



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**GIDA BİYOTEKNOLOJİSİ İÇİN MİKROBİYAL ENZİMLERİN
ANALİZİ ve ÜRETİCİLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Burcu KARTAL SURAL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bedia PALABIYIK**

Ocak, 2025

İSTANBUL

Bu çalışma, 20.01.2025 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Bedia PALABIYIK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL
Koç Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Emre YÖRÜK
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2020-37128 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

6 ŞUBAT 2023 KAHRAMANMARAŞ MERKEZLİ DEPREMLERDE;

HAYATINI KAYBEDEN BİNLERCE İNSANIMIZA,

HAYATTA KALIP YAŞAM MÜCADELESİ VERENLERE,

ve MEMLEKETİM ANTAKYA'YA...

ÖNSÖZ

Lisans bitirme tezinden bugüne kadar her konuda bilgi ve tecrübelerini paylaşan, bana güvenen, her zaman ilgi ve desteğini hissettiren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Bedia PALABIYIK'a sonsuz teşekkür ederim.

Son ara rapor dönemine kadar Tez İzleme Komitemde bulunan, doktora tez çalışmalarında büyük bir rolü olan, engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren Prof. Dr. Sezai TÜRKEK'e,

Doktora tez çalışmalarına tüm içtenliğiyle önerilerde bulunarak beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyelerinden Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a ve ayrıca Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL'e,

Tez çalışmalarında bana her zaman yardımcı olan, beni dinleyen ve yönlendiren Doç. Dr. Murat PEKMEZ'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm "University of Debrecen"de bana çalışma fırsatı sunan Prof. Dr. Matthias Sipiczki ve ekibine değerli katkıları için; ayrıca ekip üyelerinden Dr. Antunovics Zsuzsa'ya yardımları ve arkadaşlığı için teşekkür ederim

Her zaman yanımda olan, beraber gülüp beraber ağladığımız hem meslektaşlarım hem kıymetli arkadaşlarım Dr. Gizem YILDIRIM BAŞTEMUR ve Dr. Neşe AKÇAY'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatımı şekillendiren bölümümüzün değerli öğretim üyelerine ve ayrıca bölüm asistanlarına, APIWEB uygulaması konusundaki yardımları için İ.Ü. Su Bilimleri Fakültesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Çiğdem ÜRKÜ ATANASOV'a teşekkür ederim.

Bugünleri görmesini en çok istediğim insanlardan biri olan ancak bu süreçte kaybettiğimiz canım anneannem Edibe SAHİLLİ'ye bana verdiği tüm emekler için minnettarım.

Tüm zorlukların üzerinden beraber geldiğimiz için, kilometrelerce öteden bana her zaman destek oldukları için, uzakta olsalar dahi sevgilerini her daim yanımda hissettiğim canım annem Esen KARTAL ve babam Niyazi KARTAL'a ve her zaman omuz omuza olduğum kardeşlerim Eren KARTAL ve Muti KARTAL'a teşekkür ederim. Ve son olarak, her koşulda yanımda olan, sadece bu süreçte değil her zaman benim en büyük destekçim olan, sevgi ve ilgisini esirgemeyen, yol arkadaşım, çok sevgili eşim Murat SURAL'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Ocak 2025

Burcu KARTAL SURAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. MİKROBİYAL ENZİMLER	4
2.2. MAYA BİYOTEKNOLOJİSİ	8
2.2.1. Mayalardan Elde Edilen Enzimler	10
2.3. MAYA İZOLASYONU VE TANIMLANMASI	12
2.3.1. Süt ve Süt Ürünlerinden Maya İzolasyonu	15
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	17
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ	17
3.2. MAYALARIN İZOLASYONU.....	18
3.2.1. Propiyonik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi	18
3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Ekimi	19
3.3. GENEL TARAMA	20
3.3.1. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Analizi	20
3.3.2. İzolatların Farklı Karbon Kaynaklardaki Üreme Profillerinin İncelenmesi	20
3.3.3. Proteaz, Amilaz ve Lipaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	21
3.4. SEÇİLEN MAYA İZOLATLARININ API-ZYM TESTİ İLE TARANMASI.....	21
3.5. BELİRLİ ENZİMLERİN SEÇİLEN MAYA İZOLATLARINDAKİ ÜRETİM KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI.....	22
3.5.1. β -galaktosidaz Aktivitesi	22
3.5.2. β -glukozidaz Aktivitesi	23
3.5.3. Lösin Arilamidaz Aktivitesi	25

