	-	-	-	-	-	-	-
25.2	-	+	Zayıf inhibisyon	-	-	+	-	+
25.5	-	+	Zayıf inhibisyon	-	-	+	-	+
26.1	-	-	-	-	-	-	-	-
27.23	+	-	-	-	-	-	-	-
36.1	+	+	+	+	+	+	+	+
36.3	+	+	+	+	+	+	+	+
MY1	+	+	-	-	-	Zayıf inhibisyon	-	Zayıf inhibisyon
MY2	+	+	-	-	-	Zayıf inhibisyon	-	Zayıf inhibisyon

+: zon oluşumu var

-: zon oluşumu yok

3.7. Katil Maya İzolatlarının Birbirlerine Karşı Olan Katil Aktiviteleri

Ekşi hamur örneklerinden izole edilen 12 adet katil maya izolatının birbirlerine karşı olan katil aktiviteleri test edilmiş ve bu testin sonuçları Çizelge 3.7' de verilmiştir. 18.1 numaralı katil izolat 24.14, 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlara karşı katil aktivite göstermiştir. 19.2, 23.1 ve 26.1 numaralı izolatlara karşı katil izolat olarak belirlenmiştir. 24.A izolatı ise 19.2, 24.14, 25.2, 25.5 ve 36.1 numaralı izolatlara karşı katil aktivite göstermiştir. 24.B izolatı 26.1, 27.23, 36.3' e karşı katil aktivite göstermemiş, ancak diğer suşlara karşı etkili bir katil izolat olarak tespit edilmiştir. 24.14 diğer izolatlara karşı katil aktivite göstermemiştir. 25.2 ve 25.5 sadece 24.14' e karşı, 27.23 numaralı izolatlar ise 24.14 ve 25.5' e karşı katil izolat olarak belirlenmiştir. 36.1 katil izolatı 24.B, 24.14' e karşı, 36.3 ise 19.2, 23.1, 24.B, 24.14 ve 27.23' e karşı katil aktivite göstermiştir. 25.2, 25.5, 27.23 ve 36.1 numaralı izolatlarda kalan katil izolatlar en az 3 tane katil izolata karşı etkin olarak tespit edilmiştir. Katil maya izolatlarının hepsi kendi ürettikleri katil toksine karşı dirençli olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.7. Katil maya izolatlarının birbirlerine karşı katil aktiviteleri

Test suşu	18.1	19.2	23.1	24.A	24.B	24.14	25.2	25.5	26.1	27.23	36.1	36.3
18.1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
19.2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
23.1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
24.A	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
24.B	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
24.14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
25.2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
25.5	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
26.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
36.1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
36.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: zon oluşumu var

-: zon oluşumu yok

3.8. Katil Maya İzolatlarının Toksin Tipi

Katil maya izolatlarımızın katil toksin tipinin belirlenmesi için *S. cerevisiae* NCYC 232, *S. cerevisiae* NCYC 738, *S. cerevisiae* K28, *S. cerevisiae* K7, *S. cerevisiae* NCYC 1006, MY1, MY2, 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlarla yapılan testlerin sonuçları Çizelge 3.8' de görülmektedir. Sonuçlar Vagnoli ve ark.' na (39) göre değerlendirilmiştir. Çizgilerin çakıştığı noktada duyarlılığın göstergesi olan tek bir zon beliriyse zonun üzerinde belirlendiği suş duyarlı suş olarak kabul edilmiştir. Çakışma noktasında iki zon beliriyse, her iki suşta birbirine karşı katil ve duyarlı olarak tespit edilmiştir. Hiç zon belirmediyse suşlar birbirlerinin katil aktivitesine karşı dirençli olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlarına göre; hem 25.2 hemde 25.5 numaralı izolatların *S. cerevisiae* NCYC 232 ile birbirlerine karşı katil aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bu iki suş ve *S. cerevisiae* NCYC 738' nin birbirlerine karşı katil aktivite ve duyarlılık göstermediği yani birbirlerinin katil aktivitesine karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. 25.2 ve 25.5 numaralı izolatların *S. cerevisiae* K28' e karşı katil suş olduğu fakat *S. cerevisiae* K28' in 25. 2 ve 25.5 numaralı izolatlara karşı katil aktivite göstermediği belirlenmiştir. *S. cerevisiae* K7 ile bu iki suş birbirlerine karşı katil aktivite ve duyarlılık göstermemişlerdir. *S. cerevisiae* NCYC 232 ile *S. cerevisiae* NCYC 738 suşlarının birbirlerine karşı katil suş oldukları belirlenmiştir. *S. cerevisiae* K28 ile *S. cerevisiae* K7 karşılıklı olarak birbirlerinin katil aktivitesine direnç göstermişlerdir. *S. cerevisiae* NCYC 1006' nın bu testte kullanılan tüm katil suşlara karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. MY1 ve MY2 suşları ise *S. cerevisiae* K7 ve *S. cerevisiae* K28 dışındaki tüm katil suşlara karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. MY1, MY2 ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 hiçbir suşa karşı katil aktivite göstermemiştir.

Çizelge 3.8. Katil maya izolatlarının toksin tipi

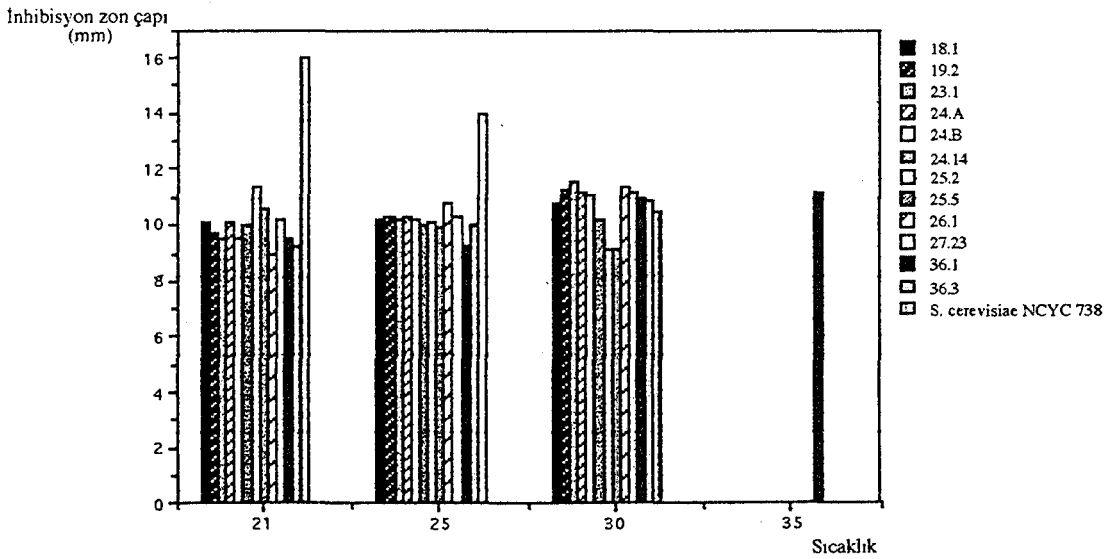
Test suşu	25.2	25.5	<i>S.cerevisiae</i> NCYC 232	<i>S.cerevisiae</i> NCYC 738	<i>S.cerevisiae</i> K28	<i>S.cerevisiae</i> K7	<i>S.cerevisiae</i> NCYC 1006	MY1	MY2
<i>S.cerevisiae</i> NCYC 232	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> NCYC 738	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> K28	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> K7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i> NCYC 1006	+	+	+	+	+	+	-	-	-
MY1	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MY2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
25.2	-	-	+	-	-	-	-	-	-
25.5	-	-	+	-	-	-	-	-	-

+: Çizgilerin çakışma noktasında mavi çizgi oluşumu var

-: Çizgilerin çakışma noktasında mavi çizgi oluşumu yok

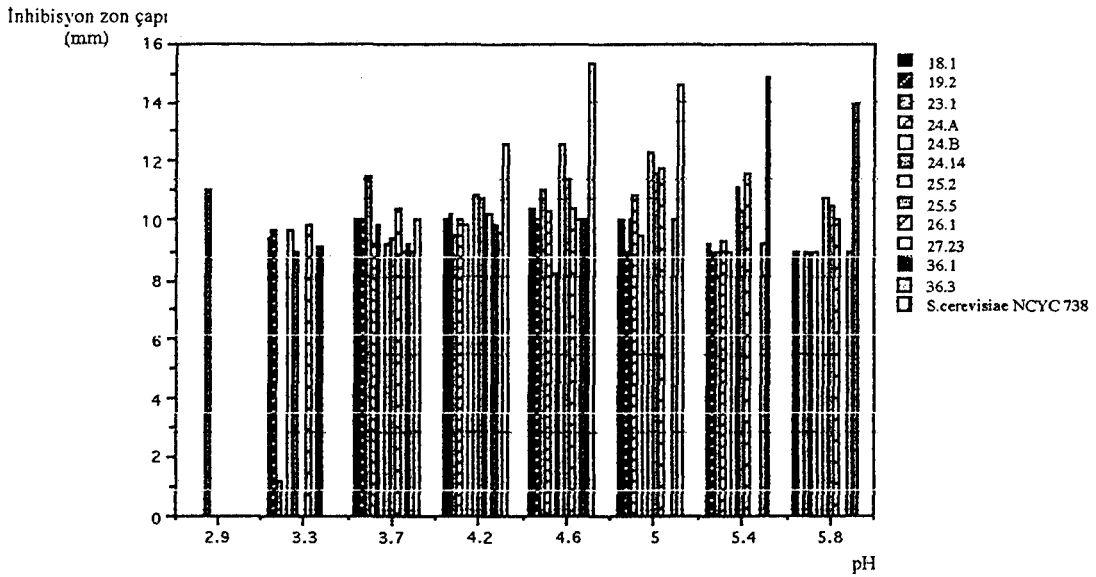
3.9. Katil Aktivite Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisi

Ekşi hamur örneklerinden izole edilen 12 adet katil maya izolatının katil aktiviteleri üzerine farklı sıcaklık, pH, antibiyotik, tuz konsantrasyonlarının ve UV' nin etkisi tespit edilmiştir. Katil aktivite üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için 21, 25, 30 ve 35 °C' da katil aktivite testleri yapılmış ve oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. 21 °C' da 25.2 numaralı izolat 11.40 mm' lik en geniş inhibisyon zonunu oluşturmuştur. 25 ve 30 °C' da ise inhibisyon zon çapları sırasıyla 10.10 ve 9.10 mm olarak tespit edilmiştir. 21 °C' da en geniş inhibisyon zon çapı (10.60 mm) oluşturan bir diğer izolat ise 25.5 numaralı izolat olmuştur. Bu izolatın 25 ve 30 °C' daki zon çapları ise, 9.90 ve 9.10 mm olarak kaydedilmiştir. Her iki izolatta 35 °C' da katil aktivite göstermemiştir. 18.1, 19.2, 23.1, 24.A, 24.B, 24.14, 26.1, 27.23 ve 36.3 numaralı izolatların en geniş inhibisyon zon çapları 30 °C' da belirlenmiş olup 21 ve 25 °C' daki ölçümlerde ise daha düşük değerler kaydedilmiştir. Bu izolatlarda da 35 °C' da katil aktivite belirlenememiştir, bu sıcaklıkta maksimum inhibisyon zon çapı veren tek izolat 36.1 numaralı izolat olmuştur. Bütün izolatlarda sıcaklık arttıkça zon çapları genişlemiş, maksimum değerden sonra ise katil aktivite gözlenmemiştir (Şekil 3.4 ve Çizelge 3. 9).



Şekil 3.4. Katil aktivite üzerine sıcaklığın etkisi

Katil aktivite üzerine pH' nın etkisini belirlemek için testler 2.9, 3.3, 3.7, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4 ve 5.8 pH değerlerinde yapılmıştır. 25.2 numaralı izolatin katil aktivitesini en etkin gösterdiği pH değeri 4.6 olarak tespit edilmiştir (12.60 mm' lik inhibisyon zon çapı ile). 25.5 numaralı izolatta ise en geniş inhibisyon zon çapı 11.60 mm ile pH 5.0' da tespit edilmiştir. Her iki izolat için pH 2.9 ve 3.3' de katil aktivite gözlenmezken, diğer pH değerlerinde ölçülen inhibisyon zon çapları daha düşük değerlerde saptanmıştır. pH 2.9' da sadece 24.14 numaralı izolat en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bu izolat pH 3.7 ve daha yüksek değerlerde ise katil aktivite göstermemiştir. Diğer izolatlar için maksimum inhibisyon zon çaplarının ölçüldüğü pH değerleri şunlardır; 24.B pH 3.7 (9.90 mm), 24.A pH 5.0 (10.90 mm), 23.1 pH 3.7 (11.50 mm), 19.2 pH 4.2 (10.20 mm), 18.1 pH 4.6 (10.40 mm), 36.3 pH 5.0 (10.00 mm), 36.1 pH 4.6 (10.00 mm), 27.23 pH 4.2 (10.20 mm) ve 26.1 pH 5.0 (11.80 mm) (Şekil 3.5). pH 2.9' da sadece 24.14, pH 3.7' de 23.1, 24.B, pH 4.2' de 19.2, 27.23, pH 4.6' da 18.1, 25.2, 36.1, pH 5.0' da ise 24.A, 25.5, 26.1 ve 36.3 numaralı izolatların maksimum katil aktivite göstermişlerdir (Çizelge 3.9). 24.14 numaralı izolat haricinde hiçbir izolat pH 2.9, 3.3, 5.4 ve 5.8' de maksimum inhibisyon zonu oluşturamamıştır. En geniş inhibisyon zon çapları ise pH 4.2-5.0 değerlerinde belirlenmiştir. İnhibisyon zon çapları pH 3.7' den başlayarak artmaya başlamış, en yüksek değere ulaştıktan sonra azalan genişlikteki değerleri ölçülmüştür.



Şekil 3.5. Katil aktivite üzerine pH' nın etkisi

Çizelge 3.9. Katil izolatların katil aktiviteleri için optimum sıcaklık ve pH değerleri

Test suşu	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH
18.1	30 °C	4.6
19.2	30 °C	4.2
23.1	30 °C	3.7
24.A	30 °C	5.0
24.B	30 °C	3.7
24.14	30 °C	2.9
25.2	21 °C	4.6
25.5	21 °C	5.0
26.1	30 °C	5.0
27.23	30 °C	4.2
36.1	35 °C	4.6
36.3	30 °C	5.0

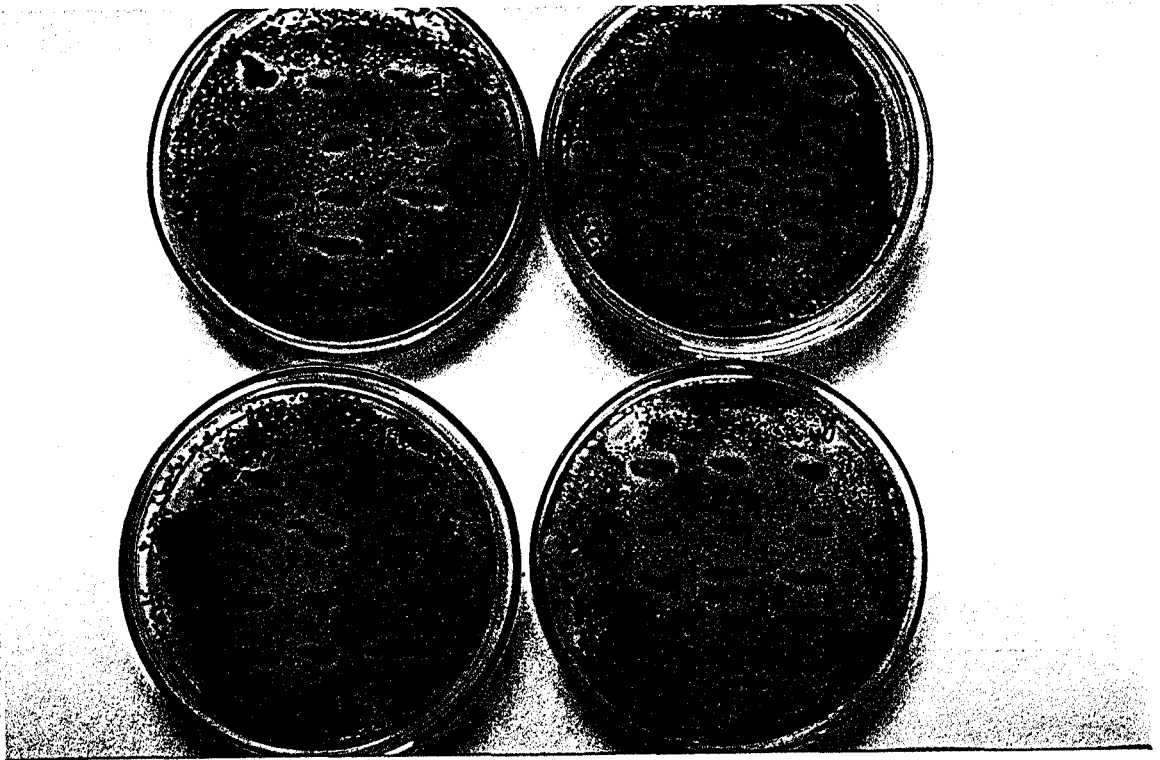
0.01, 0.05, 0.1 ve 0.3 mg/lt' lik dört farklı sikloheksimid konsantrasyonunda katil aktivite testleri yapılarak, antibiyotik konsantrasyonunun katil aktivite üzerine etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Sadece 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlar 0.01 mg/lt sikloheksimid konsantrasyonunda 10.00 mm' den geniş inhibisyon zonu oluşturmuş, diğer katil izolatların oluşturduğu inhibisyon zon çapları 10.00 mm' nin altında kaydedilmiştir. 0.05 ve 0.1 mg/lt sikloheksimid konsantrasyonunda ise yine bu iki izolat 10.00 mm' den küçük inhibisyon zonları oluştururken, diğer izolatlar bu konsantrasyonlarda katil aktivite göstermemişlerdir. En yüksek antibiyotik konsantrasyonunda (0.3 mg/lt) ise hiç bir izolatta katil aktivite belirlenmemiştir. Bu testte kullanılan antibiyotik konsantrasyonu arttıkça testte kullanılan duyarlı suşta artan oranlarda antibiyotikten etkilenmiştir (Çizelge 3. 10).

