

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPIFİTİK MAYA HÜCRELERİNİN İZOLASYONU,
TANIMLANMASI VE MİKROKAPSÜLLENEREK
NARENCİYE DEPOLAMADA HASAT SONRASI
BİYOKONTROL AJANI OLARAK KULLANIM
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Buse BERBER ÖRÇEN

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Rabia ÇAKIR

Ağustos, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPIFİTİK MAYA HÜCRELERİNİN İZOLASYONU,
TANIMLANMASI VE MİKROKAPSÜLLENEREK
NARENCİYE DEPOLAMADA HASAT SONRASI
BİYOKONTROL AJANI OLARAK KULLANIM
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Buse BERBER ÖRÇEN tarafından hazırlanan tez çalışması 01.08.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Rabia ÇAKIR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Rabia ÇAKIR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Musa TÜRKER, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mithat ÇELEBİ, Üye
Yalova Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Üye
İstanbul Gelişim Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Rabia ÇAKIR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Epifitik Maya Hücrelerinin İzolasyonu, Tanımlanması ve Mikrokapsüllenerek Narenciye Depolamada Hasat Sonrası Biyokontrol Ajanı Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Buse BERBER ÖRÇEN

İmza



Oğluma,

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel çalışmalarımdayanımdaya olup beni her zaman destekleyen, cesaretlendiren ve yönlendiren sevgili danışmanım Prof. Dr. Rabia ÇAKIR'a,

Tez çalışmalarım süresince tez izleme komitesinde bulunarak sorularıyla ve yönlendirmeleriyle çalışmalarımdaya destek olan Prof. Dr. Musa TÜRKER ve Dr. Öğr. Üyesi Mithat ÇELEBİ'ye,

Bir hayalle kurduğumuz Nanomik Biyoteknoloji Şirketi'ni birlikte güçlendirmek için çalıştığımız değerli çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca aldığım her kararda arkamdaya duran, tüm zorluklara karşı yanımdaya mücadele veren, varlığından güç aldığım sevgili aileme, eşim Arda ÖRÇEN'e ve biricik oğlumuz Atlas ÖRÇEN'e ailem oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

Buse BERBER ÖRÇEN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Narenciyelerde görülen mantar hastalıkları ve ekonomik etkileri	4
2.2 Pestisit pazarı, çeşitleri ve kullanım miktarları	6
2.3 Sentetik fungusitlerin olumsuz etkileri	8
2.4 Sentetik fungusitlerde direnç gelişimi	11
2.5 Biyopestisitler	12
2.6 Biyopestisitlerin biyolojik etkinlikleri	15
2.7 Mikroenkapsülleme Teknolojisi	17
2.8 Mayaların tarımda biyopestisit olarak kullanımı	20
3 MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1 Materyal	29
3.2 Maya Hücrelerinin İzolasyonu ve Yetiştirilmesi	29
3.3 Maya Suşlarının Tanımlanması	30
3.4 Hasat Sonrası Hastalıklara Neden Olan Mantarları Engellileyebilen Antagonistik Mayaların Seçimi	31
3.5 Mikroorganizma Üretiminin Optimizasyonu- Taguchi metodu	32
3.6 Potansiyel biyolojik kontrol ajanı olarak seçilen mayaların uçucu bileşen kapasitelerinin tayini	34
3.7 Maya Türlerinin Sinerjik Etkilerinin Belirlenmesi	34
3.8 Hidrolitik Enzimlerin Belirlenmesi	35
3.9 Biyofilm Oluşumu	35
3.10 Maya Hücrelerinin Mikroenkapsülasyonu	36

3.10.1 Polimer Çözeltisinin Hazırlanması ve Sprey Kurutma İşlemi.....	36
3. 10. 2 Sprey Kurutulmuş Tozun Optik Mikroskopi ve SEM Analizi.....	38
3.10.3 Parçacık Dağılımı ve Boyut Analizi.....	38
3.10.4 Püskürterek Kurutmadan Sonra Canlılık Testi.....	39
3.10.5 Püskürterek Kurutulmuş Maya Hücresinin Antifungal Analizi.....	39
3.10.6 MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	40
3.11 Portakallarda Hasat Sonrası Hastalıkların Kontrolünde Antagonist Mayaların Etkinliğinin Değerlendirilmesi	40
3.12 İstatistiksel analiz.....	41
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1 Mayaların izolasyonu Maya Kolonilerinin Morfolojik Karakterizasyonu..	42
4.2 Maya İzolatlarının Tanımlanması ve Tür Tayini	52
4.3 Antagonistik Mayaların Belirlenmesi	53
4.4 Maya Türlerinin Sinerjik Etkilerinin Belirlenmesi	57
4.5 Mayaların Hidrolitik Enzim ve Uçucu Bileşen Analizleri.....	60
4.6 Mikroorganizma Üretiminin Optimizasyonu- Taguchi metodu	62
4.7 Maya Hücrelerinin Mikrokapsüllenmesi	77
4.8 Portakallarda Hasat Sonrası Hastalıkların Kontrolünde Antagonist Mayaların Etkinliğinin Değerlendirilmesi	82
5 SONUÇ	86
KAYNAKÇA	87
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	97

SİMGE LİSTESİ

a	Ağırlık
rpm	Dakikada devir sayısı
dk	Dakika
h	Hacim
μ	Mikro
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
nm	Nanometre
s	Saat
sn	Saniye
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA	Varyans Analizi
BCA	Biyokontrol Ajansı
CS	Mısır nişastası
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	U.S. Food and Drug Administration (ABD Gıda ve İlaç Dairesi)
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
MDX	Maltodekstrin
SA	Sodyum aljinat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
UV/VIS	Ultraviyole/Görünür Işık
TEPGE	Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü
WPI	Whey protein izolat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Narenciler için hasat sonrası proses aşamaları	5
Şekil 2.2	2019'da kıtaların pestisit kullanımı (ton) miktarları ve 2009'dan bu yana değişimleri	8
Şekil 2.3	Beklenen pestisit Pazar büyüme oranı	11
Şekil 2.4	Biopestisit tarihi	13
Şekil 2.5	Meyve Bitkilerinin Korunmasında Biopestisitler hakkında yıllık yayın çıktısı	14
Şekil 2.6	Çeşitli kapsülleme yöntemleri türleri	18
Şekil 2.7	Püskürtmeli kurutma sistemi	19
Şekil 2.8	Maya hücresinin yapısının şematik gösterimi	21
Şekil 2.9	Mayalara biyokontrol aktivitesi kazandıran çoklu mekanizmalar	21
Şekil 2.10	Mayanın antagonist mekanizmaları	23
Şekil 3.1	Adana-Mersin Bölgesinden Mikroorganizma İzolasyonu	30
Şekil 3.2	İçsel transkripsiyona uğramış boş bölgeler (internal transcribed regions, ITS)	31
Şekil 3.3	Maya izolatlarının antagonist etkisi ölçümünün şematik gösterimi	32
Şekil 3.4	Maya hücre izolatlarının ve Uçucu Organik Bileşiklerinin (VOCs) etkisi ölçümünün şematik gösterimi	34
Şekil 3.5	Maya izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin incelenmesinin şematik gösterimi	36
Şekil 3.6	Spray-dryer üretim parametreleri	38
Şekil 3.7	Önleyici etki çalışmasında uygulanan yöntemin şematik gösterimi	41
Şekil 4.1	İzolasyonları yapılan mayalar morfolojik özellikleri	42
Şekil 4.2	İzole edilen bazı mayaların petri görüntüsü	43
Şekil 4.3	Filogenetik ağaç, nükleer ribozomal dahili kopyalanmış ayırıcı (ITS) bölgesinin dizisine dayanmaktadır. Düğümlerdeki sayı önyükleme değerlerini, dallardaki sayı ise dal uzunluğunu (genetik mesafe) gösterir.	52
Şekil 4.4	Mayaların MIC değerlerinin belirlendiği çalışma	54
Şekil 4.5	(A) M72, M74 ve M77 mayalarının <i>P. italicum</i> ve <i>P. digitatum</i> 'a karşı inhibisyon bölgelerini gösteren Petri kapları ve (B) kontrole kıyasla inhibisyon bölgesi yüzdelерinin (%) grafiğı	56

Şekil 4.6	Proteaz aktivitesi çalışmasında gözlemlenen petri görüntüleri verilmiştir. Soldan sağa kötü etkinlik, orta düzeyde etkinlik ve iyi etkinlik görülmektedir. B. Kitinaz aktivitesi çalışmasında gözlemlenen petri görüntüleri verilmiştir. Koyu renkli görülen kısımlar kitinaz aktivitesinin olmadığı kısımlardır. Görece açık renkli görülen kısımlarsa kitinaz aktivitesini göstermektedir. C. β -1,3-Glucanaz aktivitelerinin test edildiği petri resimleri verilmiştir.	62
Şekil 4.7	6 numara 6A ve 6B replikasyon 21. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	63
Şekil 4.8	6 numara 6A ve 6B replikasyon 24. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	64
Şekil 4.9	6 numara 6A ve 6B replikasyon 27. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	65
Şekil 4.10	6 numara 6A ve 6B replikasyon 45. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	66
Şekil 4.11	6 numara 6A ve 6B replikasyon 48. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	67
Şekil 4.12	6 numara 6A ve 6B replikasyon 51. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	68
Şekil 4.13	6 numara 6A ve 6B replikasyon 69. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	69
Şekil 4.14	8 numara 8A ve 8B replikasyon 21. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	70
Şekil 4.15	8 numara 8A ve 8B replikasyon 24. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	71
Şekil 4.16	8 numara 8A ve 8B replikasyon 27. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	72
Şekil 4.17	8 numara 8A ve 8B replikasyon 45. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	73
Şekil 4.18	8 numara 8A ve 8B replikasyon 48. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	74
Şekil 4.19	8 numara 8A ve 8B replikasyon 51. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	75
Şekil 4.20	8 numara 8A ve 8B replikasyon 69. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı	76
Şekil 4.21	%0,1 (a/h) sodyum aljinat (SA), %10 (a/h) mısır nişastası (CS) ve M74 mayasını içeren 10 numaralı formülasyonun farklı büyütmelelerdeki optik mikroskop görüntüleri	79
Şekil 4.22	%0,1 (a/h) sodyum aljinat (SA), %10 (a/h) mısır nişastası (CS) ve M74 mayasını içeren 10 numaralı formülasyonun farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri. A1-3 ve B1-4'de ölçek çubuğu $10\mu\text{m}$, ve C1-2'de $40\mu\text{m}$ 'yi göstermektedir.	80

- Şekil 4.23** Püskürtülerek kurutulmuş M74 mayasının 4. 7. ve 10.formülasyonların MTT analizi ile belirlenmiş canlılık değerleri (%). Kapsüllenmemiş M74 mayası kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 81
- Şekil 4.24** *P.digitatum*'a karşı %0,1 (a/h) sodyum aljinat (SA), %10 (a/h) mısır nişastası (CS) içeren 10 numaralı formülasyondaki kapsüllenmiş M74 için antifungal MIC değeri 82
- Şekil 4.25** *P.digitatum* inoküle edilen portakallara uygulanan kapsüllenmiş M74 maya (EM), serbest M74 maya (SM) ve kimyasal pestisit (imazalil) (İ) 0., 7., 14. ve 21. günden sonraki hastalık görülme oranı (%). Kontrol grubu olarak herhangi bir işlem uygulanmayan portakallar kullanılmıştır. 83
- Şekil 4.26** Kapsüllenmiş M74 maya (EY), serbest M74 maya (FY) ve kimyasal pestisit (imazalil) (P) uygulanmış *P.digitatum* inoküle edilen portakalların 21. gündeki görüntüleri. Kontrol grubu olarak herhangi bir işlem uygulanmayan portakallar kullanılmıştır. 84

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Mikroenkapsülasyonun uygulama alanları	18
Tablo 2.2 Farklı kaynaklardan izole edilen antagonist mayalar, mikroorganizmalar ve tarama yöntemleri	24
Tablo 3.1 Taguchi yönteminde kullanılan karbon kaynağı (glukoz), azot kaynağı (glukoz) ve tuz kaynağı (CaCl) üç farklı konsantrasyonlar değerleri...	32
Tablo 3.2 Taguchi yönteminde kullanılan pH, rpm ve sıcaklık değişkenlerinin üç farklı konsantrasyon değerleri	33
Tablo 3.3 M74 mayasının püskürtülerek kurutulmuş kapsül formülasyonlarının Taguchi tasarımı	37
Tablo 4.1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri ve <i>Penicillium italicum</i> ve <i>Penicillium digitatum</i> türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır	44
Tablo 4.2 İzole edilmiş maya suşlarının BLAST algoritması ile beraber moleküler tanımlanması ve genomik dizilerin GenBank veri tabanı ile karşılaştırılmış sonuçları. Erişim numaralarına göre listelenen suşlar, GenBank'ta bulunan bir diziye karşılık gelir	53
Tablo 4.3 İzole edilen mayaların antifungal etkinlik gösterdikleri dozları	55
Tablo 4.4 Maya türlerinin sinerjistik etkileri (<i>P.italicum</i>)	58
Tablo 4.5 Aday biyokontrol ajanları olarak seçilen maya izolatlarının hidroliz enzim aktivitesi, VOC ve Biyofilm Oluşturma Kapasitesi	60
Tablo 4.6 M74 mayasının püskürtülerek kurutulmuş formülasyonlarının Taguchi tasarımı ile belirlenen toz formülasyonları ve toz kalitesi, canlılığı, parçacık boyutu değerleri	78

Epifitik Maya Hücrelerinin İzolasyonu, Tanımlanması ve Mikrokapsüllenerek Narenciye Depolamada Hasat Sonrası Biyokontrol Ajanı Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması

Buse BERBER ÖRÇEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Rabia ÇAKIR

Dünya çapında her yıl 2,5 milyar tonun üzerinde taze sebze meyve üretimi olmakta, bunun %25-50'si son tüketiciye ulaşmadan israf olmaktadır. Bu israfın önüne geçebilmek amacıyla çeşitli kimyasal koruyucular kullanılmaktadır. Ancak bu kimyasal koruyucuların insan ve çevre sağlığını tehdit etmesi, ürünlerde kimyasal kalıntı bırakarak ihracatta problemler yaratması, meyvelerin kalitesini etkilemesi gibi olumsuzluklar üreticileri dar boğaza sokmaktadır. Mikroorganizmalar potansiyel biyokontrol ajanlarıdır (BCA) ve sentezledikleri metabolitlerle zararlılarla doğrudan veya dolaylı olarak mücadele ederler. Kapsülleme, doğal koruyucuların ve biyokontrol ajanlarının etkinliğini, fonksiyonel bileşenlerinin biyoyararlanımını ve kapsüllenmiş malzemenin stabilitesini sağlamak ve böylece sentetik ajanlar yerine kullanımlarını arttırmak için büyük bir fırsat sunmaktadır ve mikroorganizmaların olumsuz çevre koşullarından korunması amacıyla bir matris içerisine kaplanarak onların güneş radyasyonu, sıcaklık ve bağıl nem gibi

canlılıklarını azaltan faktörlere dayanmalarını sağlar ve uygulama sayısını ve dozunu azaltır. Bu çalışmada narenciye bahçeleri, ağaç ve yapraklarından izole edilen mayalar tanımlanmış, filogenetik analizleri yapılmış ve antifungal etkileri belirlenmiştir. *Wickerhamomyces anamolus* (M72), *Meyerozyma guilliermondii* (M77), *Pichia kudriavzevii* (M74) türleri tespit edilmiş ve *P.digitatum* ve *P.italicum*'a karşı antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek antifungal etkiye sahip olan *Pichia kudriavzevii* (M74), *P.digitatum* ve *P.italicum*'a karşı sırasıyla %67 ve %62 inhibisyon oranları göstermiştir. Antifungal etkisi en fazla olan M74 suşunun mikroenkapsülasyon işlemi ile biyopestisit olabilecek kadar uzun ömürlü olmasını sağlamak amacıyla kapsüllenmiştir. *Pichia kudriavzevii*'nin (M74) mikroenkapsülasyonu için Taguchi metodolojisi kullanılarak sprey kurutma prosesinde optimum sprey kurutma proses parametreleri ve kullanılan polimerlerin optimum konsantrasyon değerleri araştırıldı. %0,1 sodyum aljinat (SA) ve %10 mısır nişastası (CS) içeren formülasyon, yüksek canlılık yüzdesi (%73) sayesinde portakalda kayıplara neden olan bir küf olan *P.digitatum*'un inhibisyonunda iyi bir performans göstermiştir. İnhibisyon yüzde sonuçları, bu formülasyonun, *P.digitatum* küfünün etkili kontrolü için turunçgiller üzerinde sentetik fungusitlere alternatif uygulama olarak aday bir formülasyon olarak kullanılabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii*, spray dry, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*

Isolation, Identification and Microencapsulation of Epiphytic Yeast Cells and Investigation of Their Potential for Use as a Post-Harvest Biocontrol Agent in Citrus Storage

Buse BERBER ÖRÇEN

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Rabia ÇAKIR

More than 2.5 billion tons of fresh vegetables and fruits are produced worldwide every year, and 25-50% of this is wasted before reaching the end consumer. Various chemical preservatives are used to prevent this waste. However, negativities such as the fact that these chemical preservatives threaten human and environmental health, create problems in exports by leaving chemical residues on the products, and affect the quality of fruits put producers in a bottleneck. Microorganisms are potential biocontrol agents (BCA) and they fight pests directly or indirectly with the metabolites they synthesize. Encapsulation offers a great opportunity to ensure the effectiveness of natural preservatives and biocontrol agents, the bioavailability of their functional components and the stability of the encapsulated material, thereby increasing their use instead of synthetic agents, and to protect microorganisms from adverse environmental conditions by encasing them in a matrix to protect their viability such as solar radiation, temperature and relative humidity. It allows them to withstand reducing factors and reduces the number and

dose of application. In this study, yeasts isolated from citrus groves, trees and leaves were identified, phylogenetic analyzes were performed and their antifungal effects were determined. *Wickerhamomyces anamolus* (M72), *Meyerozyma guilliermondii* (M77), *Pichia kudriavzevii* (M74) species were identified and were found to have antifungal effects against *P.digitatum* and *P.italicum*. *Pichia kudriavzevii* (M74), which has the highest antifungal effect, showed 67% and 62% inhibition rates against *P.digitatum* and *P.italicum*, respectively. An encapsulation study was carried out to ensure that the M74 strain, which has the most antifungal effect, is long-lived enough to be a biopesticide by microencapsulation process. Optimum spray drying process parameters as well as optimum concentration values of wall materials were investigated in the spray drying process for microencapsulation of *Pichia kudriavzevii* (M74) through the Taguchi methodology. The formulation containing 0.1% sodium alginate (SA) and 10% corn starch (CS) showed a good performance in the inhibition of *P.digitatum*, a mold that causes losses in orange, thanks to its high percentage of viability (73%). Inhibition percentages may indicate that this formulation may be a candidate formulation to be considered as a potential alternative application to synthetic fungicides on orange fruits for the effective control of *P.digitatum* mold.

Keywords: *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii*, spray dry, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*

1.1 Literatür Özeti

Narenciye'nin anavatanı Çin, Güneydoğu Asya ve Hindistan olup, günümüzde subtropikal iklime sahip hemen hemen tüm ülkelerde yetiştirilebilmektedir. Narenciye, turunc, mandalina, greyfurt ve limon gibi meyve türlerini içeren bir bitki topluluğudur (Yılmaz vd., 2020). USDA verilerine göre meyve suyu sektörü gibi birçok sektörde tercih edilen narenciye'nin 2022/23 üretim verileri dünyada 48 milyon tonu portakal olmak üzere toplam 101 milyon ton olarak gerçekleşti. Bu üretimin %47'si portakal, %37'si mandalina, %9'u limon ve %7'si greyfurttan oluşmaktadır (Türkiye Narenciye Yıllığı, 2024).

Türkiye, dünya narenciye üretiminde çok önemli bir potansiyele sahiptir. Narenciye tarımı Cumhuriyet'ten sonra hızla gelişmiş ve günümüze kadar üretim miktarları artmıştır. Türkiye'de ticari olarak üretilen narenciye çeşitleri portakal, mandalina, limon ve greyfurttur. 2022 yılında 4,7 milyon ton narenciye üretilmiş olup, üretimin %40'ını mandalina, %28'ini limon, %28'ini portakal ve %4'ünü greyfurt oluşturmuştur (TEPGE, 2023). Narenciye üretiminde en önemli sorunlardan biri hasat sonrası kayıplardır. Gerekli önlemler alınmadığı takdirde depolamadan 30-60 gün sonra %30 ile %60 arasında ciddi atıklar ortaya çıkmaktadır (Strano vd., 2022). Hasat sonrası kayıplara neden olan en önemli faktörler küf, bakteri ve virüsler gibi fitopatojenlerdir (Aboutorabi vd., 2018; Cubero vd., 2016; Etebu ve Nwauzoma, 2014). Özellikle *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum citri-aurantii*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* gibi fitofunguslar kalite ve pazarlanabilir verimde önemli düşüslere neden olmaktadır. Hasattan sonra en sık karşılaşılan tür *P. digitatum*'dur (Macarisin vd., 2007; Moraes Bazioli vd., 2019).

Ancak uygun ve etkin muhafaza yapılması halinde hasat sonrası kayıplar önemli ölçüde azaltılabilir. Sentetik kimyasalların gıda güvenliği ve çevre üzerindeki

olumsuz etkileri nedeniyle artan kamuoyu kaygısı, çevre ve sağlık dostu yeni alternatiflere olan ihtiyacı doğurmuştur. Biyolojik mücadele yöntemlerinin en ilginç uygulaması, antagonist türlerin biyopestisit olarak kullanılmasıdır (Dukare vd., 2019; Palou vd., 2008; Droby vd., 2009).

Farklı politikalarla desteklenen biyopestisit pazarı 2005 ile 2016 yılları arasında 6 kat büyümüştür (Zaki vd., 2020). Biyopestisit pazarı 2016 yılında %14,1'lik yıllık büyüme oranı ile küresel pestisit pazarının %6'sını temsil etmiştir. 2018 yılında 3,48 Milyar USD olarak belirtilen mikrobiyal pestisit pazarı, 2023 yılında 7,37 Milyon USD hacme ulaşmıştır (Singh vd., 2022). Ancak yine de mikrobiyal kaynaklı biyopestisitler 2016 yılında küresel biyopestisit pazarının yalnızca %10'unu oluşturmuştur (Zaki vd., 2020).

Mikroorganizmalar potansiyel biyokontrol ajanlarıdır (BCA) ve sentezledikleri metabolitlerle zararlılarla doğrudan veya dolaylı olarak mücadele ederler. Mücadele ettikleri zararlılar bakteri, mantar, virüs, böcek, nematod, protozoa vb. gibi türleri içerir (Marrone vd., 2019). BCA olarak yalnızca birkaç nadir maya türü geliştirilmiştir, dolayısıyla teknoloji henüz başlangıç aşamasındadır. Ticari olarak temin edilebilen BCA'lar, tarımsal zararlılara ve hastalıklara karşı yüksek etkinliklerinin yanı sıra, ışığa maruz kaldığında hızlı bir şekilde devre dışı kalması, etki süresinin kısa olması ve gündüz ve gece ısı değişimlerine karşı hassasiyet gibi bazı dezavantajlara da sahiptir (Xiao vd., 2019). BCA'nın başarısı, tarımsal zararlı ve hastalık etkeninin özelliklerine, formülasyon bileşenleriyle ilişkisine, saklama koşullarına ve uygulama yüzeyine veya konumuna bağlı olan uygun bir formülasyonda yatmaktadır.

Imazalil şu anda kullanımda olan en yaygın küf fungusitlerinden biridir. 1980'li yıllarda imazalil kullanımının başlamasının ardından 1987 yılında ilk imazalil direnci vakası rapor edilmiştir (Eckert, 1987). Yıllar geçtikçe imazalil ve benzeri kimyasal pestisitlerin kullanımı, patojen mantarların dirençli biyotiplerinin popülasyonunu artırmıştır (Erasmus vd., 2015). Direnç geliştirmesi, kalıntı bırakması, mikroplastik içermesi (Zuccaro vd., 2024) ve faydalı türlere zarar vermesi gibi etkileri nedeniyle kimyasal pestisitlerin sürdürülebilirlik ve yeşil dönüşüm çerçeveleri kapsamında tamamen yasaklanması öngörülmektedir. Bu durum biyokontrol ajanlarına olan ilgiyi arttırmıştır (Hatamzadeh vd., 2024).

Kapsülleme, doğal koruyucuların ve biyokontrol ajanlarının etkinliğini, fonksiyonel bileşenlerinin biyoyararlanımını ve kapsüllenmiş malzemenin stabilitesini sağlamak ve böylece sentetik ajanlar yerine kullanımlarını arttırmak için büyük bir fırsat sunmaktadır (Erarslan vd., 2023). Bu nedenle biyopolimer bazlı mikroenkapsülasyon işlemleri ve canlılığı koruyan formülasyonlar önem kazanmıştır. Mikroenkapsülasyon, mikroorganizmaların olumsuz çevre koşullarından korunması amacıyla bir matris içerisine kaplanması veya hapsedilmesi işlemidir (Park ve Chang, 2000). Mayalar söz konusu olduğunda, mikrokapsülleme işlemi, onların güneş radyasyonu, sıcaklık ve bağıl nem gibi canlılıklarını azaltan faktörlere dayanmalarını sağlayarak dozları ve uygulama sayısını azaltır (Vemmer ve Patel, 2013; Gering-González vd., 2007).

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'ndeki narenciye bahçelerinden izole edilen *Wickerhamomyces anomalus* (M72), *Meyerozyma guilliermondii* (M77), *Pichia kudriavzevii* (M74)'nin Sprey kurutucu yöntemiyle mikroenkapsüle edilerek karakterize edilmesi ve narenciyede hasat sonrası kayıplara yol açan *P. italicum* ve *P. digitatum*'a karşı *in vitro* ve *in vivo* biyokontrol ajanı olarak etkinliğini araştırmaktır. Bu çalışmada *Pichia kudriavzevii* izolatu ilk kez düşük maliyetli ve endüstriyel ölçekte en uygun kapsülleme yöntemlerinden biri olan sprej kurutucu yöntemi kullanılarak mikrokapsüllenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Mikroorganizmalar biyopestisit pazarı için önemli bir potansiyele sahiptir. Çevresel koşullara karşı hassas olan mikroorganizmaların ortam koşullarındaki fiziksel ve kimyasal değişikliklerden daha az etkilenmesini sağlamak, daha dayanıklı biyopestisitler geliştirebilmek için mikrokapsülasyon işlemi uygulanabilir. Ticarileşebilir, etkili ve ekonomik mikrokapsülasyon formülasyonları ile biyopestisit formülasyonları geliştirilebilir.

2.1 Narenciyelerde görülen mantar hastalıkları ve ekonomik etkileri

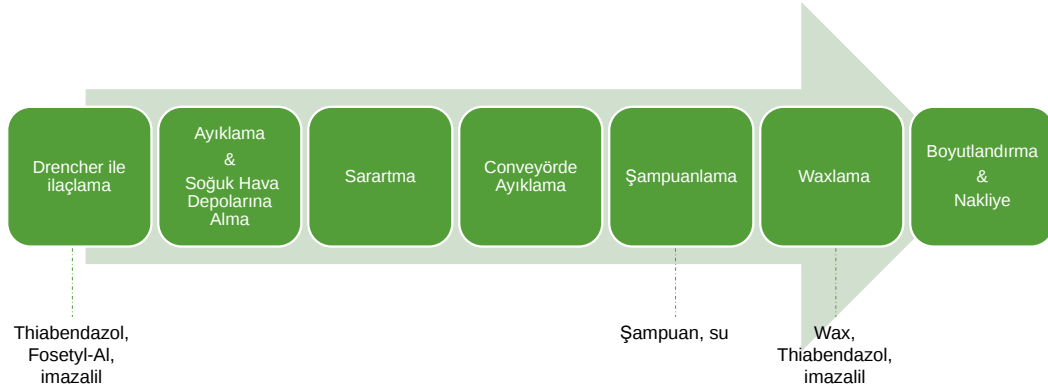
Narenciye'nin anavatanı Çin, Güneydoğu Asya ve Hindistan olup, günümüzde subtropikal iklime sahip hemen hemen tüm ülkelerde yetiştirilebilmektedir. Narenciye, turunc, portakal, mandalina, greyfurt ve limon gibi meyve türlerini içeren bir bitki topluluğudur. Meyve suyu sanayi gibi pek çok sanayide tercih sebebi olan narenciye'nin USDA verilerine göre 2022/23 yılı üretim verileri dünyada toplam 48 milyon ton portakal, 37 milyon ton mandalina, 9 milyon ton limon, 7 milyon ton greyfurt olmak üzere toplam 101 milyon ton dolayında gerçekleşmiştir. Bu üretimin %47'si portakal, %37'si mandalina, %9'u limon ve %7'si greyfurta aittir.

Türkiye, dünya narenciye üretiminde oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. Narenciye tarımı Cumhuriyet'ten sonra hızla gelişmiş ve günümüze kadar üretim miktarları artmıştır. Türkiye'de ticari olarak üretilen narenciye çeşitleri ise portakal, mandalina, limon ve greyfurttur. 2022 yılında 4,7 milyon ton narenciye üretimi gerçekleşmiş olup üretimin %40'ı mandalina, %28'i limon, %28'i portakal, %4'ü greyfurta aittir.

Türkiye'de 39.249 adet narenciye ağacı vardır ve bunlardan 4.7 ton narenciye üretimi gerçekleştirilmektedir. Akdeniz bölgesi Ülkemizde narenciye üretimi bakımından birinci sırada olup, narenciye alanları ve üretimi yönünden Türkiye varlığının sırasıyla % 88.2 ve % 78'ine sahiptir. Adana, Mersin ve Hatay illerini kapsayan ve yöremizi oluşturan Doğu Akdeniz Bölgesi narenciye alanları ve üretimi yönünden Akdeniz Bölgesi varlığının sırayla % 80.3 ve % 83.2'ine sahiptir.

Tarım ve Orman Bakanlığı'nın 2018'deki verilerine göre, yaş meyve ve sebze sektörü ülkemizdeki tarım üretiminin %42'sini oluşturmaktadır, yıllık yaklaşık 47

milyon ton üretilen yaş meyve ve sebzelerin %42'si ise narenciyelere aittir. (Tarım Orman Bakanlığı-TAGEM, Yaş Meyve ve Sebze Çalıştay Raporu, 2019)



Şekil 2. 1 Narenciler için hasat sonrası proses aşamaları

Portakallar toplandıktan sonra merkeze vardıklarında meyveler tartılır ve teslimatı belirlemek için yükleme alanlarına boşaltılır. Portakallar daha sonra PH işleminden geçer (Şekil 2.1). İlk olarak, kasalar meyvelerin su ve fungusitlerden (Tiabendazol, İmazalil ve Fosetyl-Al) oluşan bir çözeltiyle işlendiği drencher'a geçer. Bu şekilde, portakallar doğrudan sonraki işlem adımlarına giremediklerinde 4,5 °C'deki soğutulmuş odalarda saklanabilir. Ortalama soğutma süresi 3 gündür. Meyveler daha sonra bir konveyör bandına boşaltılır ve sabunla yıkama havuzuna taşınırken, HDPE kasalar yeniden kullanılmadan önce bir yıkama makinesinde temizlenir. Portakallar daha sonra ön kurutmaya tabi tutulur ve daha sonra dengesiz kusurları olanlar elle ayıklanır. Bu meyvelere mantar öldürücülü (Tiabendazol, İmazalil) balmumu uygulanır ve daha sonra bir tünelde kurutulur ve bir kez daha elle ayıklanır. Bu ikinci ayıklama işlemi, stabil kusurları olan portakallara odaklanır (çoğunlukla görünüm kusurları). Bu meyveler (işlemeye giren portakalların ortalama %11'i) portakal suyu üretimi için ayrılabilir. İkinci ayıklamayı geçen portakallar kalibre edilir ve boyutlarına göre paketlenir. Ambalaj tartılır ve paletlere yerleştirilir. Dağıtım merkezine taşınana kadar portakalların %6,8'i yaklaşık 4,5 °C'de soğutulmuş bir haznede saklanır. 4 gün, ancak süre mevsime ve piyasa koşullarına bağlı olarak 1 ila 60 gün arasında değişebilir (Ribal vd., 2019).

2018 yılında Dünya'da 868 milyon ton taze meyve sebze üretilmiştir, (Faostat, 2020) üretilen bu gıdanın 1/3'ünü çeşitli sebeplerde kaybedilmektedir. Kaybedilen

gıdanın ise yaklaşık %30'unun mantar kaynaklı hastalıklar ile tüketilemeyecek duruma geldiği literatürlerde yer almaktadır. (FRAC, 2020)

Gerekli önlemler alınmadığı takdirde 30-60 gün depolamadan sonra %30- %60 oranlarında değişen ciddi israflar oluşmaktadır. Hasat sonrası kayıplara sebep olan en önemli etmenler küf, bakteri ve virüs gibi fitopatojenlerdir (Aboutorabi vd., 2018; Cubero vd., 2016). Özellikle *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum citri-aurantii*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* gibi fitofunguslar kalite ve pazarlanabilir verimde önemli düşüşlere sebep olurlar. Hasat sonrasında karşılaşılan en yaygın tür *P. digitatum*'dur (Macarisin vd., 2007; Moraes vd., 2019).