3.5.4.	Asit Fosfataz Aktivitesi	26
3.5.5.	Proteaz Aktivitesi	26
3.6.	TÜR TAYİNİ VE KARAKTERİZASYON	27
3.6.1.	API-20C Uygulaması	27
3.6.2.	Moleküler Tür Tanısı.....	28
3.6.2.1.	<i>Genomik DNA İzolasyonu</i>	28
3.6.2.2.	<i>gDNA'nın Elektroforetik ve Spektrofotometrik Analizi</i>	29
3.6.2.3.	<i>DNA Barkod Dizilerinin Belirlenmesi</i>	29
3.6.2.4.	<i>GenBank Erişim Numaralarının Alınması</i>	32
3.6.3.	Elektroforetik Karyotipleme.....	32
3.6.4.	Mitokondriyal DNA Ekstraksiyonu ve Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi.....	33
3.6.5.	Morfolojik Karakterizasyon	35
3.6.6.	Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Asimilasyonunun Değerlendirilmesi	35
3.6.7.	Antagonistik Etkileşimlerin Belirlenmesi	35
3.7.	ENZİM KARAKTERİZASYONU	36
3.7.1.	Proteaz Enziminin Karakterizasyonu	36
3.7.1.1.	<i>İzolatların Kültürlenmesi</i>	36
3.7.1.2.	<i>Üst Sıvıların Kısmi Saflaştırılması</i>	36
3.7.1.3.	<i>Süt Pıhtılaştırma Etkinliğinin İncelenmesi</i>	37
3.7.1.4.	<i>Elektroforetik Analiz</i>	37
3.7.2.	β -glukozidaz Enziminin Karakterizasyonu	39
3.7.2.1.	<i>Florojenik Substrata Karşı Aktivite</i>	39
3.7.2.2.	<i>Kısmi Saflaştırma</i>	40
3.7.2.3.	<i>Elektroforetik Analiz</i>	40
3.7.2.4.	<i>Üreme pH'ı ve Sıcaklığının Üretilen Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi</i>	41
3.7.2.5.	<i>Reaksiyon pH'ı ve Sıcaklığının Ham Özütlerdeki Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi</i>	41
3.8.	İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	42
4.	BULGULAR	43
4.1.	PROPİYONİK ASİT KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	43
4.2.	MAYALARIN İZOLASYONU.....	44
4.3.	GENEL TARAMA SONUÇLARI	45
4.4.	SEÇİLEN MAYA İZOLATLARININ ENZİM PROFİLLERİ.....	47