UV'nin katil aktivite üzerine belirgin bir etkisi belirlenmemiştir (Şekil 3. 6). Sadece 36.1 numaralı izolatın 30 sn UV' ye maruz bırakıldıktan sonra test edilen 12 farklı kolonisinden bir tanesinde oldukça etkili bir inhibisyon zonu gözlenmiştir. UV' ye maruz kalma süresi arttıkça bununla orantılı olarak petride gelişen koloni sayısında azalma tespit edilmiştir.

Çizelge 3.10. Katil aktivite üzerine farklı antibiyotik konsantrasyonlarının etkisi

Test suşu	0.01 mg/lt	0.05 mg/lt	0.1 mg/lt	0.3 mg/lt
18.1	+	-	-	-
19.2	+	-	-	-
23.1	+	-	-	-
24.A	+	-	-	-
24.B	+	-	-	-
24.14	-	-	-	-
25.2	++	+	+	-
25.5	++	+	+	-
26.1	+	-	-	-
27.23	+	-	-	-
36.1	+	-	-	-
36.3	+	-	-	-

++: 10 mm' den büyük inhibisyon zonu +: 10 mm' den küçük inhibisyon zonu
- : İnhibisyon zonu yok



Şekil 3.6. Katil aktivite üzerine UV' nin etkisi

Katil aktivite üzerine farklı tuz konsantrasyonlarının etkisini araştırmak için katil izolatlar % 0, 0.3 ve 0.6' lık NaCl konsantrasyonlarında geliştirilerek, yine aynı konsantrasyonlarda NaCl içeren YEPD-MB besi ortamında katil aktivite testleri yapılmıştır. En geniş inhibisyon zonları 18.1, 19.2, 23.1, 24.A, 25.2 ve 36.1 numaralı izolatlar için % 0.3 NaCl içeren ortamda geliştirilip yine aynı konsantrasyonda NaCl içeren ortamda test edildiklerinde belirlenmiştir. 24.B, 26.1, 27.23 ve 36.3 numaralı izolatlarda ise, % 0.3 NaCl içeren ortamda geliştirilip, % 0.6 NaCl içeren ortamda test edildiklerinde en geniş inhibisyon zonları belirlenmiştir. Sadece 25.5 numaralı izolat % 0.6 NaCl konsantrasyonunda geliştirilip NaCl içermeyen ortamda test edildiğinde maksimum katil aktivite göstermiştir. 24. 14 numaralı izolatta hiçbir tuz konsantrasyonunda katil aktivite gözlenmemiştir. 36.3 numaralı izolat % 0.6 NaCl konsantrasyonunda geliştirilip % 0.3 ve 0.6 NaCl içeren test ortamlarında katil aktivitesini kaybetmiştir (izelge 3.11).

Çizelge 3.11. Katil aktivite üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi

Katil suşlar	NaCl konsantrasyonu (% wt/vol)	Duyarlı suş için belirtilen NaCl konsantrasyonunda (% wt/vol) inhibisyon zon çapı (mm) <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006		
		0	0.3	0.6
18.1	0	10.4	10.0	13.05
	0.3	10.55	14.05	10.55
	0.6	11.05	11.55	13.45
19.2	0	9.9	9.85	10.75
	0.3	10.4	17.15	10.35
	0.6	11.2	10.35	10.1
23.1	0	10.25	10.4	11.3
	0.3	10.75	14.7	10.6
	0.6	11.8	10.5	12.65
24.A	0	10.0	9.45	10.3
	0.3	10.2	16.45	15.65
	0.6	11.1	9.5	10.5
24.B	0	9.75	9.65	12.65
	0.3	10.3	13.9	18.8
	0.6	11.55	12.85	12.9

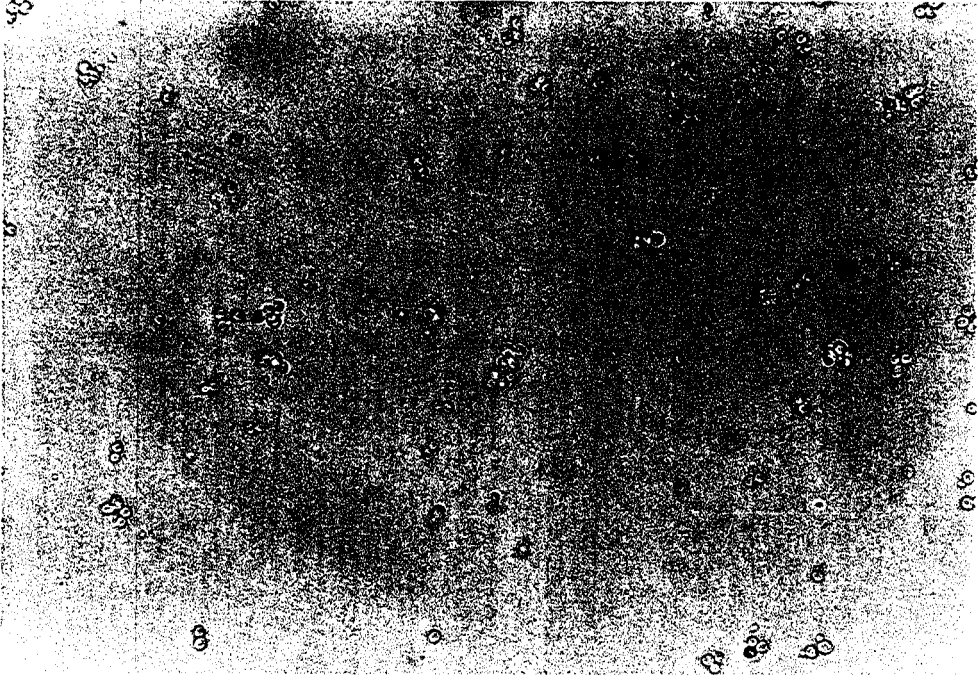
Çizelge 3.11. (Devam) Katil aktivite üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi

Katil suşlar	NaCl konsantrasyonu (% wt/vol)	Duyarlı suş için belirtilen NaCl konsantrasyonunda (% wt/vol) inhibisyon zon çapı (mm)		
		<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006		
		0	0.3	0.6
24.14	0	-	-	-
	0.3	-	-	-
	0.6	-	-	-
25.2	0	11.25	11.9	10.05
	0.3	12.65	13.65	11.95
	0.6	13.55	13.45	12.9
25.5	0	11.15	11.65	11.4
	0.3	12.55	12.9	12.9
	0.6	13.55	13.45	12.9
26.1	0	10.25	10.1	11.75
	0.3	10.00	18.45	20.15
	0.6	10.45	10.5	11.1
27.23	0	9.75	9.85	11.9
	0.3	11.65	11.25	17.65
	0.6	12.4	9.0	10.9
36.1	0	10.55	10.95	10.8
	3	14.35	18.9	17.4
	6	12.30	10.4	13.0
36.3	0	9.95	10.90	14.1
	0.3	11.35	14.4	19.25
	0.6	13.05	-	-
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738	0	10.30	11.83	12.70
	0.3	9.47	11.08	10.91
	0.6	9.64	10.46	11.00

3. 10. Floresans Boyama

Evans' a (85) göre Vondrej ve Palkova tarafından sitoplazmik membrandan geçen katil toksin aktivitesinin tahmini için geliştirilen Rhodamine B ölçüm tekniği Fluorescein boyası kullanılarak ve bazı modifikasyonlarla 25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatlarımızla uygulanmıştır. Toksinin çeşitli konsantrasyonları ile muammele edilen duyarlı suş *S. cerevisiae* NCYC 1006' nın floresans ve ışık mikroskobu ile çekilen fotoğrafları karşılaştırıldığında toksinden etkilenip Fluorescein boyası ile boyanan hücrelerin sarı floresan ışıma verdiği, etkilenmeyen hücrelerin ise floresan ışıma vermediği tespit edilmiştir (Şekil 3.7 a,b). *S. cerevisiae* NCYC 1006 duyarlı suş hücreleri *S. cerevisiae* K28 suşunun filtre edilmiş ve edilmemiş toksini ile muammele edildiğinde hücrelerin hiçbirisinde fluorasan ışıma gözlenmemiştir.

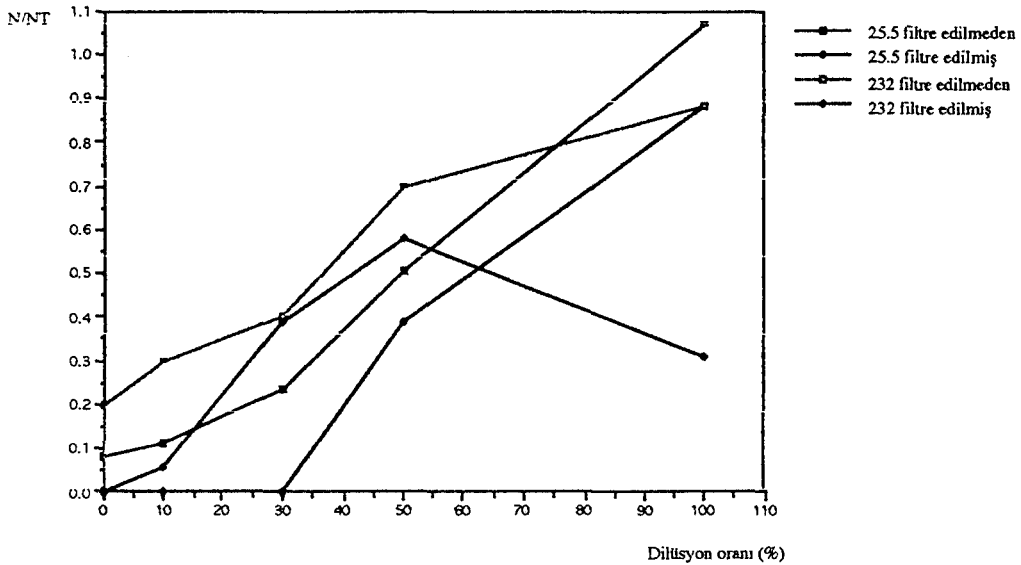
Elde edilen grafiklere bakacak olursak; 25.5 numaralı izolatın filtre edilmiş toksinin filtre edilmemiş toksine göre daha az etkili olduğu, filtre edilmiş toksinin % 100' lük dilüsyonunda N/N_T oranının 0.9' un altında kaldığı, filtre edilmemiş toksinde ise bu oranın 1.0' dan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Filtre edilmiş toksinde % 0.1, 10 ve 30' luk toksin dilüsyonlarında floresan ışıma veren hücre sayısı 0 iken, toksin hücrelere ancak % 50 ve 100' lük dilüsyonlarda etkili olmuştur. Filtre edilmeyen toksinde ise % 0.1' lik toksin dilüsyonundan itibaren duyarlı hücreler etkilenmeye başlamış ve bu etki oranı toksin dilüsyonuna bağlı olarak artmıştır. Lethal doz (LD_{50}) filtre edilmiş toksinde % 65' lik toksin dilüsyonuna yakın iken, filtre edilmemiş toksin için LD_{50} % 50' den daha küçük bir orandaki toksin dilüsyonuna denk gelmiştir (Şekil 3. 8).



Şekil 3.7.a) Katil toksin ile muamele edilen *S. cerevisiae* NCYC 1006 hücrelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü



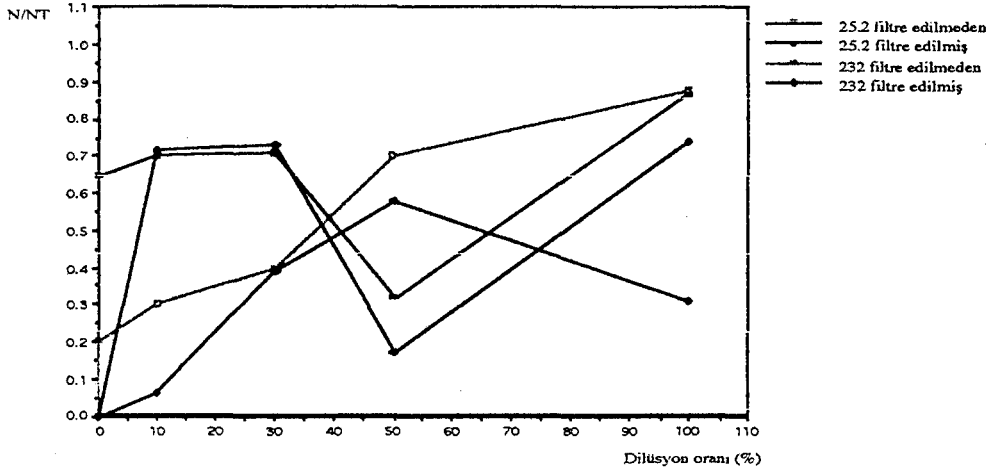
Şekil 3.7. b) Katil toksin ile muamele edilen *S. cerevisiae* NCYC 1006 hücrelerinin fluoresans mikroskobundaki görüntüsü



Şekil 3. 8. 25.5 numaralı suşun katil toksininin *S. cerevisiae* NCYC 1006 duyarlı suşu üzerine etkisi

25.2 numaralı izolatın filtre edilmiş toksinin filtre edilmemiş toksine göre daha az etkili olduğu belirlenmiştir. 25.2 numaralı izolatın filtre edilmiş toksinin % 0.1' lik dilüsyonunda fluoresan ışımaya veren hücre sayısı 0 iken, % 10 ve 30' luk toksin dilüsyonlarında fluoresan ışımaya veren hücre sayısında büyük bir artış olmuş, N/N_T oranı 0.7' nin üzerinde tesbit edilmiştir. Toksinin % 50' lik dilüsyonunda fluoresan ışımaya veren hücre sayısında büyük bir azalma gözlenmiştir. Toksinin % 100' lük dilüsyonunda fluoresan ışımaya veren hücrelerin sayısı % 30' luk toksin konsantrasyonunda tespit edilen sayıyla aynı seviyeye ulaşmıştır. 25.2 numaralı izolatın toksini filtre edilmeden duyarlı hücrelere uygulandığında fluoresan ışımaya veren hücrelerin sayısı % 0.1' lik konsantrasyondan başlayarak % 10 ve 30' luk konsantrasyonlarda ivmeli bir artış göstermiştir. Filtre edilmeyen toksinin % 50' lik konsantrasyonunda fluoresan ışımaya veren hücre sayısında filtre edilmiş toksinde gözleendiği gibi bir azalma tespit edilmiştir. Fluoresan ışımaya veren en yüksek hücre sayısı toksinin % 100' lük dilüsyonunda belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda N/N_T oranı 0.9' a yaklaşmıştır. Filtre edilmiş toksinin % 100' lük konsantrasyonunda ise N/N_T oranı 0.75' e yaklaşmıştır. Lethal doz (LD_{50}) filtre edilmiş toksinde yaklaşık

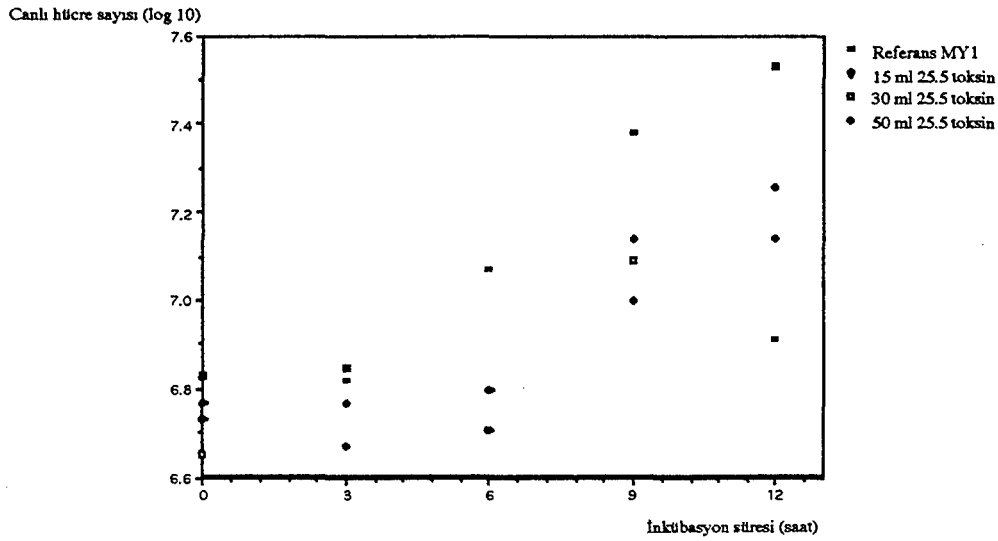
olarak % 40 ve 80' lik toksin dilüsyonda, filtre edilmemiş toksinde ise % 45 ve 70' den daha küçük orandaki toksin dilüsyonlarında ortaya çıkmıştır (Şekil 3.9). Her iki çeşit toksinde de katil aktivite dilüsyonlara bağlı olarak benzer bir grafik sergilemiştir. *S. cerevisiae* NCYC 232 suşunun filtre edilmiş toksininin filtre edilmemiş toksine göre daha az etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.8 ve 3.9).