Bu mantar hastalıklarının günümüzde en bilinen etmenlerinden olan *Penicillium* türü mantarlar ise narenciye temelli fungusit pazarında büyük bir yere sahiptir, narenciye türlerinde hasat sonrasında görülen mantar hastalıklarının %90'ının da bu türe ait olan mavi ve yeşil küflerden kaynaklandığı bilinmektedir. (Zhu vd., 2017) Özellikle hasat sonrasındaki işlemlerde örneğin, taşıma sürecinde soğuk zincirin kırılmasıyla veya paketlenme fabrikalarında depolama süreçlerinin uzaması, sıcaklığın değişmesi veya meyvelerin yüzey hasarı almasıyla, meyveler mantar hastalıklarına karşı daha duyarlı hale gelmektedirler, bahsedilen mantarların sporlarının havadan yayılabilmesi sebebiyle de ortamdan düzgünce temizlenemeyen küf sporlarının sağlıklı meyvelere de bulaşmasıyla hasat kaybının %50'ye çıktığı da gözlenmektedir. (Strano vd., 2017) Hasat kaybının yanı sıra *Penicillium* türü mantarların ortamda üremesi ile mikotoksin adı verilen oldukça toksik ve ısı uygulamalarıyla yok edilemeyen zararlı bileşenler (örneğin patulin, okratoksin A) meyveler üzerinde küfler tarafından salgılanabilir ve bu toksinler tüketildiğinde insan ve hayvanlarda gıda zehirlenmeleri gözlenmektedir. (Bazioli vd., 2019). Oluşabilecek hasat sonrası kayıpların önüne geçebilmek ancak uygun ve etkili muhafaza koşullarının sağlanmasıyla mümkündür.

2.2 Pestisit pazarı, çeşitleri ve kullanım miktarları

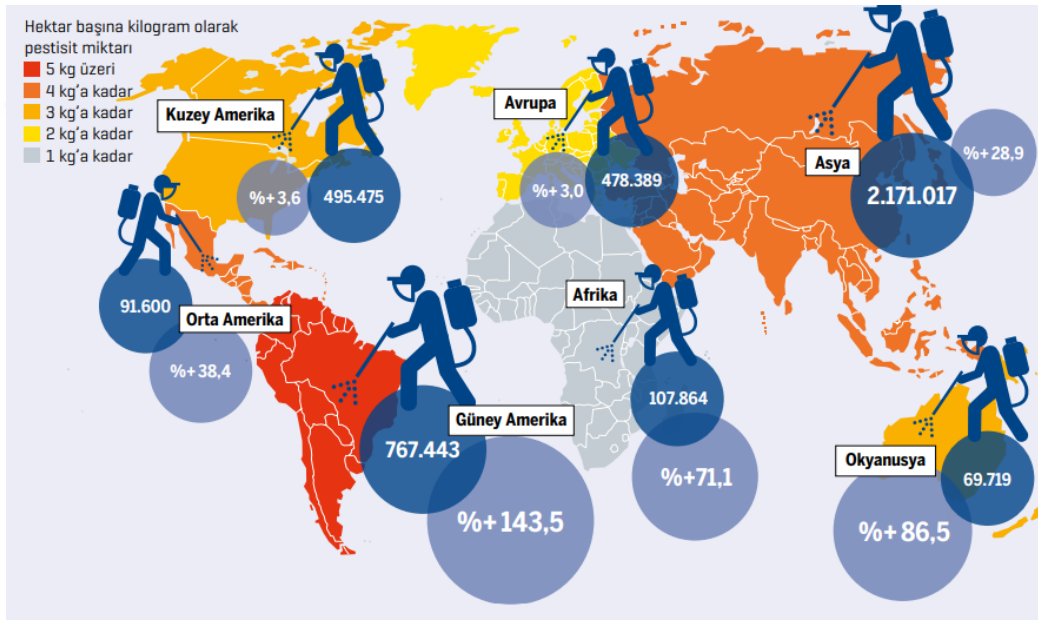
Gıda ürünlerinin çeşitli nedenlerle kayıp olmasından kaynaklanan ciddi kıtlıklar ve büyük ekonomik çalkantılar tarihte her zaman yaşanmıştır. İnsanlık belli ekim yöntemleri ve özel tarım teknikleriyle yabancı ot ve zararlılarla sürekli mücadele etmek zorunda kalmıştır. Sanayi Devrimi sırasında ortaya çıkan ilk sentetik-

kimyasal pestisitler hasadın korunmasının yanı sıra işgücünden tasarruf da vadetmiştir. Kimya şirketleri 40'lı yıllardan başlayarak geniş spektrumlu pestisit ürünleri pazarlamaya başlamıştır. Bu ürünler bir dizi organizma için zehirli olmasına rağmen daha önce kullanılan yöntemlere oranla çok daha verimli sonuç alınmıştır. Tarımda kullanılan pestisit miktarı onlarca yıldır artmaya devam etmiştir. Bu artış 1990-2017 yılları arasında %80'lere ulaşarak Türkiye'de 1990 yılında yaklaşık 30 bin ton civarında olan pestisit kullanımı iki katı artış göstererek 2018 yılında 60 bin tona ulaşmış, 2020 yılındaysa 54 bin ton olmuştur (Şekil 2.2) (Clapp, 2021). Pestisitler, gübre ve teknolojik gelişim arasındaki etkileşimle birlikte, tarımsal üretimde köklü değişikliklere yol açmıştır. Çiftçiler, münavebeli ekim ve ürün çeşitlemesi yerine pestisit kullanarak hastalıkları ve zararlıları engelleyebildikleri için, aynı kültür bitkilerini daha sık zaman aralıklarıyla ekebilmişlerdir. Sonuç olarak günümüzde pestisitsiz bir endüstriyel tarım düşünmek neredeyse imkansız hale gelmiştir. Verimlilik ve buna bağlı olarak tarım ürünleri arzı, 50'li yıllardan itibaren sermaye yoğun girdiler sayesinde talepten çok daha hızlı yükselmiş; bu da tarım ürünlerinin ucuzlamasına ve çiftçilerin gelirinin azalmasına neden olmuştur. Pestisit kullanımına paralel olarak bu konuda yapılan bilimsel araştırmalar da artmıştır (Tang vd., 2021).

Bugün dünya çapında yılda yaklaşık 4 milyon ton pestisit kullanılmaktadır. Bu miktarın yarısı yabancı otlara karşı kullanılan herbisitler, neredeyse yüzde 30'u zararlı böceklerle karşı kullanılan insektisitler, yüzde 17'si ise mantar istilasından koruyan fungisitlerden oluşmaktadır. Türkiye'de kullanılan pestisit miktarı yıldan yıla değişiklik gösterse de son otuz yıl içinde sürekli artış göstermiştir.

Pazar araştırmaları küresel pestisit piyasasının 2019'da yaklaşık 84,5 milyar dolarlık bir pazar payına ulaştığını söylemektedir. Yıllık ortalama büyüme oranı 2015'ten beri yüzde 5'in üzerine çıkmakla beraber; önümüzdeki yıllarda da artmaya devam edeceği öngörülmektedir. Pestisit kullanımında 2023 yılına kadar yüzde 11,5'lik bir büyüme, buna bağlı olarak yaklaşık 130,7 milyar dolarlık bir pazar değeri tahmin edilmektedir. Bu bariz artış, iklim kriziyle de bağlantılıdır. Seattle Üniversitesi'nden ABD'li bir araştırma grubu her bir derecelik küresel ısınmayla pirinç, mısır ve buğday üretiminin yüzde 10 ila yüzde 25 azalabileceğini raporlamışlardır. Bunun nedenleri arasında, iklim değişikliği zararlı popülasyonunu

ve zararlı/faydalı böcek oranını değiştirmesi gösterilmektedir. Bunun ötesinde yeni iklim koşullarının neden olduğu stres, bitkilerin zararlılara karşı direncini azaltmaktadır. İklim değişikliği Türkiye'yi de etkilemektedir. Örneğin artan sıcaklıklara ve nem koşullarındaki değişime bağlı olarak daha önce Orta Anadolu'da yetiştirilen buğdaylarda nadir görülen septorya yaprak leke hastalığının şimdi yaygın bir şekilde görüldüğü ve önümüzdeki yıllarda salgın hastalık oluşturma riski taşıdığı belirtilmiştir. Genel olarak yağışların arttığı bölgelerde mantarlara bağlı bitki hastalıklarının görülme sıklığı artabilir (Pestisit atlası, 2022, FOASTAT).



Şekil 2. 2019'da kıtaların pestisit kullanımı (ton) miktarları ve 2009'dan bu yana değişimleri (Pestisit atlası, 2022, FOASTAT)

2.3 Sentetik fungusitlerin olumsuz etkileri

Tehlikeli pestisitlere maruz kalmanın sağlık üzerindeki etkileri arasında deri döküntüleri, gastrointestinal ve solunum yolu rahatsızlıkları gibi akut rahatsızlıklar ve merkezi sinir sistemi sorunları yer alır. Ek olarak, pestisit maruziyeti kanserler, üreme ve gelişim bozuklukları ve uzun vadeli nörolojik işlev bozukluğu gibi birçok kronik hastalıkla ilişkilidir (Thundiyil vd., 2008). 141 ülkedeki akut pestisit zehirlenmesi vakalarına ilişkin yakın tarihli bir inceleme, dünya çapında her yıl yaklaşık 385 milyon kasıtsız, akut pestisit zehirlenmesi vakasının meydana geldiğini ve bunların yaklaşık 11.000'inin ölümle sonuçlandığını tahmin

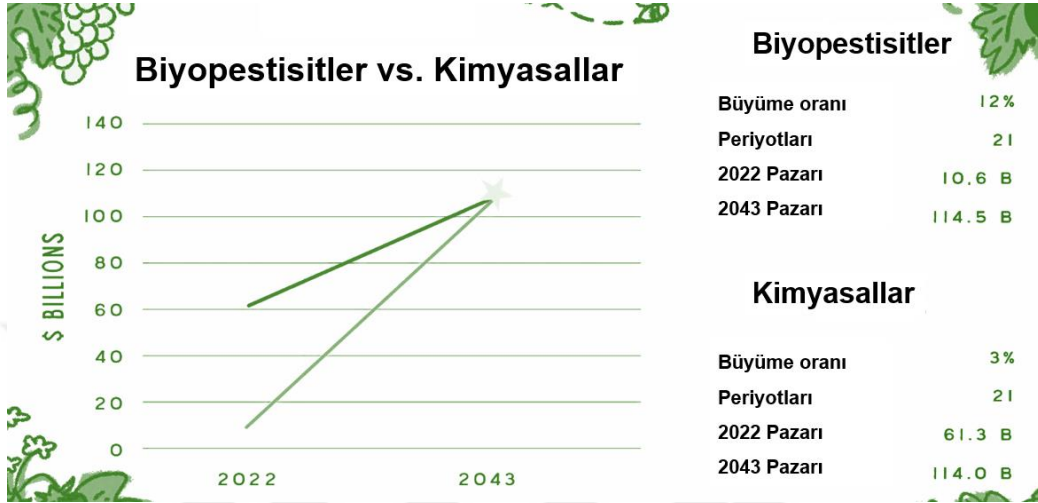
etmektedir. Yaklaşık 860 milyonluk küresel bir çiftçilik nüfusu temel alındığında, bu, çiftçilerin yaklaşık %44'ünün her yıl pestisitlerden zehirlendiği anlamına gelir (Boedeker vd., 2020). Çiftçilere ek olarak, tarımda tehlikeli pestisitlerin kullanımından doğrudan en çok etkilenenler arasında tarım işçileri, kırsal toplulukların sakinleri ve pestisitlerin üretildiği ve pestisit atıklarının döküldüğü topluluklardaki sakinler yer almaktadır. ABD'de bu bölgelerde yaşayan insanlar pestisitlerden etkilenen topluluklar orantısız bir şekilde düşük gelirli ve renkli insanlardan oluşmaktadır. Bu topluluklar akut pestisit zehirlenmeleri, kanser gibi kronik sağlık sorunları ve çocuklarda ciddi öğrenme güçlükleri gibi gelişimsel zararlar yaşamaktadır (Pedroso vd., 2022). Bu topluluklarda, birincil maruz kalma yolları kirli hava ve sudur. Yüksek riskli topluluklarda yaşamayan ve çalışmayan insanlar için tehlikeli pestisitlere birincil maruz kalma yolları yedikleri yiyecekler ve içtikleri sudur. Çocuklar yetişkinlerden pound başına daha fazla yedikleri, içtikleri ve soludukları ve vücutları aktif olarak geliştiği için, çevrelerindeki ve yiyeceklerindeki pestisitlere karşı özellikle savunmasızdırlar (Syafudin vd., 2021; Roberts vd., 2012).

Tarım işçileri için birincil maruz kalma yolları havadaki pestisitlerden, mahsullerdeki pestisit kalıntılarıyla temastan veya pestisitleri karıştırma, yükleme veya uygulama sırasında gerçekleşir. Maruz kalmanın etkileri, ısı stresine yol açan ve insan vücudunu pestisitlere karşı daha duyarlı hale getiren yüksek ısı gibi iklim değişikliğinin etkileriyle daha da kötüleşir ve bu da uzun ve kısa vadeli sağlık etkileri riskini artırır. Sıcak havalarda tarım işçileri, kendilerini pestisitlerden korumak için giysi giymekten kaynaklanan artan ısı stresi ile vücut sıcaklıklarını düşürmek için koruyucu giysi kullanmama arasında bir denge kurmak zorunda kalırlar. Zorlu çalışma koşullarına ek olarak, tarım işçileri rutin olarak sağlık hizmetlerine yetersiz erişimle de karşılaşır. Tarım topluluklarında yaşamaları ve artan duyarlılıkları nedeniyle, tarım işçisi çocukları tarımsal pestisit kullanımından kaynaklanan en ciddi sağlık etkilerinden bazılarını yaşarlar.⁴⁸ Pestisitler aynı zamanda tarımsal sistemlerimizin ve doğal dünyamızın bağlı olduğu biyolojik çeşitliliğe de zarar veriyor. Uzun zamandır kuşları, memelileri, amfibileri ve faydalı bitki ve böcek türlerini doğrudan zehirledikleri veya popülasyonlarının azalmasına yol açtıkları bilinmektedir. Artık dünya çapında biyoçeşitlilik kayıplarının en

önemli nedenlerinden biri oldukları yaygın olarak kabul edilmektedir (Hallmann vd., 2017). Bir böcek ilacı türü olan neonikotinoidler, bal arıları gibi polinatörlere verdikleri önemli zararlar nedeniyle kamuoyunun dikkatini çekmiştir. Bal arıları tarımsal ürünlerin tozlaşmasında önemli roller oynar ve ABD'de yılda yaklaşık 15 milyar dolarlık ek ürün değerinden sorumludurlar (FDA, 2018). Pestisitler ayrıca toprak makro ve mikro faunası üzerinde derin etkilere sahiptir ve bu da tarımsal toprağın uzun vadeli yapısını ve işlevini etkiler. Örneğin, böcek ilaçlarının ve diğer pestisitlerin kullanımı solucanlar gibi toprak omurgasızlarının ölümüne neden olabilir.⁶⁴ Toprak omurgasızları, topraklarda yapı ve havalandırma oluşturmada ve toprak sıkışmasını önlemede, toprağın suyu tutmasına ve diğer istenen işlevleri yerine getirmesine yardımcı olan rollerde çok önemlidir (Panna, 2023).

Narenciyelerin hasat sonrası muhafazasında mantar hastalıklarının önlenmesi için sentetik fungusitlerin kullanımı yaygındır. Sentetik fungusitlerin kullanılmadığı durumlarda depo veya nakliye sırasında meyvelerin çoğu küflenme sebebi ile bozulmaktadır. Narenciyelerde hasat sonrasında en çok kullanılan sentetik fungusitler Imazalil, Thiabendazole, Fludioxonil, Pyridimethanil, Organofosfatlar ve benzerleridir. Bahsi geçen sentetik fungusitlerin su ve toprak ekosistemlerine kolaylıkla karışabilmeleri, bu ekosistemdeki diğer canlılara da büyük oranda hasar verme ihtimalleri, doğada uzun sürelerde parçalanmaları, uzun süreli maruz kalındığında insan ve hayvan sağlığına çok ciddi zararları olması ve sürekli kullanımlarda dirençli mantar türlerinin ortaya çıkması sebebiyle ülkemizde ve dünyada her yıl kullanımlarına kısıtlamalar ve yasaklamalar getirilmektedir. Sentetik fungusitler meyveler üzerinde istenmeyen kalıntılara sebep olurlar. Üreticiler uzun nakliye aşamalarında ürünlerinin bozulmaması için daha fazla fungusit kullanmakta veya sentetik aktif maddelerin yarılanma süresini beklemeden satışa sunmaktadır. Sonuçta belirlenen kalıntı limitleri aşıldığı için ürünleri gümrük noktalarından geri dönmektedir. Avrupa Birliği Komisyonu Mayıs 2020'de yayınladığı "Towards to a Sustainable Europe by 2030" bildirisinde geçen 2030 yılına kadar sentetik pestisitlerin Avrupa'da %50'ye kadar azaltılması ve daha sürdürülebilir tarımın yaygınlaştırılması fikri üzerinde durmaktadır. Bu bildirmede de üzerinde durulduğu üzere, sürdürülebilir bir Dünya hedefiyle pazarda kullanılan pek çok zararlı aktif maddenin yasaklandığı görülmektedir. Sadece ülkemizde 2018

yılında kullanılan pestisit aktif etken madde sayısı 385 adete düşmüş, 2008-2021 yılları arasında toplam 213 etken madde kullanımı yasaklanmıştır (Pestisit atlası, 2022). Tüm bu gelişmeler ışığında şuan pestisit pazarının sadece %5'ini oluşturan biyopestisitlerin, 2043 yılına kadar sentetik pestisitler ile başabaş noktaya ulaşacağı tahmin edilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Beklenen pestisit Pazar büyüme oranı

2.4 Sentetik fungusitlerde direnç gelişimi

Sentetik pestisitler genellikle etkilerini tek bir mekanizma üzerinden gösterirler. Bu tek mekanizmalı etkileri sebebiyle patojenler zamanla direnç geliştirmektedirler. FRAC (fungicide resistance action commity) yaptığı analize göre günümüzde kullanılan pestisitlerin %60'ına karşı çeşitli patojenlerin orta ve yüksek seviyede direnç geliştirebileceği bildirilmiştir. Zararlıların oluşturdukları direnç, kullanılan pestisitlerin beklenen etkiyi gösterememesine sebep olmaktadır. Son yıllarda Ekvator'da yetişen muz ağaçlarındaki dirençli *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense, gelecekte farklı ürünlerde gözlenebilecek hasarın yaşanmış bir örneğidir. FAO verilerine göre, dirençli *Fusarium* sebebiyle oluşan ekonomik hasarın, sosyoekonomik etkiler hariç \$ 400 milyon'a ulaştığı belirtilmiştir. Bunun paralelinde, antagonist mikroorganizmalar tek bir mekanizma üzerinden inhibisyon sağlamadıklarından dolayı, direnç mekanizmalarını tetiklememekte ve literatürde herhangi bir aksi bilgi bulunmamaktadır.

Çeşitli çalışmalarda imazalil ve thiabendazole gibi pestisitlere karşı *Penicillium digitatum* and *P. italicum*'un direnç geliştirdiği gösterilmiştir (Boubaker vd., 2009).

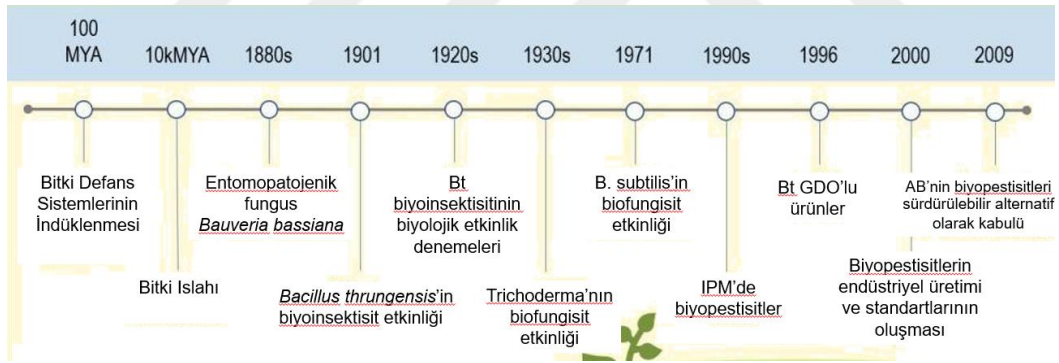
Toker ve Biçici (2001), narenciye meyvelerinin hasat, taşıma, paketlenme, depolama ve pazarlama dönemlerinde bozulmalarına neden olan *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*'un bölgede kullanılan, benomyl, thiabendazole ve imazalil fungusitlerine karşı direnç durumlarını araştırmıştır. Paketleme evlerinden, narenciye bahçelerinden ve semt pazarlarından alınan meyveler ile paketlenme evleri atmosferinden toplanmış *P. digitatum* ve *P. italicum* izolatından % 41.8'nin benomyl, thiabendazole ve imazalil'e direnç kazandıkları bulunmuştur.

2.5 Biyopestisitler

Biyopestisitlerle ilgili bilinen il çalışma 1835'te Agostino Maria Bassi tarafından, ascomycetes mantarı *Beauveria bassiana*'yı ipekböceği hastalığı olarak tanımlamasıyla başladı. 19. yüzyılın başlarında bilim insanları entomopatojenik mantarların biyolojisi ve patolojisi hakkında rapor verdiler. 1901'de ipekböceklerinin bakteriyel patojeni keşfedildi ve daha sonra *Bacillus thuringiensis* (Bt) olarak adlandırılmıştır. Avrupa mısır kurdunu kontrol etmek için Bt ile yapılan saha denemeleri 1920'lerin sonlarında yapılmış ve 1938'de ilk ticari Bt preparatı tanıtılmıştır.

Günümüzde, böcek zararlılarını kontrol etmek için entomopatojenik bakteriler yaygın olarak kullanılırken, genellikle sindirim kanalları yoluyla, Bt toksin kristalleri, lepidopteran aktive olan ve hücre parçalanmasına ve böcek ölümüne yol açan mikrobiyal kaynaklı biyoinspektisitlerin temeli olmuştur. 1930'larda, toprak kaynaklı Ascomycetes mantarı *Trichoderma*'nın birkaç türü, antibiyoz, parazitlik, bitki savunma indüksiyonu ve rekabet mekanizmaları yoluyla bitkilerin mantar hastalıklarına karşı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1971 yılında, endospor oluşturan bakteri *Bacillus subtilis*, tohum ve fide hastalıklarını baskılayabilen bir biyofungisit olarak tanımlanmıştır. *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* gibi *Bacillus* suşları, geniş bir antimikrobiyal spektrum ve yüzey aktif madde aktivitesi gösteren lipopeptitler gibi antimikrobiyal metabolitler üretir. Günümüzde, *B. subtilis* ve varyantları, toprak ve tohum kaynaklı patojenlerin yanı sıra yaprak bitkisi hastalıklarını kontrol etmek için en çok

kullanılan biyofungisitler arasındadır. 1990'larda Entegre Zararlı Yönetimi'ne (IPM) artan odaklanmayla, genetik modifikasyon (GM) ve biyopestisit geliştirmeye olan ilgi artmış ve 1996'da ilk böcek dirençli Bt GM mahsulleri tanıtılmıştır. *Bacillus thuringiensis*, toksini (Bt toksini) genetik mühendisliği kullanılarak doğrudan bitkilere dahil edildiğinde bir böcek ilacı olarak işlev görmektedir. Biyopestisitlerin doğal yırtıcılarla, zararlılara dirençli çeşitlerle, yetiştirme teknikleriyle ve geleneksel bitki koruma kimyasallarıyla bir araya getirildiği Entegre Zararlı Yönetimi stratejilerinin faydalarına ilişkin artan kamu bilinci, biyopestisit pazarının büyümesini yönlendiren önemli bir faktör olmuştur. Bitki korumada biyolojik stratejilerin artan katkısını yansıtan Biyopestisit Endüstrisi İttifakı (2017'de Biyolojik Ürünler Endüstrisi İttifakı olarak değiştirildi), endüstri standartlarını sağlamak ve tarımda biyopestisit ve biyolojikler konusunda farkındalığı artırmak için 2000 yılında başlatılmıştır. 2009 yılında AB, biyopestisit bazlı entegre zararlı yönetimi çözümlerinin uygulanmasını teşvik eden Sürdürülebilir Pestisit Kullanım Direktifini (2009/128/EC) kabul etmiştir (Şekil 2.4).



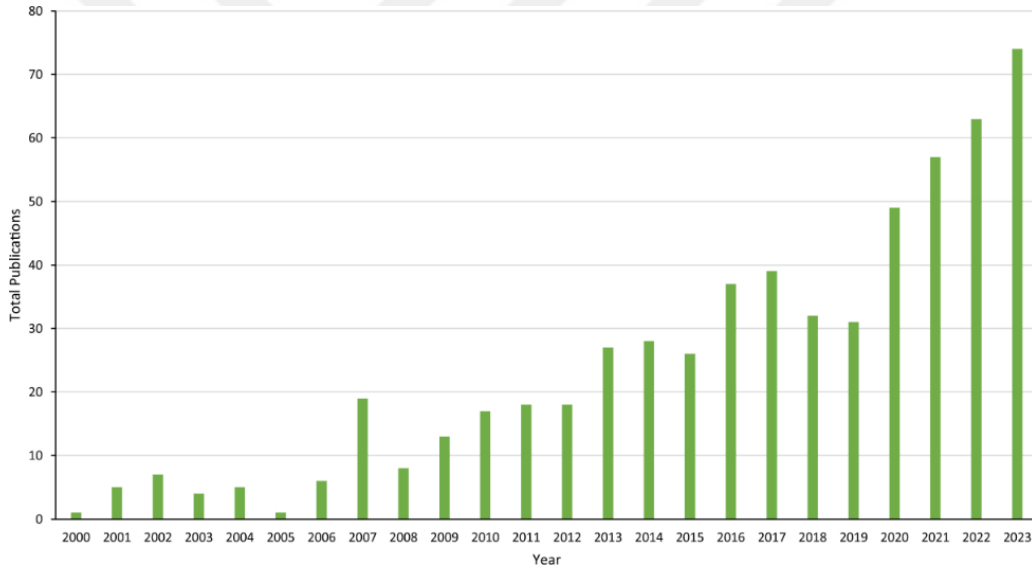
Şekil 2. 4 Biyopestisit tarihi

Farklı politikalarla desteklenen bu pazar, 2005-2016 yılları arasında 6 kat büyümüştür. 2016 yılında %14,1 CAGR ile küresel pestisit pazarının %6'sını biyopestisitler temsil etmiştir. 2018 yılında 3,48 B USD olarak belirlenen mikrobiyal pestisit pazarı 2023 yılında 7,37 M USD hacmine ulaşmıştır. Mikopestisitler 2016 yılında küresel biyopestisit pazarının yalnızca %10'unu oluşturmuştur.

Biyopestisitler, pestisit tanımına dahildirler fakat böyle isimlendirilebilmeleri için özel olarak aranan nitelikler şunlardır:

- Doğal olarak oluşan kimyasallar veya bunların türevleri
- Hedef dışı organizmalara karşı azaltılmış toksisite
- Çevrede kalıcılığın azalması
- Organik tarımda kullanılabilir
- Düşük memeli toksisitesi
- Çiftlik çalışanları ve civarda yaşayanlar için güvenli
- “Yeşil” teknoloji
- Sınırsız kullanım

Çok az ürün bu kriterlerin tümüne uymaktadır. Örneğin, hiçbir doğal üründen ilham alan veya türetilmiş sentetik bileşik organik tarım için onaylanmamıştır ve bunlar ABD EPA tarafından biyokimyasal biyopestisit olarak kabul edilmez (Seiber vd., 2014).



Şekil 2. 5 Meyve Bitkilerinin Korunmasında Biyopestisitler hakkında yıllık yayın çıktısı

Biyopestisitlere olan ilgi yıldan yıla artmaktadır (Şekil 2.5). Meyvelerin korunmasına yönelik biyopestisitler hakkındaki çalışmaların yıllar bazında artan eğilimi, artan çevresel farkındalık ve geleneksel pestisitlerin ekolojik etkilerine ilişkin endişeler, biyoteknoloji ve moleküler biyolojideki ilerlemeler, gibi gerekçelerle artmıştır (Ikhwani vd., 2024).

USA EPA biyopestisitleri; pestleri kontrol eden doğal malzemelerden geliştirilmiş pestisitler olarak tanımlanmaktadır. Biyokimyasal pestisitler, bitkiye aktarılmış koruyucular ve mikrobiyal pestisitler olmak üzere 3 kategoriye ayrılmıştır.

Biyokimyasal pestisitler: doğal olarak meydana gelen bileşenler içeren pestisitler olarak tanımlanmaktadır. Bitkisel ekstraktlar, sekonder metabolitler, feromonlar, mineraller, botanik yağlar bu grupta yer almaktadır. Bununla beraber EPA, biyopestisit olarak ruhsatlanabilirlik için sadece doğal kaynaklardan elde edilmiş olmasını kabul etmez. Bununla beraber çeşitli testlerle kullanılacak aktif içeriğin toksik olmayan bir etki mekanizmasıyla pest ve patojenlerle mücadele ettiğinin kanıtlanmasını bekler.

Bitkiye aktarılmış koruyucular (PIPs): Genellikle gen mühendisliği yoluyla bitkiye aktarılan, bu genetik materyal vasıtasıyla bitkiler tarafından üretilen pestisit maddeleridir. EPA genetik materyal ve kodladığı materyali denetler, kapsamı bitkiyle kısıtlamaz. Böcek öldürücü Bt proteinini içeren veya virüslere karşı dirençli bitkileri mümkün kılan proteinler PIP'lere örnektir (Singh vd., 2022).

Mikrobiyal pestisitler; Biyokontrol ajanı olarak işlev gören, sentezledikleri metabolitler ile pestler ile doğrudan veya dolaylı olarak mücadele eden pestisitlerdir. Bakteri, fungus, virüs, mantar, böcek, nematod, protozoa vb. içeriklere sahip olabilirler 5. Mikopestisitler olarak yalnızca birkaç nadir mantar türü geliştirilmiştir, dolayısıyla teknoloji henüz başlangıç aşamasındadır. Bağlanma, çimlenme, penetrasyon, istila, replikasyon ve konak ölümü, mikoinsektisitlerin altı genel etki aşamasıdır 2. Ticari olarak temin edilebilen mikrobiyal pestisitlerin tarım zararlı ve hastalıklarına karşı yüksek etkilerinin yanı sıra, ışığa maruz kaldıklarında hızlı devre dışı kalma, kısa aktivite süresi, yavaş ölümcül oran ve çevreye karşı düşük farkındalık ve duyarlılık gibi bazı dezavantajları da vardır (Xiao vd., 2019).

2.6 Biyopestisitlerin biyolojik etkinlikleri

Sentetik fungusitlerin çevre üzerinde bıraktığı olumsuz etkiler göz önüne alındığında, biyopestisitlerin kullanımının yaygınlaştırılması dünya çapında birçok

ülkenin vizyonuna dahil olmuştur. Biyopestisitler mikroorganizmalar, biyokimyasal moleküller ve bitkisel aktif maddeler olmak üzere 3 başlıkta incelenebilir. Ancak biyopestisitlerin bazı dezavantajları mevcuttur. Örneğin; bitkisel kaynaklı esansiyel yağlar ve aktif moleküller ise başka bir biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır ancak uçucu olmaları, etki göstermeleri için yüksek dozlarda uygulamaya ihtiyaç duymaları ve hasat edilen meyvelerde tat-koku bırakmaları, fitotoksisite gösterebilmeleri, genel olarak iklimsel koşullardan çok hızla etkilenmeleri, hektar başına düşen maliyetlerinin yüksek olması ve sahada uygulama aralıklarının kısa olması sebebi ile dezavantajlıdır.

Bunun yanı sıra, kullanılabilen diğer bir mikroorganizma türü olan bakterilerin büyük ölçekte üretimleri ve depolanmalarında yaşanan zorluklar, antibiyotik gibi istenmeyen yan ürünlerin sentezi antagonizimde bakterilerin kullanılmasına karşı önyargıların ve zorlukların oluşmasına sebep olmaktadır. Tüm bu problemler neticesinde bu projenin amaçları kısaca; narenciyelerde hasat sonrasında mantar hastalıklarının önüne geçebilmek için sentetik fungusitler yerine en az onlar kadar stabil olan ve yüksek fungusidal etki gösteren ve üretimi ölçeklenebilir antagonist mayaların kullanımını mümkün kılmaktır.

Biyopestisitler, pestisitlerin kullanımı için güçlü bir araç olarak kabul edilirler ve bu da etkinlik, üretim maliyetleri ve uygulama arasındaki dengenin iyileştirilmesine yol açmalıdır. Biyopestisitlerin tarihi, sınıflandırması ve etki şekli iyi bilinmektedir ve kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Ancak, başarılı bir şekilde uygulanmasını sağlamak için, etkinliği ve daha yüksek formülasyon kararlılığının elde edilmesi hala iyileştirilmelidir.