4.5. BELİRLİ ENZİMLERİN SEÇİLEN MAYA İZOLATLARINDAKİ ÜRETİM KAPASİTELERİ.....	48
4.5.1. β -galaktosidaz Aktivitesi	49
4.5.2. β -glukozidaz Aktivitesi	50
4.5.3. Lösin Arilamidaz Aktivitesi	52
4.5.4. Asit Fosfataz Aktivitesi	54
4.5.5. Proteaz Aktivitesi	56
4.6. TÜR TAYİNİ VE KARAKTERİZASYON	57
4.6.1. gDNA Analizleri	57
4.6.2. Barkod Dizilerin Çoğaltılması.....	58
4.6.3. Tür Tanı Sonuçları.....	60
4.6.4. Elektroforetik Karyotipleme.....	62
4.6.5. Mitokondriyal RFLP	63
4.6.6. Morfolojik Karakterizasyon	64
4.6.7. Maya İzolatlarının Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarını Asimilasyon Profilleri.....	67
4.6.8. Antagonistik Etkileşimlerin Analizi	69
4.7. ENZİM KARAKTERİZASYONU	70
4.7.1. Proteaz Enziminin Karakterizasyonu	70
4.7.1.1. Sıvı Kültürlerde İncelenen Proteolitik Aktivite Sonuçları	70
4.7.1.2. Süt Pıhtılaştırma Etkinliği	71
4.7.1.3. Elektroforetik Analiz.....	72
4.7.2. β -glukozidaz Enziminin Karakterizasyonu	73
4.7.2.1. 4-MUG Substratı ile Aktivite Analizi.....	73
4.7.2.2. Elektroforetik Analiz.....	76
4.7.2.3. Üreme pH'ı ve Sıcaklığının Üretilen Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisi	77
4.7.2.4. Reaksiyon pH'ı ve Sıcaklığının Ham Özütlelerdeki Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	81
KAYNAKLAR.....	91
EKLER.....	104
EK 1. Maya izolatlarının galaktoz, gliserol, laktoz, maltoz ve sükroz içeren besiyerlerindeki üreme profilleri.	104
ÖZGEÇMİŞ.....	108

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Enzim yapısı, aktivasyonu ve enzim ile substrat etkileşiminin şematik gösterimi (El-Gendi ve diğ., 2021).....	5
Şekil 2.2: Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel süreçlerdeki uygulama alanları (Singh ve diğ., 2016b).....	6
Şekil 2.3: Maya biyoteknolojisinin çeşitli uygulama alanları (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011).....	9
Şekil 2.4: Doğal kaynaklarda mayaların izolasyonu, karakterizasyonu ve tanımlanmasının şematik gösterimi. Mukherjee ve diğ. (2017)’den alınarak düzenlenmiştir.	13
Şekil 2.5: Nüklear ribozomal DNA’nın yapısı (Deak, 2007).	15
Şekil 4.1: Propiyonik asit konsantrasyonunun belirlenmesi. A) <i>F. graminearum</i> kültürlerinin propiyonik asit içeren (%0.05, %0.075, %0.1) ve içermeyen (K) besiyerlerindeki canlılık profilleri. B) <i>S. boulardii</i> hücrelerinin propiyonik asit içeren (%0.05, %0.075, %0.1) ve içermeyen (K) besiyerlerindeki canlılık profilleri.	43
Şekil 4.2: A) YGC besiyerinde inkübasyon sonrası oluşan koloniler. B) Seçilen kolonilerin YPD besiyerinde kültürlenmesi.	45
Şekil 4.3: İzolatların mikroskopik analizlerinde tespit edilen farklı morfolojik yapılar ile ilgili örnek fotoğraflar. A) Oval hücreler. B) Uzun ve filamentöz hücreler. C) Bir arada durarak tomurcuklanan hücrelerin oluşturduğu ‘‘Snowflakes’’ yapısı. Hücre fotoğrafları 40x objektif kullanılarak OLYMPUS BX53 mikroskopunda çekildi.	46
Şekil 4.4: İzolatların (A) YPD, (B) PDA ve (C) MEA besiyerlerine ekimlerini gösteren örnek fotoğraflar.	46
Şekil 4.5: Proteaz aktivitesi gösteren ÇM4, ÇM7, ÇM15, ÇM16, ÇM18, ÇM24 kodlu izolatların kazein-agar besiyerinde 10 günlük inkübasyonu sonucu oluşturduğu zonlar.	47
Şekil 4.6: β -galaktosidaz aktivitesinin spektrofotometrik analizi. Karbon kaynağı olarak laktoz içeren YPL ve YNB-L besiyerleri kullanıldı. Enzim aktivitesi SDS/kloroform ve homojenizasyon olmak üzere iki farklı yöntem ile analiz edildi. MU: Miller ünitesi. (Sidak’s test, *: $P<0.05$).....	49
Şekil 4.7: Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için sığır serum albümine göre hazırlanan standart grafiği.	50