Şekil 3. 9. 25.2 numaralı suşun katil toksininin *S. cerevisiae* NCYC 1006 duyarlı suşu üzerine etkisi

3.11. İzole edilen 25. 2 ve 25.5 Numaralı İzolatların Katil Toksinlerinin MY1 ve MY2 Suşları Üzerine Etkisi

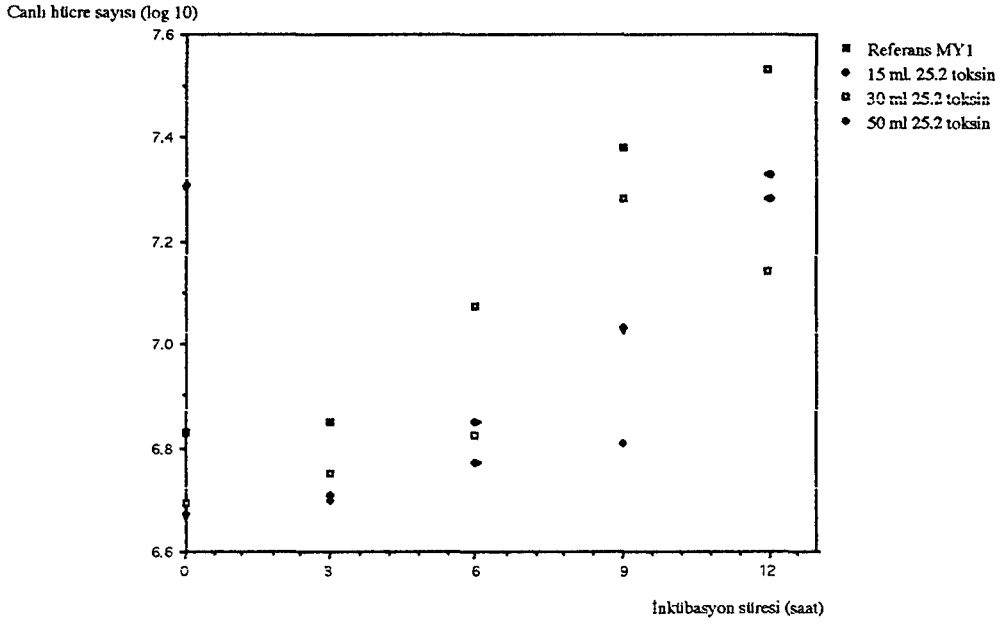
Fermentasyonun 12. saatinde MY1 canlı hücre popülasyonundaki en fazla azalma 30 ml 25.5 katil toksini içeren ortamda olurken, bu azalmayı 50 ml ve 15 ml toksin içeren ortamlar izlemiştir Ortama 15 ml toksin eklendiğinde canlı hücre popülasyonunda % 46.33, 30 ml toksin eklendiğinde % 75.65, 50 ml toksin eklendiğinde % 58.65 ve oranında azalma olmuştur (Şekil 3.10).



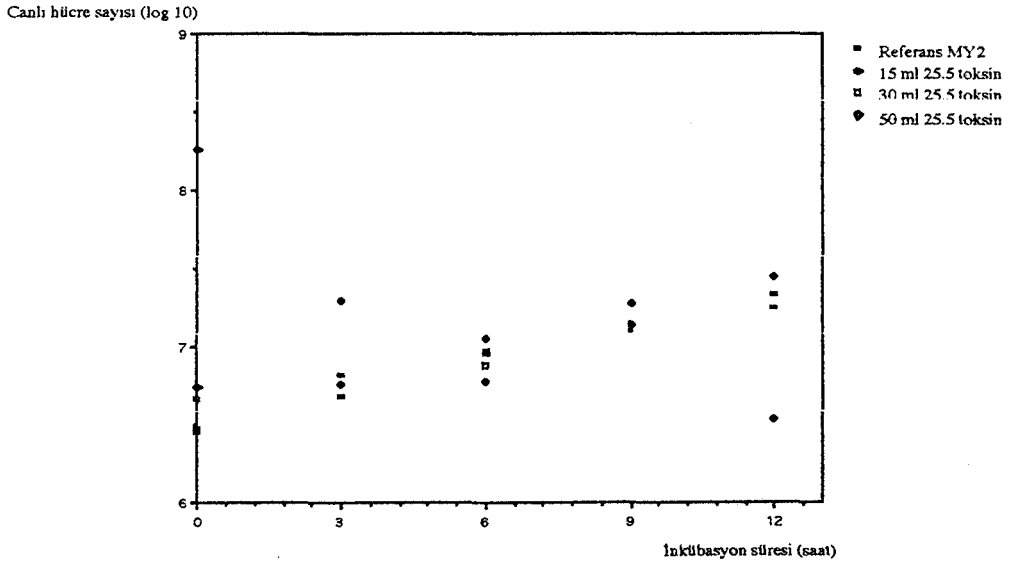
Şekil 3. 10. 25.5 katil suşunun farklı toksin miktarlarının MY1 suşu üzerine etkisi

MY1 suşu 25.2 katil toksiniyle muamele edildiğinde, canlı hücre sayısındaki en fazla azalma 30 ml toksin içeren ortamda olurken, bunu 15 ve 50 ml toksin içeren ortamlar takip etmiştir. Bu deneydeki canlı hücre popülasyonundaki azalma oranları 50 ml eklenen toksin için % 36.65, 30 ml eklenen toksin için % 58.65 ve 15 ml eklenen toksin için % 43.98 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.11).

MY2 suşu 25.5 katil toksinin çeşitli miktarları ile fermentasyona tabi tutulduğunda 12. saatin sonunda canlı hücre popülasyonundaki en fazla azalma (% 83.79) toksinin 50 ml eklendiği ortamda tespit edilmiştir. 30 ml eklenen toksin canlı hücre sayısında % 18.98 oranında bir azalmaya neden olurken, 15 ml toksin eklenen fermentasyon ortamında referans fermentasyona göre canlı hücre sayısında % 34.72' lik bir artış olmuştur. Toksin 15 ml eklendiğinde canlı hücre sayısı ilk 6 saatte sabit kalırken daha sonra ivmeli bir artış göstermiştir (Şekil 3.12).

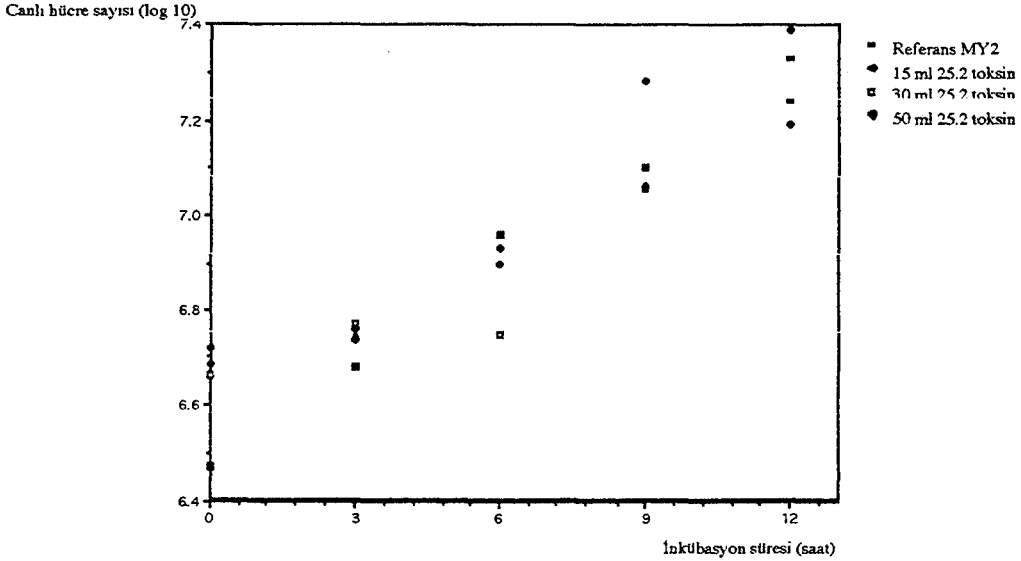


Şekil 3. 11. 25.2 katil suşunun farklı toksin miktarlarının MY1 suşu üzerine etkisi



Şekil 3. 12. 25.5 katil suşunun farklı toksin miktarlarının MY2 suşu üzerine etkisi

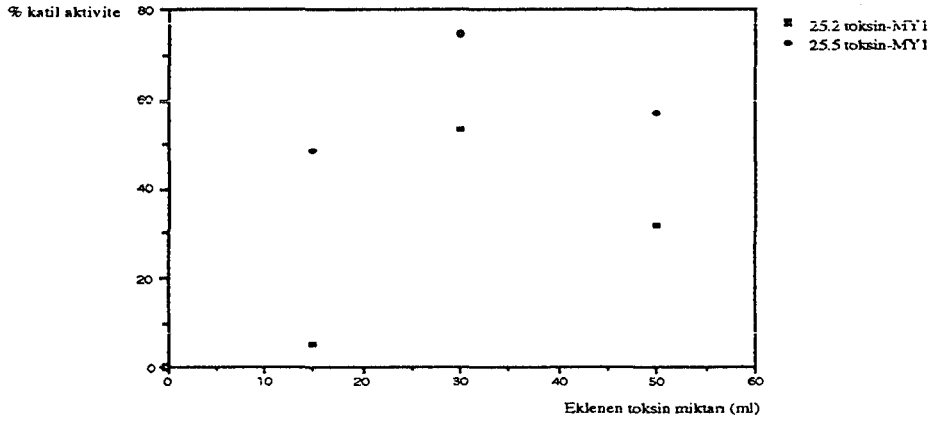
MY2 suşu 25.2 toksini ile muammele edildiğinde toksin 50 ml eklendiğinde ortamdaki canlı hücre sayısı % 26.85 azalırken, bu azalmayı % 18.98 oranı ile 30 ml toksin takip etmiştir. 15 ml toksin eklenen ortamda ise hücre sayısı % 34.72 olarak artış göstermiştir (Şekil 3. 13).



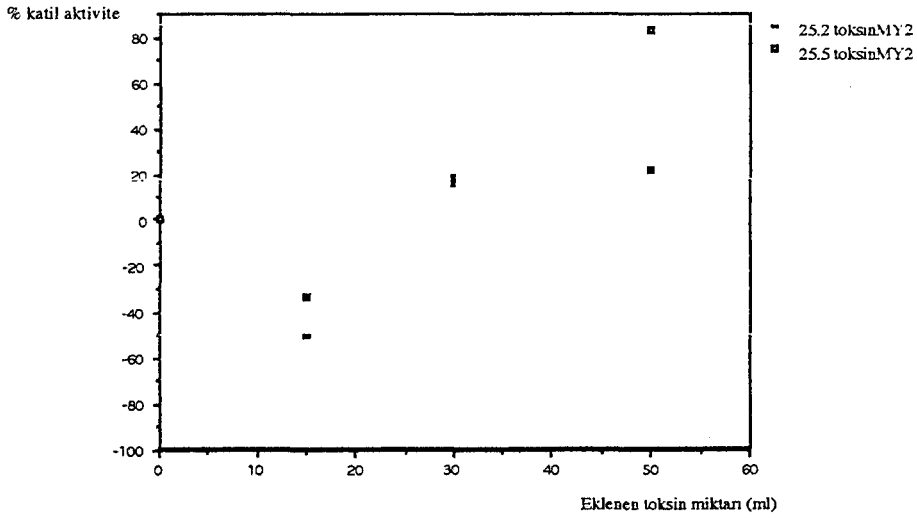
Şekil 3. 13. 25.2 katil suşunun farklı toksin miktarlarının MY2 suşu üzerine etkisi

MY1 suşu ve 25. 5 numaralı izolatın katil toksinin kullanıldığı deneylerde ortama 15 ml toksin eklendiğinde % 48.57, 30 ml toksini eklendiğinde % 76.64 ve 50 ml toksin eklendiğinde % 56.92 oranında % katil aktivite değerleri belirlenmiştir. MY1 suşu ve 25. 2 numaralı izolatın katil toksinin kullanıldığı deneylerde ise ortama 15 ml toksin eklendiğinde % 5.09, 30 ml toksini eklendiğinde % 53.48 ve 50 ml toksin eklendiğinde % 31.37 oranında % katil aktivite değerleri tespit edilmiştir (Şekil 3.14).