Biyopestisitlerin formülasyonu, organizmanın, yani preparatın üretimi, dağıtımı, depolanması, elleçlenmesi ve uygulanması sırasında preparat bileşimine dahil edilen bileşiklerin kararlılığını sağlamalıdır. Dahası, biyolojik ajanı/bileşiği dış çevre etkisinden korumak ve organizmanın üreme, temas veya hedef organizmalarla etkileşimi sırasında aktivitesinin artmasını sağlamak gerekir. Yukarıdakilerin hepsi, uygun pestisit olmayan bileşiklerin eklenmesiyle elde edilir. Bu tür ürünlerin formülasyonu, tatmin edici verimlilik, çevresel kabul edilebilirlik, uygulama sonrası sabitlik ve işlenmiş nesne boyunca düzgün dağılım gibi bir dizi hedefi karşılaması gerektiği düşünüldüğünde bir zorluk teşkil eder. Uygun bir

formülasyon, bitki koruma ürününün stabilitesini iyileştirebilir ve dış faktörlerin etkisini azaltarak aktiviteyi artırabilir veya genişletebilir.

Örneğin, kökeni ne olursa olsun uçucu yağlar, bitkilere yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında fitotoksik olabilir. Geleneksel böcek öldürücülerle karşılaştırıldığında, uçucu yağlara dayalı böcek öldürücüler daha az etkilidir ve bu nedenle genellikle %0,5-1,5 aralığında nispeten yüksek konsantrasyonlarda uygulanmalıdır. Bununla birlikte, biyoinsektisit tescil prosedürü, bitkiler üzerindeki fitotoksik etkilerin özel bir dikkatle değerlendirilmesini içermelidir. Esansiyel yağ bazlı pestisitlerin uygulanmasından sonra tarımsal üründe çok az veya hiç kalıntı beklenmez ve işlenmiş ürünlerin organoleptik kalitesi üzerindeki potansiyel etki bugüne kadar ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Tarım ve gıda endüstrisinde kullanım bulan nispeten yeni bir alan nanoteknolojidir. Bu teknoloji, nanoemülsiyonlar, nanosüspansiyonlar, nanokapsül süspansiyonları vb. gibi kontrollü salınımlı formülasyonların geliştirilmesini sağlamıştır (Şunjka ve Mechora, 2022).

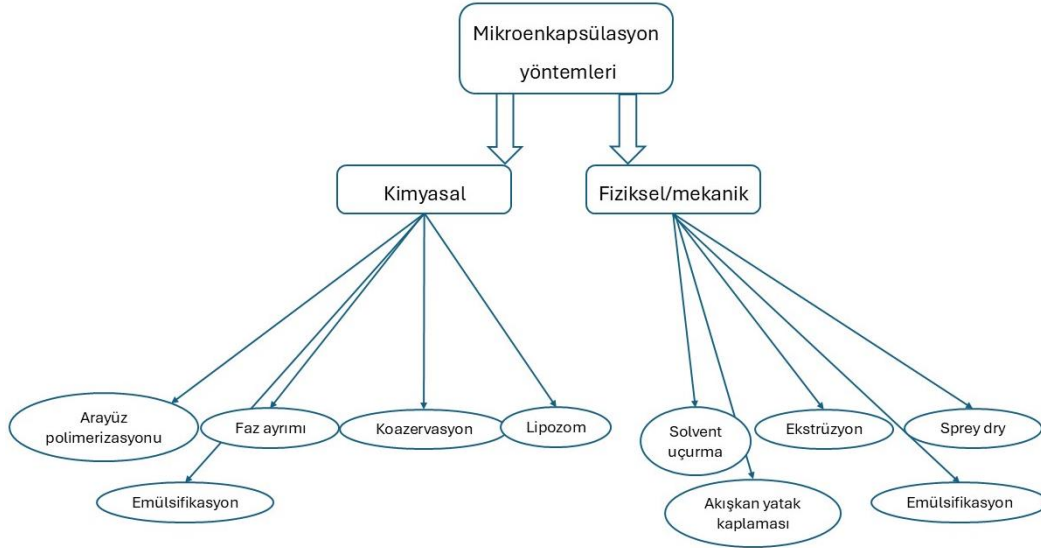
2.7 Mikroenkapsülleme Teknolojisi

Mikroenkapsülleme, tarım, gıda, ilaç gibi endüstrilerde (Tablo 2.1) uzun yıllardır kullanılan etkili bir teknolojidir (Gimeno, 1996; Nedovic vd., 2011). Mikroenkapsülleme, bir çekirdek malzemenin kapsülleyici, taşıyıcı, matris, kaplama, membran veya kabuk gibi duvar malzemeleriyle çevrelenmesidir. Mikroenkapsüllerin Kabul gören boyutları 5-500 µm arasındadır. Biyoaktif bileşenlerin mikroenkapsüllemesi, ürünlerin raf ömrünün uzatılmasını ve kullanım miktarının azaltılması gibi faydalar sağlayabilir. Endüstrinin isteklerine cevap verebilmek için kapsüllemede kullanılacak taşıyıcıların basit teknolojiye ihtiyaç duyan ve düşük maliyetli olması çok önemlidir (Paulo ve Santos, 2017). Mikroenkapsülasyon, aktif bileşenlerin çevre koşullarından etkilenmemesini sağlar ve uçucu yağlar, vitaminler ve antioksidanlar gibi değerli ve hassas bileşiklerini korur. Ayrıca, bazı bileşenlerin birbirleriyle istenmeyen etkileşimlerini önler (Dadkhodazade vd., 2021).

Tablo 2. 1 Mikroenkapsülasyonun uygulama alanları

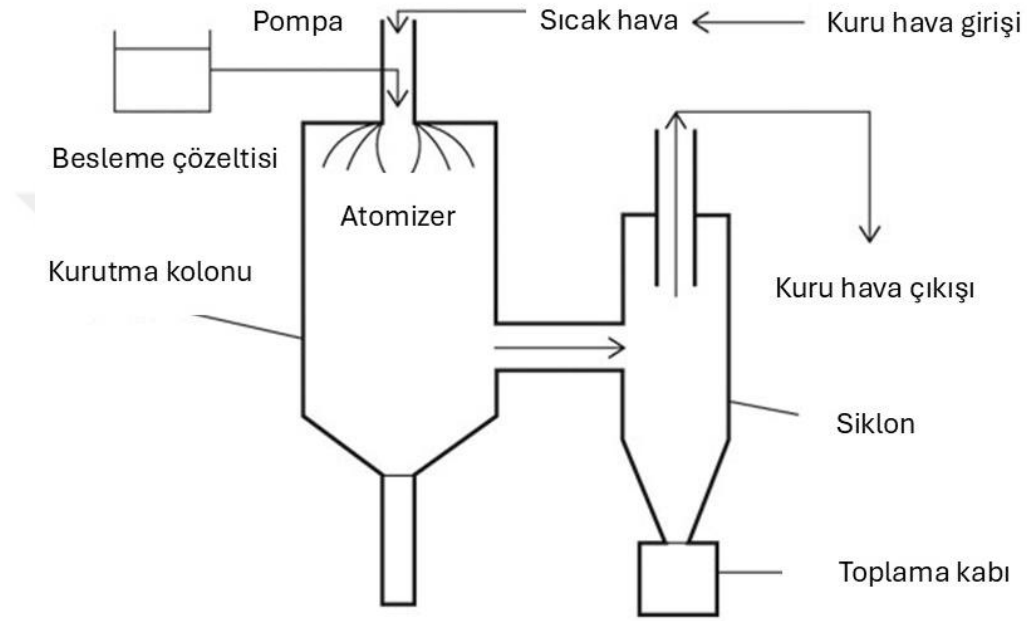
Tarım	İşleme (Processing)	Ürünler	Beslenme
Yeni pestisitler	Aroma enkapsülasyonu	UV koruma	Nutrasötikler
Genetik mühendisliği	Jelleşme prosesi	Antimikrobiyaller	Besin iletimi
Koruma	Nano emülsiyonlar	Durum ve kötüye kullanım monitörleri	Mineral/vitamin takviyesi
Toprak koşullarını ölçen sensörler	Topaklanma önleyiciler	Güvenlik/sahteciliğe karşı koruma	İçme suyu saflaştırma
	Ekipman temizleyiciler	Kontaminasyon sensörleri	Besin takviyelerinin tat ayarlamaları

Koruma rolünün yanı sıra çekirdek maddelerin istenilen matriks veya ortamda belirli bir sürede kontrollü salınımını sağlayarak bozunmayı kendiliğinden önleyebilir. Biyoaktiflerin kapsüllenmesi için çeşitli kapsülleme yöntemleri geliştirilmiştir; en yaygın olanları Şekil 2.6'da gösterilmektedir.

**Şekil 2. 6** Çeşitli kapsülleme yöntemleri türleri (Dadkhodazade vd., 2021)

Endüstride kapsülleme için en popüler tekniklerden biri püskürtmeli kurutma olarak bilinir. İyi kalitede toz parçacıkları üretmek için uygun maliyetli, esnek ve hızlı bir prosedürdür (Chandralekha vd., 2016).

Püskürtmeli kurutma yönteminde, çözelti halindeki duvar ve çekirdek malzemeleri kapsülleme işlemi için, bir pompa yardımıyla ısı içeren bir girişe yollanır ve bir püskürtme nozzle'ı aracılığıyla çözelti parçacıklarının hızlı atomizasyonu gerçekleşir. Atomize damlacıklar sprey kurutucunun sıcak hava akışına maruz kalır (160-220°C). Bu nedenle, bu damlacıklarda bulunan su hızla buharlaşır ve katı kütle susuz kalır. Daha sonra uygun çıkış sıcaklığıyla kurutma havasından son ürün ayrılır (Piñón-Balderrama vd., 2020).



Şekil 2. 7 Püskürtmeli kurutma sistemi

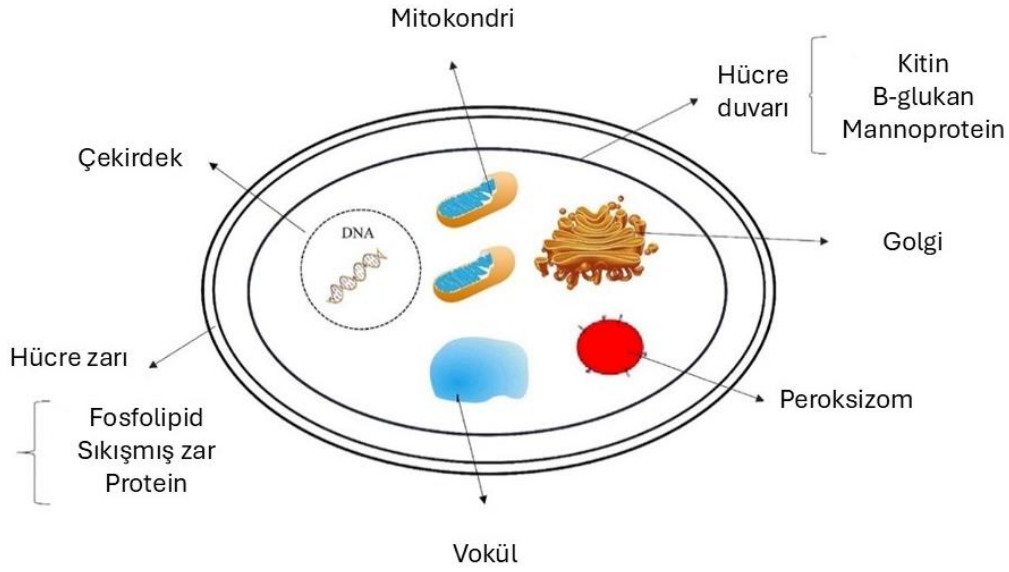
Endüstriyel ortamlarda, kolay ve nispeten basit bir yöntem olan püskürtme kurutma sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak sıcaklığa duyarlı moleküller (protein taşıyıcılar vb.) yüksek kurutma sıcaklıklarında parçalanabilir ve sistemde enzimatik olmayan kahverengileşme oluşabilir. Yüksek giriş sıcaklıkları, mikroorganizmaları ve kimyasal biyoaktif bileşikler de etkileyebilir (Anandharamakrishnan, 2015). Bunun için üretim yönteminin optimize edilmesi ve duvar malzemelerin doğru seçilmesi çok önemlidir.

Mikrobiyal pestisitlerin başarısı, tarım zararlı ve hastalık etmeninin özelliklerine, formülasyon bileşenleriyle ilişkisine, saklama koşullarına ve uygulama yüzeyine veya yerine bağlı olan uygun bir formülasyonda yatmaktadır. Son yıllarda çoğu araştırma, sırasıyla depolama sırasında ve uygulama sonrasında daha stabil ve etkili

formülasyonların araştırılması ve geliştirilmesini bir kenara bırakarak, esas olarak daha öldürücü suşların seçimi, seri üretim ve saha deneylerine odaklanmıştır. Bu sebeple biyopolimer temelli mikroenkapsülasyon işlemleri ve canlılığı koruyan formülasyonlar önem kazanmıştır. Mikrobiyal mikrokapsülasyon, mikroorganizmaların olumsuz çevre koşullarından korunması için bir matris içerisinde kaplandığı veya hapsedildiği bir işlemdir. Mayalar söz konusu olduğunda, mikrokapsülasyon işlemi onların güneş radyasyonu, sıcaklık ve bağıl nem gibi canlılıklarını azaltan faktörlere dayanmalarına olanak tanıyarak doz ve uygulama sayısını azaltır (Gerding-González vd., 2007; Vemmer ve Patel, 2013).

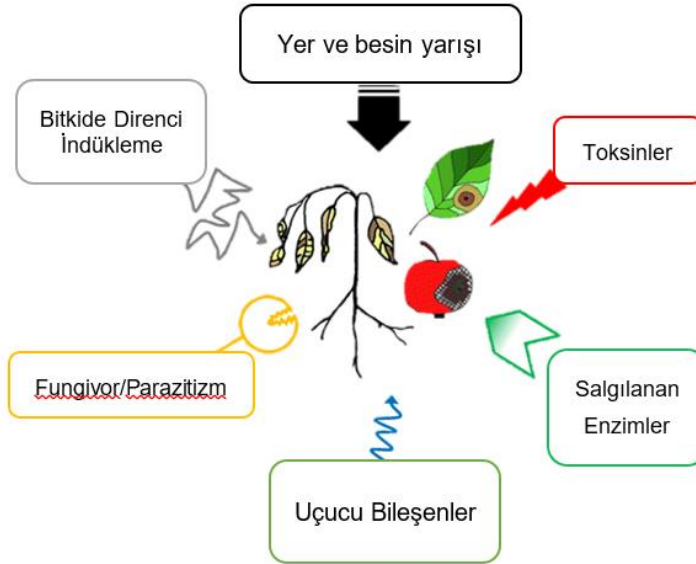
2.8 Mayaların tarımda biyopestisit olarak kullanımı

Mayalar ökaryotik hücre duvarında kitin, β -glukan ve mannoprotein olan mikroorganizmalardır. Mayalar dünya çapında esas olarak gıda endüstrisindeki uygulamalarıyla tanınmaktadır ancak son yıllarda biyomedikal araştırmalar için model organizma olarak, biyoyakıt üretim endüstrisinde ve tarım sektörü kullanılmaktadır. Tarımda biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirler. Mayalar besinler ve alan için rekabet, toksinlerin, enzimlerin ve uçucu organik bileşiklerin salgılanması ve bitkideki direncin uyarılması gibi özelliklerle antifungal aktivite gösterirler. Bu özellikleri nedeniyle biyolojik bitki koruma maddelerinin geliştirilmesi için umut vericidirler (Ezzouggari et al., 2024).



Şekil 2. 8 Maya hücresinin yapısının şematik gösterimi (Dadkhodazade vd., 2021)

En büyük maya popülasyonları genellikle topraktan ziyade rizosferde bulunur. Alternatif olarak, bitkinin iç kısmında kolonileşen endofitik mayalar ve ayrıca bitki ve meyve yüzeyinde bulunan epifitik mayalarda mevcuttur (Freimoser vd.,2019).



Şekil 2. 9 Mayalara biyokontrol aktivitesi kazandıran çoklu mekanizmalar (Freimoser vd.,2019)

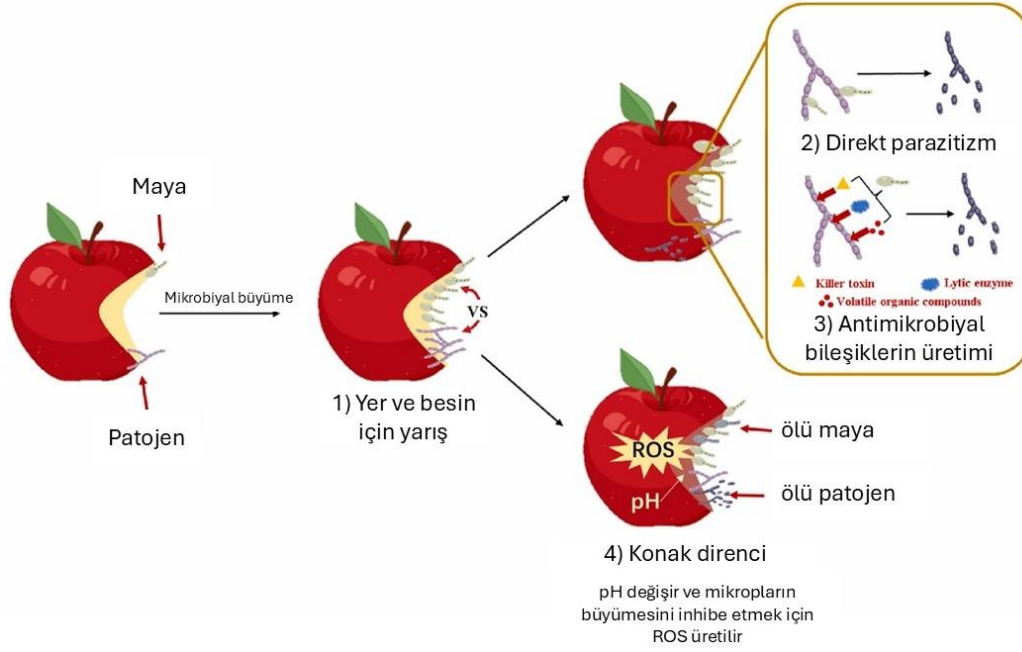
Özellikle meyvelerde hasat sonrası uygulanan maya, besin maddeleri ve alan için rekabet üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Mayalar genellikle alan açısından hızlı

ve yüksek büyüme avantajına sahiptir, bu da meyvedeki yaralı alanın tamamını kaplayan biyofilm oluşumuna neden olur. Ek olarak, çeşitli çalışmalarda, mayaların bazı patojenlere karşı besin maddesi için rekabete girdiğini belirtilmiştir. Bu durum, ortamda bulunan besin maddelerinin mayalar tarafından hızla tüketildiğini ve fungal sporların çimlenmesinin engellendiğini göstermektedir. Ayrıca mayalar, patojenleri kontrol etmek için çok önemli olan VOC'ler üretebilirler. Bu özellikleri sayesinde, biyokontrol ajanı ile patojen veya gıda arasında fiziksel bir etkileşim olmadığından, ideal antimikrobiyaller olarak kabul edilebilirler (Sui vd., 2015; Freimoser vd., 2019). Biyolojik kontrol, böcek saldırılarını önlemek veya ortam koşullarında yabancı otların bitki büyümesini engellemek amacıyla da içerir (Hernández-Fernández vd., 2021).

Özellikle iyi biyokontrol performanslarına sahip antagonist mayalar, meyve yüzeyleri, yaprak-toprak gibi doğal habitatlar, toprak ve deniz suyu gibi birçok kaynaktan başarıyla izole edilmiştir. Hasat sonrası biyokontrol ajanları olarak antagonistik mayaların uygulama potansiyelleri, bilimsel yayınlarda geniş çapta araştırılmıştır (Tablo 2.2). Ancak *Candida oleophila*, *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia fructicola*, *Cryptococcus albidus* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi yalnızca birkaç maya türü ticarileştirilmiş maya bazlı biyokontrol ürünleri olarak geliştirilebilmiştir (Hernandez-Montiel vd., 2021).

Tipik bir antagonistik süreçte maya hücreleri ilk olarak elma, şeftali ve domates gibi hasat sonrası meyve ve sebzelerde yaralarla karşılaşır ve ardından ilk 24 saat içinde besinleri ve alanı işgal etmek için hızla büyür. Kolonize mayaların gelişmesiyle birlikte, doğrudan parazitleştirme etkisi yoluyla konakçı dokular veya fitopatojen hücreler üzerinde bir maya biyofilmine dönüşebilirler. Mayalar tarafından salgılanan hücre duvarını parçalayan enzimler (esas olarak kitinazlar, glukanazlar ve proteazlar dahil), öldürücü toksinler (K1, K2 ve K28 gibi) ve uçucu organik bileşikler (hidrokarbonlar, alkoller ve benzen türevleri gibi VOC'ler) maya biyofilmi yoluyla yayılabilir ve dış ortama taşınarak yakındaki fitopatojenleri inhibe edebilir veya etkisiz hale getirebilir (Freimoser vd., 2019). Ek olarak, meyve ve sebzelerin yara bölgesinde kolonize olan mayalar da bitkilerin konakçı direncini tetikleyebilir, bu da pH durumunun değişmesine ve artık mikroorganizmaların hayatta kalması için uygun olmayan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına

neden olabilir. Özetle, mayaların antagonistik mekanizmaları dört yola ayrılabilir: rekabet (besin maddeleri ve alan gibi), doğrudan parazitlenme, antimikrobiyal bileşiklerin üretimi (litik enzimler, öldürücü toksinler ve VOC'ler gibi) ve konakçı direncinin uyarılması (Ma vd., 2023).



Şekil 2. 10 Mayanın antagonist mekanizmaları (Ma vd., 2023)

Antagonist mayaların antimikrobiyal etkileri; besinler ve alan için rekabet, doğrudan parazitlik etkisi, antimikrobiyal bileşiklerin üretimi, öldürücü toksin üretimi, litik enzimler, uçucu organik bileşikler (VOC'ler) ve konakçı direncinin indüksiyonu gibi etkilere bağlıdır (Şekil 2.6).

Tablo 2. 2 Farklı kaynaklardan elde edilen antagonist mayalar, hedef mikroorganizmalar ve tarama yöntemleri

Maya türleri	Antagonistik suşlar	Kaynak	Hedef mikroorganizma	Tarama yöntemleri	Referans
<i>Candida</i> spp.	<i>Candida famata</i>	Narenciyeler, incir, dikenli armut, üzüm	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Vitro</i>	Arras (1996)
	<i>Candida sake</i>	Elma	<i>Penicillium expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizopus nigricans</i>	<i>Vivo</i>	Viñas vd. (1998)
		Toprak	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>	<i>Vitro</i>	Arrarte vd. (2017)
		Domates	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>	<i>Vivo</i>	Wilson vd. (1993)
	<i>Candida tropicalis</i>	Muz	<i>B. cinerea</i>	<i>Vivo</i>	Zhimo vd. (2016)
<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Elma	<i>P. expansum</i>	<i>Vivo</i>	Lima vd. (1998)
	<i>Cryptococcus flavus</i>	Pirinç yaprağı	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Helminthosporium oryzae</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Vivo</i>	Nutaratat vd. (2014)
<i>Pichia</i> spp.	<i>Pichia anomala</i>	Doğal yaşam alanları	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<i>Vitro</i>	Mohamed and Saad (2009)
	<i>Pichia kluyveri</i>	Yaprak	<i>P. digitatum</i>	<i>Vivo</i>	Liu vd. (2017)
	<i>Pichia caribbica</i>	Meyve bahçesi toprağı	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>vivo</i>	Zhao vd. (2012)
	<i>Pichia membranaefaciens</i>	Şeftali	<i>R. nigricans</i>	<i>Vivo</i>	(Fan & Tian, 2000)
	<i>Pichia guilliermondii</i>	Meyve ve sebzeler	<i>Colletotrichum capsici</i>	<i>Vivo</i>	Chanchaichaovivat vd. (2007)

Tablo 2. 2 Farklı kaynaklardan elde edilen antagonist mayalar, hedef mikroorganizmalar ve tarama yöntemleri (devamı)

<i>Metschnikowia</i> spp.	<i>Metschnikowia andauensis</i>	Elma	<i>P. expansum</i>	Vivo	Manso and Nunes (2011)
			<i>B. cinerea</i>		
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	İncir	<i>Rhizopus stolonifer</i>	vivo	Ruiz-Moyano vd. (2016)
	<i>Metschnikowia sinensis</i>	Çilek	<i>B. cinerea</i>	Vivo	Pawlikowska vd. (2019)
			<i>Monilinia laxa</i>		
			<i>Alternaria alternata</i>		
			<i>P. expansum</i>		
<i>Rhodosporidium</i> spp.	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	Deniz	<i>A. alternata</i>	Vivo	Wang vd. (2008)
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Çilek	<i>P. expansum</i>	Vivo	Zhang vd. (2009)

Pichia kudriavzevii, doğal ortamlarda yaygın görülen ve dünyanın her kıtasında geleneksel olarak fermente edilmiş yiyecek ve içeceklerde bulunan bir maya türüdür. Son yirmi yılda, gıda işleme ve biyoteknolojideki potansiyel kullanımı nedeniyle daha fazla ilgi çekmiştir (Chu vd., 2023). Bu bozulma mayası bazen koku salınımına ve biyofilm oluşumuna neden olur, ancak daha sıklıkla probiyotik özellikler gösterir ve lezzet bileşiklerinin oluşumuna katkıda bulunur. Son yıllarda tek başına veya diğer mayalarla birlikte tutarlı kalitede fermente ürünler elde etmek için bir başlatıcı kültür olarak kullanılmaktadır. *P. kudriavzevii*, etanol, yüksek pH, yüksek sıcaklık, hiperozmotik stres ve lignoselülozik inhibitörlere karşı yüksek toleransı gibi doğal özellikleri nedeniyle endüstriyel uygulamalar için de ilgi çekici hale gelmiştir (Chu vd., 2023).

P. kudriavzevii'nin, birçok etki mekanizması yoluyla fungal patojenlerin neden olduğu hasat sonrası küflenme ve çürümeye karşı etkili olduğu da gösterilmiştir. Bleve vd. (2006), *P. kudriavzevii*'nin *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus niger*'e karşı antifungal etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Madbouly vd. (2020) ise elma meyvelerinden izole edilen çeşitli endofitik mayalar arasında *P. Kudriavzevii*'nin en güçlü öldürücü toksinler ürettiğini göstermiştir. Delali vd. (2021), *P. digitatum*'a karşı yapılan *in vitro* ve *in vivo* biyokontrol deneylerinde, *P. kudriavzevii*'nin turuncgillerdeki yeşil küfü kontrol etmek için biyofilm oluşumu, besinler için rekabet ve uçucu organik bileşikler (VOC) üretimi gibi bir dizi mekanizmayı kullandığını doğrulamışlardır. Chi vd. (2015) ise, *P. kudriavzevii*'nin biyofilm oluşturabilmesinin ısı ve oksidatif stres gibi çevresel faktörlere karşı toleransını artırdığını keşfetti.

P. kudriavzevii feniletil asetat ve feniletanol gibi antimikrobiyal özelliklere sahip uçucu bileşikler üretir ve bu bileşiklerin çeşitli küflere karşı etkili olduğunu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Choińska vd., 2020). Ayrıca *P. kudriavzevii*, patojenik mikroorganizmalar ve meyve yüzeylerindeki diğer yerel epifitik mikroflora ile besin ve alan rekabeti sonucu baskın tür haline gelebilme özelliğine sahiptir. Liu vd. (2020), soğuk depolama sırasında *P. kudriavzevii* uygulamasının kiraz domatesi yüzeylerinin mikrobiyal bileşimi ve popülasyon dinamikleri üzerindeki etkilerini incelemişler ve *P. kudriavzevii* rekabet avantajına dayanarak patojenlerin ardışıklığı bozarak baskın tür olmalarını engellediğini göstermişlerdir. Bununla

birlikte, beslenme ve alan rekabetindeki etkisini vurgulayan başka bir çalışmada ise, *P. kudriavzevii*'nin enerji metabolizması ve besin kullanımı verimliliği, kalsiyum askorbat kullanımının sinerjik teşvik etkisiyle artırılmış ve kiraz domates gri küfüne karşı daha iyi biyolojik kontrol etkinliği gösterdiği gözlemlenmiştir (Sun vd., 2021). Diğer antagonistik mayalara benzer şekilde, *P. kudriavzevii*'nin biyolojik kontrolünde çok sayıda mekanizma çalışmaktadır ve konak, mikrobiyom ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimler daha fazla araştırılmalıdır.

BCA olarak kullanılan mikroorganizmaların ve mayaların ticari başarısı, büyük ölçüde ürün formülasyonlarına bağlıdır, bu nedenle bu çalışmalarda birincil amaç daha etkili formülasyonlar geliştirebilmektir. BCA'ların yeni formlarını elde etmekle ilgili araştırmalar, yararlı mikroorganizmaların biyotik strese karşı direncini ve biyoaktif kalıcılığı artırır (Fathi vd., 2021; Lade vd., 2019). Bu bakış açısından, yeni biyo-pestisit formülasyonları oluşturmak için mikro ve nanoteknolojilerin kullanılması öne çıkmaktadır. BCA'ların (sporlar veya metabolitlerin) kapsülasyon ile polimer koruyucu bir kabuk içine yerleştirilmesi, BCA'ların stabilitesini artıran ve onları iklim koşullarından koruyan ve dolayısıyla biyotik strese karşı daha fazla biyoaktiviteye sahip olan güçlü bir formülasyondur. Peil vd. (2020), sulu ortamlarda *Trichoderma reesei* sporunun lignin polimerine kapsüllenmesinin, *Trichoderma reesei* sporunun istenmeyen erken çimlenmesini önlediğini ve *T. reesei*'nin asma gövdesi hastalıklarına karşı antifungal aktivitesini artırdığını keşfetmişlerdir. Mikroorganizma ve maya enkapsülasyonunun BCA olarak kullanılmalarında sağladıkları avantajlar şöyle özetlenebilir:

- Biyoaktif bileşiğin kontrollü salımı
- Biyoaktif bileşiğin raf ömrünün uzatılması
- BCA'nın biyokütlesinin korunması
- BCA stabilitesinin artırılması
- Kimyasal pestisitlere göre daha etkin maliyet yaklaşımı sağlaması
- İklim faktörlerine karşı BCA'nın korunması
- Etkin doz ve mikroorganizma sayının azaltılması
- BCA biyoaktivitesinin biyotik strese karşı korunması
- BCA etkinliğinin artırılması

Kapsülleme, biyoaktif maddelerin raf ömrünü uzatır ve depolama süresi boyunca ve biyotik stres faktörlerine uygulandıktan sonra metabolik aktivitelerini korur. Bu nedenle, daha az uygulama ve daha az doz gereklidir. Gerçekten de, kapsülleme biyolojik ajanların biyokütlesini korur ve formülasyonların toplam maliyetini düşürür, bu da kimyasal işleme göre daha ucuz bir şekilde biyotik stres faktörleriyle mücadele etmek için daha ekonomik bir yöntem sağlar (Fraceto vd., 2018). Ek olarak, kapsülleme, biyoaktif bileşiklerin düzenlenmiş salınımı yoluyla biyolojik ajanların biyokütlesini korur ve formülasyonun toplam maliyetini düşürür, bu da biyotik streslerle kimyasal işleme göre daha ekonomik bir şekilde mücadeleye yardımcı olur (Saber-Riseh vd., 2021). Çeşitli taşıyıcıların kapsülleme sistemleri oluşturma yeteneği çok önemlidir. Taşıyıcılar olarak, ucuz, biyolojik olarak parçalanabilir ve çevreye faydalı olan yeşil nanomalzemeler ve biyopolimerler popülerlik kazanmıştır (Riseh vd., 2022).

3.1 Materyal

Sodyum aljinat (SA), peynir altı suyu protein izolatı (WPI), mısır nişastası (CS) ve maltodekstrin (MDX) Katkı Deposu'ndan (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir. Maya ekstraktı, malt ekstraktı, pepton, glukoz, agar ve Patates dekstroza agar (PDA) Merck'ten (Darmstadt, Almanya) elde edildi.