Şekil 4.8: β -glukozidaz enzim aktivitesi. A) Enzim aktivitesi (U/L), B) Spesifik aktivite (U/mg). Bir ünite enzim (U) bir dakikada 1 μ mol pNP açığa çıkaran enzim miktarı olarak hesaplandı. (Sidak's test, *: $P<0.05$, **: $P<0,01$, ***: $P<0,001$, ****: $P<0,0001$).	51
Şekil 4.9: Lösin arilamidaz enzim aktivitesi. A) Enzim aktivitesi (U/L), B) Spesifik aktivite (U/mg). Bir ünite enzim (U) bir dakikada 1 μ mol p-NA açığa çıkaran enzim miktarı olarak hesaplandı. (Tukey's test, *: $P<0.05$, **: $P<0,01$, ***: $P<0,001$, ****: $P<0,0001$).	53
Şekil 4.10: Asit fosfataz enzim aktivitesi. A) Enzim aktivitesi (U/L), B) Spesifik aktivite (U/mg). Bir ünite enzim (U) bir dakikada 1 μ mol p-NP açığa çıkaran enzim miktarı olarak hesaplandı. (Tukey's test, *: $P<0.05$, **: $P<0,01$).	55
Şekil 4.11: Tirozin aminoasidine göre hazırlanan standart grafiği.	56
Şekil 4.12: Proteaz aktivitesi. (Tukey's test, **: $P<0,01$).	57
Şekil 4.13: Genomik DNA'ların elektroforetik analizi. DNA marker: "Lambda DNA/HindIII Marker".	58
Şekil 4.14: PZR ile çoğaltılan ITS1-5SrDNA-ITS2 bölgelerinin elektroforetik analizi. DNA marker: "GeneRuler 1 kb DNA Ladder".	59
Şekil 4.15: PZR ile çoğaltılan D1/D2 alanlarının elektroforetik analizi. DNA Marker: "GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder".	59
Şekil 4.16: PZR ile çoğaltılan <i>tef1</i> (A) ve <i>act1</i> (B) gen bölgelerinin elektroforetik analizi. DNA Marker: "GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder".	60
Şekil 4.17: İ20, İ40 ve Arm5 suşlarının elektroforetik karyotipleri. <i>S. cerevisiae</i> (SC) kromozomlarının numaralandırılması sağ tarafta gösterilmiştir: I: 230.218 bç, VI: 270.161 bç, III: 316.620 bç, IX: 439.888 bç, VIII: 562.643 bç, V: 576.874 bç, XI: 666.816 bç, X: 745.751 bç, XIV: 784.333 bç, II: 813.184 bç, XVI: 948.066 bç, XIII: 924.431 bç, XV: 1.091.291 bç, XII: 1.078.177 bç, VII: 1.090.940 bç, IV: 1.531.933 bç.	62
Şekil 4.18: MboI restriksiyon endonükleazı ile kesilen mitokondriyal DNA'ların RFLP motifleri. A) ÇM9/ÇP13 (<i>W. pararugosa</i>), B) İ20/İ40 (<i>K. marxianus</i>).	63
Şekil 4.19: Sıvı YPD üretilen 12 maya suşunun mikroskopik morfolojisi. Hücreler 40x objektif altında gözlendi.	64
Şekil 4.20: İnce bir YEA filminde üreyen hücrelerin morfolojik incelemesi.	66
Şekil 4.21: Antagonistik etkileşimlerin belirlenmesi. İndikatör organizmalar; A) <i>K. marxianus</i> İ20, B) <i>K. marxianus</i> İ40, C) <i>H. uvarum</i> Arm5. EP23: <i>P. membranifaciensis</i>	69