MY2 suşu ve 25. 5 numaralı izolatın katil toksinin kullanıldığı deneylerde ortama 30 ml toksini eklendiğinde % 18.98 ve 50 ml toksin eklendiğinde % 82.54 oranında % katil aktivite değerleri belirlenmiştir. Bu suş ile 25. 2 numaralı izolatın katil toksinin kullanıldığı deneylerde ortama 30 ml toksini eklendiğinde % 15.86 ve 50 ml toksin eklendiğinde % 21.22 oranında % katil aktivite değerleri tespit edilmiştir (Şekil 3.15)



Şekil 3.14 . 25.2 ve 25.5 katil toksinin farklı konsantrasyonlarının MY1 suşu üzerine % katil aktivite değerleri



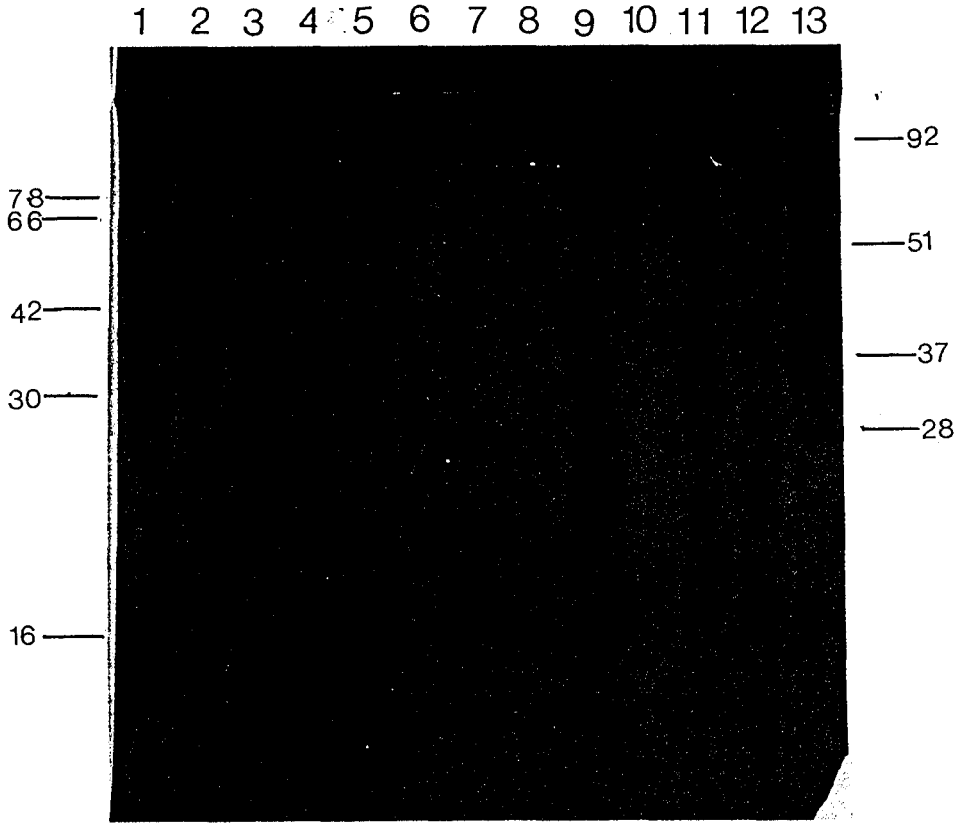
Şekil 3.15. 25.2 ve 25.5 katil toksinin farklı konsantrasyonlarının MY2 suşu üzerine % katil aktivite değerleri

3.12. Protein Elektrofrez

Lowry yönteminde, BSA standartına göre çizilen grafikten yapılan karşılaştırma sonucunda örneklerde belirlenen protein konsantrasyonları sırası ile *S. cerevisiae* NCYC 1006' nın süzünü örneklerinde 200 µg/ml, amonyum sülfatla çöktürme uygulanan örneklerde 500 µg/ml, aseton ile çöktürülen örneklerde ise 950 µg/ml değerlerine karşılık gelen yaklaşık protein konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. *S. cerevisiae* NCYC 232' nin süzünü örneklerinde 175 µg/ml, amonyum sülfatla çöktürme uygulanan örneklerde 600 µg/ml, aseton ile çöktürülen örneklerinde ise 850 µg/ml değerlerine karşılık gelen yaklaşık protein konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir. İzolat 25.2' de ise, süzünü örneklerinde 200 µg/ml, amonyum sülfatla çöktürme uygulanan örneklerde 500 µg/ml, aseton ile çöktürülen örneklerde ise 500 µg/ml değerlerine karşılık gelen yaklaşık protein derişim değerleri belirlenmiştir. TCA çöktürmesinde ise *S. cerevisiae* NCYC 1006' nın süzünü protein konsantrasyonu 0 µg/ml iken, *S. cerevisiae* NCYC 232' nin 100 µg/ml, izolat 25.2' nin ise 125 µg/ml protein konsantrasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı örneklere protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için Warburg ve Christian Yöntemi (A_{280}/A_{260} oranı) uygulandığında *S. cerevisiae* NCYC 1006' nın süzünü örneklerinde 2.86 mg/ml, amonyum sülfatla çöktürme uygulanan örneklerinde 1.87 mg/ml, aseton ile çöktürülen örneklerde ise 8.33 mg/ml; *S. cerevisiae* NCYC 232' nin süzünü örneklerinde 2.49 mg/ml, amonyum sülfatla çöktürme uygulanan örneklerinde 2.45 mg/ml, aseton ile çöktürülen örneklerinde ise 8.39 mg/ml; izolat 25.2' nin süzünü örneklerinde 2.66 mg/ml, amonyum sülfatla çöktürme uygulanan örneklerinde 1.93 mg/ml, aseton ile çöktürülen örneklerinde ise 8.34 mg/ml protein konsantrasyonu tespit edilmiştir. TCA ile çöktürme işleminde ise *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve 232' de hiç protein belirlenemezken, izolat 25.2' de 0.14 mg/ml değerine karşılık gelen protein derişimi tespit edilmiştir.

Hızlı gümüş boyama tekniğine göre boyanan jelde, enbelirgin ve birbirinden ayırt edilebilen protein bantları sırası ile aseton çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi uygulanan protein örneklerinde görülmüştür. TCA çöktürmesi uygulanan örneklerdeki

protein konsantrasyonunun diğer çöktürme yöntemlerine ile elde edilen değerlere göre çok daha düşük olması nedeniyle bu örnekler elektroforeze uygulanmamıştır (Şekil 3. 16).



Şekil 3.16. *S. cerevisiae* NCYC 232, *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve 25.2 numaralı katil izolatın ekstrasellüler proteinlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezinden sonra boyanarak bant örneklerinin gösterilmesi. 1, 5, 13 moleküler ağırlık standardı. 2, 3, 4 aseton çöktürmesi uygulanan örnekler, sırasıyla 25.2, *S. cerevisiae* NCYC 232 ve 1006 suşu için, 6, 7, 8 süzüntü örnekleri, sırasıyla 25.2, *S. cerevisiae* NCYC 232 ve 1006 suşu için, 9, 11, 12 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi uygulanan örnekler, sırasıyla 25.2, *S. cerevisiae* NCYC 232 ve 1006 suşu için. Sol taraftaki rakamlar kDa cinsinden moleküler standart proteinlerinin moleküler ağırlığını, sağ taraftaki rakamlar ise farklı proteinlerin bulunduğu moleküler ağırlıkları göstermektedir

Şekil 3.16' da görüldüğü gibi jel boyandıktan sonra 25.2, *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve *S. cerevisiae* NCYC 232 suşlarının $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi uygulandıktan sonra elde ettiğimiz ekstrasellüler protein profilinde 10-20 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip, yani katil fenotipten sorumlu olduğunu düşündüğümüz bir protein bantı gözlenmemiştir. Süzüntü örneklerinde gözlenen protein bantları ise hem aseton hemde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi uygulanan örneklerden elde edilen bantlardan çok daha az yoğun bantlar olarak gözlenmiştir. Genel olarak jelde yürütülen bütün örneklerde 42 700 moleküler ağırlığından daha büyük moleküler ağırlığa sahip protein bantları benzer bir profilde karşımıza çıkmıştır. En belirgin protein bantlarının elde edildiği aseton çöktürmesi uygulanan örneklerde *S. cerevisiae* NCYC 232 için diğer örneklerden farklı olarak 37 ve 28 kDa civarında iki tane farklı ve oldukça yoğun protein bantı gözlenmiştir. Bu bantlar *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve 25.2 suşunda gözlenmemiştir. Örneklerde *S. cerevisiae* NCYC 1006' da gözlenmeyip, 25.2 ve *S. cerevisiae* NCYC 232' de 10-20 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip ve katil aktiviteden sorumlu bir protein bantı jelde gözlenmemiştir (Şekil 3.16).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Geleneksel bir Türk içkisi olan boza başta Türkiye olmak üzere, Orta Asya, Orta Doğu ve Afrika ülkelerinde başka adlarla yaygın olarak tüketilmektedir. Boza kelimesi Farsçada darı anlamına gelen "buze" kelimesinden gelmektedir. Hammaddesi yapıldığı yerin tarım ürününe göre değişmekle beraber, genellikle kullanılan hammadde darıdır. Bundan başka mısır, arpa, çavdar, yulaf, bulgur, karabuğday, pirinç ve nadir olmakla birlikte kenevir unu ve ekmek boza yapımında hammadde olarak kullanılmaktadır (92-93). Elimizdeki literatürlere göre boza mikroflorası ile ilgili çalışmaların az sayıda ve daha çok yöresel boyutta olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda bozada çeşitli maya ve bakterilerin birarada bulunduğu ve boza fermentasyonunda rol aldıkları belirtilmiştir. Türkiye' de Pamir (92) tarafından 1961 yılında yapılan bir çalışmada, bozanın etimolojisi, tarihçesi, coğrafyası ve hammaddeleri ayrıntılı şekilde ele alınmış, bozanın kimyasal yapısı yanında bozadaki mikroorganizmalar hakkında da bilgiler verilmiştir. Pamir (92) bu çalışmasında bozadaki mikroorganizma sayıları hakkında bilgi vermemekle birlikte, izole ettiği mayaların *Saccharomyces*, *Candida* ve *Torulopsis* genusuna, bakterilerin ise; *Streptococcus*, *Micrococcus* ve *Lactobacillus* genusuna ait olduğunu bildirmiştir. Hancıoğlu ve Karapınar (93) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, bozadan izole ettikleri 77 bakteri izolatının *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* genusuna ait bakteriler, 70 maya izolatının ise, *Saccharomyces* genusuna ait mayalar olduğu bildirilmiştir. Yaptıkları 24 saatlik fermentasyon deneylerinde bakteri sayısının 7.6×10^5 ' ten 4.6×10^8 ' e, maya sayısının ise, 2.25×10^5 ' ten 8.1×10^6 ' ya yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise, 4 farklı satış merkezinden sağlanan boza örneklerindeki ortalama bakteri sayısı 1.71×10^8 , ortalama maya sayısı 1.93×10^8 , ortalama küf sayısı ise 2.45×10^2 kob/g olarak tespit edilmiştir. Bakteri sayıları Hancıoğlu ve Karapınar (93) tarafından verilen sonuçlardaki uygunluk gösterirken, maya sayısı bizim örneklerimizde 100 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir. Elimizdeki çalışmalarda boza mikroflorasındaki küf sayılarına ait bilgi bulunmadığı için, elimizdeki sonuçları bozada tespit edilen ilk küf sayıları olarak verebiliriz. Çalışmamızda ağırlığı ekşi hamurundan izole elde edilen katil mayalar oluşturduğu için boza mikroorganizmalarının identifikasyonu yapılmamıştır.

Mayaların insanlar tarafından ekmek yapımında kullanılması M.Ö. 2000 yıllarına kadar uzansa da, ekmek yapımında standart saf mayanın (*S. cerevisiae*) kullanılması ilk defa Viyana' da 1850' de olmuştur. Ekmek yapımında ticari maya kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşsa da Türkiye' nin birçok bölgesinde ekşi maya ile

ekmek yapımı hala yaşatılan bir gelenektir. Ekşi maya ile hazırlanan ekmeklerin kendine has aroma ve lezzetinin ekşi hamurda bulunan mikrobiyal floradan kaynaklandığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Kendiliğinden fermente olan hamura taze hamurun katılması sonucu mayaların çoğalmaya başlaması ile ekşi hamur meydana gelmektedir. Ekşi maya hamura katıldığında normal olarak hamur fermentasyonu devam etmektedir. Bu mayaya, alkol mayaları ile sirke ve süt asidi bakterilerini içerdiği ve ekşi olduğu için ekşi maya adı verilmiştir (94). Starter, ekşi maya ile ekmek yapımında un, su ve bir miktar tuz ile karıştırılmakta ve fermentasyon sonunda elde edilen ana hamur bir bakteri ve maya kombinasyonu içermektedir. Bu flora ekşimsi tat oluşumunda, ekmeğin kabarmasında ve lezzette etkili olmaktadır (95). Ekşi hamurda bulunan mikroorganizmaların izolasyonu ve identifikasyonları çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmıştır (94-97). Yapılan bu çalışmalarda yöresel olarak kullanılan ekşi maya ve hamurlar incelenmiştir. Bizim çalışmamızda ilk aşama olarak Eskişehir ve çevresi ile Bilecik' ten sağlanan ekşi hamur örneklerindeki bakteri, maya ve küf sayıları belirlenmiştir. Örneklerin hepsinden maya sayımı yapılmış ve en düşük maya sayısı 9.25×10^5 kob/g, en yüksek maya sayısı ise 6.0×10^8 kob/g olarak belirlenmiştir (ortalama maya sayısı 8.85×10^7 kob/g' dir). Kalafatoğlu (95) tarafından yapılan çalışmada maya sayısı 1×10^4 - 4.7×10^7 /g olarak bildirilirken, Viljoen ve Lues (96) tarafından yapılan başka bir çalışmada incelenen ekmek hamurlarındaki en yüksek yabancı maya sayısı 1.4×10^9 kob/g, en düşük maya sayısı ise 1.2×10^7 kob/g olarak verilmiştir. Çalışmamızda belirlenen maya sayıları Kalafatoğlu (95) tarafından elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterirken, diğer çalışmada elde edilen sayılardan daha düşük olarak bulunmuştur. Bu fark Viljoen ve Lues' in (96) Güney Afrika bölgesine, Kalafatoğlu' nun (95) Gebze ve çevresine, bizimde Eskişehir ve çevresine ait farklı yöresel ekşi hamur örnekleri ile çalışmamızdan kaynaklanabilir.

Ekşi hamur örneklerimizin % 32.25' inde bakteri ve küf tespiti yapılamamıştır. Küfe rastlanan örnekler ekşi hamur örneklerinin % 19.35' ini oluşturmaktadır. Bu örneklerin hepsi, sadece 11. örnek hariç, Eskişehir çevresindeki köylerden sağlanmıştır. Eskişehir merkezindeki farklı fırınlardan sağlanan örneklerin hiçbirisinde küfe rastlanmamıştır. Hem köy hemde fırınlardan sağlanan ekşi hamur örneklerindeki toplam bakteri sayısı 1.6×10^6 - 2.31×10^8 kob/g olarak tespit edilmiştir. Gebze ve çevresinde kullanılan ekşi maya örneklerindeki laktik asit bakteri sayıları 9.1×10^6 - 2×10^9 /g olarak belirlenmiştir (95). Tamerler (94) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise hamurda 70×10^7 - 300×10^7 /g bakteri sayılmıştır. Güney Afrika'da yapılan bir

çalışmada (96) ise, bakteri sayısı 2.5×10^6 kob/g olarak tespit edilmiştir. Örneklerimizdeki toplam bakteri sayısı diğer bölgesel hamurlardan elde edilen sayılara uygunluk göstermekle birlikte, her bölgenin ekşi hamurunun kendine has bir mikrobiyal kombinasyona sahip olduğu açıkça görülmektedir. Köylerden sağlanan örneklerde küfe rastlanmasının nedeni, bu ortamlardaki hijyen koşullarının farklılığından kaynaklanabileceği gibi ekmek yapımında kullanılan un, su, tuz vb. maddelerden de kaynaklanabileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (95-96).

İncelediğimiz ticari yaş ve kuru mayalarda hiç küfe rastlanmazken, kuru maya örneklerinde sadece maya, yaş maya örneklerinde ise maya ile birlikte bakteriyede rastlanmıştır. Ticari kuru mayalarda toplam maya sayısı 2.58×10^9 ile 2.48×10^{10} kob/g, yaş mayalarda ise 7.2×10^9 - 9.5×10^9 kob/g olarak belirlenmiştir. Yaş maya örneklerindeki bakteri sayısı ise 9.32×10^9 - 11.0×10^9 kob/g'dır. Kompres maya blokları ile yapılan bir çalışmada, maya sayısı 1.7×10^{10} kob/g, bakteri sayısı 6.0×10^7 kob/g olarak belirtilmiştir (96). Üç farklı endüstriyel ekşi hamurda maya ve bakteri florasını inceleyen başka bir çalışmada bakteri sayısı 1.9×10^5 - 8.3×10^6 , maya sayısı ise 1.2×10^4 - 1.3×10^8 arasında tespit edilmiştir (95). Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz maya sayıları ilk çalışmaya yakın değerlerdeyken, bakteri sayıları 100 kat daha fazladır. İkinci çalışmaya göre ise, bakteri sayıları en az 1000 kat, maya sayıları da en az 10 kat daha fazla olarak karşımıza çıkmaktadır. Elimizde bulunan literatürlerde ticari mayalardaki küf sayılarına ait bilgi olmadığı için bu konuda bir karşılaştırma yapılamamaktadır. Ticari mayalarda küfe rastlanmaması fabrika üretim şartlarındaki hijyen koşullarının uygunluğunu göstermektedir. Ayrıca Kalafatoğlu (95) hamurdaki bakterilerin ekmekte küflenmeyi engellediğini bildirmiştir.

Ekşi hamur örneklerimizin kendine has mikrobiyal florasında maya sayısının yüksek, bakteri sayısının ise daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar maya sayısının bakterilerden 30-100 misli daha fazla olduğunu bildiren çalışma ile desteklenmektedir (94). Bununla birlikte, ekşi hamurdaki bakteri sayısının ticari mayadaki bakteri sayısından daha düşük olması Viljoen ve Lues (96) tarafından bildirilen benzer sonuçlarla da uygunluk göstermektedir.