3.2 Maya Hücrelerinin İzolasyonu ve Yetiştirilmesi

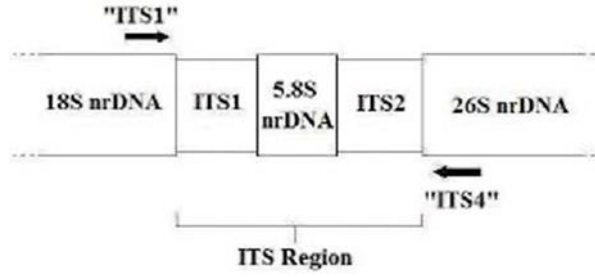
Bu çalışmada, Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'ndeki Adana ilindeki narenciye bahçesi meyvelerinden 100 maya suşu izole edilmiştir (Park ve Chang, 2000; Vemmer ve Patel, 2013; Gerding-González vd., 2007). İzolatların 76'sı *ascomycetous* suşlardan, 44'ü ise *basidiomycetous* suşlardan oluşmuştur. Aktif kültürler elde etmek için mayalar, 26°C'de maya ekstraktı pepton dekstroza agar (YPDA, 10 g/L, pepton 20 g/L, dekstroza (glikoz) 20 g/L) üzerinde büyütülmüştür. Mayaların izolasyonu sırasında, hasat sonrası narenciyelerde yeşil küf oluşumuna neden olan *P. digitatum* da aynı ortamlardan izole edilmiştir (Şekil 3.1). Aktif kültür elde etmek için patates dekstroza agarda (PDA; 4 g/L patates infüzyonu, 20 g/L glikoz ve 15 g/L agar) 14 gün süreyle büyütülmüştür. Bu maya suşlarından antifungal etkili üç maya türü *Wickerhamomyces anomalus* (M72), *Meyerozyma guilliermondii* (M77), *Pichia kudriavzevii* (M74)) seçildi ve kapsülleme için *Pichia kudriavzevii* (M74) kullanılmıştır.



Şekil 3. 1 Adana-Mersin Bölgesi Narenciye Yetişen Ortamlardan/Yüzeylerden Mikroorganizma İzolasyonu

3.3 Maya Suşlarının Tanımlanması

İzole edilmiş maya suşlarının tanımlanması, DNA izolasyonu ve ardından ITS (dahili kopyalanmış ayırıcı) primerleri kullanılarak PCR ile yapılmıştır. Mantarlarda genellikle nüklear ribozomal DNA (nrDNA)'da 18S, 5.8S, 26S bölgelerinin arasında kalan iç transkripsiyona uğramış boş bölgelere (internal transcribed regions) spesifik primerler tasarlanarak spesifik tür tayini yapılmıştır. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi 18S nrDNA ile 5.8 S nrDNA arasında kalan bölgeye ITS 1, 5.8 S nrDNA ile 26S nrDNA arasında kalan bölge ITS2 olarak adlandırılmakta ve ayırıcı tanıma bu iki bölgenin de aynı anda PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin veri kütüphanelerinde araştırılmasının daha kesin sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Manter ve Vivanco, 2007). Kullanılan primerler ITS-F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3'), ITS-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')tir ve PCR koşulları şunlardır: denatürasyon 94°C'de 3 dakika, tavlama 53°C'de 45 saniye, uzatma 72°C'de 90 saniye ve son uzatma 72°C'de 10 dakika olarak ayarlanmıştır. Reaksiyonun tamamı 30 döngüye ayarlanmış ve PCR ürünleri Sanger Sekans yöntemiyle sekanslanmıştır.



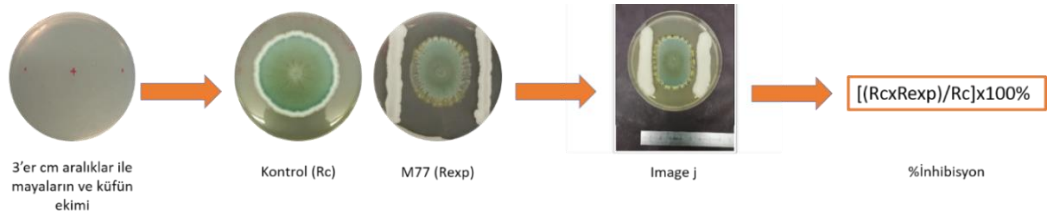
Şekil 3. 2 İçsel transkripsiyona uğramış boş bölgeler (internal transcribed regions, ITS)

3.4 Hasat Sonrası Hastalıklara Neden Olan Mantarları Engelleyebilen Antagonistik Mayaların Seçimi

Bir PDA plakası üzerinde bir maya ve bir mantar patojeninin ikili yetiştirilmesiyle, Türkiye Akdeniz Bölgesi'ndeki narenciye bahçeleri ve ağaçlarında yetişen ve portakallarda hasat sonrası hastalıklara neden olan 120 maya suşunun antagonistik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Antagonistik aktivite tayini Sukmawati vd. (2021) yönteminde bazı değişikliklerle ile yapılmıştır (Şekil 3.3). PDA ortamı, plakanın bir kenarından yaklaşık 3 cm uzağa aktif maya hücrelerinden oluşan bir koloni ile doğrusal çizgilerle aşılmalıdır. Plakanın 26 °C'de 48 saat inkübasyonundan sonra, aktif olarak büyüyen bir mantar patojeninin (*Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum*) 4 mm çapındaki bir diski, maya çizgisinden yaklaşık 3 cm uzakta, plakanın karşı kenarına aşılmalıdır. Plakalar üzerinde on gün 26°C'lik inkübasyon yapılmıştır. Kontrol olarak yalnızca mantarla enfekte olmuş bir plaka kullanılmış ve her bir işlem için üç tekrar gerçekleştirilmiştir. Bir inhibisyon bölgesi, antagonist aktivitenin varlığını gösterir. Miselyum büyümesinin % inhibisyonu şu formül ile belirlenmiştir:

$$\{(R_1 - R_2)/R_1\} \times 100 \quad (1)$$

R_1 kontrol uygulamasında fungus büyüme yarıçapı ve R_2 örnekteki büyüme yarıçapı olarak ölçülmüştür.



Şekil 3. 3 Maya izolatlarının antagonist etkisi ölçümünün şematik gösterimi

3.5 Mikroorganizma Üretiminin Optimizasyonu- Taguchi metodu

Mayaların en yüksek konsantrasyonda ve maksimum üreme potansiyelinde elde edilebilmesi için besiyeri optimizasyonu Taguchi metoduyla yapılmıştır. Antagonist mayanın büyütülmesi için optimal şartların araştırılması yapılmıştır. Besiyeri hazırlanırken hücrelerin ihtiyacı olan karbon kaynağı, azot kaynağı, tuz oranı vb. içerikler önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra ortam sıcaklığı, besi yerinin pH gibi çevresel koşulların optimizasyonu da gerekmektedir. Bu optimizasyonlar için literatürde yer alan Taguchi metodu uygulanmıştır. Taguchi yöntemi büyütülmeye uygulanan değişkenlerin biyo-kütle miktarına göre yorumlandığı bir yöntemdir. Toguchi'de karbon kaynağı (glikoz), azot kaynağı (glikoz) ve tuz kaynağı (CaCl_2) üç farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Konsantrasyon değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1 Taguchi yönteminde kullanılan karbon kaynağı (glikoz), azot kaynağı (glikoz) ve tuz kaynağı (CaCl_2) üç farklı konsantrasyonlar değerleri

	Yüzde Konsantrasyon		
	Glikoz	Pepton	Yeast extract
1	%1	%1	%0,5
2	%1	%2	%1
3	%1	%4	%2
4	%2	%1	%1
5	%2	%2	%2
6	%2	%4	%0,5
7	%4	%1	%2
8	%4	%2	%0,5
9	%4	%4	%1

İlk toguchi'de karbon kaynağı (glikoz), azot kaynağı (pepton) ve tuz kaynağı (CaCl_2) üç farklı değişkenin farklı konsantrasyonlarda tartımları yapılmıştır. 100 ml besiyerine 10µl'lik öze ucu yardımıyla taze petrilerinden koloniler toplanmıştır

ve erlenlerin içerisine atılmıştır. Daha sonra karıştırıcı içerisine yerleştirilmiştir. Sıfırinci saat ölçümü olarak 6-10ml olarak ayrılan örneklerin OD600 ve OD660 dalga boylarında absorbansları ölçülmüştür. Örnekler OD600 ve OD660 dalga boylarına karşı en iyi absorbans değeri ölçülmüştür ve bir sonraki taguchi yönteminde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Taguchi yönteminin ikinci kısmında farklı konsantrasyonlarda pH, rpm ve sıcaklık değerleri farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Tablo 3.2’de taguchi yönteminde kullanılan pH, rpm ve sıcaklık değişkenlerinin üç farklı konsantrasyon değerleri verilmiştir. Total 110ml olarak hazırlanan besiyerleri 121°C’de 15dk otoklavlandıktan sonra içerisine 1M sitrat buffer ve 1M dipotasyum hidrojen fosfat buffer eklenmiştir. İlk hazırlanan besiyeri miktarı bufferların miktarına göre azaltılmıştır. Bu çalışmada 110ml olarak hazırlanan besiyerlerinde 75ml olarak yeast extract, pepton ve glukoz içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Otoklav sonunda toplam 35 ml olacak şekilde sitrat buffer ve fosfat buffer eklenerek toplam hacim 110ml’ye tamamlanmıştır. Bufferları eklenmiş ve 110ml olan besiyerlerinden 6-10ml örnek toplanıp ve temiz falkonlara konulmuştur. Örnekler ayrıldıktan sonra 10ul’lik öze ucu yardımıyla mayanın taze petrilerinden koloniler toplanmıştır ve erlenlerin içerisine atılmıştır. Daha sonra orbital shaker içerisine yerleştirilmiştir. Sıfırinci saat ölçümü olarak 6-10ml olarak ayrılan örneklerin OD600 ve OD660 dalga boylarında absorbansları ölçülmüştür.

Tablo 3. 2 Taguchi yönteminde kullanılan pH, rpm ve sıcaklık değişkenlerinin üç farklı konsantrasyon değerleri

	Yüzde Konsantrasyon		
	pH	Rpm	Sıcaklık
1	4	180	25
2	4	200	30
3	4	220	37
4	5	180	30
5	5	200	37
6	5	220	25
7	7	180	37
8	7	200	25
9	7	220	30

3.6 Potansiyel biyolojik kontrol ajanı olarak seçilen mayaların uçucu bileşen kapasitelerinin tayini

Maya izolatlarının *P.digitatum* ve *P.italicum*'a karşı ürettiği uçucu organik bileşiklerin (VOC'ler) antifungal aktivitesi, Parafati vd., (2015) ve Hammami vd., (2022) protokolüne göre iki katlı bir petri kabı deneyi kullanılarak test edilmiştir. Kontrol olarak sadece *Penicillium* türlerini içeren PDA kapları kullanılmıştır. Her işlem için üç tekrar plaka kullanılmış ve test funguslarının radyal büyüme inhibisyonunu ölçmek için deney iki kez tekrarlanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4 Maya izolatlarının Uçucu Organik Bileşiklerinin etkisi ölçümünün şematik gösterimi

3.7 Maya Türlerinin Sinerjik Etkilerinin Belirlenmesi

Maya türlerin ayrı ayrı antifungal etkinliklerinin belirlenmesinin ardından birbirleriyle olan sinerjik aktiviteleri araştırılmıştır. Bu çalışma ürünleşme potansiyeli olan mikroorganizmaların birbirlerinin etkinliklerini nasıl değiştirdiği araştırılmıştır. Çalışmada sinerjik etkinliklerin belirlenmesinde 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak dama tahtası (checkerboard) yöntemi uygulanmıştır. Sıvı besiyerinde etkin dozlarının bir düşük dozunda ayarlanan maya örnekleri kuyu içerisine 50µl'lik hacimlerde olacak şekilde yatay ve dikey sıralarda ikili maya kombinasyonları çalışılmıştır. Mayalar kuyulara eklendikten sonra 100µl agarlı besiyeri eklenmiştir. Agarlar donduktan sonra *P.digitatum* ve *P.italucum* küfleri 0.5 Macfarland konsantrasyona ayarlandıktan sonra 10µl'lik hacimde besiyerlerine ekilmiştir ve 5-7gün 28°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda küflenmenin olmadığı kuyular belirlenmiş ve not edilmiştir.

3.8 Hidrolitik Enzimlerin Belirlenmesi

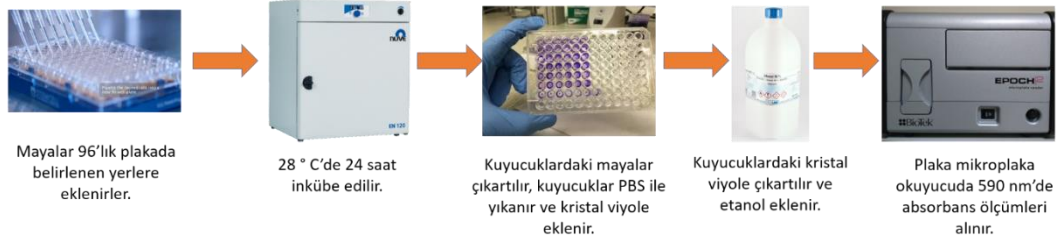
β -1,3-glukanaz, proteaz ve kitinaz enzimleri, aday BCA'ların antifungal aktivitelerinin etki mekanizmasını açıklamada önemli belirteçlerdendir. İlgili enzimlerin substratı olarak kitin, β -glukan ve yağsız süt tozu kullanılmıştır. Hammami vd. (2022) kullandığı yöntem modifiye edilerek, 24 saatlik maya kültürü süspansiyonlarından (10^7 hücre/mL) alınan alikotlar (10 μ L) eşleşen substratları içeren katı ortam (agar 15 g/L) üzerine yüzeysel olarak yayılmıştır.

- β -1,3-glukanazın aktivitesi, 5 g/L laminarin (β -1,3-glukan) ve 6,7 g/L maya nitrojen bazı içeren katı bir ortamda değerlendirilmiştir. Plakalar 72 saat boyunca 25°C'de inkübe edilmiş, Kongo Kırmızısı (0.6 g/L) ile boyanmış ve daha sonra oda sıcaklığında doksan dakika beklemeye bırakılmıştır. Plakalardaki kolonileri çevreleyen sarı-turuncu bölge, fazla kalan boyanın uzaklaştırılmasından sonra glukan hidrolizinin varlığını göstermiştir.
- Proteaz aktivitesi %2 agar ve %10 yağsız süt tozu kullanılarak değerlendirilmiştir. 110 °C'de beş dakikalık otoklavlamadan sonra ortam petrilere aktarılmıştır. Bir hafta boyunca aşılaman plaklar 25°C'de tutulmuş ve her gün kontrol edilmiştir. Aşılama bölgesinin çevresinde parlak bir halenin varlığı, enzimatik aktivitenin varlığını göstermiştir.
- Kitinaz aktivitesi, pH 7'de kitin üzerinde değerlendirilmiştir. 25°C'de 1-6 gün sonra, aşı bölgesini çevreleyen berrak bir bölgenin varlığı, hücre dışı kitinaz aktivitesinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Her izolat için üç tekrar petri kullanılmıştır. Koloninin onu çevreleyen halesinin gelişmesi olumlu bir sonuç olarak görülmüştür.

3.9 Biyofilm Oluşumu

Boya kristal moru kullanılarak, daha önce Parafati vd., (2015) ve Hammami vd., (2022) tarafından bildirildiği gibi, potansiyel BCA'lar olarak seçilen maya izolatlarının biyofilm gelişimini değerlendirmek için mikrotitre kabı analizi yöntemi kullanılmıştır. Maya suşları 10^7 hücre/mL'de büyütülmüş, 96 kuyucuklu bir polistiren plakanın oyuklarına üç tekrar halinde aşılamanmış ve plakalar, 75 rpm'de 26 °C'de 72 saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklar PBS

ile yıkanmış ve 45 dakika boyunca 100 µL %0,4 sulu kristal viyole çözeltisi ile boyanmıştır. Daha sonra kuyucuklar steril distile su ile yıkanmış ve hemen 200 µL %95 etanol ile boyası alınmıştır (Şekil 3.5). 45 dakika sonra çözeltideki kristal menekşe miktarı 590 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar OD cinsinden verilmiştir.



Şekil 3. 5 Maya izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin incelenmesinin şematik gösterimi

3.10 Maya Hücrelerinin Mikroapsüllenmesi

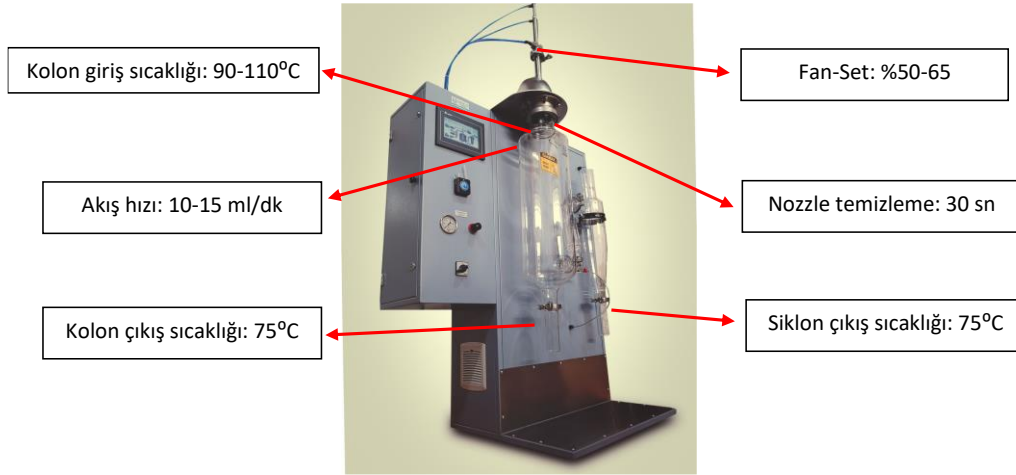
3.10.1 Polimer Çözeltisinin Hazırlanması ve Sprey Kurutma İşlemi

Başlangıç ortamından besin bileşenlerini çıkarmak için maya kültüründen hücreler, 6000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjleme yoluyla geri kazanılmış ve daha sonra iki kez steril %0,1 (ağırlık/hacim, a/h) peptonlu suyla yıkanmıştır. Önceki çalışmalar ve biyopolimerlerin özellikleri dikkate alınarak, farklı polimer konsantrasyonları (%0,1-10 a/h) ve bunların kombinasyonları, püskürterek kurutmanın başarılı olup olmayacağını belirlemek için ön testlere tabi tutulmuştur. 25°C sıcaklıkta bekletildikten sonra belirlenen oranlara karşılık gelen miktarda polimerler (MDX, nişasta, WPI) ilave edilmiş ve homojen bir çözelti elde edilinceye kadar 2 saat karıştırılmıştır. Maya konsantrasyonu 1×10^9 hücre/mL'ye ayarlanmış ve polimer çözeltisine eklenmiştir.

Tablo 3. 3 M74 mayasının püskürtülerek kurutulmuş kapsül formülasyonlarının Taguchi tasarımı

Örnekler	SA (w/v, %)	CS (w/v, %)	MDX (w/v, %)	WPI (w/v, %)
1	0	5	0	0
2	0	0	5	0
3	0	0	0	5
4	0	10	0	0
5	0	0	10	0
6	0	0	0	10
7	0,1	5	0	0
8	0,1	0	5	0
9	0,1	0	0	5
10	0,1	10	0	0
11	0,1	0	10	0
12	0,1	0	0	10

Minitab yazılımıyla hazırlanan Taguchi yaklaşımı, biyofarmülasyonun bileşimini sprey kurutucu işlemiyle optimize etmek için kullanılmıştır (Tablo 3.3). Biyopolimerlerin Taguchi yaklaşımı için ön çalışmalar sonucu seçilen sodyum aljinat (SA) konsantrasyonları %0-0,1 (a/h), peynir altı suyu protein izolatı (WPI), mısır nişastası (CS) ve maltodekstrin (MDX) konsantrasyonları %0-10 (a/h)'dir. Deneysel tasarım için yanıt değişkenleri kurutma sonrası mayaların canlı kalma miktarları (%) ve üretilen toz formülasyonunun verimi olmuştur. Taguchi yaklaşımıyla 12 deneysel çalışma oluşturulmuş ve her işlem üç kez tekrarlanmıştır. Sprey dryer ile kurutma parametreleri Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3. 6 Spray-dryer üretim parametreleri

3.10.2 Sprey Kurutulmuş Tozun Optik Mikroskopi ve SEM Yoluyla Morfolojik Analizi

Püskürterek kurutmayla elde edilen toz örneklerinin genel dağılımını incelemek için bir optik mikroskop (CKX41; Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) kullanılarak optik mikroskopi görüntüleri elde edilmiştir. Tozun yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Püskürterek kurutma yoluyla elde edilen toz numuneler, çift taraflı yapışkan bant kullanılarak alüminyum stublara sabitlenmiş ve fazla toz, kuru havanın stubların yüzeyine yönlendirilmesiyle giderilmiştir. Numuneler SCD 005 püskürtmeli kaplayıcıda (Almanya) altınla kaplanmış ve 10 kV hızlanma voltajında çalışan Zeiss Gemini 500 Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu (Almanya) ile farklı büyütmelerde incelenmiştir.

3.10.3 Parçacık Dağılımı ve Boyut Analizi

Püskürterek kurutulmuş toz numuneler (0,5-1 g) etanol ile karıştırılmış ve parçacıkların çaplarını ölçmek için bir parçacık boyutu analiz cihazı (Mastersizer-2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) kullanılarak boyutları ölçülmüştür. Tüm ölçümlerde protein için 1,41 ve su için 1,33'lük gerçek kırınım indeksi kullanılmış ve her numune için üç ölçüm alınmıştır. Toz numuneler için partikül boyutu değerleri Dv90 olarak verilmiştir.

3.10.4 Püskürterek Kurutmadan Sonra Canlılık Testi

Püskürterek kurutma işleminden sonra canlı maya hücresi sayımları, agar plakaları üzerine kaplama yoluyla belirlenmiştir. Bunun için 1 g sprey kurutulmuş maya tozu numunesi, 9 ml %0,1 (a/h) peptonlu su içerisinde rehidre edilmiş, 1 dakika vortekslenmiş ve yaklaşık 15 dakika boyunca çözünmeye bırakılmıştır. Seri dilüsyonlar yapılarak YPD agar üzerine ekim yapılmış ve 48 saat (26°C) inkübasyona bırakılmıştır. Canlı maya hücreleri, aşağıdaki formül (2) (Reddy vd., 2009) kullanılarak hesaplanmış ve sonuç, 1 g sprey kurutucu ürünü başına canlı maya hücreleri olarak rapor edilmiştir. Aynı işlem, canlı kalma yüzdesini ve enkapsülasyon yüzdesini hesaplamak için sprey kurutucu besleme süspansiyonunun 1 ml'sinin seyreltilmesiyle de yapılmıştır. Deney üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Canlılık yüzdesi şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ canlılık} = \text{Nr/Nf} * 100 \quad (2)$$

Nr, sprey kurutucu ürünündeki canlı hücrelerin sayısı ve Nf, kurutmadan önce besleme solüsyonundaki canlı hücrelerin sayısıdır (González-Gutiérrez vd., 2021).

3.10.5 Püskürterek Kurutulmuş Maya Hücresinin Antifungal Analizi

Agar dökme yöntemi Virgili R vd. (2012) tarafından tarif edilen yöntem bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu, maya suşlarının fungal suşlarına karşı minimum inhibitör konsantrasyonunu (MIC) belirlemek için yapılmıştır (fungus büyümesini engellemek için gereken maya hücresi/ml). Bunun için 1 g sprey kurutulmuş maya tozu örneği, 9 ml %0,1'lik peptonlu su ile rehidre edilmiş, 1 dakika vortekslenmiş ve yaklaşık 15 dakika çözünmeye bırakılmıştır. Maya süspansiyonu petri kutularına üç tekrar halinde eklenmiş ve Malt ekstrakt agarı (45-50 °C) ile karıştırılarak 1×10^0 'den 1×10^8 hücre/ml'ye kadar nihai hücre konsantrasyonları elde edilmiştir. Agar katılaştıktan sonra, Malt ekstrakt agar üzerinde büyütülmüş 10 günlük *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum*'dan hazırlanan 10 µl spor süspansiyonu (1×10^6 spor/mL) her petrinin ortasına eklenerek 7 gün boyunca (26°C) inkübasyona bırakılmıştır. Fungus yarıçapı ölçülmüş ve inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır. MIC, fungus büyümesini engelleyen hücre konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

3.10.6 MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Mayaların kapsülleme sonrasında mitokondriyal aktivitelerinin devam edip etmediğini değerlendirmek ve canlılıklarını incelemek amacıyla MTT analizi yapılmıştır. Püskürterek kurutulmuş mayanın canlılığı, FB Dos Reis Almeida vd. (2011) tarafından tarif edildiği gibi MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunun için 1 g sprey kurutulmuş maya tozu numunesi (4., 7. ve 10. formülasyon) 9 ml %0.1'lik peptonlu su içerisinde rehidrate edilmiş, 1 dakika vortekslenmiş ve yaklaşık 15 dakika çözünmeye bırakılmıştır. 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüjleme yapılarak süpernatant uzaklaştırılmış ve eşit miktarda YPD sıvı besiyeri ile değiştirilmiş, ardından hücre canlanmasına izin vermek için döner çalkalayıcıda (26°C 120 rpm) gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bundan sonra, 96 oyuklu plakaya 100µl maya numunesi ilave edilmiş, ardından 10µl (5 mg/ml) MTT çözeltisi ilave edilerek 4 saat boyunca 26°C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Süspansiyon formazan kristallerine zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. Son olarak 100µl DMSO ilave edilmiş ve 26°C'lik döner çalkalayıcıda 10 dakika süreyle inkübe edilmiş ve absorbans, bir plaka okuyucu (BioTek Epoch 2 Microplate Reader) kullanılarak 595 nm'de ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak serbest kapsüllenmiş M74 mayası kullanılmıştır.

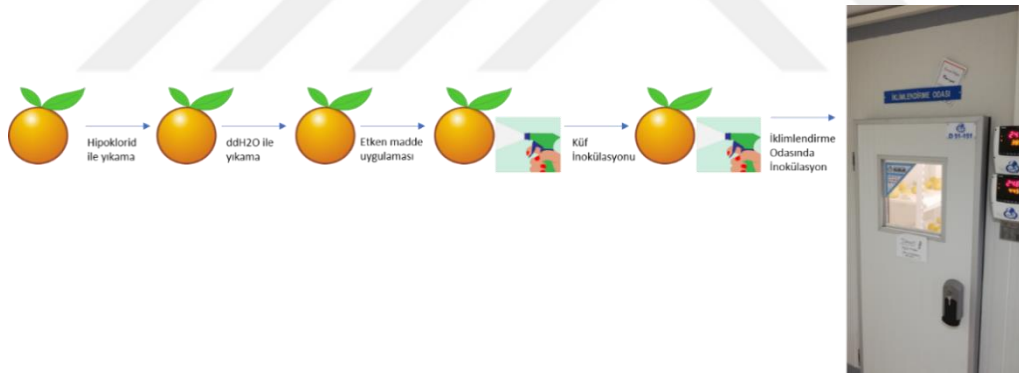
3.11 Portakallarda Hasat Sonrası Hastalıkların Kontrolünde Antagonist Mayaların Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Mikrokapsüllenmiş mayaların *Penicillium digitatum*'a karşı *in vivo* aktivitesini test etmek için bir narenciye olan portakal meyvesi seçilmiştir. Organik portakallar (*Citrus sinensis*), yaş, homojenlik ve kusursuz durum gibi faktörler dikkate alınarak çalışma için yakındaki yerel bir marketten rastgele seçilmiştir. Portakallar %2'lik (a/h) sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu ile iki dakika dezenfeksiyondan sonra temiz su ile iki kez durulanmış ve 25 °C'de açık havada kurumaya bırakılmıştır.

Meyveler üzerindeki önleyici etkiyi gözlemlemek için serbest mayalar (hematositometre kullanılarak 1×10^8 hücre/mL'ye ayarlanmış) süspansiyona alınmış ve kapsüllenmiş mayanın çözülmesinden sonra daldırma solüsyonu hazırlanmıştır. Enkapsüle maya içeren daldırma solüsyonu 1×10^8 hücre/mL'lik

nihai maya hücresi konsantrasyonu elde etmek için gerekli miktarda sprey kurutucu ürününün %0,1 (a/h) peptonlu suda çözülmesiyle elde edilmiştir (canlılık analizinde 1 g sprey kurutucu ürününde bulunan hücre sayısı belirlenmiştir). Bu işlem için, öncelikle meyveler fungus süspansiyonuna (1×10^6 hücre/mL) daldırılmış ve 1 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra meyvelere tamamen kaplanacak şekilde maya içeren sprey dry süspansiyonu püskürtülmüştür. Steril distile su ile atomize edilen meyveler negatif kontrolü oluştururken Imazalil® (Azoxystrobin, 0,8 g/L; AMISTAR® Syngenta, Frankfurt, Almanya) ile kaplanan meyveler ise pozitif kontrolü oluşturmuştur. Her iki işlemde de fungusları aşlamak için spor süspansiyonu kullanılmıştır.

Portakal meyveleri 21 gün boyunca 25 °C (%75 bağıl nem) boyunca depolanmış ve hastalık insidansı, patojen büyümesi ölçülerek hesaplanmıştır (Öztekin ve Karbancıoğlu-Güler, 2023). Her grup 6 meyveden oluşmakta olup pozitif kontrol grubu olarak İmazalil uygulanan meyveler, negatif kontrol olarak ise sadece patojen uygulanan gruplar kullanılmıştır. Deney üç kez tekrarlanmış ve her bir işlem on meyve içeren ve işlem başına üç tekrardan oluşan grup içermektedir (Şekil 3.7).



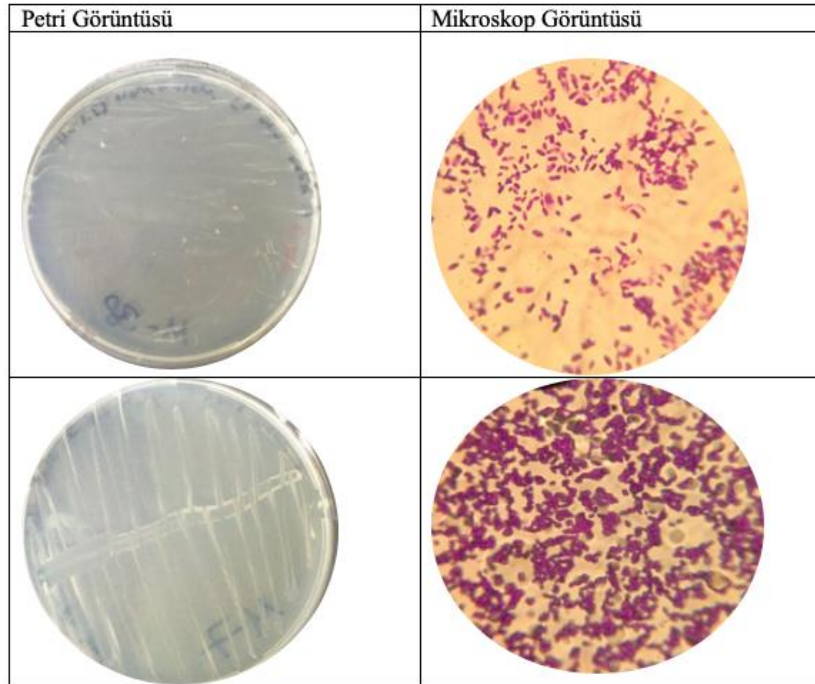
Şekil 3. 7 Önleyici etki çalışmasında uygulanan yöntemin şematik gösterimi

3.12 İstatistiksel analiz

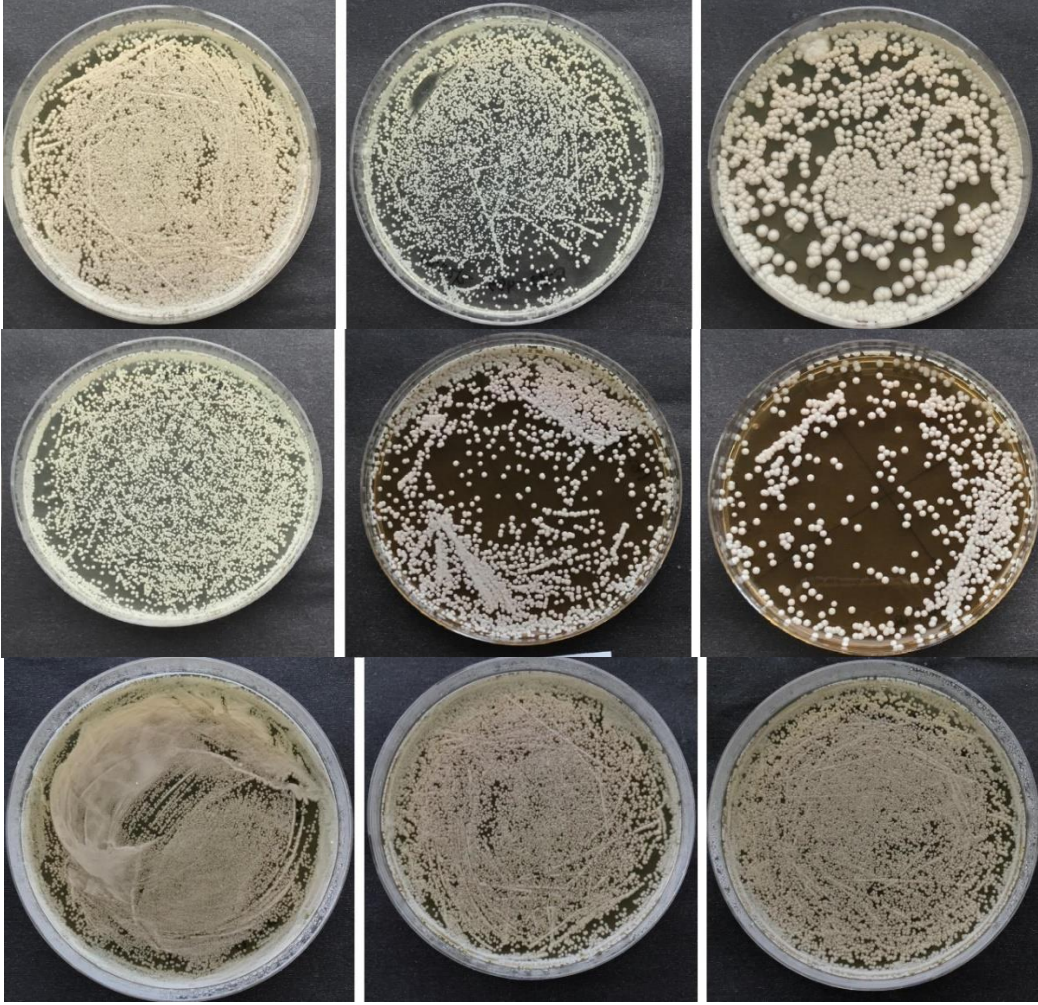
Her deney üç tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve her biri için sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak rapor edilmiştir. İstatistiksel çalışma, Armonk, NY'de bulunan SPSS İstatistik Yazılımının IBM 20 sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerler arasındaki farkları değerlendirmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldıktan sonra Tukey post hoc testi yapılmıştır. $p < 0,05$ olduğunda farkların anlamlı olduğu belirlenmiştir.