Şekil 4.22: Üst sıvılar ile analiz. A) Üst sıvıların 600 nm dalga boyunda ölçülen yüzde optik dansite değerleri. B) Üst sıvılarda belirlenen tirozin miktarları. (Tukey's test, **: P<0,01, ***: P<0,001, ****: P<0,0001).....	70
Şekil 4.23: Agar zonların ve kimozen enziminin süt pıhtılaştırma etkinliği. 37 °C 1 gece inkübasyon sonrası gözlenen aktivite ve pH ölçüm sonuçları. (+) kontrol: Ticari peynir mayası. (-) kontrol: Boş kazein-agar besiyeri.	71
Şekil 4.24: Kısmi saflaştırılmış üst sıvıların ve kimozen enziminin süt pıhtılaştırma etkinliği. 37 °C ve 60 °C 1 gece inkübasyon sonrası elde edilen sonuçlar.	72
Şekil 4.25: Proteinlerin elektroforetik analizi. M: Marker protein karışımı; 1: ÇM4-40 µg; 2: ÇM4-50 µg; 3: ÇM4-60 µg; 4: ÇM7-40 µg; 5: ÇM7-50 µg; 6: ÇM7-60 µg; 7: (-) kontrol-40 µg.....	73
Şekil 4.26: 4-MUG substratı içeren (%0, %0,002, %0,004, %0,006) besiyerlerinde β-glukozidaz enzim aktivitesinin incelenmesi. A) Petrilerin normal ışık altındaki görüntüleri. B) Petrilerin 24 saat inkübasyonu sonucunda UV ışık altındaki görüntüleri. C) Petrilerin 48 saat inkübasyonu sonucunda UV ışık altındaki görüntüleri.	74
Şekil 4.27: 4-MUG içeren sıvı besiyerlerinde β-glukozidaz enzim aktivitesinin incelenmesi. YNB ve YNBGlC besiyerlerinde 24 saat boyunca substrat içermeyen (kontrol) ve içeren ortamlarda üretilen İ40 ve Arm5 kültürlerinin üst sıvılarının UV ışık altındaki görüntüleri. UV ışık altında gözlenen ışımların 360 nm eksitasyon-440 nm emisyon dalga boylarındaki absorbans değerleri. (Sidak's test, *: P<0.05, ***: P<0,001, ****: P<0,0001).....	75
Şekil 4.28: 4-MUG substratı ile ham ekstrelerdeki enzim aktivitesinin incelenmesi. A) YPD besiyeri, B) YNBGlC besiyeri. *48 saatlik kültürlerden elde edilen örnekler.....	76
Şekil 4.29: Kısmi saflaştırılmış ham ekstrelerinin elektroforetik analizi. M: Protein marker, 1: Arm5-kontrol (aseton çöktürmesi) 2: Arm5-4MUG (aseton çöktürmesi) 3: Arm5-kontrol (metanol/kloroform çöktürmesi) 4: Arm5-4MUG (metanol/kloroform çöktürmesi) 5: İ40-kontrol (metanol/kloroform) 6: İ40-4MUG (metanol/kloroform çöktürmesi).	77
Şekil 4.30: Farklı pH (A) ve sıcaklık (B) değerlerinde İ40 ve Arm5 hücrelerinin üreme profilleri.....	78
Şekil 4.31: Farklı sıcaklıklarda üretilen İ40 ve Arm5 hücrelerinde β-glukozidaz enzim aktivitesinin karşılaştırılması. (Tukey's test, **: P<0,01).	79
Şekil 4.32: Reaksiyon pH'ı (A) ve sıcaklığının (B) ham özütlerdeki enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	80