İlk defa 1963 yılında Makover tarafından *S. cerevisiae* suşlarında gözlenen katil aktivite fenomeni Russel (82) tarafından 1986'da geliştirilen maya plak ölçümü (yeast plate assay) yönteminin katil aktiviteye sahip maya suşlarının belirlenmesinde kolaylık sağlamasıyla birçok araştırmacı gerek kültür koleksiyonlarında yer alan mayaları (24, 39, 43, 48) gereksiz şarap fermentasyonunda rol alan mayaları (35, 39, 40, 42, 47) ve

gerekse çeşitli doğal ortamlardan izole edilen mayaları (25, 36, 46) katil aktivite için test etmişlerdir. Bugüne kadar bira ve şarapçılıkta rol oynayan mayalardaki katil aktivite araştırmacılar tarafından detaylı bir şekilde çalışılmasına rağmen, ekmekek hamuru, ekşi hamur veya bozadan izole edilen mayalar bu aktivite yönünden test edilmemiştir. Bu çalışmada ilk kez ekşi hamur ve bozadan izole edilen mayalarda katil, duyarlı ve nötral maya özellikleri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, bozadan izole edilen toplam 97 maya izolatının 32 tanesi (% 32.98) katil, 13 tanesi (% 13.40) duyarlı ve 52 tanesi ise (% 53.60) nötral izolattır. Otuzbir adet ekşi hamur örneğinden sadece 8 tanesinde katil mayalara rastlanmıştır. Toplam 307 adet ekşi maya izolatının 12 tanesi (% 3.90) katil, 79 tanesi (% 25.73) duyarlı ve 216 tanesi (% 70.35) nötral izolot fenotipi göstermiştir. Ticari yaş ve kuru maya örneklerinde ise hiç katil mayaya rastlanmamıştır. Yapılan bir çalışmada, 17 adet kuru şarap mayasının 4 tanesi, kültür koleksiyonundan sağlanan 74 mayanın % 14' ü katil, % 79' u nötral, % 7' side duyarlı izolotlar olarak rapor edilmiştir (35). Yapılan başka bir çalışmada 18 farklı şarap üretim merkezinin 15 tanesinden izole edilen mayalarda katil aktivite belirlenmiştir. Bu şarap üretim merkezlerindeki spontan şarap fermentasyonlarında % 88 oranında katil mayaya rastlanmıştır. Aynı çalışmada toplam maya popülasyonuna göre katil maya oranının fermentasyon basamaklarına göre farklılık göstererek % 0-95.6 arasında değiştiği belirtilmiştir (39). İspanya' da yapılan benzer bir çalışmada fermentasyon süresince değişmekle birlikte, 11 farklı şarap üretim merkezinden toplanan 54 adet örnekten izole edilen 270 maya izolatının şırada % 18.8, orta fermentasyonda % 50, geç fermentasyonda ise % 58.8 (ortalama % 42.6) oranında katil fenotip gösterdiği tespit edilmiştir (40). Kuzey batı İspanya' nın değişik şarap üretim merkezlerinden toplanan örneklerdeki katil maya oranı ise % 22.4 gibi daha düşük bir oranda tespit edilmiştir (47). Japonya' da 14 farklı şarap üretim merkezinden toplanan 80 adet örneğin 16 tanesinin % 20 oranında katil mayalar ile kontamine olduğu bildirilmiştir (42). Bizim çalışmamızda örneklerdeki test edilen izolot sayısına göre katil maya oranı % 0-66.66 olarak belirlenmiştir.

Türkiye' de Özçelik ve Dönmez (38) tarafından bölüm koleksiyonlarında yer alan 78 farklı maya suşunun sadece iki tanesinin katil, 45 tanesinin duyarlı, 29 suşunda nötral maya fenotipi gösterdiği bildirilmiştir. Türkiye' nin çeşitli şarap üretim bölgelerinden izole edilen 73 mayadan hiç birinde katil fenotipe rastlanmamıştır. Bu çalışmada mayaların 63 tanesi duyarlı, 13 tanesinde nötral maya olarak tespit edilmiştir (49). Rosini' nin (24) yürüttüğü bir çalışmada ise kültür koleksiyonlarına ait 782 S.

cerevisiae suşunun 31'i katil, 707' si duyarlı, 44' ü ise nötral suş olarak rapor edilmiştir. Çekoslovak maya koleksiyonunda test edilen 49 *Kluyveromyces* suşundan 5 tanesi, 55 *Hansenula* suşundan 10 tanesi *S. cerevisiae* suşlarına karşı katil aktivite göstermiştir (48). Tredoux ve ark. (43) Güney Amerika' da Viticultural ve Oenological Research Institution kültür koleksiyonundaki 85 *S. cerevisiae* suşunun 7 tanesi katil, 9 tanesi nötral, 69 tanesi de duyarlı suş olarak bildirilmiştir.

Almanya, İtalya, Japonya ve İspanya' da şarap üretim merkezlerinden izole edilen katil maya oranı oldukça yüksek olmasına karşın, Türkiye' deki şarap mayalarında henüz katil fenotip varlığı rapor edilmemiştir. Kültür koleksiyonlarında yapılan çalışmalarda katil maya oranı İtalya' da % 3.96, Güney Amerika' da % 8.23 olarak rapor edilmiştir. Türkiye'deki çalışma için bu oran % 2.5 olarak bildirilmiştir. Boza ve ekşi hamurdan izole edilen mayaları katil aktivite yönünden test eden, Türkiye ve dünyada ilk olan çalışmamızda, boza mayalarındaki katil suş oranı % 32.98 gibi yüksek bir değerde iken, ekşi hamur izolatlarında ise % 3.90 gibi oldukça düşük bir oranda tespit edilmiştir. Türkiye ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda duyarlı izolat sayısı nötral izolat sayısından daha fazla olarak rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bunun tersi bir sonuç elde edilmiştir. Yani nötral izolat sayısı duyarlı izolat sayısına göre daha fazladır. Katil, duyarlı ve nötral mayalardaki farklı sayı ve oranlara araştırmacılar tarafından dikkat çekilmiştir (47).

Farklı katil faktörlerin aynı genus ve tür üyesi mayalar tarafından ve farklı genus veya aynı genusun farklı türleri tarafından üretildiği bildirilmektedir (22). Araştırmacılar tarafından bildirilen farklı katil maya oranları, bu fenotipteki mayaların yayılışındaki çok büyük çeşitlilik ile açıklanmaktadır (40-41). Bununla beraber, Avrupa ve Japonya arasındaki katil maya florasının dikkate değer bir şekilde farklı olduğu (35), lokalite ve habitatın bu oranda önemli bir kriter olduğu (36) ve katil maya populasyonlarında mevsimsel varyasyonlara rastlandığı (25) araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Çalışmamızdaki farklı oranlar hem katil mayaların dağılımındaki büyük çeşitlilik hemde Türkiye katil maya florasının farklılığı ile açıklanabilir.

Barnet ve ark.' na (13) göre identifikasyonu yapılan 12 adet ekşi hamur katil maya izolatu fizyolojik özelliklerine göre 6 farklı gruba ayrılmıştır. İzolatların hiçbirisi laktozu fermente etmezken, hepsi bu şekeri asimile etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada ekmek hamurundan izole edilen ve fizyolojik özelliklerine göre 13 gruba ayrılan maya izolatlarından 3 grubun laktozu asimile ettiği, hiçbir izolatu ise laktozu fermente edemediği bildirilmiştir (97). Yapılan başka bir çalışmada sekiz adet katil izolattan

sadece bir tanesinin laktozu asimile ettiği rapor edilmiştir (35). Birinci ve ikinci grup katil maya izolatlarımız *Saccharomyces* genusu üyelerine özgü reaksiyonlar vermiştir. Birinci grupta yer alan 25.2 numaralı izolat laktoz, salisin ve arabinoz asimilasyon etme özelliklerinin haricinde *S. cerevisiae* türüne ait tipik fizyolojik reaksiyonlar göstermiştir. Bu özellikler birçok literatürde onaylanmaktadır (13, 35, 42, 95, 97-99). 25.5 numaralı izolat gösterdiği fizyolojik özelliklerden dolayı Barnet ve ark.' na (13) göre *S. cerevisiae* dışında farklı bir *Saccharomyces* genusu üyesi, maltozu fermente edemediği için Campbell ve Duffus (88) ve Tamerler' e (94) göre *S. exiguus*, Sanni ve Lönner (99) literatürüne göre ise *S. cerevisiae*'dan ayrı olarak *S. chevalieri* olarak isimlendirilebilir. Shimizu ve ark.' nın (35) rapor ettiği sonuçlara uygun olarak, katil izolatlarımız dışardan vitamine gereksinim duymadan gelişmelerini sürdürebilmişlerdir. Yine aynı çalışmada katil izolatların 37 °C' da geliştiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatların bu sıcaklıkta gelişirken, diğer gruptaki katil mayalar gelişime göstermemişlerdir. Katil izolatlarımız arasında nitratı asimile eden suşlar bulunmaktadır. Bazı katil izolatlarda gözlenen bu özellik Shimizu ve ark. (35) tarafından da tespit edilmiştir. Katil izolatlarımızın fizyolojik özellikleri diğer çalışmalarda bildirilenlerle uygunluk göstermektedir. 1. ve 2. grup dışındaki izolatlar gösterdikleri farklı fizyolojik özelliklerden dolayı Barnet ve ark. (13) ve diğer araştırmacılara göre *Saccharomyces* genusu dışındaki başka genoslara ait mayalar olarak tanımlanabilir. Birinci, 2. ve 5. grup mayalar Tamerler' in (94) ekşi hamur mayalarından izole ettiği yaş maya izolat tipine ait özellikleri taşımaktadırlar. Yapılan benzer çalışmalarda ekşi hamurda başta *Saccharomyces* genusu olmak üzere diğer genos üyelerine ait mayalarda da rastlandığı rapor edilmiştir (95-97). Katil izolatların laktozu asimile etme özelliği önemli bir kriter olarak karşımıza çıkmaktadır. Dağaşan (16) laktozu karbon kaynağı olarak kullanabilen ve fermente eden mikroorganizmaların maya üreticileri tarafından alternatif ve ucuz hammadde kullanımı yönünden gelecekte ekmek mayası endüstrisinde önemli bir yer tutacağına dikkat çekmektedir. Bu açıdan 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlarımız bu konuda ümit vaat edebilir.

Fizyolojik testler maya identifikasyonunda önemli kriterler olarak kabul edilmesine rağmen, araştırmacılar tarafından bu testlerde değişik kriterlerin kullanılması farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir. Özellikle son yıllarda maya taksonomisinin, moleküler çalışmalardan elde edilen yeni ve değişik sonuçlar doğrultusunda değişkenlik göstermesi ve mayalardaki suş çeşitliliğinin çok fazla olması

izole edilen yeni mayaların identifikasyon çalışmalarını güçleştirmektedir (13, 100). Bu nedenlerden dolayı izole ettiğimiz katil mayaların tamamlanması için fizyolojik test sonuçlarının moleküler çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

On iki adet ekşi hamur katil maya izolatının stoklarımızda bulunan referans katil mayalara karşı olan duyarlılıkları incelenmiştir. 25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatların K1 (*S. cerevisiae* NCYC 232) ve K2 (*S. cerevisiae* 1385) tip katil toksin üreten *S. cerevisiae* suşlarına ve katil *P. anomola* CYC 1027 suşuna karşı duyarlı olmakla beraber, K2 tip toksin üreten başka bir *S. cerevisiae* NCYC 738 suşuna karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. K28 tip katil toksin (*S. cerevisiae* 28) ise bu izolatlarda zayıf inhibisyon göstermiştir. Pak-Gıda Üretim ve Pazarlam A.Ş.' den sağlanan iki adet ticari maya suşu (MY1 ve MY2) ise, K1 (*S. cerevisiae* NCYC 232) ve K2 (*S. cerevisiae* NCYC 738) tip toksinlere duyarlı iken, *S. cerevisiae* 1385 (K2 tip) ve *P. anomola* CYC 1027'nin ürettiği katil toksinler bu suşlar üzerinde zayıf inhibisyona neden olmuşlardır. 36.1 ve 36.3 numaralı katil izolatlar dışında, test edilen bütün suşların hepsi K7 tip toksine (*S. cerevisiae* K7) karşı dirençli olarak belirlenmiştir. 36.1 ve 36.3 numaralı izolatlar K1, K2, K7 ve K28 tip *S. cerevisiae* katil toksinleri ile *Saccharomyces* genusu dışındaki mayaların ürettiği katil toksinlere karşı duyarlı olarak tespit edilmiştir. *Saccharomyces* genusu üyesi 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlar dışındaki *Saccharomyces* genusuna üye olmayan diğer katil izolatlardan, 36.1, 36.3, 24.A ve 27.23 numaralı izolatlar dışında kalan katil maya izolatlarından hiçbirisi K1, K2, K7 ve K28 tip toksinlerden etkilenmemiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre; *Saccharomyces* genusuna ait izolatlar yine bu genus üyelerinin ürettiği katil toksinlere karşı duyarlılık göstermişlerdir. Ayrıca *P. anomola* CYC 1027' de *Saccharomyces* genusuna ait ve bu genus dışındaki katil maya izolatlarının birkaçına karşı katil aktivite göstermiştir. *Saccharomyces* genusuna ait olmayan 24.A, 27.23, 36.1 ve 36.3 numaralı izolatlar *S. cerevisiae* NCYC 1006' ya karşı katil aktivite göstermelerine rağmen, hem *Saccharomyces* hemde diğer genus üyeleri olan referans katil mayalara karşı dirençli olarak tespit edilmişlerdir. Çalışmamızda diğer araştırmalardan elde edilen sonuçlara paralel olarak *Saccharomyces* genusuna üye olan ve olmayan maya izolatlarında katil aktivite belirlenmiştir. Bu sonuçlar Young ve Yagui (22) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile uygunluk göstermektedir. Heard ve Fleet (44) ise şarap fermentasyonunda gelişen ve *Saccharomyces* genusuna ait olmayan maya izolatlarında katil aktiviteye rastlamadığını bildirmelerine rağmen *Saccharomyces*, *Candida*,

Debaryomyces, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* ve *Cryptococcus* genusuna ait mayalarda katil aktivite yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir (25, 48).

Katil izolatların birbirleri ile olan çapraz reaksiyonlarından daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi herbir izolatın kendisinin ürettiği katil toksine karşı bağışık olduğu tespit edilmiştir. Katil suşların kendi ürettikleri toksine dirençli olmasının bu suşlarda kendi toksin ya da toksinlerinin etki bölgesinin olmayışı veya spesifik inhibe ya da inaktive edici substratın olmayışı ile açıklanmıştır (22). Yine bir katil suş başka bir katil mayayı öldürdüğünde, üretilen toksinin yapısal olarak farklı olması gerektiği bildirilmiştir. Çünkü öldüren suşun spesifik bağışıklık sistemi kendi ürettiği toksine karşı aktif ama diğer katil toksinlere karşı inaktiftir. Bu nedenle toksinler yapısal ve biyokimyasal olarak gösterdikleri farklılara göre K1-K10 arasında farklı gruplara ayrılmıştır (22).

Ayrıca *Saccharomyces* genusu katil izolatlarımız diğer genus üyesi mayalara karşı katil aktivite göstermezken, 18.1, 24.14 ve 27.23 numaralı izolatlar dışındaki mayalar birbirlerine ve *Saccharomyces* genusu mayalara karşı katil aktivite göstermişlerdir. *Saccharomyces* genusu dışındaki mayaların birbirlerine karşı olan katil aktiviteleri diğer araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (25, 48).

25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatlar *Saccharomyces* genusu üyesi oldukları ve ticari ekmek mayası üretiminde bu genus üyeleri kullanıldığı için bu iki izolatın katil toksin tipi belirlenmeye çalışılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre bu iki katil izolat K1 ve K28 tipi suşlara karşı katil aktivite gösterirken, K2 ve K7 tip katil mayalara karşı katil aktivite ve duyarlılık göstermemişlerdir. K28 tip katil suşu 25.2 ve 25.5 numaralı izolatlara karşı katil aktivite göstermemiştir fakat bu iki suş K28 tip katil maya suşuna karşı katil aktivite göstermiştir. 25.5 ve 25.2 numaralı izolatlar K2, K7 ve K28 tipteki üç farklı toksine karşı dirençli aynı zamanda K1 tip toksine karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. Vagnoli ve ark. (39) tarafından yapılan bir çalışmada izole edilen K2 fenotipli katil mayanın K2 tip toksine karşı dirençli yani K2 tip referans suşları öldürmediği fakat K1 tipe karşı ise duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç bu bulgu ile desteklenmektedir. İki farklı toksin tipine (K1 ve K2 tip) dirençli *C. valida* katil suşu Vagnoli ve ark. (39) tarafından da rapor edilmiştir. MY1 ve MY2 ticari ekmek mayası suşları ise K1, K2, 25.2 ve 25.5 numaralı katil mayalara duyarlı iken, K7 ve K28 tip toksinlere karşı dirençli olarak tespit edilmişlerdir. Katil mayaların birbirlerine karşı olan bağışıklık ve katil aktivite özelliklerini inceleyen çalışmalarda suşlarda çapraz bağışıklığın bulunmadığı yani K1 tip katil suşların K2 tip

katil suşları öldürdüğü, bunun tersi olarak K2 tip katil suşlarında K1 tipleri öldürdüğü, bu özelliğinde suşlara bağlı olarak farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (22, 47, 78). Bu farklılığın K1 tip ve K2 tip toksini kodlayan nükleik asit sırasında da bulunduğu Bussey ve ark. (2) tarafından bildirilmiştir. Kitanö ve ark. (42), yaptıkları bir çalışmada K1 tip katil mayaların K2 ve K3 tip katil mayaları öldüğünü, K2 ve K3 tiplerin aynı zamanda K1 tip mayaları da öldürdüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre K1 tip katil toksine karşı duyarlı, K2, K7 ve K28 tip toksine dirençli, aynı zamanda, K1 ve K28 tip katil mayalara karşı katil aktivite gösteren ancak K2 ve K7 tip mayalara karşı etkisiz olan 25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatlarımızın farklı tip katil mayalar olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir. Aynı katil grupların farklı direnç fenotipleri gösterdikleri Young ve Yagui (22) tarafında rapor edilmiştir.