4.1 Mayaların izolasyonu ve Maya Kolonilerinin Morfolojik Karakterizasyonu

Meyve örneklerinden izole edilen maya türlerinin morfolojik karakterizasyonunda ilk önce mayalar için spesifik seçici besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Yapılan pasajlar ile mayalar her petride tek tip koloni olacak şekilde ayrılmıştır. Her pasaj 28°C’de 24-72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mayalar +4°C’de muhafaza edilmiştir. Morfolojik özelliklerine göre ayırım yapılırken maya kolonilerinin şekil, boyut ve renklerine göre ayırım yapılmış ve mikroskop ile koloniler incelenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2).



Şekil 4. 1 İzolasyonları yapılan mayalar morfolojik özellikleri ve toplandıkları yerlere göre belirlenmiş ve listelenmiştir



Şekil 4. 2 İzole edilen bazı mayaların petri görüntüsü

Tablo 4. 1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri ve *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır

M.O Kodu	İzolasyon Şehri	İzolasyon Yeri	Petrideki Adı	Koloni Rengi	<i>Penicillium italicum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
M-1	Adana	limon	F. Adana limon örneği 2- LB(1) 10.10.2018(2)	krem	-	-
M-2	Adana	limon yumuşak yüzey	F. Adana Lilmon yumuşak yüzey-3 Malt 18.10.2018 (8)	krem	-	-
M-3	Adana	Şalgam	F. Adana şalgam 1 LB 20.11.2018 Mavi koloni (4)	beyaz	-	-
M-4	Adana	Şalgam	F. Adana şalgam 1 LB 20.11.2018 Beyaz koloni (4)	beyaz	-	-
M-5	Mersin-Alata	portakal	F. portakal değdirme 21.11.2018 Mavi koloni	beyaz	-	-
M-6	Mersin-Alata	portakal	F. portakal değdirme 21.11.2018 Beyaz koloni	krem	-	-
M-7	Adana	limon	F. Adana limon örneği 11 LB- 20.11.2018 Tek beyaz koloni (16)	beyaz	etki var- mik belirsiz	-
M-8	-	Ananas	F. Ananas 1 LB 20.11.2018 Mavi koloni (11)	beyaz	-	-
M-9	-	Ananas	F. Ananas 1 LB 20.11.2018 Beyaz koloni (11)	beyaz	-	-
M-10	Adana	limon	F. Adana limon örneği 2 LB 20.11.2018 Mavi koloni (10)	beyaz	10 ⁶	10 ⁹

Tablo 4. 1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri ve *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır (devamı)

M-11	Adana	portakal	F. Adana portakal örneği 2 Malt(2) 18.10.2018	krem	-	-
M-12	Adana	Mandalina	F. Adana Mandalina ekşi çürüklük şüphesi Malt 15.11.2018	beyaz	10 ⁹	-
M-13	Adana	-	Adana 27 Ekim Malt 30.10.2018 (swab)	beyaz	-	-
M-14	-	Ananas	F. Ananas 1 MRS 26.10.2018	beyaz	-	10 ⁹
M-15	Adana	portakal-yaprak	F. Portakal yaprak (sağlıklı) Karışık Malt (1) 04.11.2018	koyu sarı	-	-
M-16	Adana	Mandalina	F. Adana Mandalina <i>Penicillium</i> Şüphesi Malt (3) 04.12.2018	beyaz	10 ⁹	10 ⁹
M-17	Adana	limon	F. Adana 8 pk Malt(1) 13.12.2018	beyaz	10 ⁹	10 ⁹
M-18	Adana	-	Adana Swab 10 Malt (1) 14.12.2018	beyaz	10 ⁶	10 ⁹
M-19	Adana	limon	Adana limon sap dibi Malt (2) 14.12.2018	koyu sarı	-	-
M-20	Adana	Mandalina	F. Adana Mandalina Geotrichum şüphesi 04.12.2018 MRS	beyaz	-	-
M-21	Adana	Greyfurt	F. Adana Greyfurt (2.2) Malt-Malt 06.12.2018	beyaz	10 ⁶	10 ⁹
M-22	Adana	Greyfurt	F. Adana Greyfurt (2.1) Malt 06.12.2018	parlak sarı	-	-
M-23	Adana	Yaprak	F. Adana yaprak 10 siyah leke Malt 13.12.2018	soluk beyaz	-	-

Tablo 4. 1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri ve *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır (devamı)

M-24	Adana	Mandalina	F. Adana Mandalina <i>Penicillium</i> Şüphesi Malt (1) 04.12.2018	beyaz	-	10 ⁶
M-25	Adana	limon	F. Adana sağlıklı limon değdirme (6.1) Malt 21.11.2018	soluk sarı	10 ⁹	-
M-26	Adana	limon	F. Adana Limon örneği (2.1.1) Malt 13.11.2018	beyaz	-	-
M-27	Adana	limon	F. Adana sağlıklı limon değdirme 5 Malt 04.12.2018	beyaz	10 ⁶	-
M-28	Adana	Yaprak	F. Adana yaprak (7.3) Malt 04.12.2018	beyaz	-	-
M-29	Adana	yaprak	F. Adana yaprak 9 Malt (2) 14.12.2018	koyu krem	-	-
M-30	Adana	-	F. Adana 4i1-3000 Malt 19.11.2018	beyaz	-	-
M-31	Adana	-	Adana swab 15 Malt 14.12.2018	Şeffaf beyaz	-	-
M-32	Adana	toprak	F. Adana toprak Malt 12.11.2018	beyaz	10 ⁶	10 ⁹
M-33	Adana	portakal	F. 27 Ekim Portakal Malt 19.11.2018	beyaz	10 ⁹	-
M-34	Adana	toprak	F. Adana toprak 1 Malt 19.11.2018	koyu krem	10 ⁶	-
M-35	Adana	Limon	F. Adana limon örneği (2.2.1) Malt 13.11.2018	beyaz	10 ⁶	10 ⁹
M-36	Adana	Mandalina	F. Adana Mandalina <i>Penicillium</i> Şüphesi Malt (2) 04.12.2018	soluk beyaz	-	-
M-37	Adana	Yaprak	F. Adana yaprak 12 siyah leke Malt 13.12.2018	soluk beyaz	10 ⁹	10 ⁶

Tablo 4. 1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır (devamı)

M-38	Adana	-	F. Adana swab 13 Malt 13.12.2018	soluk beyaz	-	-
M-39	Adana	-	F. Adana 8 pk Malt (2) 13.12.2018	beyaz	10 ⁹	10 ⁹
M-40	Adana	Greyfurt	F. greyfurt (2.1) Malt 06.12.2018	beyaz	-	-
M-41	Adana	-	F. Adana s2-1500 (2.1) Malt 06.12.2018	beyaz	-	-
M-42	Adana	Yaprak	F. Adana yaprak (7.1) Malt 22.11.2018	soluk sarı	-	-
M-43	Adana	portakal	F. Adana portakal <i>Penicillium</i> şüphesi Malt 04.12.2018	beyaz	-	-
M-44	Adana	Limon	F. Adana sağlıklı limon yüzey Malt (1) 13.12.2018	krem	-	10 ⁹
M-45	Adana	Mandalina	F. Adana Mandalina kontrol- dış Malt (2) 13.12.2018	soluk beyaz	-	-
M-46	Adana	Limon	F. sağlıklı limon değdirme (6.4) Malt 04.12.2018	beyazımsı sarı	-	-
M-47	Adana	limon	F. Adana limon değdirme 2 Malt 12.11.2018	soluk beyaz	-	-
M-48	Adana	limon	F. Adana limon örneği 10 Malt 07.11.2018	soluk beyaz	10 ⁹	-
S-1	Adana	portakal	MEA- Adana portakal örneği 15.11.2018 (3)	beyaz	-	10 ⁹
S-2	Adana	Limon	MEA- Adana limon örneği 11-15.11.2018 (16)	beyaz	-	-
S-3	-	Ananas	MEA- Ananas 1- 15.11.2018 (11)	beyaz	-	-
S-4	Adana	Limon	MEA- Adana limon örneği 2- 15.11.2018 (10)	beyaz	-	-

Tablo 4. 1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri ve *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır (devamı)

S-5	Adana	şalgam	MEA- Adana şalgam 1- 15.11.2018 (4)	beyaz	-	-
M-49	Adana	limon	F. Adana limon örneği 3 MRS 18.10.2018	beyaz	-	-
M-50	Adana	Limon	F. Adana limon örneği 1 MRS 10.10.2018	beyaz	-	-
M-51	-	turşu	Turşu probiyotiği Kod-B2 07.11.2018 Malt	beyaz	-	-
M-52	Adana	limon Çekirdeği	F. Adana limon çekirdek Malt- Malt 17.12.2018	beyaz	10 ⁹	10 ⁶
M-53	Adana	limon	Adana limon sap dibi Malt (1) 17.12.2018	beyaz	-	-
M-54	Adana	limon dalı	Adana limon dal içi Malt(1)	açık pembe	-	-
M-55	Adana	limon dalı	Adana limon dal içi Malt(2)	soluk beyaz	10 ⁹	10 ⁹
M-56	Adana	limon yaprak	Adana sağlıklı limon yaprağı Malt (1)	soluk beyaz	10 ⁹	10 ⁹
M-57	Adana	turunç	Adana turunç kazım sap dibi Malt	koyu krem	-	-
M-58	Adana	mandalina	26.12.2018 F. Adana mandalina kabuk ekşi çür. Şüp. 04.01.19 Malt (2)	beyaz	-	-
M-59	Adana	Turunç	F. Adana Turunç kazım portakal içi LB 04.01.19	pembemsi krem	-	-
M-60	Adana	limon	F. Adana ağaçtan limon 1 Malt 26.12.18	beyaz	10 ³	10 ³
M-61	Adana	limon	F. Adana limon dalı içi Malt (3) 24.12.18	sarı	-	-
M-62	Adana	Yaprak	F.Adana yaprak 13 siyah leke Malt (1) 26.12.18	sarı-yeşil	-	-
M-63	Adana	limon	F. Adana limon sap dibi Malt (1) 26.12.18	sarı	-	-

Tablo 4. 1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri ve *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır (devamı)

M-64	Adana	yaprak	F. Adana yaprak 13 siyah leke Malt(3) 26.12.18	yavruağzı	-	-
M-65	Adana	swab	F. Adana swab 11 Lb 26.12.18	beyaz	-	10 ⁹
M-66	Adana	Yaprak	f. Adana yaprak 13 siyah leke Malt(2) 26.12.18	koyu krem	-	-
M-67	Adana	swab	F. Adana swab 12 çatlaktan Malt 24.12.18	beyaz	10 ⁹	10 ⁹
M-68	Adana	Mandalina	28.12.18 F.Adana Mandalina kabuk ekşi çürüklük şüp. 04.01.19 Malt (2)	sarımsı beyaz	10 ⁹	-
M-69	Adana	Mandalina	28.12.18 F.Adana Mandalina kabuk ekşi çürüklük şüp. 04.01.19 Malt (1)	soluk beyaz	10 ⁹	-
M-70	Adana	Mandalina	F. Adana mandalina dilimi Malt 04.01.19	soluk sarı	10 ⁹	-
M-71	Adana	Mandalina	F. Adana mandalina ekşi çürüklük şüphesi 3 Malt 02.01.19	beyaz	10 ⁹	10 ⁹
M-72	Adana	limon	22.01.2019 Limon sirkesi sıvı Malt (1)	beyaz	10 ⁶	10 ³
M-73	Adana	Swab	F.Adana swab 15 Malt (1) 11.01.19	soluk beyaz	-	-
M-74	Adana	Limon	F. Buzdolabındaki limon Malt 17.01.19	soluk sarı	10 ⁶	10 ³
M-75	Adana		* 26.12.18 F.Adana küflü kasa Malt (2.3) 17.01.19	beyaz	-	-
M-76	Adana		* 26.12.18 F.Adana küflü kasa Malt (2.1) 17.01.19	beyaz	-	-

Tablo 4. 1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri ve *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır (devamı)

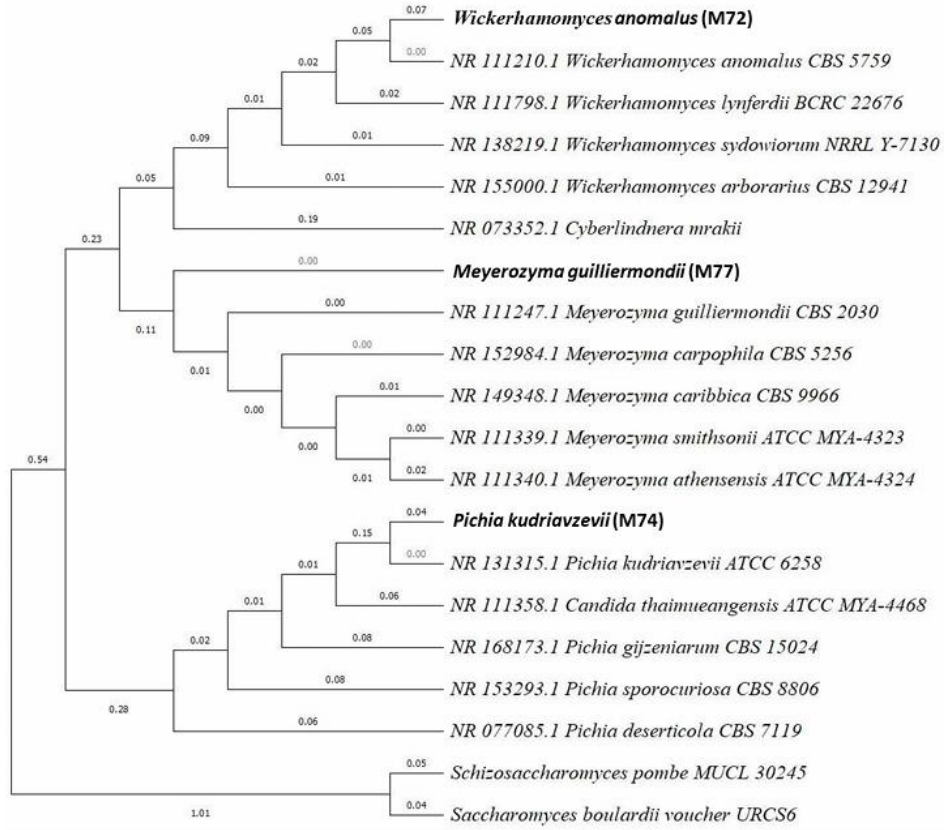
M-77	Adana	Mandalina	26.12.18 F.Adana Mandalina kabuk ekşi çürüklük şüp. Malt(1.2) 17.01.19	beyaz	-	10 ⁹
M-78	Adana	Limon	18.12.18 F.Adana sağlıklı limon 9 yüzey Malt(6) 17.01.19	krem ama büyüdükçe yeşil	-	-
M-79	Adana	Yaprak	Adana yaprak 14 Malt 11.01.19	yavruağzı	-	-
M-80	Adana	Greyfurt	Z. Adana greyfurt sap dibi Malt(3) 11.01.19	soluk beyaz	-	-
M-81	Adana	swab	F. Adana swab 15 Malt(2) 11.01.19	soluk beyaz	-	-
M-82	Adana	Yaprak	Z. Adana turunc kazım yaprak 1 Malt(1) 10.01.19	pembemsi krem	-	-
M-83	Adana	Sap dibi	Z. Adana Turunc kazım sap dibi Malt(2) 10.01.19	yeşil	-	-
M-84	Adana	Sap dibi	Z. Adana greyfurt sap dibi Malt(2) 11.01.19	soluk beyaz	-	-
M-85	Adana	Sap dibi	Z. Adana greyfurt sap dibi 11.01.19 Malt(1)	soluk beyaz	-	-
M-86	Adana	swab	F. Adana sağlıklı swab Malt(2) 11.01.19	beyaz	-	-
M-87	Adana	swab	18.12.18 F. Adana swab 18 Malt(1.1) 11.01.19	sarı	-	-
M-88	Adana		18.12.18 Z.Adana küf 2 Malt(2) 11.01.19	soluk beyaz		-
M-89	Adana	swab	F.Adana sağlıklı swab Malt 04.01.19	sarı	-	-
M-90	Adana		Z-18.12.18-F.Adana küf 2 Malt 10.01.19	beyaz	-	-
M-91	Adana	swab	F.Adana swab 18 Malt(1.2) 11.01.19	beyaz	-	-
M-92	Adana	swab	F.Adana sağlıklı swab Malt(2) 11.01.19	beyaz	-	-

Tablo 4. 1 Doğadan izole edilen mayaların listesi. Tabloda mikroorganizmalara verilen kodlar, izolasyon yerleri, koloni renkleri ve *Penicillium italicum* ve *Penicillium digitatum* türlerine karşı etkinlikleri yer almaktadır (devamı)

M-93	Adana	Mandalina	Adana S1-1500 Mandalina dışı Malt 11.01.19	beyaz	-	-
M-94	Adana	Mandalina	Z.S1-3000 Mandalina dışı Malt 11.01.19	beyaz	-	-
M-95	Adana	Mandalina	Z.Adana S3İ-1500 Mandalina içi Malt(2) 11.01.19	soluk sarı	-	-
M-96	Adana		18.12.18 z.Adana küf 2 Malt(1) 11.01.19	beyaz	-	-
M-97	Adana	Mandalina	Z.Adana mandalina geatrichum şüphesi3 10.01.19 Malt	soluk sarı	-	-
M-98	Adana	Mandalina	Z.Adana mandalina dış Malt(2) 11.01.19	soluk sarı	-	-
M-99	Adana	Yaprak	F.Adana 13 yaprak siyah leke Malt(4) 08.01.19	pembemsi krem	-	-
M-100	Adana	Yaprak	F.Adana 13 yaprak siyah leke Malt(4) 04.01.19	pembemsi krem	-	-

4.2 Maya İzolatlarının Tanımlanması ve Tür Tayini

Komşu-Birleştirme (Neighbor-Joining) yaklaşımı bu çalışmadaki mayaların evrimsel tarihi anlamak için kullanılmıştır (Saitou ve Nei, 1987). İdeal filogenetik ağaç Şekil 4.2’de verilmiştir. Dalların yanında, önyükleme testinde (1000 tekrar) ilgili taksonların bir arada kümелendiği oranlar bulunmaktadır (Felsenstein, 1985).



Şekil 4. 3 Filogenetik ağaç, nükleer ribozomal dahili kopyalanmış ayırıcı (ITS) bölgesinin dizisine dayanmaktadır. Düzgümlerdeki sayı önyükleme değerlerini, dallardaki sayı ise dal uzunluğunu (genetik mesafe) gösterir.

Şekil 4.3’de görülen filogenetik ağaçta evrimsel mesafeler bölge başına baz olarak ifade edilmiş ve Maksimum Bileşik Olabilirlik (Maximum Composite Likelihood) yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır (Tamura vd., 2004). Bu araştırmada altı nükleotid dizisi vardır ve her dizi çifti için tüm belirsiz konumlar elenmiştir (ikili silme seçeneği). Nihai veri seti toplamda 1185 konum içermiştir. Evrimsel analizler MEGA11’de yapılmıştır (Tamura vd., 2021). Maya izolatlarını tanımlamak için kullanılan diziler sonucu, M72 maya izolatının *Wickerhamomyces anomalous* CBS5759 ile %98,72 benzerlikle, M74 izolatının *Pichia kudriavzevii* ATCC6658

ile %99,55 benzerlikle ve M77 maya izolatının *Meyerozyma guilliermondii* CBS2030 ile %99,63 benzerlik yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Tablo 4.2).

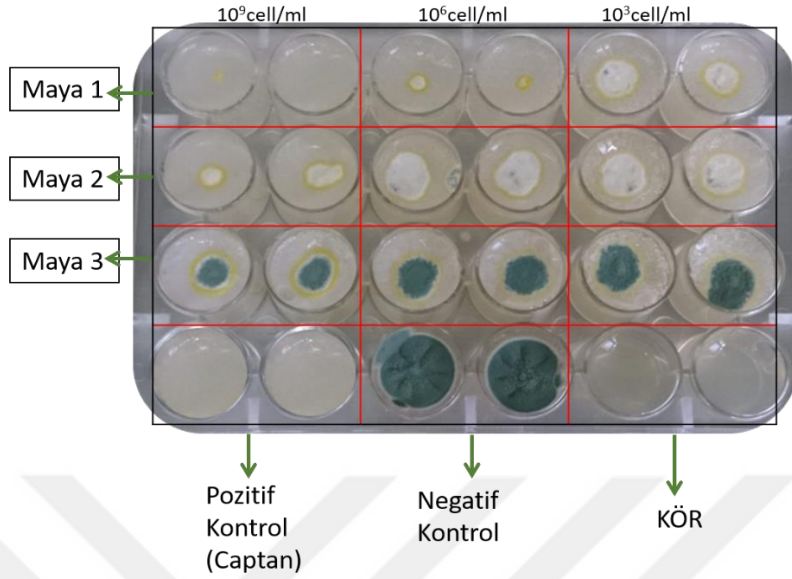
Tablo 4. 2 İzole edilmiş maya suşlarının BLAST algoritması ile moleküler tanımlanması ve genomik dizilerin GenBank veri tabanı ile karşılaştırılmış sonuçları. Erişim numaralarına göre listelenen suşlar, GenBank'ta bulunan bir diziye karşılık gelir.

	İzolat kodu	Kaynak	Kültür	Erişim numarası	Benzerlik (%)
Ingroup	M72	Orange (<i>Citrus sinensis</i>)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NR_111210.1	98.72%
				NR_155000.1	91.73%
				NR_073352.1	91.56%
				NR_138219.1	90.98%
				NR_111798.1	90.89%
	M74	Orange (<i>Citrus sinensis</i>)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	NR_131315.1	99.55%
				NR_153293.1	98.35%
				NR_168173.1	98.22%
				NR_077085.1	97.65%
				NR_111358.1	97.63%
	M77	Orange (<i>Citrus sinensis</i>)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR_111247.1	99.63%
				NR_152984.1	98.46%
				NR_149348.1	98.42%
				NR_111339.1	97.37%
				NR_111340.1	96.25%
Outgroup	-	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> MUCL 30245	NG_070697.1	-
	-	-	<i>Saccharomyces boulardii</i> voucher URCS6	KT000037.1	-

4.3 Antagonistik Mayaların Belirlenmesi

Bu çalışmada öncelikle izole edilen mayaların *P. digitatum* ve *P. italicum*'a karşı antifungal aktiviteleri MIC değerleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.4). Sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir. Yüksek MIC değerine sahip üç tür olan *Wickerhamomyces*

anamolus (M72), *Meyerozyma guilliermondii* (M77) ve *Pichia kudriavzevii* (M74) seçilerek sonrasında inhibisyon oranları ölçülmüştür.



Şekil 4. 4 Mayaların MIC değerlerinin belirlendiği çalışma

Türkiye'de narenciyelerin kabuklarından elde edilen toplam 100 maya ve bakteri izolatından 3'ü, yeşil ve mavi küf etkeni *P. digitatum* ve *P. italicum*'a karşı yüksek antifungal yetenekleri nedeniyle seçilmiştir. Aday BCA'ların Türkiye'deki narenciye kabuğunda yaşayan mikroorganizma popülasyonlarından seçilmesinin nedeni, endemik izolatların doğal olarak yerel çevre koşullarına daha iyi uyum sağlayacağı ve BCA olarak daha iyi performans sağlayacağı varsayımıydı (Hammami vd., 2022).

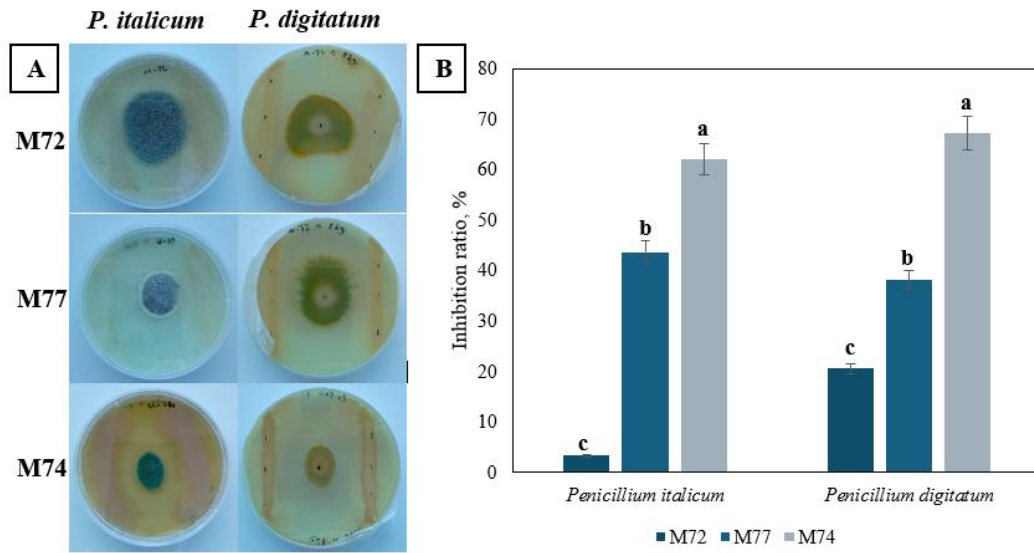
Tablo 4. 3 İzole edilen mayaların antifungal etkinlik gösterdikleri dozları

M.O. Kodu	Tür Analizi Sonuçları	Erişim Numarası	MIC (hücre/ml) <i>P.digitatum</i>	MIC (hücre/ml) <i>P.italicum</i>
M16A	<i>Pichia fermentans</i> strain UFLA CWFY24	KM402062.1	10 ⁹	10 ⁹
M16B	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain XQ9	KU216711.1	10 ⁶	10 ⁶
M18	<i>Pichia terricola</i> isolate 44	MK352024.1	10 ⁹	10 ⁹
M21A	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain XQ9	KU216711.1	10 ⁹	10 ⁹
M21B	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain VV12	KT157518.1	10 ⁹	10 ⁹
M24	<i>Meyerozyma caribbica</i> CBS 9966	NR_149348.1	10 ⁶	10 ⁶
M32	<i>Meyerozyma caribbica</i> strain SCAU023	KY827353.1	10 ⁹	10 ⁹
M35	<i>Meyerozyma caribbica</i> isolate CGMCC3616	KM676452.1	10 ⁹	10 ⁹
M37	<i>Pichia kudriavzevii</i> isolate BYY09	MK106346.1	10 ⁶	10 ⁶
M39	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain SZWL3	MG845260.1	10 ⁹	10 ⁹
M44	<i>Papiliotrema terrestris</i> strain AUMC 10766	KY495734.1	10 ⁹	10 ⁹
M55	<i>Pichia terricola</i> culture CBS:5517	KY104653.1	10 ⁹	10 ⁹
M56	<i>Pichia terricola</i> isolate 44	MK352024.1	10 ⁹	10 ⁹
M60	<i>Pichia terricola</i> strain AUMC 10796	KY495764.1	10 ⁹	10 ⁹
M65	<i>Pichia terricola</i> isolate 44	MK352024.1	10 ⁹	10 ⁹
M72	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NR_111210.1	10 ³	10 ³
M74	<i>Pichia kudriavzevii</i>	NR_131315.1	10 ³	10 ³
M77	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR_111247.1	10 ³	10 ³
M173	<i>Saccharomyces</i> sp. 'boulardii' isolate 6-TS4	MK672871.1	10 ⁶	10 ⁶

MIC:Minimum inhibisyon komsantrasyonu

Üç maya suşu *Wickerhamomyces anamolus* (M72), *Meyerozyma guilliermondii* (M77), *Pichia kudriavzevii* (M74), portakalda meyve çürüklüğü hastalığına neden olan *P.italicum*'un gelişimini sırasıyla %3, %43 ve %62 oranında inhibe etmiştir ve *P.digitatum* sırasıyla %20, %38 ve %67 oranında (Şekil 4.5) *Pichia kudriavzevii* (M74) her iki mantar türüne karşı en fazla antifungal etki gösteren maya suşu

olmuştur (Tablo 4.3). Önceki çalışmaların sonuçlarında, bazı maya suşlarının bu iki mantar patojeninin büyümesini engellediğinin bildirmiştir. Örneğin, Delali vd. (2021), birçok Kimçiden izole ettikleri maya türleri arasında *Pichia kudriavzevii*'nin narenciyelerdeki yeşil küflere karşı en yüksek antifungal etki gösterdiği bulunmuştur. Bu antifungal bileşikler kendi sınıflarına ait aldehitler, esterler, ketonlar, alkoller, organik asitler vb. içerir (Oro vd., 2017; Delali vd., 2021). Delali vd. (2021) çalışmalarında izole ettikleri *Metschnikowia fructicola*, *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Yarrowia lipolytica* gibi bazı maya türlerinin narenciyelerdeki yeşil küflere karşı antagonist yeteneklerini belirlemişlerdir. Hammami vd. (2022) 180'den fazla bakteri türü ve maya izolatu ile yaptıkları çalışmada *Candida oleophila* ve *Debaryomyces hansenii* izolatlarının narenciyelerde *P.italicum* ve *P.digitatum*'a karşı antagonist etki gösterdiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4. 5 (A) M72, M74 ve M77 mayalarının *P. italicum* ve *P.digitatum*'a karşı inhibisyon bölgelerini gösteren Petri kapları ve (B) kontrole kıyasla inhibisyon bölgesi yüzdelерinin (%) grafiğı.

P. italicum'a karşı M72 %3,33, M77 % 43,67 ve M74 %62,00 inhibisyon oranı gösterirken, *P.digitatum*'a karşı M72 %20,62, M77 % 38,13 ve M74 %67,19 inhibisyon oranı göstermiştir (Şekil 4.5). Bu çalışmada, M72, M74 ve M77 suşlarının, sahip oldukları bileşenlerin çeşitliliğı ve etkileri nedeniyle farklı seviyelerde antifungal bileşikler ürettiğı görülmüştür.

4.4 Maya Türlerinin Sinerjik Etkilerinin Belirlenmesi

Sinerjik etki çalışmasında etkinlik gösteren maya kombinasyonları x ile işaretlenmiştir (Tablo 4.4). Yeni antifungal ajanların geliştirilmesi zor ve maliyetlidir. Sinerjistik olarak birden fazla mayanın kullanımı, direnç gelişimini kontrol etmek için potansiyel stratejilerdir çünkü birden fazla mayanın uygulanması, patojendeki çeşitli mekanizmaları veya süreçleri bozabilir ve dolayısıyla dirençli suşların seçimini en aza indirebilir (Tome vd., 2018). Bu çalışmada izole edilen mayaların birbiri ile olan sinerjistik etkileri incelenmiştir.