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Mayalardan elde edilen endüstriyel enzimler ve kullanım alanları (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011).	11
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan besiyerlerinin adı ve içerikleri.	17
Tablo 3.2: Ringer çözeltisi içeriği.	19
Tablo 3.3: β -galaktosidaz aktivitesinde kullanılan Z tamponu (pH:7) içeriği.	23
Tablo 3.4: Protein izolasyonunda kullanılan parçalama tamponu içeriği.	24
Tablo 3.5: Agar zondan protein izolasyonu için kullanılan tamponun içeriği.	26
Tablo 3.6: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponların içerikleri.	28
Tablo 3.7: Barkod dizilerin çoğaltılması için yapılan PZR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri.	30
Tablo 3.8: ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.	30
Tablo 3.9: ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesinin PZR ile sentez aşamasında kullanılan koşullar.	30
Tablo 3.10: D1/D2 bölgesi ile <i>tef1</i> ve <i>act</i> gen dizilerinin PZR ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.	31
Tablo 3.11: D1/D2 bölgesi ile <i>tef1</i> ve <i>act</i> gen dizilerinin sentez aşamasında kullanılan PZR koşulları.	31
Tablo 3.12: Elektroforetik karyotipleme işleminde kullanılan tamponlar.	33
Tablo 3.13: mtDNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.	34
Tablo 3.14: mtDNA restriksiyon fragmentlerinin analizi için uygulanan kesim reaksiyonu.	34
Tablo 3.15: SDS-PAGE yönteminde jellerin hazırlanmasında ve örneklerin yürütülmesinde kullanılan solüsyonlar.	38
Tablo 3.16: SDS-PAGE yönteminde kullanılan ayırma ve yükleme jellerinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları.	38
Tablo 3.17: Coomassie boyama yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	39

Tablo 3.18: Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	41
Tablo 4.1: Mayaların izolasyonunda kullanılan kaynaklar ile ekimleri sonucu elde edilen ve seçilen koloni sayıları.	44
Tablo 4.2: Seçilen maya izolatlarının API-ZYM test sonuçları.	48
Tablo 4.3: Spektrofotometrik olarak analiz edilen enzimlerin ve üretildikleri maya izolatlarının isimleri.....	49
Tablo 4.4: Genomik DNA'ların spektrofotometrik analizi.	58
Tablo 4.5: Seçilen maya izolatlarının ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ile D1/D2 bölgeleri dizi homolojileri ve API-20C testine göre tanımlanan türleri, benzerlik oranları ve GenBank erişim numaraları.....	61
Tablo 4.6: Seçilen maya suşlarının farklı karbon kaynaklarını asimilasyonunun değerlendirilmesi. (+): üreme var, (-): üreme yok, (z): zayıf üreme.	67
Tablo 4.7: Seçilen maya suşlarının farklı azot kaynaklarını asimilasyonunun değerlendirilmesi. (+): üreme var, (-): üreme yok, (z): zayıf üreme.	68
Tablo 4.8: Kısmi saflaştırılmış üst sıvı örneklerinin proteolitik aktivitesi.	71

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

α	: Alfa
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
%	: Yüzde
μ	: Mikro
m	: Mili
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
v/v	: Hacim/hacim
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

Act	: Aktin
$\beta\text{-gal}$	: Beta-galaktosidaz
$\beta\text{-glu}$	: Beta-glukozidaz
bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumin (“bovine serum albumin”)
CFU	: Colony forming unit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
gDNA	: Genomik DNA

ITS	: Internal transcribed spacer
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
L-Leu-p-NA	: L-Leucine-p-nitroanilide
MEA	: Malt extract agar
MMA	: Minimal agar
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
4-MUG	: 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside
NCBI	: “National Center for Biotechnology Information”
OD	: Optik dansite
o-NPG	: o-nitrophenyl- β -D-galactoside
PDA	: Potato dekstroz agar
p-NA	: p-nitroaniline
p-NP	: p-nitrofenol
p-NPG	: 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside
p-NPP	: p-Nitrophenyl-phosphate
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rDNA	: ribozomal DNA
RNA	: Ribonükleikasit
rRNA	: ribozomal RNA
SDS	: Sodyumdodesilsülfat
TAE	: Tris Asetat EDTA
TBE	: Tris Borat EDTA
TCA	: Trikloroasetikasit
TE	: Tris EDTA
Tef1	: Translation elongation factor 1
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
YEL	: Yeast extract liquid
YGC	: Yeast etract glukoz kloroamfenikol
YNB	: Yeast Nitrogen Base
YNBGlc	: Yeast Nitrogen Base Glucosidase
YPD	: Yeast extract pepton dekstroz