Türkiye’de yapılan çalışmalarda şarap üretiminde kullanılan ticari suşlar arasında henüz katil aktiviteye sahip olana rastlanmamıştır (39, 49). Türkiye dışında yapılan çalışmalarda da ticari maya suşlarının katil toksinlere karşı duyarlılığına dikkat çekilmiştir (43). Yaptığımız bu çalışmada ticari yaş ve kuru mayalardan izole edilen bütün mayalar katil aktiviteye karşı duyarlı olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte MY1 ve MY2 ticari suşlarının hem ekşi hamurundan izole ettiğimiz 25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatlara hem de K1 tip ve K2 tip katil mayalara karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Kültür filtratlarını 0.2 µm selüloz asetat filtreden geçirdiğimizde, bütün izolatların katil aktivitesi kaybolmuştur. Nitroselüloz membran filtrelerin katil aktiviteyi adsorbladığı ve bu testler için kullanımlarının uygun olmadığı Shimizu ve ark. (35) tarafından da bildirilmiştir. Katil aktivite testlerinde aynı şartlarda, yayma plak yöntemi uygulandığında dökme plak yöntemi uygulanan testlerden daha büyük inhibisyon zonları ölçülmüştür.

Katil aktivite ve toksinin değişik pH’lardaki kararlılığının bu aktivite için optimum pH ölçümlerinden daha az ayırt edici bir özellik olduğu araştırmacılar tarafından (2, 22) bildirildiğinden için katil izolatlarımızın bu aktiviteleri için optimum pH ve sıcaklık değerleri tespit edilmiştir. 25.2 numaralı izolat 21 °C’ da pH 4.6’ da, 25.5 numaralı izolat aynı sıcaklıkta pH 5.0’ da optimum katil aktivite göstermiştir. 36.1 numaralı izolat 35 °C’ da, bu üç izolat dışındaki diğer katil mayalar ise 30 °C’ da birtek optimum katil aktivite göstermiştir. Bu izolatlar için optimum pH değerleri 2.9 ile 5.0 arasında değişmiştir. 35 °C’ da 36.1 dışındaki bütün izolatlar katil aktivitelerini

kaybetmişlerdir. 0.01 mg/lt sikloheksimid varlığında 24.14 numaralı izolat haricinde bütün izolatlar katil aktivitelerini korurken, 25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatlar dışındaki izolatlar artan antibiyotik konsantrasyonlarında katil aktivitelerini kaybetmişlerdir. Bu iki izolatın katil aktiviteleri ise 0.3 mg/lt sikloheksimid konsantrasyonunda inaktive edilmiştir. İzolatların katil aktiviteleri üzerine UV' nin belirgin bir etkisi tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızda katil aktivite için optimum sıcaklıklar 21-30 °C ve optimum pH 4.2-5.0 değerleri arasında belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara uygun olarak sikloheksimid varlığı (0.2 ppm, 1.5 mg/lt) ve yüksek sıcaklıkta inkübasyonun izolatlarda katil aktiviteyi elimine ettiği ve UV' nin bu aktivite üzerine etkisinin olmadığı diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (42, 48). *Kluyveromyces* katil mayaları için optimum pH 4.5, *Hansenula* genusu katil izolatları için ise bu aktivitenin pH 2.9-6.0 arasında değişiklik gösterdiği, bazı izolatlarda pH arttıkça katil aktivitenin arttığı, bazılarında ise azaldığı bildirilmiştir (48). *H. uvarum* için pH 5.0' ın üstü ve 25-35 °C' da katil aktivitenin inaktif olduğu, optimum pH' nın ise 4.2-4.6 arasında değiştiği tespit edilmiştir (25). Shimizu ve ark. (35) K2 tip katil mayalar için optimum pH' yı 4.0-4.2, K1 ve K3 tipler için 4.4-4.9 olarak bildirmiştir. Ayrıca katil aktivitenin pH 2.9-4.9 arasında gözlemlendiği, 5.0' da aktivite kararlılığının azaldığı, 5.4' ün üzerinde ise gözlenmediği, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uygunluk gösteren bir şekilde tespit edilmiştir. Aynı çalışmada yüksek sıcaklıkta aktivite eliminasyonu sadece 3 izolatta bildirilmiştir. K2 ve K3 tiplerde pH 4.6' nın üzerinde, diğer katil tipler için ise pH 5.0' ın üzerinde geri dönüşümsüz olarak katil aktivitenin inaktive edildiği Young ve Yagui (22) tarafından bildirilmiştir. Aynı çalışmada K3 tip katil toksinlerin sıcaklığa K1 ve K2 tip toksinlerden daha dayanıklı olduğu, K1 ve K3 tip toksinlerin sikloheksimid varlığında aktivitelerini kaybettiği, K2 tip toksinlerin ise bu etkiye daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada, yüksek sıcaklık ve sikloheksimid varlığında katil aktivitelerini kaybeden K1 ve K3 tip katil mayalarda katil aktiviteden sorumlu olan dsRNA' nın bulunduğu belirtilmiştir. Katil aktivite eliminasyonu gözlenen bu suşlarda dsRNA' nın bulunuşu, fakat eliminasyon göstermeyenlerde dsRNA' nın tespit edilemeyişi nedenlerinden dolayı katil aktivitenin sitoplazmik kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (22). Yüksek sıcaklıktaki aktivite eliminasyonunu katil plazmidin bu sıcaklıkta korunması için gerekli bir mekanizmanın varlığına yada katil toksinin kromozomal kodlu olmasına bağlamışlardır (35).

Young ve Yagui (22) sadece *Saccharomyces* genusuna ait suşlarda katil aktivitenin siklohekzimid varlığından ve yüksek sıcaklıktan etkilendiğini, diğer genoslara ait katil mayalarda ise bunun gözlenmediğini ve bu mayaların daha yüksek bir ısı stabilitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaya paralel sonuçlar Zorg ve ark. (57) 1988 tarafından da tespit edilmiştir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada *Saccharomyces* genusu üyesi K1 tiplerin yüksek sıcaklıkta, K2 tiplerin ise siklohekzimid varlığında katil aktivitelerini kaybettiklerini, *Saccharomyces* genusu dışındaki üyelerin yüksek sıcaklıktan etkilenmediğini, siklohekzimide karşı suşların toleransında dikkate değer ölçüde çeşitlilik gözlendiğini rapor etmişlerdir. *H. uvarum* ve *P. kluyveri* katil mayalarındaki toksin üretiminin pH ve yüksek sıcaklıktan etkilendiği Radler ve ark. (25) tarafından bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, *Saccharomyces* genusu üyeleri katil izolatların yanısıra bu genus dışındaki katil mayalarda da yüksek sıcaklık ve siklohekzimid varlığında aktivite kaybı tespit edilmiştir. Katil mayaların gelişmelerini etkileyen siklohekzimid konsantrasyonunun suşlar arasında çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir (22, 57). Young ve Yagui (22) tarafından yüksek sıcaklıkta eliminasyonun suşlara bağlı olarak çeşitlilik gösterdiği, bazı K1 tiplerde eliminasyon gözlenirken, diğerlerinde ise gözlenmediği rapor edilmiştir. Zorg ve ark. (57) ise *H.uvarum* suşlarının yüksek sıcaklıktan etkilenmemelerini 37 °C' da gelişmemelerine bağlamışlardır. Yapılan bir çalışmada çok fazla sayıda maya suşunun bir şekilde birbirlerinden farklı toksin ürettiğinin açık olduğu ve değişik toksin üreten farklı suşlarının tespit edilmesiyle toksin sınıflandırılmasının değişebileceği öne sürülmüştür (25).

Katil mayalarda toksin üretimi ve bu toksine karşı bağışıklıktan sorumlu olan dsRNA' ların protein sentezi inhibitörü olan siklohekzimid varlığında gelişen hücrelerde, bu antibiyotik subletal konsantrasyonlarında ve yüksek sıcaklıkta elimine oldukları bilinmektedir (52). Siklohekzimidin katil mayalardaki bu eliminasyon etkisi viral replikasyonun protein sentezi üzerine bağımlılığını önermekle birlikte, siklohekzimidin bu etkisi yanında fungal hücreler üzerine direkt etkilerini bildiren raporlarda gözönüne alındığında, bu antibiyotik ile eliminasyonda alternatif mekanizmaların da olabileceği Leibowitz (52) tarafından önerilmiştir.

K1 ve K2 tip katil mayalarda yapılan ayrıntılı çalışmalar sonucunda bu aktiviteden sorumlu M1 ve M2 dsRNA' lar arasında çok az bir sıra benzerliği olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte K1 tip katil virüslerin replikasyonlarının doğal olarak sıcaklığa karşı duyarlı olduğu, bu tip mayaların 37 °C üstünde geliştirilmesinin M1

dsRNA dolayısıyla katil aktivitenin eliminasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (101). Aynı çalışmada bu eliminasyonun bazı K1 tip mayalarda gözlenirken bir kısmında gözlenmediği de bildirilmiştir. Diğer yandan K2 tip katillerin sıcaklığa bağlı aktivite eliminasyonuna karşı oldukça dirençli olduğu tespit edilmiştir (57). Weinstein ve ark. (101) K1 ve K2 tip katillerdeki ısı ile eliminasyon arasındaki farkta L-A dsRNA' ların allellerinin önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir.

Besi ortamının pH' sı, inkübasyon sıcaklığı ve besi ortamında inhibitörlerin varlığı ve miktarları katil aktiviteye etki eden faktörler olarak araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (48). Katil toksinlerle yapılan biyokimyasal ve çapraz reaksiyon testlerinin sonuçlarına göre farklı toksinlerin genel ortak özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir. Bütün katil toksinlerin 35 °C' da inaktive olduğu bildirilmiştir. Bu katil toksinlerin inaktivasyonunun pH 2.0' ın altında geri dönüşümsüz, yüksek pH' larda ise geri dönüşümlü olduğu rapor edilmiştir (22).

Günümüzde ozmotik basınca daha az duyarlı, dolayısı ile çok miktarda şeker ve tuz içeren hamurda etkili olabilecek nitelikte maya üretimi hedeflenmektedir (14). Tamerler (94) tarafından yapılan bir çalışmada ekşi hamur bakterisinin % 4-6.5 NaCl konsantrasyonunda gelişmediği, tuz miktarının % 0.5 gibi çok düşük bir oranda olması gerektiği belirtilmiştir. Test edilen ticari kuru mayalardaki tuz oranı % 0.7 bulunduğundan, katil izolatların aktiviteleri üzerine tuzun etkisini belirlemek için deneylerde % 0, 0.3, ve 0.6' lık NaCl konsantrasyonları kullanılmıştır. Son yıllarda araştırmacılar tarafından tanımlanmakta olan halofilik veya halotolerant katil mayaların katil toksinlerinin yüksek tuz konsantrasyonlarında oldukça etkili olduğu ve tat ve lezzet oluşumunda etkili olan bu mayaların fermentasyon ortamlarında kontaminant mayaların gelişimini inhibe ettiği bildirilmektedir (37). Özellikle Japonya'da yapılan çalışmalarda tuz içeren besin ve turşularda katil mayaların geniş bir yayılıma sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada % 8-10 tuz içeren salamuraların *D. hansenii* suşlarının gelişmesi ve katil aktivitesi için uygun olduğu, bu suşların katil aktivitelerinin besi ortamındaki NaCl konsantrasyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir (37). Aynı çalışmada 32 adet *D. hansenii* suşunun besi ortamında NaCl yoksa katil aktivite göstermediği, 21 adet suşun ise NaCl olmadanda katil aktivite gösterdiği ve bu suşların katil aktivite spektrumlarının NaCl varlığında çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Zeytin salamuralarına benzer oranda tuz (% 6 NaCl) içeren ortamlarda çok az sayıdaki katil mayanın toksisitesini artırarak katil spektrumunu genişlettiği ayrıca bazı mayalarda katil aktivitenin belirlenebilmesi için besi ortamında NaCl' nin bulunması

gerektiği Llorente ve ark. (41) tarafından bildirilmiştir. Çalışmamızda artan tuz konsantrasyonunda geliştirilen katil izolatların inhibisyon zonları tuz içermeyen test ortamında artış göstermiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarında hem duyarlı hemde katil suşlarda sonuçlar çeşitlilik göstermekle birlikte Llorente ve ark.'nın (41) elde ettiği sonuçlara uygun olarak birçok durumda besi ortamındaki tuz konsantrasyonu artıkça suşların toksisiteside artmıştır.

Katil mayaların dağılışı ve ekolojik rolleri hakkında çalışmalar yapılmış olmasına rağmen henüz bu mayaların davranışları üzerine etkili olan faktörler araştırmacılar tarafından tam olarak açığa çıkarılmamıştır. Bununla birlikte katil aktivitenin belirlenmesinde uygun duyarlı suşun ve deney parametrelerinin seçiminin etkili olduğu yapılan çalışmalar sonucunda karşımıza çıkmaktadır (47). Mayalarda katil aktivite üzerine farklı tuz konsantrasyonlarının etkisini belirlemek için Suzuki ve ark. (37) ve Llorente ve ark. (41) tarafından yapılan çalışmalarda tuzun seçilmiş hedef suşlara karşı mayalardaki katil aktivite üzerine etkisi olduğu belirlenmiş ama bu olayın etki mekanizması ve NaCl ile duyarlı suş ve toksin arasındaki etkileşim tam olarak açığa çıkarılmamıştır. Bu çalışmalarda NaCl varlığı veya yokluğunda katil aktivite arasındaki farkın NaCl' nin duyarlı suşun gelişmesi üzerine etkisinden olabileceği, üretilen toksin miktarının ve yapısının da bu konuda önemli role sahip olabileceği bildirilmiştir. Tuza bağlı olarak katil aktivitedeki değişim sadece tuzlu gıdalardan izole edilen mayalarda değil laboratuvar suşlarında da rapor edilmiştir. Çalışmamızda tuzun ekşi hamurdan izole edilen katil mayalarda bu aktivite üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Tuzun katil mayalarla duyarlı mayalar arasındaki yarışta ilave seçici bir avantaj sağlayabileceği bu mayaların fermentasyon son ürününe organoleptik karakterler sağlamada önemli olduğu önceki çalışmalarda bildirildiği için elimizdeki katil ekşi hamur suşları ile bu konuda çalışmalar yapılmasının, konunun aydınlatılmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Son on yıldır floresans mikroskopi için kullanılan yöntemlerde önemli bir ayırt edicilik ve spesifiklik kaydedilmiştir. Araştırmacılar tarafından iki tip floresans çalışılmaktadır. Primer floresans olarak adlandırılan birinci tip floresansta hücrelerde bulunan maddelerdeki doğal floresans incelenmektedir. İkinci tipte ise, floresans boyalar ile hücrelerde indüklenen sekonder floresans çalışılmaktadır. Ayrıca araştırmacılar tarafından florokromların antikorlar ile birlikte kullanılmasıyla hücre içindeki veya yüzeyindeki antijenlerin lokasyonu ve identifikasyonuda belirlenebilmektedir. Klasik florokromlar maya sitolojisi için vital boyalar olarak iş

görmektedir. Bu boyalar son yıllarda özellikle maya hücre duvarı ve hücre iskeleti ile ilgili çalışmalarda araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Fluorescein ve Rhodamine B bu çalışmalarda tercih edilen iki önemli florokromdur. Her iki boyada isothiocyanate formda kullanılır ve suda çözünen vital boyalardır. Fluorescein isothiocyanate (FITC) bağlı antikolar yeşil-sarı floresans verirken, Rhodamine B işaretli antikolar kırmızı-truncu renk floresans vermekteler (85, 88). Özellikle 1980' li yıllardan sonra FITC ve FITC işaretli antikolar kullanılarak katil mayalardaki bu aktiviteden sorumlu proteinin identifikasyonu, lokasyonu ve etki mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır (70, 86).