Tablo 4.4 Maya türlerinin sinerjistik etkileri (*P.italicum*)

	M16A	M16B	M18	M21A	M21B	M32	M35	M37	M39	M44	M55	M56	M60	M65	M72	M74
M16A						x							x	x	x	x
M16B					x	x							x			x
M18	x				x								x	x		x
M21A				x		x							x	x		x
M21B	x	x			x	x	x	x						x	x	x
M24	x	x			x	x	x		x					x	x	
M32	x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
M35					x	x	x	x	x	x	x		x	x		x
M37						x	x	x	x	x	x					
M39					x	x	x	x		x	x					
M44						x	x	x	x	x						
M55						x	x			x						
M56						x			x	x						
M60	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x				x	x
M65	x		x	x	x	x	x	x	x	x					x	
M72	x				x	x			x	x	x		x	x	x	x
M74	x	x	x	x	x	x	x		x					x	x	x
M77				x	x	x	x	x				x	x		x	x

Tablo 4.4 Maya türlerinin sinerjistik etkileri (*P. digitatum*) (devamı)

	M16A	M16B	M18	M21A	M21B	M32	M35	M37	M39	M44	M55	M56	M60	M65	M72	M74
M16A			x	x	x		x									x
M16B				x												
M18	x				x	x										
M21A	x				x	x								x		
M21B			x	x	x	x				x		x	x			
M24					x	x	x	x	x	x	x		x	x		
M32			x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
M35	x					x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
M37						x	x	x	x	x						
M39							x	x		x	x		x	x	x	x
M44					x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
M55						x	x		x	x			x	x	x	x
M56					x	x			x						x	x
M60					x	x	x		x	x	x		x			
M65				x		x	x		x	x	x			x		x
M72						x	x		x	x	x	x		x	x	x
M74	x					x	x		x	x	x	x		x	x	
M77			x			x	x	x	x		x				x	
M173						x	x		x	x	x					

4.5 Mayaların Hidrolitik Enzim ve Uçucu Bileşen Analizleri

Mayalar, kitinaz, glukanaz ve proteazlar gibi antifungal hidrolitik enzimler olarak görev yapan bir dizi antifungal protein bileşiği üretir (Hammami vd., 2022). Aday BCA'ların antifungal aktivitesi, seçilen tüm maya izolatları tarafından en az iki litik enzimin, özellikle kitinaz, proteaz ve glukanazın üretimiyle ilişkilendirilmiştir (Chan vd., 2005; Droby vd., 2009). Mantarların çoğunluğunun hücre duvarlarının birincil bileşenleri, kitinaz ve β -1,3-glukanaz enzimlerinin substratları olan kitin ve β -1,3-glukandır. Ayrı olarak alındıklarında saf β -1,3-glukanazlar ve kitinazlar bazı mantarları inhibe eder ancak çoğunluğunu engellemez. Agar plakalarında veya sıvı ortamda, iki enzimin kombinasyonlarının çok çeşitli saprofitik ve patojenik mantarları baskıladığı bilinmektedir (Boller, 1993; Sandhu vd., 2017). M72 *Wickerhamomyces anomalus*, M74 *Pichia kudriavzevii* ve M77 *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının kitinaz ve β -1,3-glukanaz aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.5, Şekil 4.6).

Tablo 4. 5 Aday BCA'lar olarak seçilen maya izolatlarının hidrolitik enzim aktivitesi, VOC ve Biyofilm Oluşturma Kapasitesi

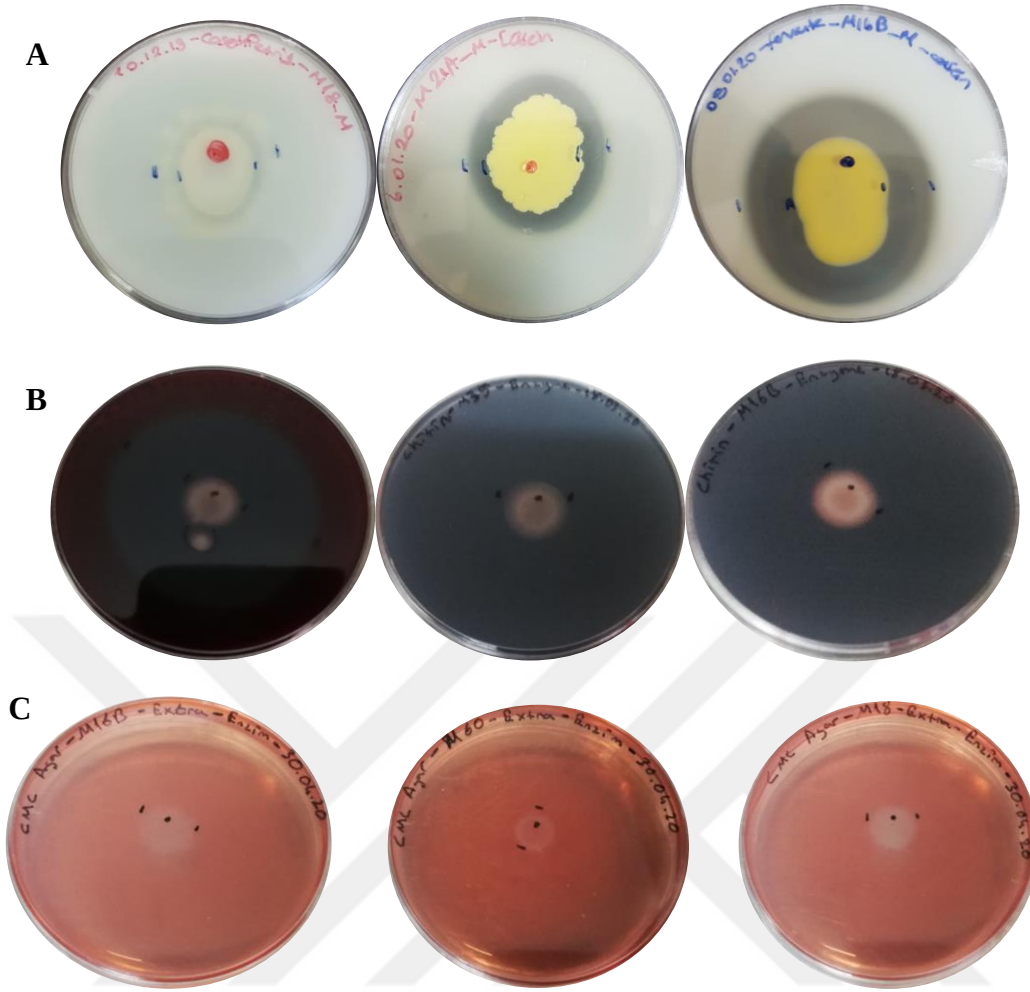
İzola syon kodu	Kültür	Enzimatik aktivite			Biyofilm kapasitesi Optik yoğunluk (OD)	VOCs	
		Kitin az	β -1,3- Glukan az	Prote az		Inhibisyon oranı (%) <i>P. digitatum</i>	<i>P. italicum</i>
M72	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	+	-	0,45±0,12	38±1,21	27±1,13
M74	<i>Pichia kudriavzevii</i>	+	+	+	0,51±0,09	55±2,23	46±2,14
M77	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	+	-	0,48±0,05	35±1,87	21±1,01

Maya ve bakteri hücrelerinin polistiren kaplara yapışma yeteneği doğrudan OD değerleriyle bağlantılıdır. VOC'ler: uçucu organik bileşikler.

Antifungal etkili uçucu organik bileşiklerin (VOC'ler) üretimi, BCA'ların miselyum büyümesini engellemek için yaygın olarak kullandığı başka bir mekanizmadır. Bu durum, belirli maya türlerinin antifungal özelliklere sahip VOC'ler ürettiğini öne süren çeşitli çalışmaların da bulgularıyla uyumludur. Zhang vd. (2021), *Pichia* spp. tarafından üretilen VOC'lerin fermantasyon sürecinde ortaya çıkan fungusları

engellediğini göstermiştir. Benzer şekilde Delali vd. (2010), kimchiden izole edilen üç maya türünün *P. digitatum*'a karşı antifungal etkilerini, hücre dışı litik enzim aktivitesi açısından taramış ve VOC'larını incelemiştir. *Pichia kudriavzevii*'nin, biyofilm oluşumu, besin rekabeti ve uçucu salınımı yoluyla *Penicillium digitalatum*'un neden olduğu yeşil küf vakasını azalttığını bildirmişlerdir.

Biyofilm oluşturma kapasitesi, bakteri ve mayaların BCA'lar olarak etkinliğini artırabilecek başka bir etki yöntemidir (Bais vd., 2004). Bu çalışmada seçilen maya izolatlarının üçü de (M72, M74 ve M77) biyofilm oluşturma konusunda yüksek kapasite göstermiştir. Bu durum, üç maya suşunun *P. italicum* ve *P. digitatum*'a karşı *in vitro* antagonistik aktivitesinin (özellikle en güçlü aktiviteye sahip olan M74'ün) yanı sıra deneysel olarak aşılanmış narenciyelerinde *Penicillium* çürümesini etkili bir şekilde engelleme yeteneklerini açıklayabilir. Liu vd. (2019), narenciye meyvelerinin biyofilm geliştirme yeteneği ile *Penicillium* çürüklüğünü önlemedeki etkinliği arasında karşılaştırılabilir bir ilişki gözlemiştir.

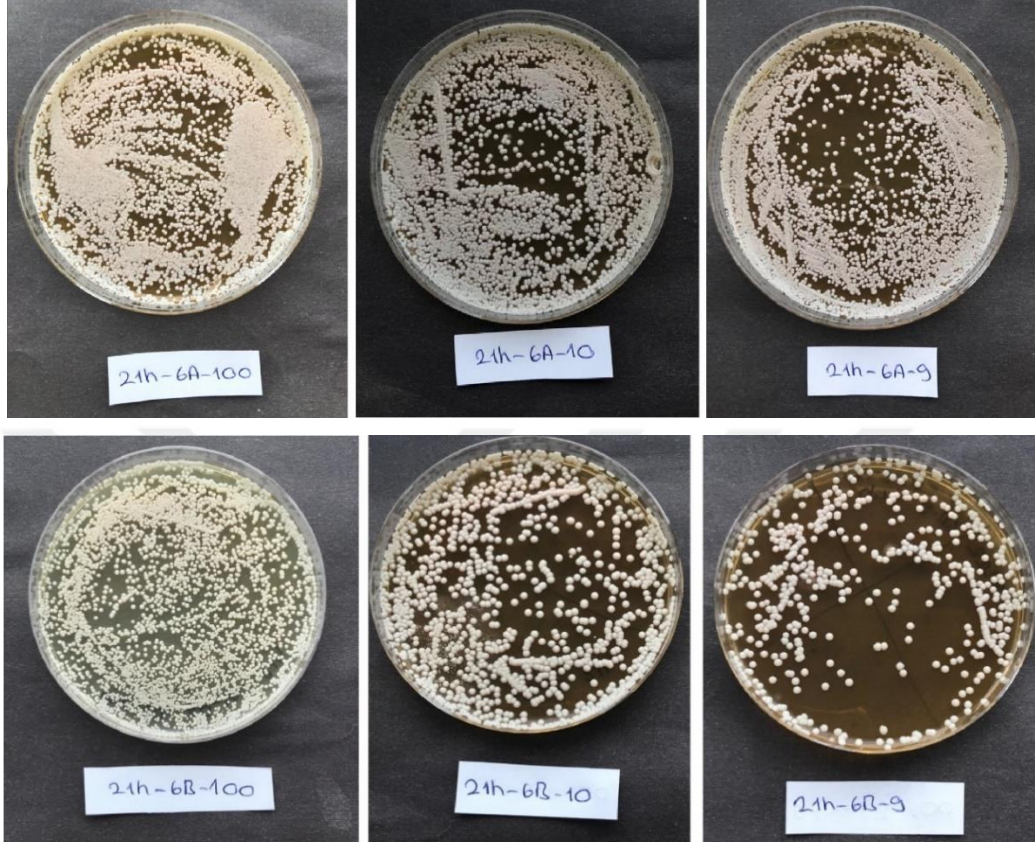


Şekil 4. 6 A.Proteaz aktivitesi çalışmasında gözlemlenen petri görüntüleri verilmiştir. Soldan sağa kötü etkinlik, orta düzeyde etkinlik ve iyi etkinlik görülmektedir. **B.** Kitinaz aktivitesi çalışmasında gözlemlenen petri görüntüleri verilmiştir. Koyu renkli görülen kısımlar kitinaz aktivitesinin olmadığı kısımlardır. Görece açık renkli görülen kısımlarsa kitinaz aktivitesini göstermektedir. **C.** β -1,3-Glucanaz aktivitelerinin test edildiği petri resimleri verilmiştir.

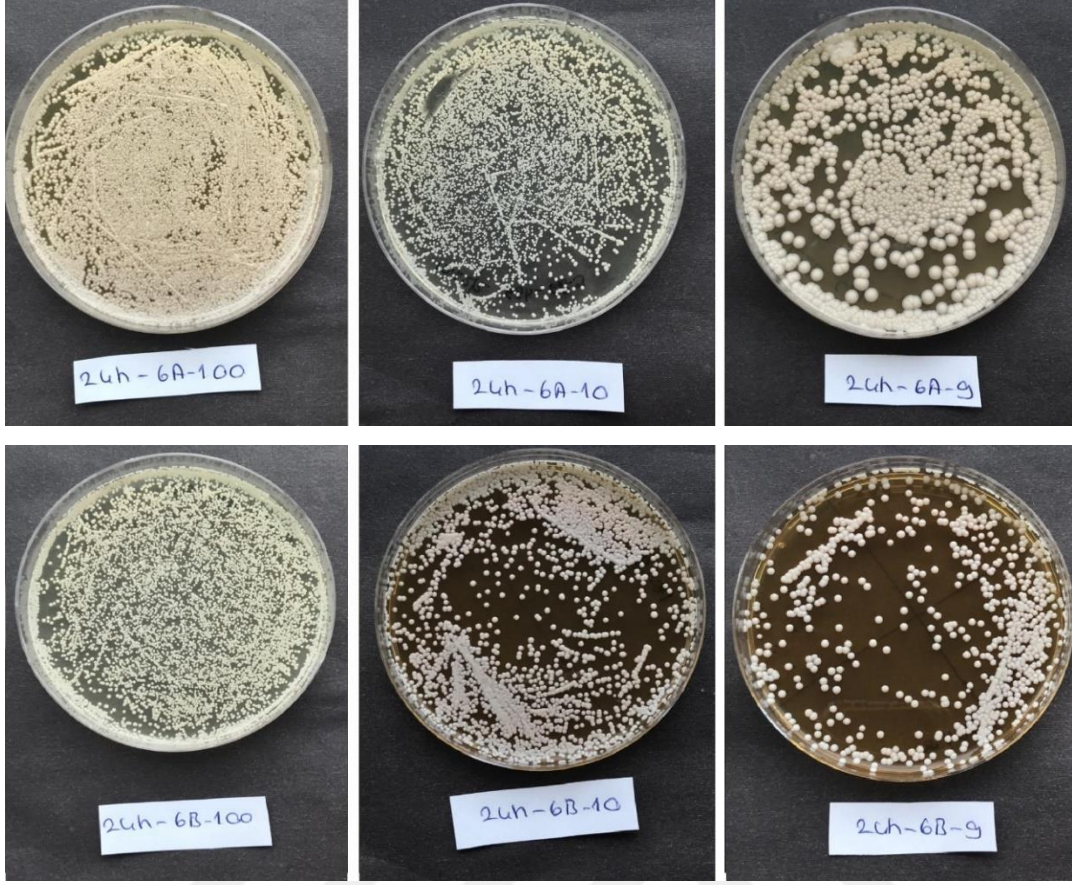
4.6 Mikroorganizma Üretiminin Optimizasyonu- Taguchi metodu

%2'lik glikoz, %2'lik pepton ve %2'lik yeast ekstrakt bulunan YPDA besiyerinde pH:5, sıcaklık: 25, rpm: 220 olan fermentasyon (6 numara) ve %2'lik glikoz, pepton ve yeast extract bulunan YPDA besiyerinde pH:7, sıcaklık: 25, rpm: 200 olan fermentasyon (8 numara) konsantrasyonları en iyi fermentasyon optimizasyonu olarak belirlenmiştir.

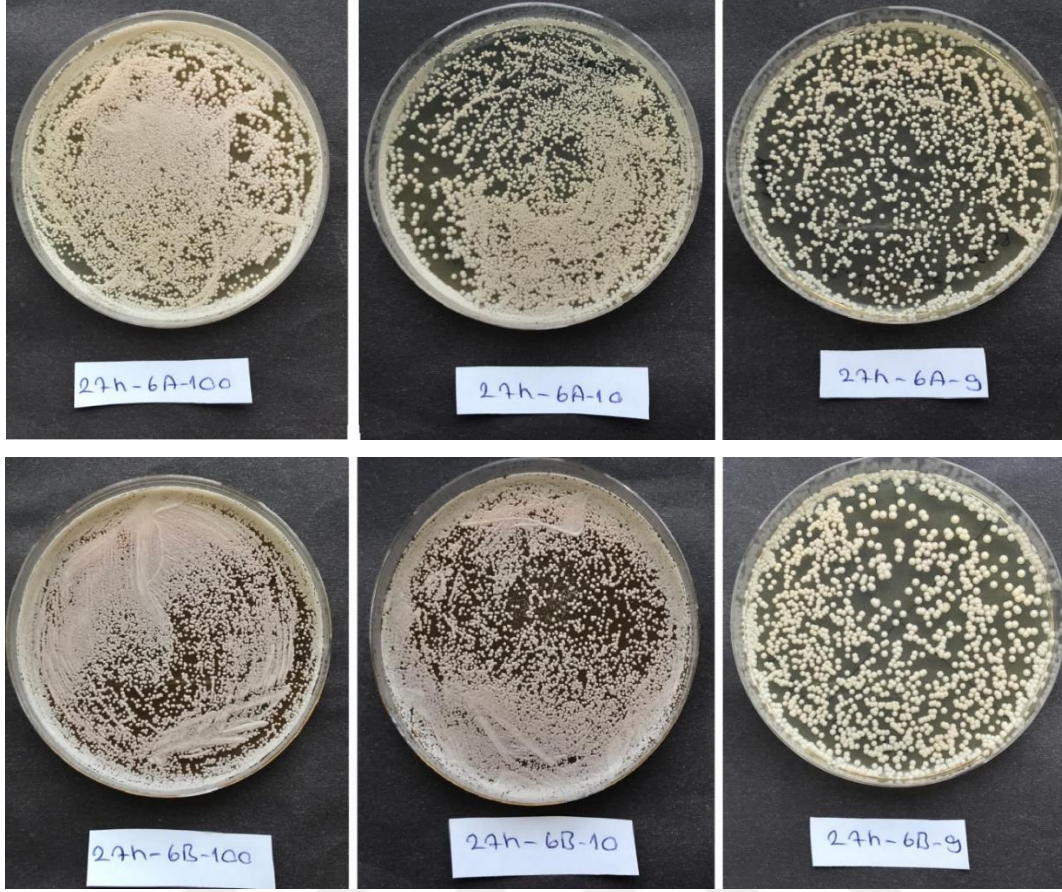
Bu aşamada OD ölçümleri ile birlikte seri dilisyonların agarlarda sayımları ile doğrulama yapılmıştır. Besiyerlerinde büyütülen örneklerin farklı dilüsyonlarda agar petrilere ekimi ve sayımları yapılmıştır.



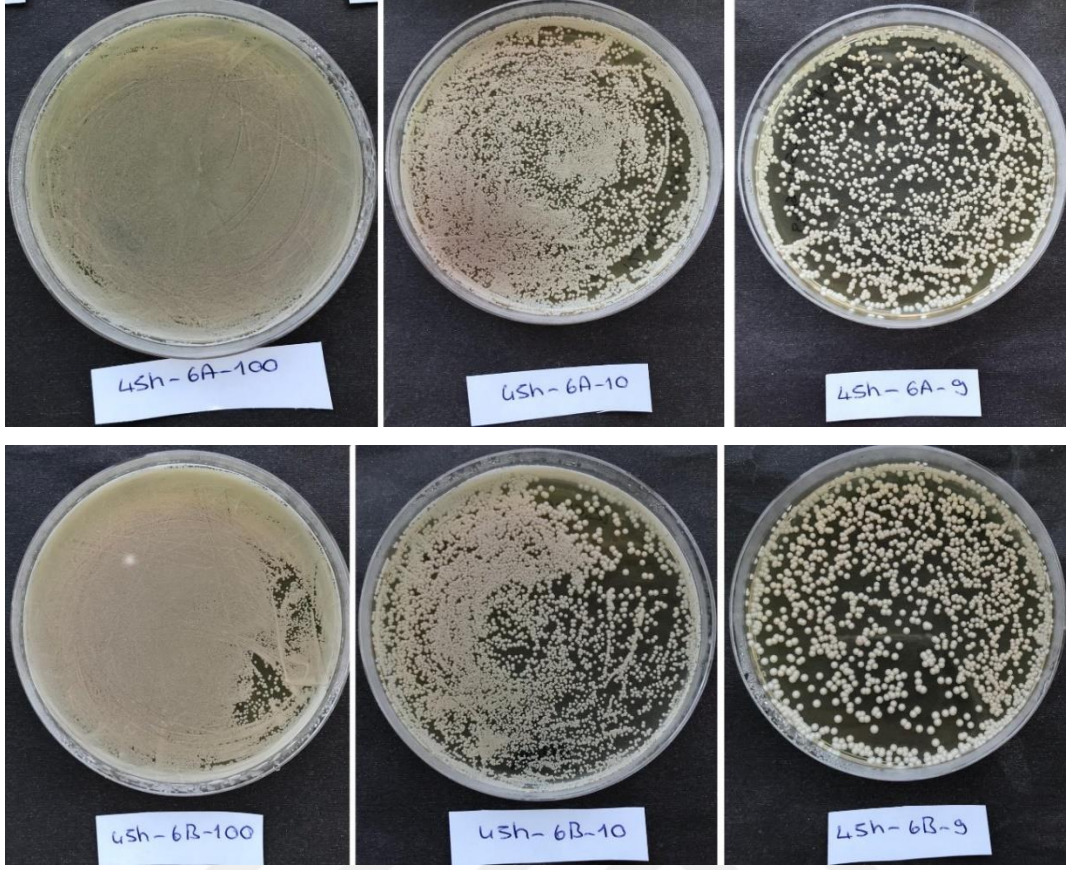
Şekil 4. 7 6 numara 6A ve 6B replikasyon 21. saat 10⁰-10⁹ oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



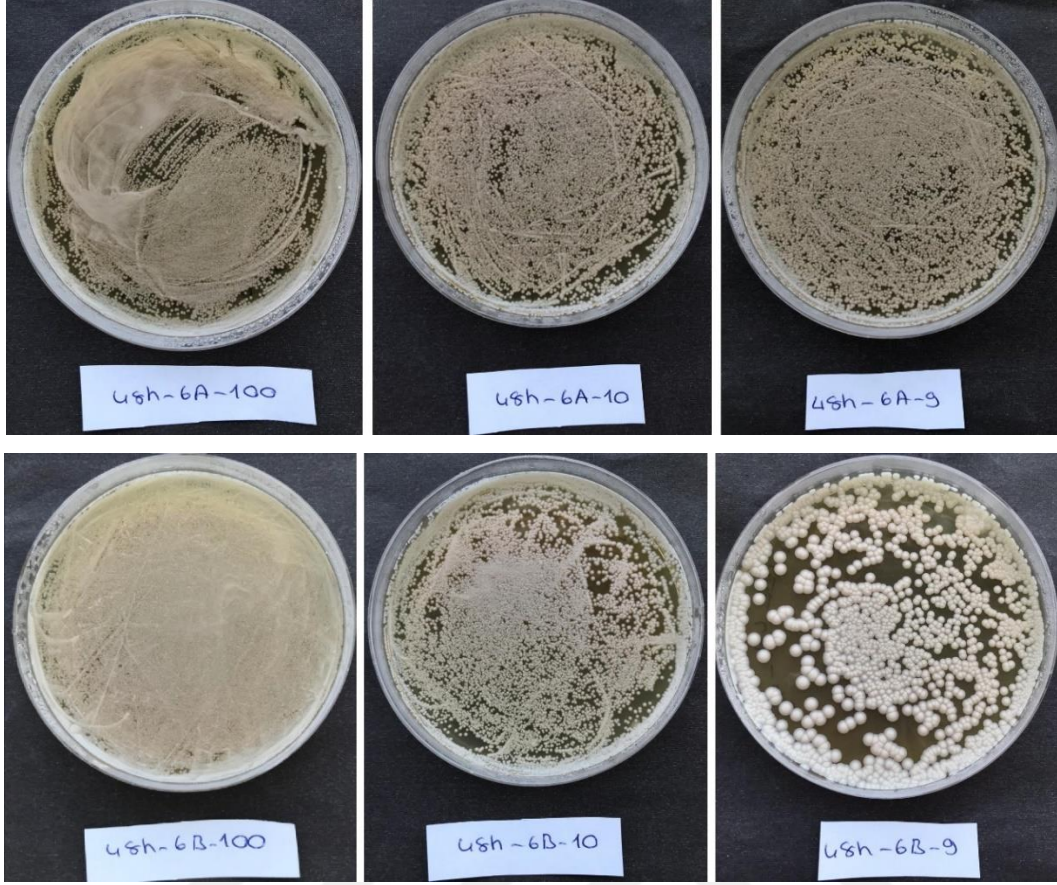
Şekil 4. 8 6 numara 6A ve 6B replikasyon 24. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



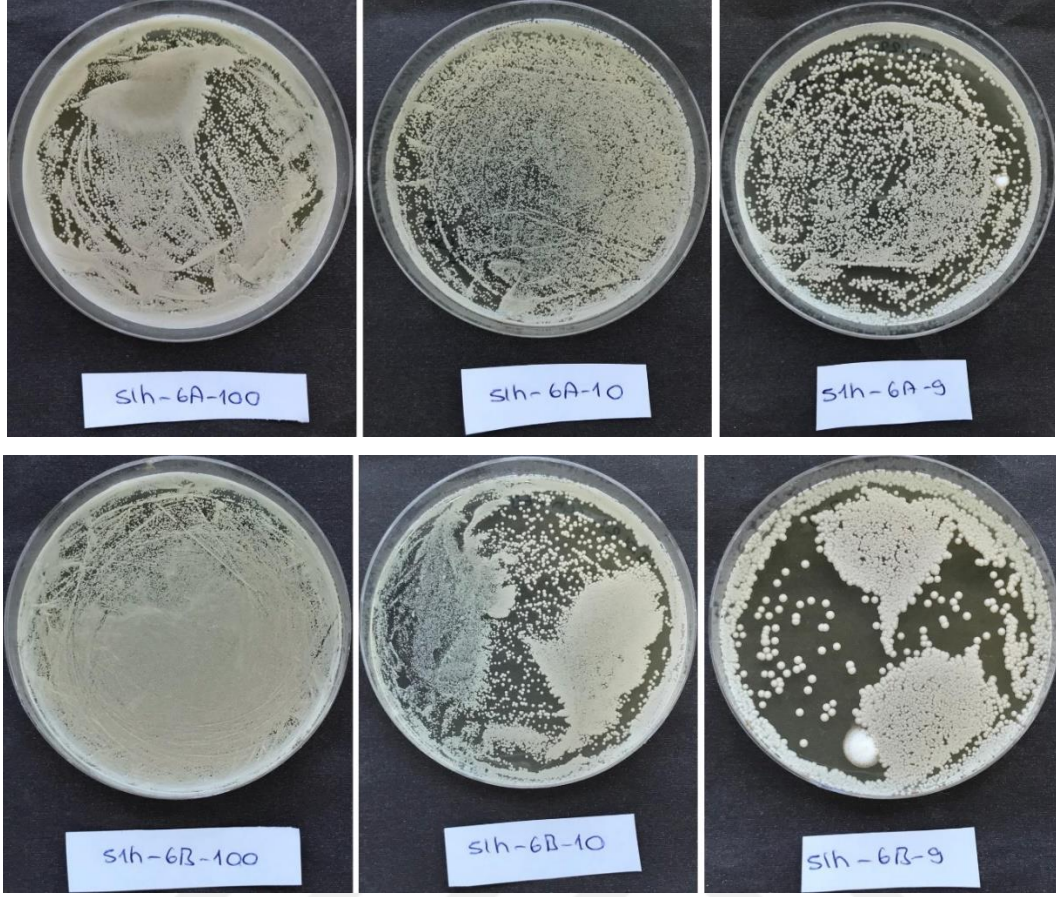
Şekil 4. 9 6 numara 6A ve 6B replikasyon 27. saat 10⁰-10⁹ oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



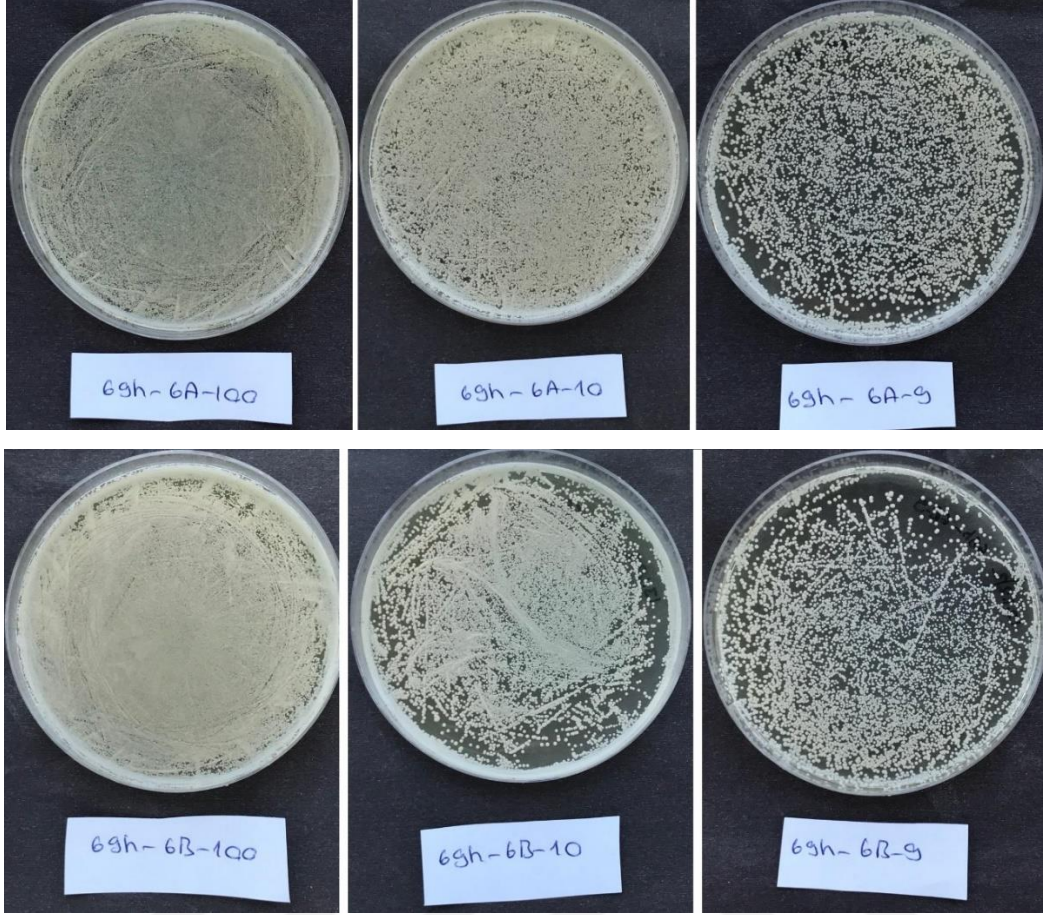
Şekil 4. 10 6 numara 6A ve 6B replikasyon 45. saat 10⁰-10⁹ oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



Şekil 4. 11 6 numara 6A ve 6B replikasyon 48. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı

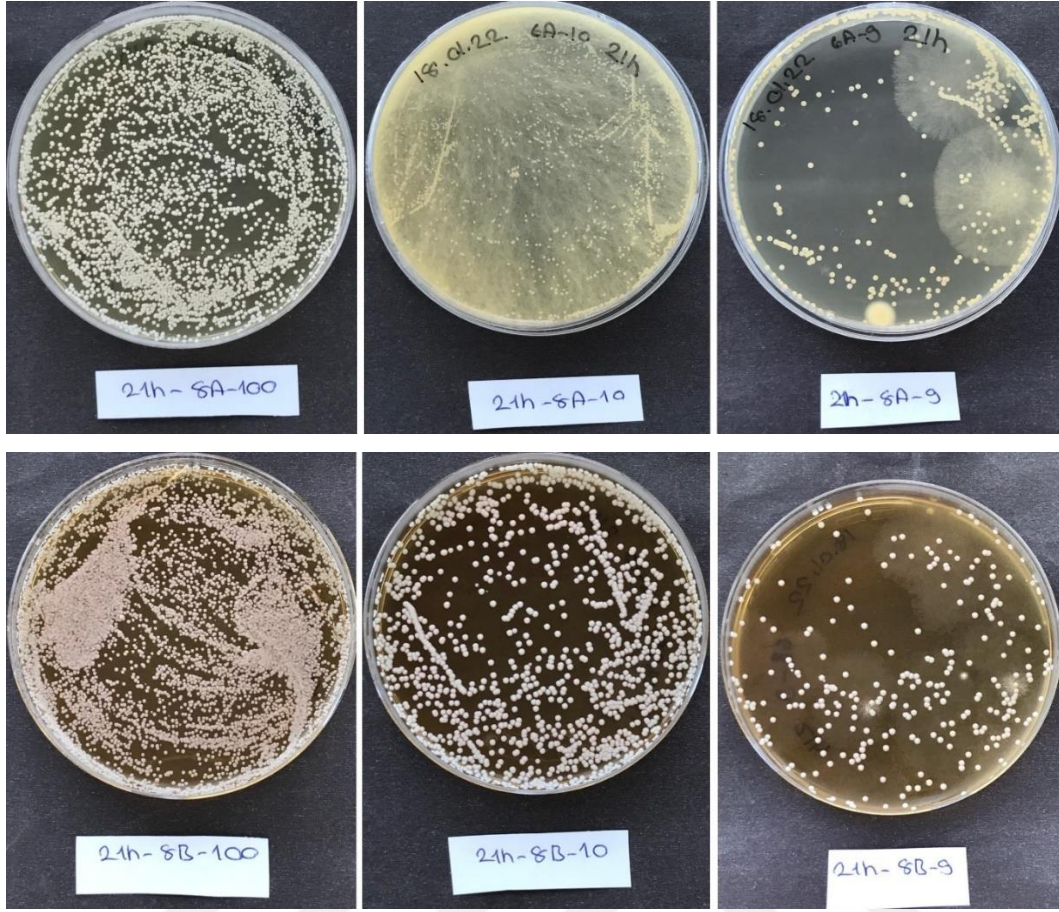


Şekil 4. 12 6 numara 6A ve 6B replikasyon 51. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı

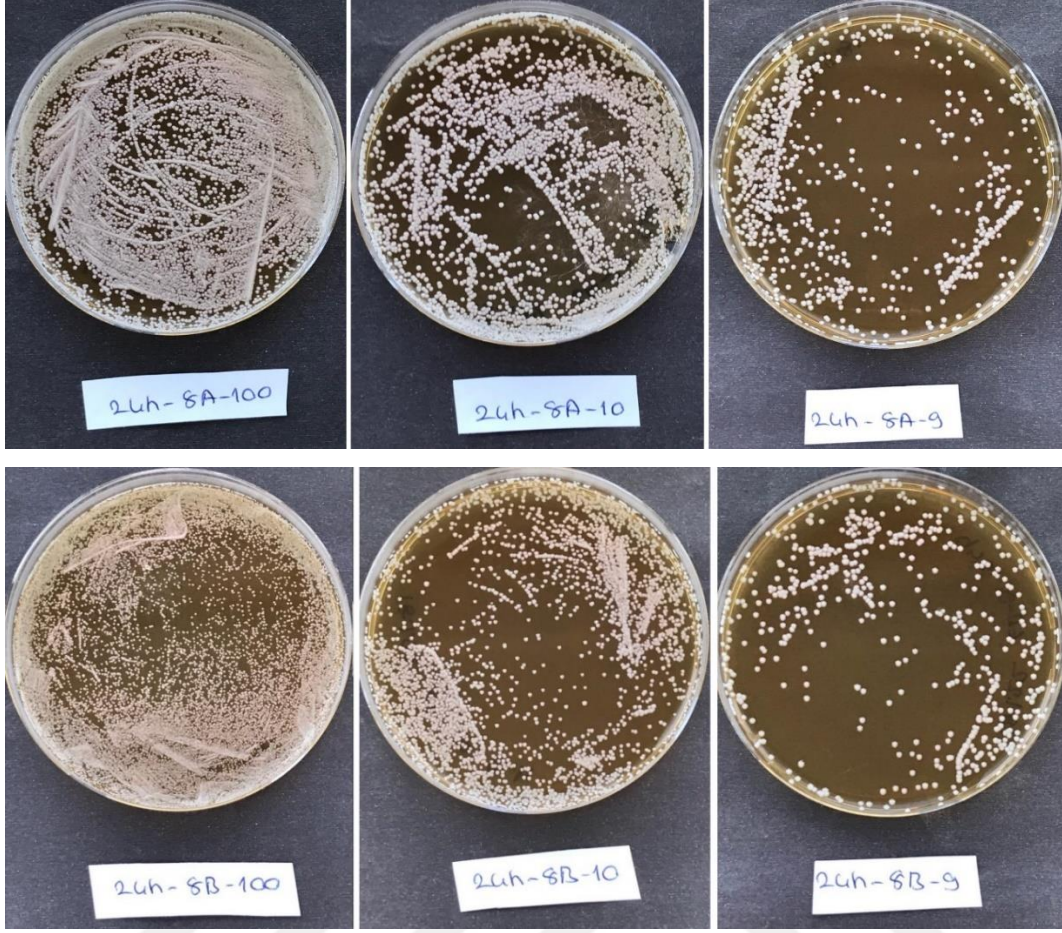


Şekil 4. 13 6 numara 6A ve 6B replikasyon 69. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı

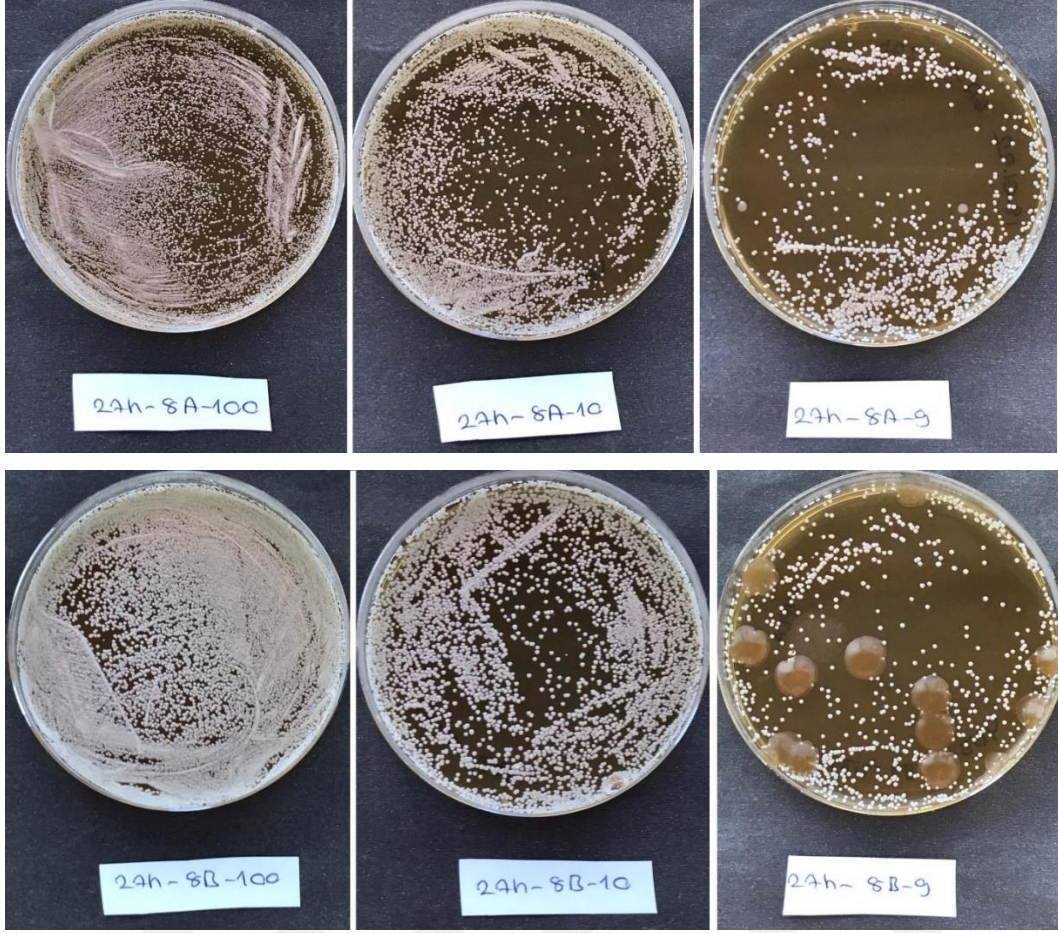
6 numaralı fermentasyon konsantrasyonunun belirli saatlerdeki seri dilisyon koloni sayımına bakıldığında neredeyse tüm saatlerde her iki replikada da üç farklı seyreltmede oluşan koloni sayısı 300 ün üzerindedir. OD ölçümünde üremenin en hızlı olduğu dönem hem OD600 hem de OD660 da 3h-27h arasındır. 48. saat itibariyle üreme durgunluk fazına girmiştir. Agar da koloni sayımına baktığımız zaman 21. saatten itibaren tüm saatlerde koloni sayımı 300 ün üzerindedir.



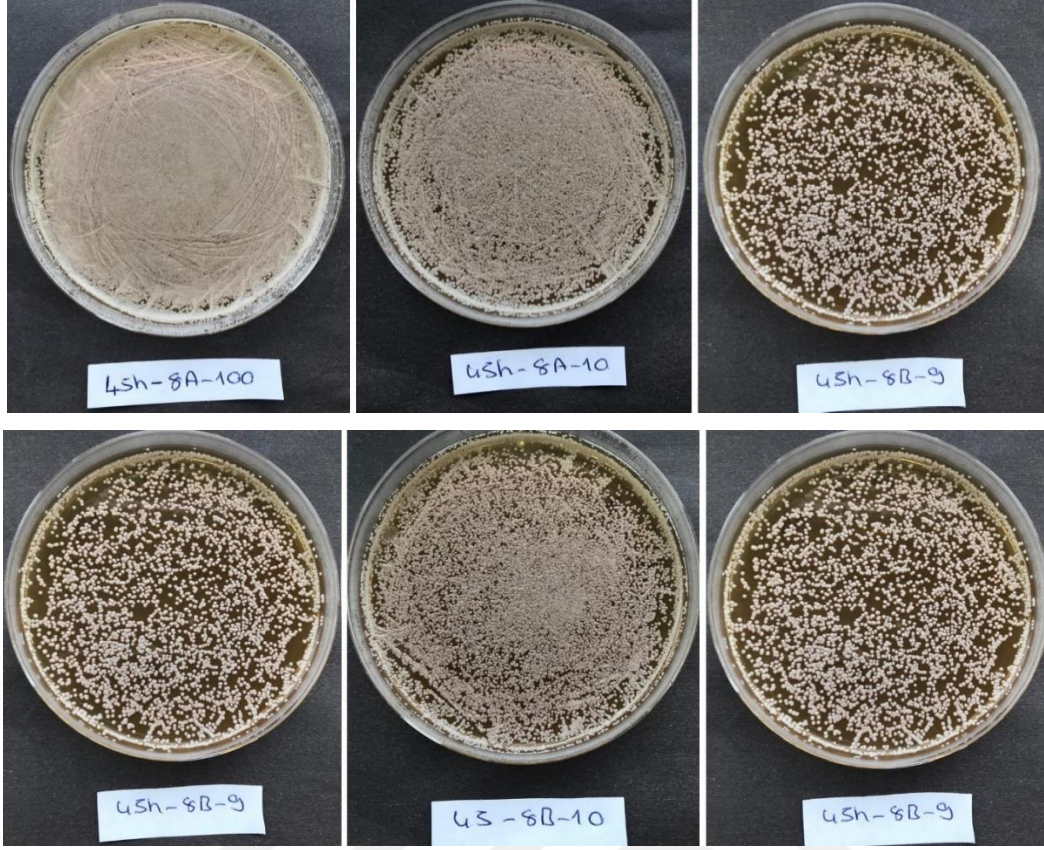
Şekil 4. 14 8 numara 8A ve 8B replikasyon 21. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



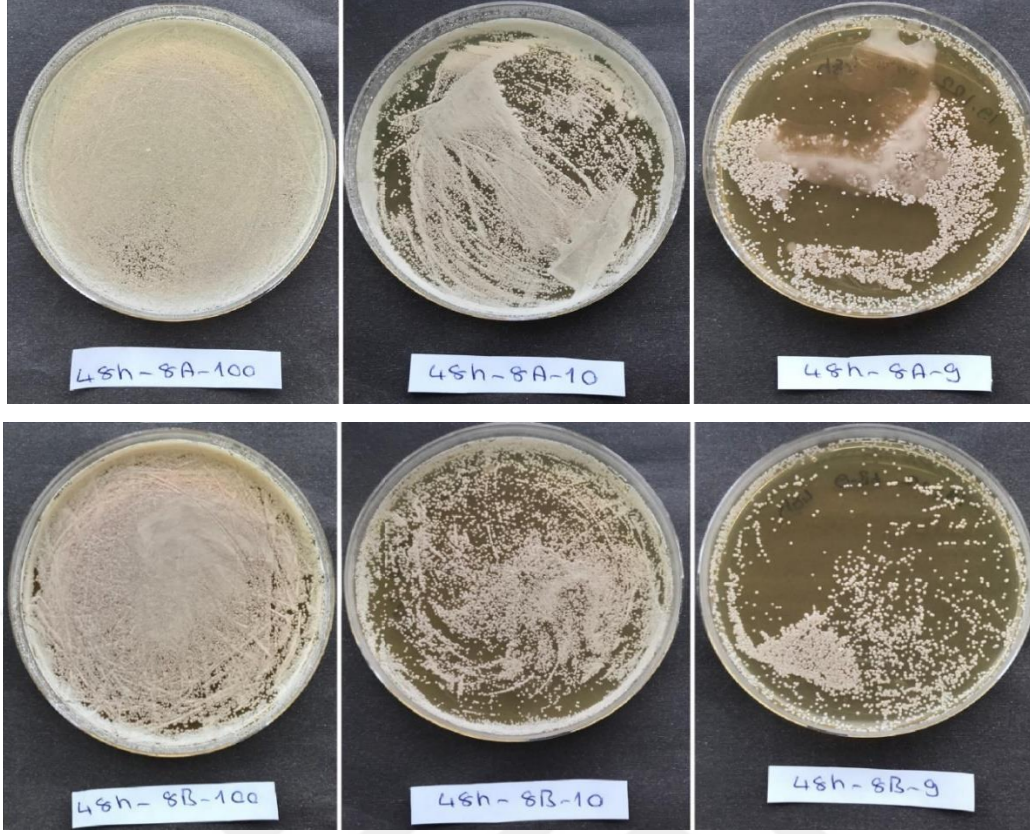
Şekil 4. 15 8 numara 8A ve 8B replikasyon 24. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



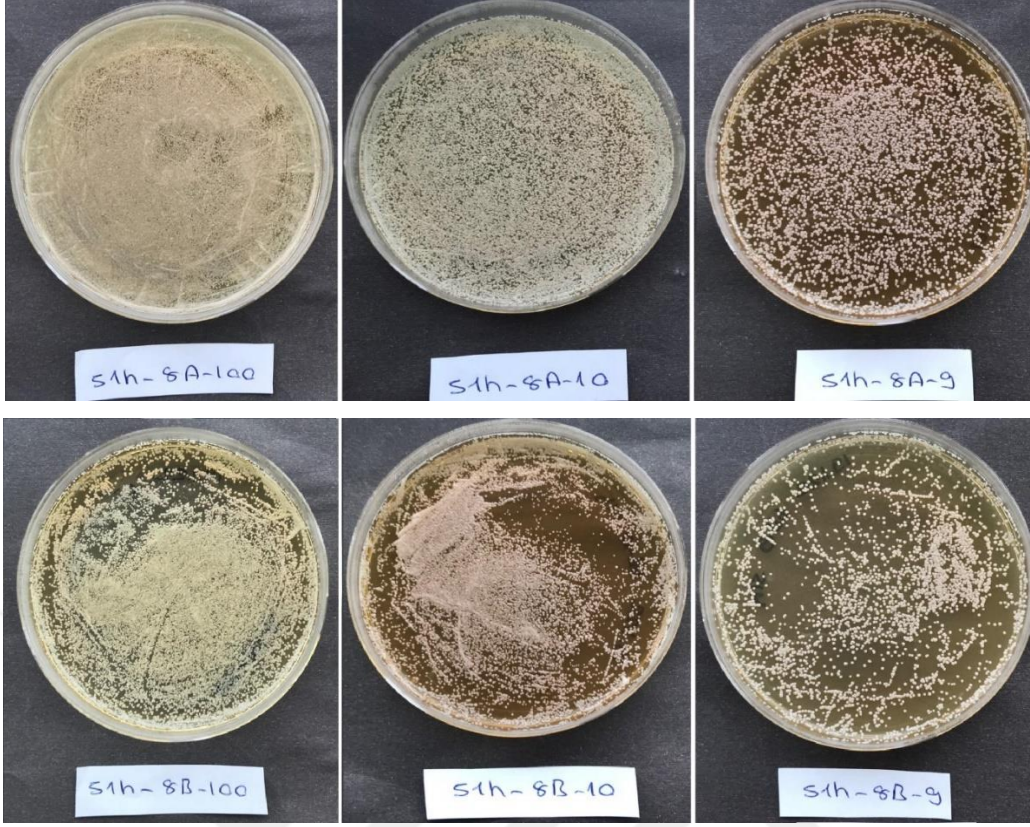
Şekil 4. 16 8 numara 8A ve 8B replikasyon 27. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



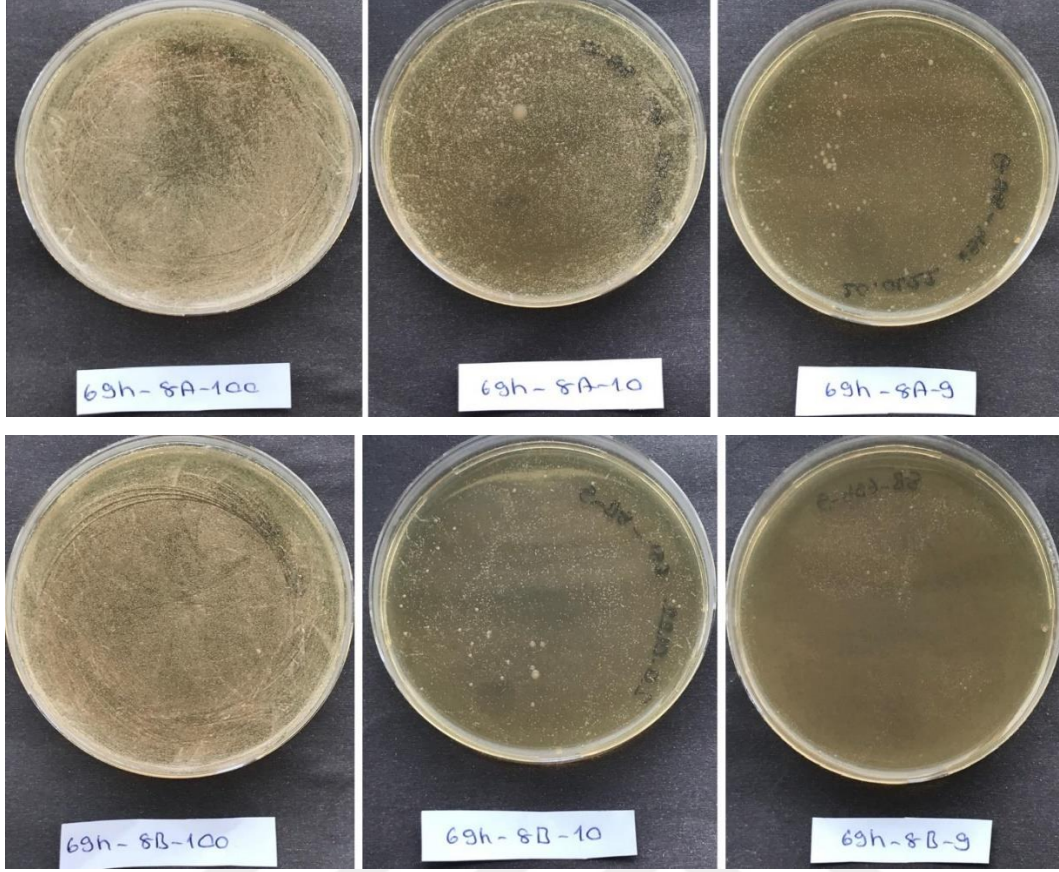
Şekil 4. 17 8 numara 8A ve 8B replikasyon 45. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



Şekil 4. 18 8 numara 8A ve 8B replikasyon 48. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



Şekil 4. 19 8 numara 8A ve 8B replikasyon 51. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı



Şekil 4. 20 8 numara 8A ve 8B replikasyon 69. saat 10^0 - 10^9 oranlarında seri dilisyon koloni sayımı

8 numaralı fermentasyon konsantrasyonunun belirli saatlerdeki seri dilisyon koloni sayımına bakıldığında neredeyse tüm saatlerde her iki replikada da üç farklı seyreltmede oluşan koloni sayısı 300 ün üzerindedir. OD ölçümünde hem OD600 hem de OD660 da iki replikada da 3. saat itibariyle üreme hızında farklılık bulunmaktadır. Hem OD600 hem de OD660 da 45. saat itibariyle durgunluk fazına girilmiştir. Agar da koloni sayımına baktığımız zaman 21. saatten itibaren tüm saatlerde koloni sayımı 300 ün üzerindedir.

6 numaralı fermentasyon koşullarında mikroorganizma 3h itibariyle üremeye başlamıştır. Üremenin en hızlı olduğu dönem hem OD600 hem de OD660 da 3h-27h arasındır. 48. saat itibariyle üreme durgunluk fazına girmiştir.

8 numaralı fermentasyon mikroorganizma 3. saat itibariyle üremeye başlamıştır. Hem OD600 hem de OD660 da iki replikada da 3. saat itibariyle üreme hızında farklılık bulunmaktadır. Hem OD600 hem de OD660 da 45. saat itibariyle

durgunluk fazına girilmiştir. Mikroorganizma 86h itibariyle ölüm fazına girmiştir. 123h itibariyle net bir düşüş gözlemlenmiştir.

Fermentasyon sonucunda elde edilen ıslak ağırlık ve kuru ağırlık ağırlık en yüksek olduğu 8 numaralı fermentasyon prosesinde elde edilmiştir. Koloni sayımı ve MTT deneyleri sonucunda elde edilen veriler hem 6 numaralı fermentasyon prosesinde hem de 8 numaralı fermentasyon prosesinde aynıdır. Ancak fermentasyon boyunca 6 numaralı fermentasyon prosesinin durgunluk fazının 8 numaralı fermentasyon prosesinden daha uzun sürdüğü belirlenmiştir. İki fermentasyonda da sıcaklıkları ve rpm dereceleri aynıdır. Tek fark pH olduğu belirlenmiştir. Fermentasyon koşullarında durgunluk fazının belirlenmesinde belirleyici rol oynayan faktörün pH olduğu varsayımlanmıştır. Aynı fermentasyon koşullarında pH ve sıcaklık sabit tutulup farklı rpm dereceleri (180 ve 220 rpm) denendiğinde ise durgunluk fazının değişmediği ıslak ve kuru ağırlığının azaldığı belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar ele alındığında %2'lik glikoz, %2'lik pepton ve %2'lik yeast extract bulunan YPDA besiyerinde pH:5, sıcaklık: 25, rpm: 220 olan fermentasyon prosesi olan 6 numaralı fermentasyon çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.7 Maya Hücrelerinin Mikrokapsülasyonu

Mikrokapsülasyonu M74 mayasının canlılık yüzdesinin en yüksek deneysel değerleri, %0,1 (a/h) SA, %10 (a/h) CS içeren 10. formülasyonda %71,42±1,74 olmuştur. Ön çalışmalar sonucunda Sprey kurutucu parametreleri 90°C giriş sıcaklığı, 10ml/dk akış hızı ve 70°C çıkış sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklara maruz kalması hücre zarı hasarına, protein ve enzimlerin denatürasyonuna ve hücre ölümüne neden olur (Dos Santos vd., 2014). Bu nedenle proses optimizasyonu ve formülasyon optimizasyonu hücre canlılığını artıracak en iyi parametreleri bulmak amacıyla yapılmıştır. Huang vd. (2023), *Pichia kudriavzevii*'yi kitosan ve sodyum aljinat ile çapraz bağlanmış bir jel ağı içerisinde immobilize ederek mikroküreler oluşturmuş ve kapsülleme verimliliğini %42-74 aralığında bulmuşlardır. Martins vd. (2022), bir sprej kurutucu ve peynir altı suyu tozu (WP), yüksek maltoz (MA) ve maltodekstrin DE10 (MD) içeren duvar bileşenleri kullanarak *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684 ve *Meyerozyma caribbica* CCMA

1738 mayalarını mikrokapsüllemiştir. Peynir altı suyu proteininin duvar malzemesi olarak kullanılmasının, üç maya türünün tamamı için maya canlılığını MDX kullanımına göre daha fazla koruduğunu bulmuşlardır. Mayanın sprey kurutucu kullanılarak kurutulması, dehidrasyonu ve rehidrasyonu sırasında neredeyse tüm organellerde ve hücresel bileşenlerde temel yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelir ve hücre ölümüyle sonuçlanabilir (Rapoport, 2019). Hücre korumasını geliştirmek için kullanılan maltodekstrin, nişasta ve peynir altı suyu tozu gibi koruyucu özelliklere sahip belirli bileşenlerin eklenmesi, hücre zarının bazı kısımlarını stabilize ederek daha fazla canlılığa yol açmış olabilir (Martins vd., 2022).

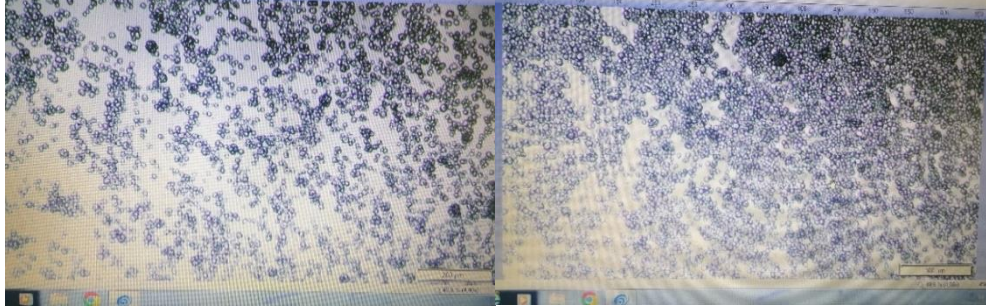
Tablo 4. 6 M74 mayasının püskürtülerek kurutulmuş kapsülleme formülasyonlarının Taguchi tasarımı ile belirlenen toz formülasyonları ve toz kalitesi, canlılığı, parçacık boyutu değerleri

Örnek	SA (w/v, %)	CS (w/v, %)	MDX (w/v, %)	WPI (w/v, %)	Toz kalitesi (0- 5 aralığı)	Canlılık (%)	Parçacık boyutu (Dv90, µm)
1	0	5	0	0	3	36,78±1,14	32,41±0,22
2	0	0	5	0	2	10,32±0,98	26,69±0,34
3	0	0	0	5	2	9,41±0,79	22,65±0,12
4	0	10	0	0	3	54,41±1,17	36,78±0,18
5	0	0	10	0	2	21,41±0,74	41,45±0,26
6	0	0	0	10	2	11,69±0,09	35,74±0,31
7	0,1	5	0	0	3	65,48±1,19	35,62±0,19
8	0,1	0	5	0	3	35,42±0,67	24,71±0,09
9	0,1	0	0	5	2	16,35±0,08	18,59±0,11
10	0,1	10	0	0	4	71,42±1,74	37,54±0,23
11	0,1	0	10	0	3	22,65±0,12	38,46±0,25
12	0,1	0	0	10	3	14,28±0,10	22,45±0,08

SA: Sodyum aljinat, CS: Mısır nişastası, MDX: Maltodekstrin ve WPI: Peynir altı suyu proteini izolatu.

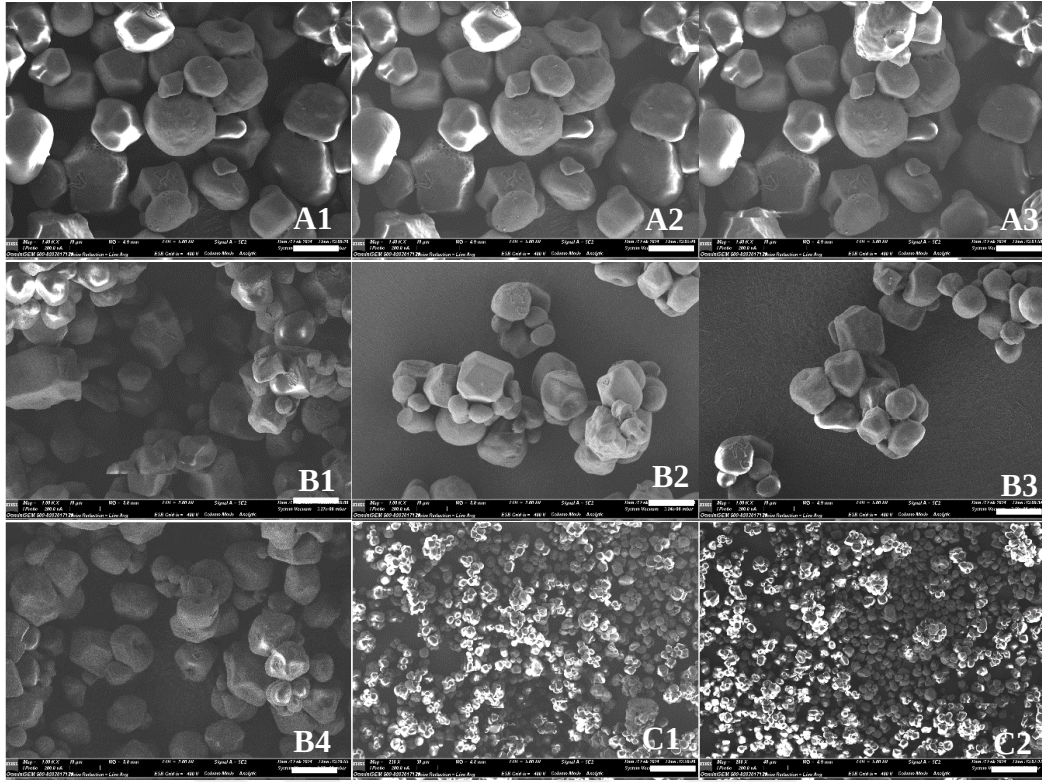
Tablo 4.6 kuru toz örnekleri için parçacık boyutu değerlerini ve kullanılan taşıyıcı malzeme türünün kapsüllenmiş maya hücrelerinin parçacıklarının boyutunu nasıl büyük ölçüde etkilediğini göstermektedir. Kurutulmuş tozların parçacık boyutu 20 ila 40 µm arasında değişir. SA ve SC içeren formülasyonun partikül büyüklüğü 37,54±0,23 olarak ölçülmüştür. Kapsülleme için kullanılan duvar malzemelerinin farklı film oluşturma ve jelleşme yetenekleri, çeşitli taşıyıcı malzemelerle kurutulan

maya kapsülleme numuneleri arasındaki parçacık boyutu ve canlılıktaki farklılıkları açıklamak için kullanılabilir. Literatürdeki bazı çalışmalar, sodyum aljinat/mısır nişastası kombinasyonlarının çok daha üniform ve daha küçük boyutlu kapsül oluşumunu mümkün kıldığını belirtmektedir (Tan vd., 2009).



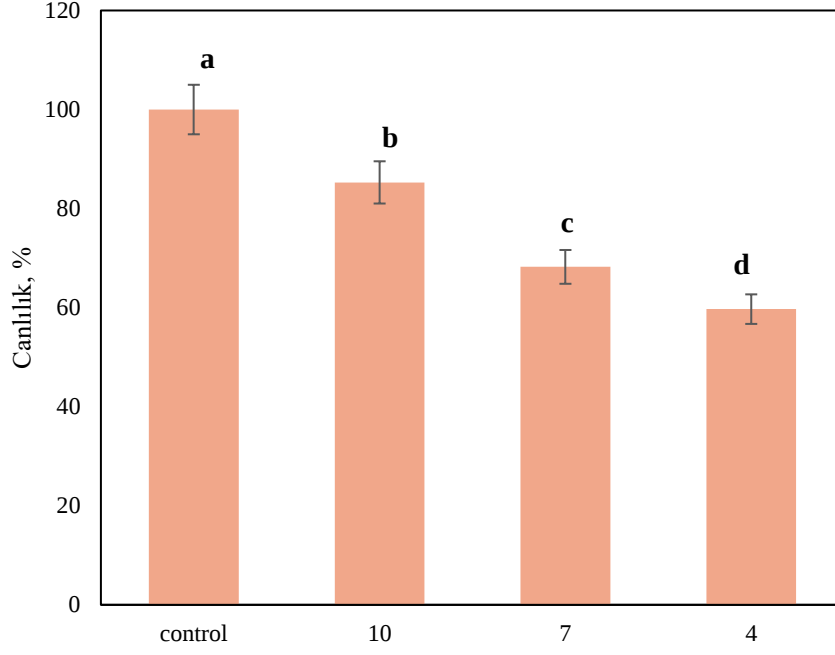
Şekil 4. 21 %0,1 (a/h) sodyum aljinat (SA), %10 (a/h) mısır nişastası (CS) ve M74 mayasını içeren 10 numaralı formülasyonun farklı büyütmelelerdeki optik mikroskop görüntüleri

Optimum koşullar altında üretilen 10. mikrokapsül formülasyonunun taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinde hafif pürüzlü yüzeyler görülmüş (Şekil 4.22) ancak herhangi bir kırık veya çatlak görülmemiştir. Boyut analizine paralel olarak mikrokapsüllerin 30 ila 40 μm arasında dağılım gösterdiği optik mikroskop (Şekil 4.21) ve SEM görüntüleri ile de doğrulanmıştır. Benzer morfolojik özellikler, sprey kurutucuyla maya kapsüllemenin kullanıldığı çalışmalarda da doğrulanmıştır (López-Cruz vd., 2020; Chandralekha vd., 2016).