Çalışmamızda Rhodamine B ölçüm yöntemi, Fluorescein boyası kullanılarak 25.2 ve 25.5 numaralı katil izolatların filtre edilmiş ve edilmemiş toksinlerinin lethal dozlarının ($LD_{(50)}$) belirlenmesi için kullanılmıştır. Toksinden etkilenen ölü duyarlı hücrelerin sarı floresans verdiği, etkilenmeyen canlı hücrelerin ise, floresans ışımaya göstermediği tespit edilmiştir. Bu tespitten yararlanılarak ölü ve canlı hücreler ışık ve floresan mikrofotografi yöntemi ile ve Thoma lamı kullanılarak birbirinden rahatça ayırt edilmiş ve sayılmıştır. N/N_T oranlarından elde edilen $LD_{(50)}$ verilerine göre 25.5 numaralı izolatın filtre edilmemiş toksinini $LD_{(50)}$ değeri yaklaşık % 50' lik toksin dilüsyonuna karşılık gelirken, bu değer 25.2 numaralı izolat için yaklaşık % 40' lık toksin dilüsyonda tespit edilmiştir. Evans' a (85) göre Vandrejs ve Palkova tarafından Rhodamine B ölçüm yöntemi ile yapılan bir çalışmada ise süper katil suş *S. cerevisiae* T158C için $LD_{(50)}$ % 0.9' luk toksin dilüsyonunda elde edildiği için bizim izolatlarımız süper katil suş olarak sınıflandırılmaz. Çalışmamızda toksinler filtreden geçirildiğinde toksin aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Katil maya kültür filtratı 0.2 μm ' lik selüloz asetat filtreden geçirildiğinde katil aktivitenin ortadan kalkması floresans boya ile elde edilen bu sonuçlarla da desteklenmektedir. Katil toksinlerin filtreden geçirilmesinin toksin aktivitesini absorbladığı Shimizu ve ark. (35) tarafından da rapor edilmiştir.

Evans' a (85) göre Vandrejs ve Palkova tarafından yapılan başka bir çalışmada *K. lactis* katil toksininin duyarlı hücrelerde sitoplazma membran geçirgenliğini bozmadan hücre döngüsünün G1 evresini bloke ederek etki göstermesinden dolayı bu tip toksinler için Rhodamine B ölçüm yönteminin uygun olmadığı belirlenmiştir. Bu tip toksinler için başka boyalarla birlikte diğer bir ölçüm yöntemi geliştirmişlerdir. Bu sonuç ve K28 tip referans katil toksini ile muamele ettiğimiz duyarlı hücrelerde floresans boyama sonuçlarımıza göre floresan ışımaya tespit etmediğimiz için 25.2 ve

25.5 numaralı izolatların toksinlerinin sitoplazmik membran geçirgenliğini bozarak etki gösteren katil toksinler sınıfına üye olduklarını söyleyebiliriz.

Araştırmacılar tarafından mayalarda katil aktivitenin belirlenmesi için katı besi ortamı kullanılarak yapılan testlerin bazı dezavantajlara sahip olduğu bildirilmiştir. Besi ortamındaki şekerin öncelikli olarak tüketiminin, toksinin agara difüzyonunun, besi ortamının metabolit konsantrasyonunun ve heterojenitesinin bu testlerde dikkate alınmadığı belirtilmektedir (87). Ayrıca katı besi ortamının kullanıldığı testlerde katil aktivitenin kantitatif olarak belirlenmesinde de güçlükler olduğu rapor edilmiştir. Bunlara ilaveten toksin aktivitesini inhibisyon zon çapı ölçümü ile belirlemeye çalışan yöntemler en az 48 saat sonra sonuç verdiği için araştırmacılar daha kısa sürede sonuç alabilecekleri yöntemler geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Araştırmacılar tarafından sıvı kültür ortamında katil toksin aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi için geliştirilen bu yöntemlerden birisi düşük konsantrasyonlarda yüksek kararlılık veren fluoresans boyaların kullanımıdır (85). Diğer bir yöntem ise Portugal ve ark. (87) tarafından geliştirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada, eksponansiyel fazdaki duyarlı hücrelerin bulunduğu sıvı besi ortamına farklı miktarlarda toksin ilave ederek, toksinin % katil aktivite değerini hesaplamaya çalışmışlardır. Çalışma sonucunda katil toksinin besi ortamında bulunmasının, bu ortamdaki duyarlı suşun canlı hücre sayısında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Portugal ve ark.'nın (87) uyguladıkları bu yöntem çalışmamızda, 25.2 ve 25.5 numaralı izolatların katil toksinlerinin MY1 ve MY2 ticari suşları üzerine olan katil aktivitelerinin kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, katil toksinler MY1 suşu için besi ortamına 30 ml eklendiğinde (% 20' lik toksin dilüsyonu), MY2 suşu için ise 50 ml eklendiğinde (% 33' lük toksin dilüsyonu) canlı hücre sayısında en yüksek seviyede azalma tespit edilmiştir. Bu toksin konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlar % katil aktivite değerleri ile de uygunluk göstermiştir. Portugal ve ark. (87) yaptıkları çalışma sonucunda *S. cerevisiae* K1 (K2 tip) toksininin sıvı besi ortamına 50 ml eklenmesinin (% 33' lük toksin konsantrasyonu) aynı ortamdaki *S. cerevisiae* 522D (duyarlı suş) canlı hücre sayısında önemli bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Portugal ve ark.'ı (87) toksin etkisinin inkübasyonun 10. saatinden sonra ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise bu etki, MY1 suşu için inkübasyonun 3. saatinden, MY2 suşu için ise 6. saatinden itibaren ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu deneyden elde ettiğimiz sonuçlar katı besi ortamı üzerinde yapılan katil aktivite-

duyarlılık testlerinden elde edilen sonuçları doğrulamakla birlikte toksinlerin katil aktivitesinin kantitatif olarak hesaplanmasına da olanak sağlamıştır.

Portugal ve ark. (87) sıvı besi ortamına eklenen toksin miktarı ile canlı hücre sayısındaki düşüş arasında doğrusal bir ilişki belirlemişlerdir. Çalışmamızda katil toksinlerin sıvı besi ortamına 15 ml eklenmesinin (% 10' luk toksin konsantrasyonu) MY2 suşu için toksik etki yapmadığı gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda katil toksinlerin farklı konsantrasyon değerlerinin MY1 ve MY2 suşlarına bağlı olarak toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Araştırmacılar antagonistik katil fenotip varlığının doğal maya populasyonlarında seçici bir avantaj sağlayabileceğini bildirmektedirler (2). Katı besi ortamında yapılan testler sonucunda antagonizimin her zaman ortaya çıkarılmadığı bilinmektedir. Sıvı besi ortamı kullanılarak yapılan deneylerde kısa sürede sonuç alınması ve katil aktivitenin kantitatif olarak hesaplanabilmesinin yanı sıra katil ve duyarlı mayalar arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya çıkarılabileceği düşünülmektedir. Katil fenomenin modellenmesi, kinetik profilinin çıkarılması ve katil ve duyarlı mayaların kültür ortamındaki davranışlarının belirlenmesinde bu tip deneylerin önemli rol alacağı düşünülmektedir (87). Çalışmamızın bu konuda ileriki yıllarda yapılacak olan daha detaylı çalışmalar için bir örnek teşkil ettiği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda katil mayalar tarafından salgılanan katil proteinlerin moleküler ağırlıklarının 10-20 kDa arasında değiştiği belirlenmiştir (53). K1 toksininin 20 kDa (32), K2 toksininin 16 kDa (87), K28 toksininin ise 16 kDa (72) moleküler ağırlığına sahip olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda SDS-PAGE yöntemi ile *S. cerevisiae* NCYC 1006 (duyarlı suş), *S. cerevisiae* NCYC 232 (katil suş) ve 25.2 numaralı izolatların ekstrasellüler protein profili belirlenmeye çalışılarak, 25.2 numaralı izolatın katil aktiviteden sorumlu olan proteininin varlığı moleküler seviyede belirlenmeye çalışılmıştır. Bu profilde süzüntü ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi uygulanan örneklerde görülen bantların aseton çöktürmesi uygulanan örneklerle göre daha az yoğun bantlar olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu örneklerde katil proteinin belirleyicisi olacak bir protein bantına rastlanmamıştır. Aseton ile çöktürülen örneklerde *S. cerevisiae* NCYC 232 ve 25.2 numaralı katil maya izolatında K1 tip katil protein varlığını belirleyen kesin bir protein bantı gözlenmemiştir. Bu nedenle 25.2 numaralı izolatımızın katil aktivitesinden sorumlu olan proteinin varlığını moleküler seviyede belirleyemedik. Bu sonucun ilgilendiğimiz proteinin süzüntüde yoğunluğunun çok az olabileceğinden, izolasyon sırasında çeşitli faktörlerden etkilenerek yapısının

bozulmasından kaynaklanabileceğinden, bu hususlar göz önüne alınarak, ileriki çalışmaların daha büyük hacimlerde süzüntü ile çalışılıp ultrafiltrasyon ile proteinin konsantrasyonunun artırılarak, değişik saflaştırma işlemleri uygulanarak ve jelin boyutu ve konsantrasyonunun değiştirilerek yapılması önerilebilir.

Ekmek mayası üretiminde kullanılan geleksel maya suşlarının, hem tüketicinin hem de üreticinin isteklerine cevap verecek özellikler yönünden geliştirilmesi ve iyileştirilmesi, önümüzdeki yıllarda daha da önem kazanacak bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Patent sağlanması ve korunması açısından da önemli olan bu konuda başarılı bir şekilde yol alınabilmesi için maya fizyolojisi, maya genetiği ve sistemleri konusunda daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç olduğu göz ardı edilemez. Ayrıca genetik mühendisliği yolu ile elde edilen iyileştirilmiş suşların, endüstride uygulama alanına sokulması için, fermentasyon özelliklerindeki ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bu konulara ilaveten genetik olarak modifiye edilmiş suşlar kullanılarak elde edilen besin maddeleri ve içkiler konusunda tüketicinin korunmasına yönelik yasal düzenlemelerde yapılmalı ve halk bu konularda bilinçlendirilmelidir. Henüz büyük bir çoğunluğu laboratuvar aşamasında olan ekmek mayası suşlarının genetik mühendisliği teknikleri ile iyileştirilmesi çalışmaları, karşılaşılan güçlük ve olumsuzluklara rağmen özellikli üreticiler için umut vaat etmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda ekşi hamur örneklerinden izole edilen katil mayalardan *S. cerevisiae* suşu olan tek izolat 25.2 numaralı maya izolatu olarak belirlenmiştir. Ekmek mayası üretiminde *S. cerevisiae* suşları kullanıldığı için bu izolatumuzun identifikasyonunun moleküler testler ile desteklenmesini takiben, ekmek mayası üretimi için uygunluğunun test edilmesi gerekmektedir. Bu testlerden alınacak olumlu sonuçlar neticesinde, izolatumuzun taşıdığı katil karakterin hem patent sağlama hemde ekmek mayası üreticilerinin yeni isteklerine cevap verecek niteliklerinden dolayı Türkiye ve dünyada ekmek mayası üreticileri için bir ilk olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca daha ileriki çalışmalarda 25.2 numaralı izolatu katil fenotipinden sorumlu olan genetik elementin belirlenmesi ve bunun *S. cerevisiae* suşlarına moleküler teknikler ile aktarımının araştırmacılar için ilginç bir konu olacağı açıkça görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. BERRY, D. R., *The Biology of Yeast.*, Edward Arnold (publishers) Ltd., London, 1982.
2. BUSSEY, H., Boone, C., Zhu, H., Vernet, T., Whiteway, M., Thomas, D. Y., *Genetic and Molecular Approachs to Synthesis and Action of The Yeast Killer Toxin.*, Experientia, 46, 193-200, 1990.
3. PETERING, J. E., Symons, M. R., Langridge, P., Henschke, P. A., *Determination of Killer Yeast Activity in Fermenting Grape Juice by Using a Marked Saccharomyces Wine Yeast Strain*, Appl. and Enviromen. Microbiol., November, 3232-3236, 1991.
4. SAKAI, Y., Goh, T. K., Tani, Y., *High-frequency Transformation of A Methylophilic Yeast, Candida bondii, With Autonomously Replicating Plasmids Which Are Also Functional in Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Bacteriology, June, 3556-3562, 1993.
5. HAMMOND, J. R. M., *Genetically-Modified Brewing Yeasts For The 21st Centry. Progress to Date*, Yeast, 11, 1613-1627, 1995.
6. MURAI, T., Ueda, M., Yamamura, M., Atomi, H., Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Osumi, M., Amachi, T., Tanaka, A., *Constraction of a Starch-Utilizing Yeast by Cell Surface Engineering*, Appl. and Environ. Microbiol, April, 1362-1366, 1997.
7. REED, G., and Nagodawithana T. W., *Yeast Technology*, 2nd edition, An AVI Book, U.S.A., 1991.
8. KREGER-VAN RIJ, N. J. W., *"The Yeasts"*. Elsevier, Amsterdam, 1984.
9. ROSE, A. H. and Harrison, J. S., *The Yeaasts*, Volume 4, Academic Press Limited, London, 1987.
10. MEYERS, R. A., *Molecular Biology and Biotechnology. A Comprehensive Desk Reference*, VCH, 1995.
11. GRIFFITHS, A. J. F., *Naturel Plasmids of Filamentous Fungi*, Microbiological Reviews, December, 673-685, 1995.
12. TEMİZKAN, G., *Maya Teknolojisinde Rekombinant DNA Yöntemleri-Uygulamalı Eğitim Kursu Notları*, 12-16 Eylül, İstanbul Üniversitesi, BİYOGEM, 1994.
13. BARNETT, J. A., Payne , R. W., Yarrow, D., *Yeasts: Characteristics and Identification*, 2nd edition., Cambridge University Press, New York, USA, 1990.

14. CANBAŞ, A., *Ekmek Mayacılığı*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Yayın no: 22, Ankara, 1995.
15. AKMAN, A. V., Yazıcıoğlu, T., *Fermentasyon Teknolojisi 1. Kitap*, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 51, Ders Kitabı: 22, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1962.
16. DAĞAŞAN, L., *Maya Teknolojisinde Rekombinant DNA Yöntemleri-Uygulamalı Eğitim Kursu Notları*, 12-16 Eylül, İstanbul Üniversitesi, BİYOGEM, 56-65, 1994.
17. SONE, H., Fujii, T., Kondo, K., Shimizu, F., Tanaka, J., Inoue, T., *Nucleotid Sequence and Expression of The Enterobacter aerogenes α -acetolactate Decarboxylase Geni in Brewer's Yeast*, Appl. and Environ. Microbiol., January, 38-42, 1988.
18. LANCASHIRE, W. E., Carter, A. T., Howard, J. J., Wilde, R. J., *Superattenuating Brewing Yeast*, EBC Congress, 491-498, 1989.
19. KIM, J., Alizadeh, P., Harding, T., Hefner-Gravink, A., Klionsky, D. J., *Distruption of The Yeast ATH1 Gene Confers Better Survival After Dehydration, Freezing and Ethanol Shock: Potential Commercial Applications*, Appl. and Environ. Microbiol, May, 1563-1569, 1996.
20. YUAN, J. Q., Bellgardt, K. H., *Investigation on The Optimal Control Storage Stability of Compressed Baker's Yeast Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biotechnology, 32, 261-272, 1994.
21. PAMİR, M. H., *Tokat-Amasya Çevresi Şaraphanelerinden İzole Edilen Şarap Mayası Suşlarının Teknolojik Özellikleri.*, Fermentasyon Teknolojisi Kürsüsü Çalışmalarından, 1-20, 1984.
22. YOUNG, T. W., and Yagiu, M., *A Comparision of The Killer Character in Different Yeasts and its Classification*, Antonie van Leeuwenhoek, 44, 59-77, 1978.
23. MIDDELBEEK, E. J., Van De Laar, H. H. A., Hermans, J. H. M., Stumm, C., Vogels, G. D., *Physiological Conditions Affecting The Sensitivity of Saccharomyces cerevisiae to a Pichia kluyveri Killer Toxin and Energy Requirement For Toxin Action*, Antonie van Leeuwenhoek, 46, 483-497, 1980.
24. ROSINI, G., *The Occurrence of Killer Characters in Yeasts*, Can. J. Microbiol, 29, 1462-1464, 1983.
25. RADLER, F., Pfeiffer, P., and Dennert, M., *Killer Toxin in New Isolates of The Yeasts Hanseniaspora uvarum and Pichia kluyveri.*, FEMS Microbiology Letters, 29, 269-272, 1985.
26. LEHMANN, P. F., Lemon, M. B., and Ferencak, W. J., *Antifungal Compounds ("Killer Factors") Produced By Kluyveromyces Species and Their Detection an Improved Medium Containing Glycerol*, Mycologia, 79 (5), 790-794, 1987.