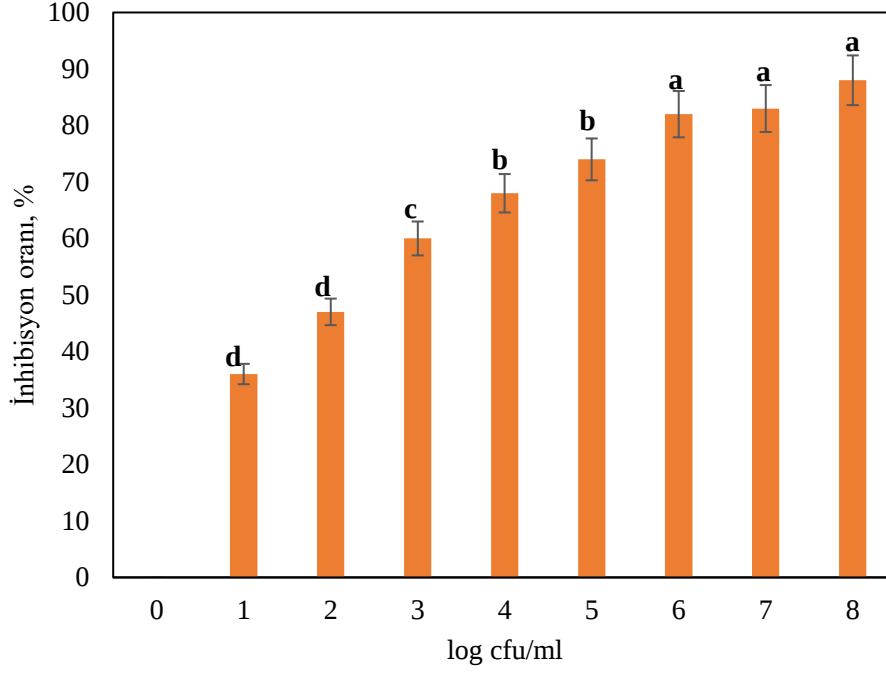
Şekil 4.22 %0,1 (a/h) sodyum aljinat (SA), %10 (a/h) mısır nişastası (CS) ve M74 mayasını içeren 10 numaralı formülasyonun farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri. A1-3 ve B1-4’de ölçek çubuğu 10µm, ve C1-2’de 40µm’yi göstermektedir.

MTT sonuçlarında (Şekil 4.23) 4, 7 ve 10 numaralı formülasyonların MTT sonuçları sırasıyla %85, %68 ve %59 olarak bulunmuştur. %50’den fazla kapsülleme verimliliğine sahip sprey kurutucu formülasyonları için MTT analizi yapılmış ve hücre canlılığı en yüksek olan kombinasyon 10 numaralı formülasyon olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 23 Püskürtülerek kurutulmuş M74 mayasının 4. 7. ve 10. formülasyonlarının MTT analizi ile belirlenmiş canlılık değerleri (%). Kapsüllenmemiş M74 mayası kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Pichia kudriavzevii'nin (M74) optimum koşullar altında püskürterek kurutma yoluyla mikrokapsüllenmesi, portakal meyvelerinde hastalığa neden olan *P.digitatum*'a karşı etkili olmuştur (Şekil 4.23). M74 mayasını içeren 10 numaralı formülasyon 5 log kob/ml'de %74 inhibisyon oranı göstermiştir. *In vivo* meyve denemelerinde kullanılmak üzere hücre canlılığı ve MTT canlılığı en yüksek olan 10. formülasyon seçilmiştir (Şekil 4.24).



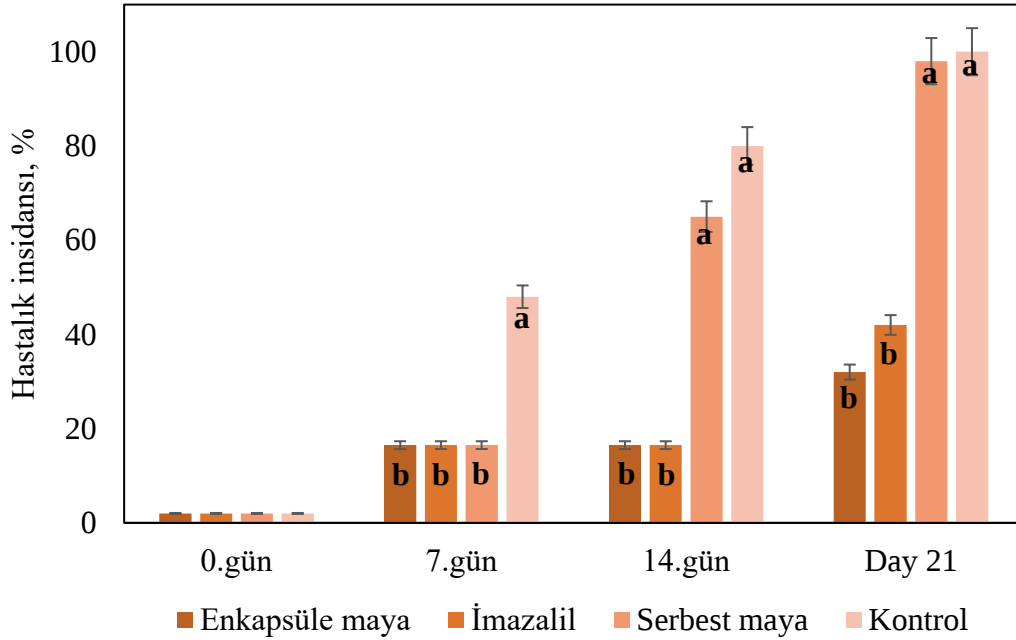
Şekil 4. 24 *P. digitatum*'a karşı %0,1 (a/h) sodyum aljinat (SA), %10 (a/h) mısır nişastası (CS) içeren 10 numaralı formülasyondaki kapsüllenmiş M74 için antifungal MIC değeri

4.8 Portakallarda Hasat Sonrası Hastalıkların Kontrolünde Antagonist Mayaların Etkinliğinin Değerlendirilmesi

BCA'lar gibi mikrobiyal antagonistlerin uygulanması, meyve mahsullerindeki hastalıkların yönetilmesinde güvenli, çevre dostu ve toksikolojik açıdan sağlam bir yöntem olma avantajını sunmaktadır (Hammami vd., 2022). Yeşil küf olarak bilinen *P. digitatum*, ortam sıcaklıklarında büyümesi kolay olduğundan ticari işlemler sırasında genellikle daha yüksek kayıplara neden olur. Mavi küf (*P. italicum*) ise, 10°C'nin altındaki soğuk depolama koşullarında *P. digitatum*'dan daha hızlı büyür (Plaza vd., 2003). Narenciyelerin ticarileştirilmesinde ortam sıcaklığı koşulları daha önemli olduğundan çalışmada model organizma olarak *P. digitatum* (yeşil küf) seçilmiştir. 21 günlük formülasyondan sonra, kapsüllenmemiş mayaya (%98) kıyasla portakalların yalnızca %32'si küflenmiştir (Şekil 4.25). Bu durum, serbest mayaların 21 gün boyunca canlı kalmaması, mikrokapsülenmiş mayaların ise canlı kalması ve zamanla salınıp etki gösterebilmesi ile açıklanabilir. Kapsülleme ile portakallarda hastalık görülme

sıklığında kontrole göre %68'lik bir azalma elde edilmiştir. Lima vd. (2014)'nin yaptıkları bir çalışmada burdaki sonuçlara benzer bir şekilde, *M. guilliermondii*'nin kapsüllenmesinin papaya antraknozu şiddetini %50 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada seçilen M74 izolatı, *P. digitatum*'un misel büyümesinde yüksek bir *in vitro* inhibitör aktivite göstermiş ve ortam sıcaklığında (25 °C) saklanan portakal meyvelerinde *Penicillium digitatum* küfünün önlenmesinde kapsülleme yoluyla etkili olduğu bulunmuştur. Kapsüllenmiş M74'ün antifungal aktivitesinin serbest M74'e göre daha yüksek olması, kapsülleme sisteminin mayanın canlılığını koruyabilmesini ve depolama süresi boyunca aktivite göstermeye devam edebilmesini sağlamasından kaynaklanabilir.



Şekil 4. 25 *P. digitatum* inoküle edilen portakallara uygulanan kapsüllenmiş M74 maya (EM), serbest M74 maya (SM) ve kimyasal pestisit (İ) 0., 7., 14. ve 21. günden sonraki hastalık görülme oranı (%). Kontrol grubu olarak herhangi bir işlem uygulanmayan portakallar kullanılmıştır.

Gram-busch vd. (2024) bir sprey kurutucuyla *Saccharomyces spp.*'yi kapsüllemiş ve maya canlılığının 90 güne kadar %75'e kadar kalabildiğini göstermişlerdir. Kapsüllemenin, duvar malzemesinin türüne bağlı olarak küf ve bakteri gibi patojenlerin hücre duvarı ile etkileşime girerek içerdiği biyoaktif bileşenin

antifungal aktivitesini arttırması da mümkündür. Buna paralel olarak Erarslan vd. (2024) adaçayı esansiyel yağını kapsüllemiş ve bunun *Aspergillus niger* ve *Botrytis cinerea*'ya karşı antifungal aktivitesinin PVA/Chi NP'lere kapsülleme sonrasında önemli ölçüde artabileceğini göstermiştir.



Şekil 4. 26 Kapsüllenmiş M74 maya (EY), serbest M74 maya (FY) ve kimyasal pestisit (imazalil) (P) uygulanmış *P. digitatum* inoküle edilen portakalların 21. gündeki görüntüleri. Kontrol grubu olarak herhangi bir işlem uygulanmayan portakallar kullanılmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları, bu çalışmada seçilen M74 maya izolatının antifungal aktivitesinin birden fazla etkiye bağlı olduğunu gösterebilir. Özellikle, serbest ve

kapsüllenmiş M74'ün *P.digitatum*'a karşı *in vitro* ve *in vivo* deneylerde gösterdiği inhibisyon, bunun hidrolitik enzimler, VOC'ler ve biyofilm oluşturma kapasitesi gibi hücre dışı yayılabilir metabolitlerden kaynaklandığını gösterebilir ve dolayısıyla enkapsüle edilmiş *Pichia kudriavzevii* M74 suşunun aday BCA olabileceği söylenebilir.



Bu çalışmada narenciye bahçeleri, ağaç ve yapraklardan izole edilen mayalar tanımlanmış, filogenetik analizleri yapılmış ve antifungal etkileri belirlenmiştir. Mevcut çalışma, Taguchi metodolojisi yoluyla *Pichia kudriavzevii*'nin (M74) mikrokapsülasyonu için spreyci kurutma prosesinde optimum spreyci kurutma proses parametrelerinin yanı sıra polimerlerin optimum konsantrasyon değerlerinin elde edilmesine olanak sağlamıştır. %0,1 SA ve %10 CS içeren *Pichia kudriavzevii* (M74) formülasyonu, yüksek canlılık yüzdesi (%73) sayesinde portakalda kayıplara neden olan bir küf olan *P. digitatum*'un inhibisyonunda iyi bir performans göstermiştir. Bu çalışmanın bulguları, bu çalışmada seçilen M74 maya izolatının antifungal aktivitesinin çeşitli faktörler tarafından etkilendiğini gösterebilir. Serbest ve kapsüllenmiş M74'ün *P. digitatum*'a karşı gösterdiği inhibisyon, hidrolitik enzimler, VOC'ler ve biyofilm oluşturma yeteneği gibi hücre dışı yayılabilir metabolitlerden kaynaklandığını gösterebilir. Bu nedenle, enkapsüle edilmiş *Pichia kudriavzevii* M74 suşunun BCA olarak değerlendirilebileceği düşünülüyor. İnhibisyon yüzdeleri, bu formülasyonun, *P. digitatum* küfünün etkili kontrolü için turuncgillerde sentetik fungusitlere potansiyel bir alternatif uygulama olarak değerlendirilmesi için yeterli olabilir. İleriki çalışmalarda portakal ağaçlarında saha çalışmaları ve diğer meyvelerde denemeler yapılabilir.

- Aboutorabi, M. A., (2018). Review on the Biological Control of Plant Diseases Using Various Microorganisms. *J. Res. Med. Dent. Sci.*, 6 (4).
- Anandharamakrishnan, C. (2015). Spray drying techniques for food ingredient encapsulation. John Wiley & Sons.
- Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., & Vero, S. (2017). Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control*, 109, 14-20.
- Arras, G. (1996). Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 8(3), 191-198.
- Bais, H.P.; Fall, R.; Vivanco, J.M., (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.*, 134, 307–319.
- Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü İstatistik Veritabanı (FAOSTAT) (2020). Gıda ve Tarım Verileri. 8.08.2022 tarihinde <https://www.fao.org/faostat/en/#data> adresinden alınmıştır.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., & Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International journal of food microbiology*, 108(2), 204-209.
- Boubaker, H., Saadi, B., Boudyach, E. H., & Benaoumar, A. A. (2009). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to imazalil and thiabendazole in Morocco.
- Chan, Z.L.; Tian, S.P., (2005). Interaction of antagonistic yeasts against post-harvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biol.Technol.*, 36, 215–223.
- Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., & Panijpan, B. (2007). Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*, 42(3), 326-335.
- Chandralekha, A., Tavanandi, A. H., Amrutha, N., Hebbar, H. U., Raghavarao, K. S. M. S., & Gadre, R. (2016). Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life. *Drying technology*, 34(11), 1307-1318.
- Chi, M., Li, G., Liu, Y., Liu, G., Li, M., Zhang, X., & Liu, J. (2015). Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biological Control*, 90, 113-119.

- Choińska, R., Piasecka-Jóźwiak, K., Chabłowska, B., Dumka, J., & Łukaszewicz, A. (2020). Biocontrol ability and volatile organic compounds production as a putative mode of action of yeast strains isolated from organic grapes and rye grains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 1135-1146.
- Chu, Y., Li, M., Jin, J., Dong, X., Xu, K., Jin, L., & Ji, H. (2023). Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries. *Journal of Fungi*, 9(2), 170.
- Clapp, J. (2021). The problem with growing corporate concentration and power in the global food system. *Nature Food*, 2(6), 404-408.
- Cubero, S., Lee, W. S., Aleixos, N., Albert, F., & Blasco, J. (2016). Automated systems based on machine vision for inspecting citrus fruits from the field to postharvest—a review. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 1623-1639.
- Dadkhodazade, E., Khanniri, E., Khorshidian, N., Hosseini, S. M., Mortazavian, A. M., & Moghaddas Kia, E. (2021). Yeast cells for encapsulation of bioactive compounds in food products: a review. *Biotechnology Progress*, 37(4), e3138.
- Delali, K. I., Chen, O., Wang, W., Yi, L., Deng, L., & Zeng, K. (2021). Evaluation of yeast isolates from kimchi with antagonistic activity against green mold in citrus and elucidating the action mechanisms of three yeast: *P. kudriavzevii*, *K. marxianus*, and *Y. lipolytica*. *Postharvest Biology and Technology*, 176, 111495.
- Dos Reis Almeida, F. B., Carvalho, F. C., Mariano, V. S., Alegre, A. C. P., Silva, R. D. N., Hanna, E. S., & Roque-Barreira, M. C. (2011). Influence of N-glycosylation on the morphogenesis and growth of *Paracoccidioides brasiliensis* and on the biological activities of yeast proteins. *PLoS One*, 6(12), e29216.
- Dos Santos, R. C. S., Finkler, L., & Finkler, C. L. L. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 31(8), 759–767. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.932026>
- Droby, S.; Wisniewski, M.; Macarasinb, D.; Wilson, C., (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.*, 52, 137–145.
- Dukare, A. S.; Paul, S.; Nambi, V. E.; Gupta, R. K.; Singh, R.; Sharma, K.; Vishwakarma, R. K. Exploitation of Microbial Antagonists for the Control of Postharvest Diseases of Fruits: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019, 59 (9), 1498–1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>.
- Eckert, J. W. (1987, December). *Penicillium digitatum* biotypes with reduced sensitivity to imazalil. In *Phytopathology* (Vol. 77, No. 12, pp. 1728-1728). 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC.
- Erarslan, A., Karakas, C. Y., Bozkurt, F., & Sagdic, O. (2023). Enhanced antifungal activity of electrosprayed poly (vinyl alcohol)/chitosan nanospheres loaded with sage essential oil on the viability of *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea*. *ChemistrySelect*, 8(21), e202300296.

- Erasmus, A., Lennox, C. L., Korsten, L., Lesar, K., & Fourie, P. H. (2015). Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. *Postharvest Biology and Technology*, 107, 66-76.
- Etebu, E., & Nwauzoma, A. B. (2014). A review on sweet orange (*Citrus sinensis* L Osbeck): health, diseases and management. *American Journal of Research Communication*, 2(2), 33-70.
- Ezzougari, R., Bahhou, J., Taoussi, M., Seddiqi Kallali, N., Aberkani, K., Barka, E. A., & Lahlali, R. (2024). Yeast warriors: Exploring the potential of yeasts for sustainable citrus post-harvest disease management. *Agronomy*, 14(2), 288.
- Fathi, F., Saberi-Riseh, R., & Khodaygan, P. (2021). Survivability and controlled release of alginate-microencapsulated *Pseudomonas fluorescens* VUPF506 and their effects on biocontrol of *Rhizoctonia solani* on potato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 627-634.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fraceto, L. F., Maruyama, C. R., Guilger, M., Mishra, S., Keswani, C., Singh, H. B., & de Lima, R. (2018). *Trichoderma harzianum*-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(8), 2056-2063.
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 154.
- Gerding-González, M., France, A., Sepulveda, M. E., & Campos, J. (2007). Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 17(1), 105-110.
- Gimeno, M. (1996). An overview of the latest development of microencapsulation for agricultural products. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 31(3), 407-420.
- González-Gutiérrez, K. N., Ragazzo-Sánchez, J. A., & Calderón-Santoyo, M. (2021). Application of stressed and microencapsulated *Meyerozyma caribbica* for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(5), 1243-1251.
- Grambusch, I. M., Schlabit, C., Schmitz, C., Benvenuti, E. V., Ducati, R. G., Neutzling Lehn, D., & Volken de Souza, C. F. (2024). Spent brewer's yeast encapsulated by spray drying: a promising bioproduct for dairy cow feeding supplementation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-15.
- Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., ... & de Kroon, H. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PloS One*, 12(10), e0185809.

- Hammami, R., Oueslati, M., Smiri, M., Nefzi, S., Ruissi, M., Comitini, F., & Sadfi Zouaoui, N. (2022). Epiphytic yeasts and bacteria as candidate biocontrol agents of green and blue molds of citrus fruits. *Journal of fungi*, 8(8), 818.
- Hatamzadeh, S., Akbari Oghaz, N., Rahnema, K., & Noori, F. (2024). Comparison of the Antifungal Activity of Chlorine Dioxide, Peracetic Acid and Some Chemical Fungicides in Post-harvest Management of *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* Infecting Sweet Orange and Strawberry Fruits. *Agricultural Research*, 13(1), 72-84.
- Hernández-Fernández, M., Cordero-Bueso, G., Ruiz-Muñoz, M., & Cantoral, J. M. (2021). Culturable yeasts as biofertilizers and biopesticides for a sustainable agriculture: a comprehensive review. *Plants*, 10(5), 822.
- Huang, J., Qiao, C., Wang, X., Gao, Y., Zhao, J., Luo, H., & Huo, D. (2023). The microsphere of sodium alginate-chitosan-*Pichia kudriavzevii* enhanced esterase activity to increase the content of esters in Baijiu solid-state fermentation. *Food Chemistry*, 407, 135154.
- Ikhwan, I., Rahayuningsih, S., Yuniarti, E., Kusuma, H. S., Darmokoesomo, H., & Putra, N. R. (2024). Mapping the trend of evolution: a bibliometric analysis of biopesticides in fruit crop protection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(3), 645-664.
- Lade, B. D., Gogle, D. P., Lade, D. B., Moon, G. M., Nandeshwar, S. B., & Kumbhare, S. D. (2019). Nanobiopesticide formulations: Application strategies today and future perspectives. In *Nano-biopesticides today and future perspectives* (pp. 179-206). Academic Press.
- Lima, G., de Curtis, F., Castoria, R., & de Cicco, V. (1998). Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology*, 8(2), 257-267.
- Lima, J. R. d., Viana, F. M. P., Lima, F. A., Pieniz, V., & Gonçalves, L. R. B. (2014). Efficiency of a yeast-based formulation for the biocontrol of postharvest anthracnose of papayas. *Summa Phytopathologica*, 40(3), 203–211. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1963>
- Liu, X., Gao, Y., Yang, H., Li, L., Jiang, Y., Li, Y., & Zheng, J. (2020). *Pichia kudriavzevii* retards fungal decay by influencing the fungal community succession during cherry tomato fruit storage. *Food Microbiology*, 88, 103404.
- Liu, Y., Wang, W., Zhou, Y., Yao, S., Deng, L., & Zeng, K. (2017). Isolation, identification and *in vitro* screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. *Biological Control*, 110, 18-24.
- Liu, Y.; Yao, S.; Deng, L.; Ming, J.; Zeng, K. Different mechanisms of action of isolated epiphytic yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 2019, 152, 100–110.
- López-Cruz, R., Ragazzo-Sánchez, J. A., & Calderón-Santoyo, M. (2020). Microencapsulation of *Meyerozyma guilliermondii* by spray drying using sodium alginate and soy protein isolate as wall materials: a biocontrol

- formulation for anthracnose disease of mango. *Biocontrol Science and Technology*, 30(10), 1116-1132.
- Ma, Y., Wu, M., Qin, X., Dong, Q., & Li, Z. (2023). Antimicrobial function of yeast against pathogenic and spoilage microorganisms via either antagonism or encapsulation: A review. *Food Microbiology*, 112, 104242.
- Macarisin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M., & Droby, S. (2007). *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. *Phytopathology*, 97(11), 1491-1500. (9)
- Madbouly, A. K., Elyousr, K. A. A., & Ismail, I. M. (2020). Biocontrol of *Monilinia fructigena*, causal agent of brown rot of apple fruit, by using endophytic yeasts. *Biological control*, 144, 104239.
- Manso, T., & Nunes, C. (2011). *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 64-71.
- Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of microbiological methods*, 71(1), 7-14.
- Marrone, P. G., (2019). Pesticidal Natural Products – Status and Future Potential. *Pest Manag. Sci.*, 75 (9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1002/ps.5433>.
- Martins, P. M. M., Batista, N. N., Santos, L. D., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2022). Microencapsulation of epiphytic coffee yeasts by spray drying using different wall materials: Implementation in coffee medium. *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109839.
- Mohamed, H., & Saad, A. (2009). The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biology and Technology*, 53(3), 123-130.
- Moraes Bazioli, J., Belinato, J. R., Costa, J. H., Akiyama, D. Y., Pontes, J. G. D. M., Kupper, K. C., ... & Fill, T. P. (2019). Biological control of citrus postharvest phytopathogens. *Toxins*, 11(8), 460.
- Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 2011; 1: 1806-1815.
- Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2014). Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal biology*, 118(8), 683-694.
- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., & Comitini, F. (2018). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 265, 18-22.

- Öztekin, S., & Karbancioglu-Guler, F. (2023). Biological control of green mould on mandarin fruit through the combined use of antagonistic yeasts. *Biological Control*, 180, 105186.
- Palou, L., Smilanick, J. L., & Droby, S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 2(2), 1-16.
- Panna, 2023. <https://www.panna.org/wp-content/uploads/2023/02/202301ClimateChangeEngFINAL.pdf>
- Parafati, L.; Vitale, A.; Restuccia, C.; Cirvilleri, G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing postharvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 2015, 47, 85–92.
- Park, J. K., & Chang, H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology advances*, 18(4), 303-319.
- Paulo F, Santos L., (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: a review. *Mater Sci Eng C*, 77: 1327-1340.
- Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H., & Kregiel, D. (2019). Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112, 1425-1445.
- Pedroso, T. M. A., BenvindoSouza, M., de Araújo Nascimento, F., Woch, J., Dos Reis, F. G., & de Melo e Silva, D. (2022). Cancer and occupational exposure to pesticides: a bibliometric study of the past 10 years. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(12), 17464- 17475.
- Peil, S., Beckers, S. J., Fischer, J., & Wurm, F. R. (2020). Biodegradable, lignin-based encapsulation enables delivery of *Trichoderma reesei* with programmed enzymatic release against grapevine trunk diseases. *Materials Today Bio*, 7, 100061.
- Pestisit atlası, 2023. <https://tr.boell.org/sites/default/files/2023-10/pestisit-atlasi-final.pdf>
- Piñón-Balderrama, C. I., Leyva-Porras, C., Terán-Figueroa, Y., Espinosa-Solís, V., Álvarez-Salas, C., & Saavedra-Leos, M. Z. (2020). Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. *Processes*, 8(8), 889.
- Plaza, P., Usall, J., Teixidó, N., & Vinas, I. (2003). Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 549-554.
- Qing, F., & Shiping, T. (2000). Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant disease*, 84(11), 1212-1216.
- Rapoport, A., 2019. Anhydrobiosis in non-conventional yeasts. In: *Non-conventional Yeasts: From Basic Research to Application*. Springer International Publishing, Cham, pp. 341–359. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_10.

- Reddy KB, Madhu AN, Prapulla SG (2009) Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. *Int J Dairy Technol* 62:240–248. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00480.x>
- Ribal, J., Estruch, V., Clemente, G., Fenollosa, M. L., & Sanjuán, N. (2019). Assessing variability in carbon footprint throughout the food supply chain: a case study of Valencian oranges. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 24, 1515-1532.
- Riseh, R. S., Hassanisaadi, M., Vatankhah, M., Soroush, F., & Varma, R. S. (2022). Nano/microencapsulation of plant biocontrol agents by chitosan, alginate, and other important biopolymers as a novel strategy for alleviating plant biotic stresses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 222, 1589-1604.
- Roberts, J. R., Karr, C. J., Council on Environmental Health, Paulson, J. A., Brock-Utne, A. C., Brumberg, H. L., ... & Wright, R. O. (2012). Pesticide exposure in children. *Pediatrics*, 130(6), e1765-e1788
- Rosa, M. M., Tauk-Tornisiello, S. M., Rampazzo, P. E., & Ceccato-Antonini, S. R. (2010). Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1491-1502.
- Ruiz-Moyano S., Martín A., Villalobos M.C., Calle A., Serradilla M.J., Córdoba M.G., Hernández A., (2016) Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases, *Food Microbiology*, 57, 45-53.
- Saberi-Riseh, R., Moradi-Pour, M., Mohammadinejad, R., & Thakur, V. K. (2021). Biopolymers for biological control of plant pathogens: Advances in microencapsulation of beneficial microorganisms. *Polymers*, 13(12), 1938.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sandhu, J. S., Sidhu, M. K., & Yadav, I. S. (2017). Control of fungal diseases in agricultural crops by chitinase and glucanase transgenes. *Sustainable agriculture reviews*, 163-212.
- Seiber, J. N., Coats, J., Duke, S. O., & Gross, A. D. (2014). Biopesticides: state of the art and future opportunities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(48), 11613-11619.
- Singh, P.; Mazumdar, P. Chapter 5 - Microbial Pesticides: Trends, Scope and Adoption for Plant and Soil Improvement. In *Biopesticides*; Rakshit, A., Meena, V. S., Abhilash, P. C., Sarma, B. K., Singh, H. B., Fraceto, L., Parihar, M., Singh, A. K., Eds.; *Advances in Bio-inoculant Science*; Woodhead Publishing, 2022; pp 37–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00023-7>.
- Strano, M. C., Altieri, G., Admane, N., Genovese, F., & Di Renzo, G. C. (2017). Advance in citrus postharvest management: diseases, cold storage and quality evaluation. *Citrus pathology*, 10, 66518.

- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, J. (2015). Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 2968-2975.
- Sukmawati, D., Sondana, G. A., Fikriyyah, N. N., Afifah, Z. N., Firhandini, A., Khumaiya, U., & Surono, S. (2021, April). Cellulase-producing yeast isolated from fermented cocoa beans as biocontrol for pathogenic mold chocolate fruit collected from Sentul, Jawa Barat, Indonesia. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1869, No. 1, p. 012043). IOP Publishing.
- Sun, K., Wang, Z., Zhang, X., Wei, Z., Zhang, X., Li, L., & Wang, J. (2021). Enhancement of Biocontrol Efficacy of *Pichia kudriavzevii* Induced by Ca Ascorbate against *Botrytis cinerea* in Cherry Tomato Fruit and the Possible Mechanisms of Action. *Microbiology spectrum*, 9(3), e01507-21.
- Šunjka, D., & Mechora, Š. (2022). An alternative source of biopesticides and improvement in their formulation—recent advances. *Plants*, 11(22), 3172.
- Syafrudin, M., Kristanti, R. A., Yuniarto, A., Hadibarata, T., Rhee, J., Al-Onazi, W. A., ... & Al-Mohaimed, A. M. (2021). Pesticides in drinking water—a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2), 468. 53
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tan, L. H., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2009). Alginate/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. *Journal of Microencapsulation*, 26(3), 263-271.
- Tang, F. H., Lenzen, M., McBratney, A., & Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature geoscience*, 14(4), 206-210.
- TEPGE, Turkey: Citrus Annual USDA Foreign Agricultural Service. <https://fas.usda.gov/data/turkey-citrus-annual-6> (accessed 2024-04-14), Turunçgiller Ürün Raporu 2023-382 TEPGE.Pdf. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/2023%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/Turun%C3%A7giller%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporu%202023-382%20TEPGE.pdf> (accessed 2024-04-14).
- Thundiyil, J. G., Stober, J., Besbelli, N., & Pronczuk, J. (2008). Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. *Bulletin of the World Health Organization*, 86, 205-209.
- Boedeker, W., Watts, M., Clausing, P., & Marquez, E. (2020). The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review. *BMC public health*, 20(1), 1-19.
- Tome, M., Zupan, J., Tomičić, Z., Matos, T., & Raspor, P. (2018). Synergistic and antagonistic effects of immunomodulatory drugs on the action of antifungals against *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *PeerJ*, 6, e4999.

- U.S. Food and Drug Administration. (2018). Helping Agriculture's Helpful Honey Bees. <https://www.fda.gov/animal-veterinary/animal-healthliteracy/helping-agricultures-helpfulhoney-bees#:~:text=These%20plants%20rely%20on%20other,carries%20it%20to%20the%20stigma>.
- Vemmer, M., & Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological control*, 67(3), 380-389.
- Vinas, I., Usall, J., Teixidó, N., & Sanchis, V. (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International journal of food microbiology*, 40(1-2), 9-16.
- Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., & Zheng, X. D. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodosporidium paludigenum* Fell & Tallman. *International journal of food microbiology*, 123(3), 234-239.
- Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., Droby, S., & Chalutz, E. (1993). A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia horticultrurae*, 53(3), 183-189.
- Xiao, Y.; Wu, K., (2019). Recent Progress on the Interaction between Insects and *Bacillus Thuringiensis* Crops. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 374 (1767), 20180316.
- Yilmaz, H.; Aydin, B., (2020) Comparative Input-Output Energy Analysis of Citrus Production in Turkey: Case of Adana Province. *Erwerbs-Obstbau*, 62 (1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s10341-019-00447-z>.
- Zaki, O.; Weekers, F.; Thonart, P.; Tesch, E.; Kuenemann, P.; Jacques, P., (2020). Limiting Factors of Mycopesticide Development. *Biol. Control*, 144, 104220. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104220>.
- Zhang, H., Du, H., & Xu, Y. (2021). Volatile organic compound-mediated antifungal activity of *Pichia* spp. and its effect on the metabolic profiles of fermentation communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(9), e02992-20.
- Zhang, H., Ma, L., Turner, M., Xu, H., Dong, Y., & Jiang, S. (2009). Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay of pears. *Food Chemistry*, 117(4), 621-626.
- Zhao, L., Zhang, H., Li, J., Cui, J., Zhang, X., & Ren, X. (2012). Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* to postharvest diseases of strawberries by addition of trehalose to the growth medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3916-3932.
- Zhimo, V. Y., Bhutia, D. D., & Saha, J. (2016). Biological control of post harvest fruit diseases using antagonistic yeasts in India. *Journal of Plant Pathology*, 275-283.
- Zhu, C., Sheng, D., Wu, X., Wang, M., Hu, X., Li, H., & Yu, D. (2017). Identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters associated with the infection of citrus fruit by *Penicillium digitatum*. *Postharvest Biology and Technology*, 134, 17-21.

Zuccaro, P., Thompson, D. C., de Boer, J., Llompарт, M., Watterson, A., Bilott, R., & Vasiliou, V. (2024). The European Union Ban on Microplastics Includes Artificial Turf Crumb Rubber Infill: Other Nations Should Follow Suit. *Environmental Science & Technology*, 58(6), 2591-2594.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Berber-Orcen B., Orcen A., Terzi G., Cakır-Koc R., Microencapsulation of Yeast Cells and Its Potential Usage As a Post- Harvest Biocontrol Agent for Citrus Storage, 2. Uluslararası Gıda Kimyası Kongresi, Antalya, Turkey, 13-16 March 2023, p. 25.
2. Orcen A., Tozun M., Poyraz F., Hacıoglu A., Berber-Orcen B., "Investigation of Antifungal Activity of Yeasts Isolated from Orange Fruits against *Penicillium digitatum*", International Conference on Agronomy and Food Science and Technology, AgroFood, Istanbul, Turkey, 20-21 June 2019, p.263.

Makaleler

1. Berber Orcen, B., Karakas, C. Y., Orcen, A., Tulimat, M. A., & Cakir, R. (2024). Microencapsulation of Yeast Cells and Its Potential Usage as a Post-Harvest Biocontrol Agent for Citrus Storage. *Agronomy*, 14(7), 1431.

Projeler

1. KOSGEB- Ar-Ge ve Inovasyon Programı- Narenciye Türlerine Yönelik Hasat Sonrası Biyofungusitlerin Geliştirilmesi, 2019.