27. CAILLIEZ, J., Cantelli, C., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, W., Morace, G., Polonelli, L., *Pichia anomala* Killer Toxin Secretion in The Presence of Tunicamycin, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 31, 337-347, 1993.
28. RADLER, F., Herzberger, S., Schönig, I., and Schwarz, P., *Investigation of a Killer Strain of Zygosaccharomyces bailii.*, *Journal of General Microbiology*, 139: 495-500, 1993.
29. WICKNER, R. B., *Double-Stranded RNA Viruses of Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiological Reviews*, March, 250-265, 1996.
30. PFEIFFER, P; Radler, F., Caspritz, Hanel, G. H., *Effect of a Killer Toxin of Yeast on Eucaryotic Systems*, *Appl. and Environ. Microbiol*, April, 1068-1069, 1988.
31. POLINELLI, P., Conti, S., Campani, L., Morace, G., Fanti, F., *Yeast Killer Toxins and Dimorphism*, *J. of Clinical Microbiology*, June, 1423-1425, 1989.
32. ZHU, H., Bussey, H., *The K1 Toxin of Saccharomyces cerevisiae Kills Spheroplast of Many Yeast Species*, *Appl. and Environ. Microbiol*, August, 2105-2107, 1989.
33. TIPPER, D. J., Bostian, K. A., *Double-Stranded Ribonucleic Acid Killer Systems in Yeasts*, *Microbiological Reviews*, June, 125-156, 1984.
34. POLONELLI, L., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, W., Chezzi, C., Morace, G., *Interfaces of The Yeast Killer Phenomenon*, *Critical Reviews in Microbiology*, 18 (1), 47-87, 1991.
35. SHIMIZU, K., Adachi, T., Kitano, K., Shimazaki, T., Totsuka, A., Hara, S., and Dittrich, H. H., *Killer Properties of Wine Yeasts and Characterization of Killer Wine Yeasts*, *J. Ferment. Technol.*, 63 (5), 421-429, 1985.
36. STARMER, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M-A., Phaff, H. J., *The Ecological Role of Killer Yeasts in Natural Communities of Yeasts*, *Can. J. Microbiol.*, 33, 738-796, 1987.
37. SUZUKI C., Yamada, K., Okada, N., and Nikkani, S., *Isolation and Characterization of Halotolerant Killer Yeasts From Fermented Foods*, *Agric. Biol. Chem.*, 53 (10), 2593-2597, 1989.
38. ÖZÇELİK, F., and Dönmez, S., *Killer Yeast and The Determination of Killer Characters of some Yeasts*, *Tr. J. of Biology*, 17, 1-4, 1993.
39. VAGNOLI, P., Musmanno, R. A., Cresti, S., Di Maggio, T., and Corata, G., *Occurrence of killer Yeasts in Spontaneous Wine Fermentations From the Tuscany Region of Italy*, *Appl. and Environ. Microbiol*, 59 (12), 4037-4043, 1993.
40. HIDALGO, P. and Flores, M., *Occurrence of The Killer Character in Yeasts Associated With Spanish Wine Production*, *Food Microbiology*, 11, 161-167, 1994.

41. LLORENTE, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M., and Spencer-Martins I., *Effect of Salt on The Killer Phenotype of Yeasts From Olive Brines*, Appl. and Environ. Microbiol., 63 (3), 1165-1167, 1997.
42. KITANO, K., Sato, M., Shimazaki, T., and Hara, S., *Occurance of Wild killer Yeasts in Japanese Wineries and Their Characteristics*, J. Ferment. Technol., 62, (1), 1-6, 1984.
43. TREDoux, H. G., Tracey, R. P., and Tromp, A., *Killer Factor in Wine Yeasts and Its Effect on Fermentation*, S. Afr. J. Enol. Vitic., 7 (2), 105-112, 1986.
44. HEARD, G. M. and Fleet, G. H., *Occurance and Growth of Killer Yeasts During Wine Fermentation*, Appl. and Environ. Microbiol., 53 (9), 2171-2174, 1987.
45. PASQUAL, S., Carrau, J. L., Serafini, L. A., and Dillion, A. J. P., *A simple Method to Detect Killer Yeasts in Industrial Systems*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 70 (3), 180-181, 1990.
46. JACOBS, C. J. and Van Vuuren, H. J. J., *Effects of Different Killer Yeasts on Wine Fermentations*, Am. J. Enol. Vitic., 42 (4), 295-300, 1991.
47. CANSADO, J., Lango, E., Calo, P., Sieiro, C., Velazquez, J. B., and Villa, T. G., *Role of Killer Characteret in Spontaneous Fermentations From NW Spain: Ecology, Distribution and Significance*, Appl. Microbiol. Biotechnology, 34, 643-647, 1991.
48. MICHALCAKOVA, S., Sulo, S. P., Slavikova, E., *Killer Yeasts of Kluyveromyces and Hansenula Genera With Potential Application in Fermentation Therapy*, Acta Biotechnol, 13 (4), 341-350, 1993.
49. ÖZÇELİK, F., Türkmen, U., Ateş, S., *Farklı Bölgelerden İzole Edilen Şarap Mayalarının Killer Özelliklerinin Belirlenmesi*, Tr. J of Biology, 20, 241-249, 1996.
50. GUNGE, N., Tamaru, A., Ozawa, F., Sakaguchi, K., *Isolation and Characterization of Linear Deoxyribonucleic Acid Plasmids From Kluyveromyces lactis and The Plasmid-Associated Killer Character*, J. of Bacteriol., January, 382-390, 1981.
51. GUNGE, N., Murata, K., Sakaguchi, K., *Transformation of Saccharomyces cerevisiae With Linear DNA Killer Plasmid From Kluyveromyces lactis.*, Journal of Bacteriology, July, 462-464, 1982.
52. LEIBOWITZ, M. J., *Role of Protein Synthesis in Tha Replication of The Killer Viruss of Yeast*, Current Genetics, 5, 161-163, 1982.
53. KAGAN, B. L., *Mode of Action of Yeast Killer Toxins: Channel Formation in Lipid Bilayer Membranes*, Nature, 302 (21), 1983.
54. SEKI, T., Chol, E., Ryu, D., *Constraction of Killer Wine Yeast Strain*, Appl. and Environ. Microbiol., May, 1211-1215, 1985.

55. STARK, M. J. R., Boyd, A., *The Killer Toxin of Kluyveromyces lactis: Characterization of The Toxin Subunits and Identification of The Genes Which Encode Them*, The EMBO Journal, 5 (8), 1995-2002, 1986.
56. RADLER, F., Schmitt, M., *Killer Toxins of Yeasts: Inhibitors of Fermentation and Their Adsorption*, Journal of Food Protection, 50 (3), 234-238, 1987.
57. ZORG, J., Kilian, S., Radler, F., *Killer Toxin Producing Strains of The Yeasts Hanseniaspora uvarum and Pichia kluyveri.*, Arch Microbiol, 149, 261-267, 1988.
58. WESELOWSKI-LOUVEL, M., Tanguy-Rougeal, C., Fukuhara, H., *A Nuclear Gene Required For The Expression of The Linear DNA-Associated Killer System in The Yeast*, Yeast, 4, 71-81, 1988.
59. RADLER, F., Schmitt, M. J., Meyer, B., *Killer Toxin of Hanseniaspora uvarum*, Arch Microbiol, 154, 175-178, 1990.
60. STARK, M. J. R., Boyd, A., Mileham, A. J., Romanos, M. A., *The Plasmid-Encoded Killer System of Kluyveromyces lactis: A Review*, Yeast, 6, 1-29, 1990.
61. BARBONE, F. P., Leibowitz, M. J., *Coupling of Killer Virus Transcription with Translation in Yeast cell-free Extracts*, Journal of General Virology, 72, 1755-1760, 1991.
62. WELSH, J. D., Leibowitz, M. J., *Transcription of Killer Virion Double-Stranded RNA in Vitro*, Nucleic Acid Research, 8 (11), 2365-2375, 1980.
63. BARBONE, F. P., Williams, T. L., Leibowitz, M. J., *Yeast Killer Virus Transcription Initiation in Vitro*, Virology, 187, 333-337, 1992.
64. TOMMASINO, M., *Killer System of Kluyverodmyces lactis: The Open Reading Frame 10 of The pGK12 Plasmid Encodes a Putative DNA Binding Protein*, Yeast, 7, 245-252, 1991.
65. SCHAFFRATH, R., Meacock, P. A., *Kluyveromyces lactis Killer Plasmid pGKL2: Molecular Analysis of an Essential Gene, ORF5*, Yeast, 11, 615-628, 1995.
66. PFEIFFER, P., Radler, F., *Purification and Characterization of Extracellular and Intracellular Killer Toxin of Saccharomyces cerevisiae Strain 28*, Journal of General Microbiology, 128, 2699-2706, 1982.
67. SCHMITT, M. J., Radler, F., *Mannoprotein of The Yeast Cell Wall as Primary Receptor For The Killer Toxin of Saccharomyces cerevisiae Strain 28*, Journal of General Microbiology, 133, 3347-3354, 1987.
68. SCHMITT, M., Radler, F., *Molecular Structure of The Cell Wall Receptor For Killer Toxin KT28 in Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Bacteriology, May, 2192-2196, 1988.

69. SCHMITT, M., Radler, F., *Purification of Yeast Killer Toxin KT28 by Receptor-mediated Affinity Chromatography*, Journal of Chromatography, 469, 448-452, 1989.
70. SCHMITT, M., Brendel, M., Schwarz, R., Radler, F., *Inhibition of DNA Synthesis in Saccharomyces cerevisiae by Yeast Killer Toxin KT28*, Journal of General Microbiology, 135, 1529-1535, 1989.
71. SCHMITT, M. J., Tipper, D. J., *K28 A Unique Double-Stranded RNA Killer Virus of Saccharomyces cerevisiae*, Molecular and Cellular Biology, September, 4807-4815, 1990.
72. SCHMITT, M. J., Radler, F., *Blockage of Cell Wall Receptor for Yeast Killer Toxin KT28 With Antimannoprotein Antibodies*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, August, 1615-1618, 1990.
73. THIELE, D. J., Wang, R. W., Leibowitz, M. J., *Separation and Sequence of The 3' Termini of M Double-Stranded RNA From Killler Yeast*, Nucleic Acid Research, 10 (5), 1661-1678, 1982.
74. HANNING, E. M., Thiele, D. J., Leibowitz, M. J., *Saccharomyces cerevisiae Killer Virus Transcripts Contain Template-Coded Polyadenylate Tracts*, Molecular and Cellular Biology, January, 101-109, 1984.
75. THIELE, D. J., Hannig, E. M., Leibowitz, M. J., *Genome Structure and Expression of a Defective Interfering Mutant of The Killer Virus of Yeast*, Virology, 137, 20-31, 1984.
76. WEINSTEIN, L. A., Leibowitz, M. J., *5S RNA and tRNA-like Molecules are Associated With Killer Virus dsRNA of Yeast*, J. Gen. Virol, 67, 191-195, 1986.
77. GEORGOPOULOS, D. E., Leibowitz, M. J., *Nucleotide Phosphotransferase, Nucleotide Kinase and Inorganic Pyrophosphatase Activities of Killer Virions of Yeast*, Yeast, 3, 117-129, 1987.
78. TIPPER, D. J., Schmitt, M. J., *Yeast dsRNA Viruses: Replication Killer Phenotypes*, Molecular Microbiology, 5 (10), 2331-2338, 1991.
79. THIELE, D. J., Hannig, E. M., Leibowitz, M. J., *Multiple L Double-Stranded RNA Species of Saccharomyces cerevisiae: Evidence For Separate Encapsidation*, Molecular and Cellular Biology, January, 92-100, 1984.
80. FRIED, H. M., Fink, G. R., *Electronmicroscopic Heterodublex Analysis of "Killer" Double-Stranded RNA Species From Yeast*, Proc. Natl. Acad. Sci., 75 (9), 4224-4228, 1978.
81. CONG, Y-S., Yarrow, D., Li, Y., Fukuhara, H., *Linear DNA Plasmids From Pichia etchellsii, Debaryomyces hansenii ve and Wingae robertsiae*, Microbiology, 140, 1327-1335, 1994.

82. RUSSEL, I. *Killer Yeast Identification*, ASBC Journal, 44 (3), 123-125, 1986.
83. CLARK, G., *Staining Procedures*, 4th edition, Williams and Wilkins, U.S.A., 1981.
84. SANO, A., Kurita, N., Kunie, I., Coelho, R., Takeo, k., Nishimura, K., Miyaji, M., *A Comparative Study of Four Different Staining Methodes for Estimation of Live Yeast Form Cells of Paracoccidioides brasiliensis*, Mycopathologia, 124,157-161, 1993.
85. EVANS, I. H., *Yeast Protocols Methods in Cell and Molecular Biology. Methods in Molecular Biology, Volume 53*, Humana Press Inc., New Jersey, 1996.
86. CAILLIEZ, J., Morace, M. G., Conti, S., Cantelli, C., Polonelli, L., *Ultrasutritional Immunodetection of a Pichia anomala Killer Toxin: A Preliminary Study*, Biol. Cell, 75, 19-23, 1992.
87. PORTUGAL, F. R., Delia-Dupuy, M. L., Schneider, G., and Strehaiano, P., *Yeast Killer Activity: A Quantitative Study*, Biotechnology Techniques, 8 (11), 797-804, 1994.
88. CAMPBELL, I., and Duffus, J. H., *Yeast, a Practical Approach*. IRL Press Ltd., Oxford, England, 1988.
89. SINGLETON, P., *Introduction to Bacteria, For Students of Biology, Biotechnology and Medicine*, 2nd edition, John Willey and Sons Ltd., West Sussex, England, 1992.
90. BECKER, J. M., Caldwell, G. A., Zachgo , E. A., *Biotechnology a Laboratory Course*, Academic Press Inc., London, England, 1990.
91. TEMİZKAN, G. ve ark., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, (editörler; Güler Temizkan ve Nazlı Arda), İstanbul Üniversitesi, Biyogem Yayın No:1, Nobel Tıp Kitapevleri, 1999.
92. PAMİR, M. H., *Boza Üzerinde Mikrobiyolojik ve Kimyasal Araştırmalar*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 176, Çalışmalar: 109, Ankara Üniversitesi Basım Evi, 1961.
93. HANCIOĞLU, Ö., Karapınar, M., *Microflora of Boza, A Traditional Fermented Turkish Beverage*, International Journal of Food Microbiology, 35, 271-274, 1997.
94. TAMERLER, T., *Ekşi Maya ile Buğday Ekmeğinin Hazırlanması ve Ekşi Maya Mikroorganizmaları*, E. Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi, Seri: B Gıda Mühendisliği, 4 (1), 99-110, 1986.
95. KALAFATOĞLU, H., *Ekşi Maya Mikroorganizmalarının Belirlenmesi ve Ekmek Yapımında Kullanılmaları*, KÜKEM Dergisi, 18 (1), 83-89, 1995.

96. VILJOEN, B. C., and Lues, J. F. R., *The Microbial Populations Associated With Post-Fermented Dough and Compressed Baker's Yeast*, Food Microbiology, 10, 379-386, 1993.
97. TADAYON, R. A., *Characteristics of Yeasts Isolated From Bread Doughs of Bakeries in Shiraz, Iran*, J. Milk Food Technol., 39 (8), 539-542, 1976.
98. GREEN, M. D. and Ibe, S. N., *Yeasts as Primery Contaminants in Yogurts Produced Commercially in Lagos, Nigeria*, Journal of Food Protection, 50 (3), 193-198, 1987.
99. SANNI, A. I., and Lönner, C., *Identification of Yeasts Isolated From Nigerian Treditional Alcoholic Beverages*, Food Microbiology, 10, 517-523, 1993.
100. DEAK, T and Beuchat, L.R., *Identification of Foodborne Yeasts*, Journal of Food Protection, 50 (3), 243-264, 1987.
101. WEINSTEIN, L. A., Capaldo-Kimball, F., Leibowitz, M. J., *Genetics of Heat-Curability of Killer Virus of Yeast*, Yeast, 9, 411-418, 1993.