ÖZET

DOKTORA TEZİ

GIDA BİYOTEKNOLOJİSİ İÇİN MİKROBİYAL ENZİMLERİN ANALİZİ ve ÜRETİCİLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Burcu KARTAL SURAL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Günümüzde mayalar tarafından üretilen enzimler başta gıda sektörü olmak üzere temel ve endüstriyel uygulama alanlarına sahiptir. Bununla birlikte, doğal kaynaklardan yeni mikroorganizmaların izolasyonu ve bunların biyoteknolojik uygulama potansiyellerinin aydınlatılması, mikrobiyal biyoteknolojinin temel kavramlarından biridir. Maya biyoteknolojisi çalışmaları ile geleneksel olmayan mayaların farklı biyoteknolojik özelliklere sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durum, potansiyel endüstriyel öneme sahip mevcut ve yeni türler de dahil olmak üzere çeşitli geleneksel olmayan mayaların metabolik özelliklerine ilişkin ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları yapma fırsatını sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında biyoteknolojik potansiyeli olan enzimleri üretebilen yeni maya suşlarının süt ve süt ürünlerinden izolasyonu, tanımlanması ve enzimatik karakterizasyonlarının yapılması amaçlandı. Çalışmada inek ve manda çiğ süt örnekleri ile yöresel peynir örneklerinden toplam 137 maya izole edildi. Yapılan taramalar sonucunda, biyoteknolojik açıdan önemli olan β -galaktosidaz, β -glukozidaz, lösin arilamidaz, asit fosfataz ve proteaz enzimlerini üretebilen mayalarda enzim aktivite analizleri yapıldı. β -galaktosidaz aktivitesi İ20 ve İ40 izolatlarında iki farklı koşulda (laktoz içeren zengin besiyeri YPL ve laktoz içeren sentetik besiyeri YNB-L) çalışıldı. Buna göre, en yüksek enzim aktivitesi YNB-L besiyerinde üretilen İ20 izolatında 24.75 MU olarak belirlendi. β -glukozidaz aktivitesi İ40 ve Arm5 izolatlarında iki farklı besiyeri koşulunda (zengin besiyeri YPD ve sentetik besiyeri YNBGlC) analiz edildi. Her iki izolatta YNBGlC koşulunda birbirine yakın spesifik aktivite belirlenirken, en yüksek spesifik aktivite

(207 U/mg) YPD besiyerinde üretilen Arm5 izolatında ölçüldü. Lösın arilamidaz aktivitesi zengin besiyerinde üretilen Arm4, ÇM9, ÇP13, EP23, Arm5, İ40 ve İ20 izolatlarında incelendi. Burada, Arm4, ÇP13, Arm5 ve İ20 izolatlarında spesifik aktivitenin 1400 U/mg üzerinde olduğu tespit edildi. Asit fosfataz enzim aktivitesi zengin besiyerinde üretilen ÇM9, ÇP13, EP23, İ40 ve İ20 izolatlarında çalışıldı. Bunlar arasından, ÇM9 ve İ20 izolatlarında spesifik aktivite sırası ile 3731 U/mg ve 4810 U/mg olarak hesaplandı. Proteaz aktivitesinin ÇM4 ve ÇM7 izolatlarında sırası ile 14.25 ve 18.80 U/mL olduğu belirlendi.

Bu enzimler arasından β -glukozidaz ve proteaz enzimlerinin ayrıntılı aktivite analizleri gerçekleştirildi. İ40 izolatının ürettiği β -glukozidaz enziminin karakterizasyon çalışmaları kapsamında, ilk olarak farklı kültür sıcaklıklarının üretilen enzimin aktivitesine etkisi incelendi. Buna göre, İ40'ın en iyi üreme sıcaklığı 42 °C iken en yüksek enzim aktivitesinin ölçüldüğü kültür sıcaklığının 28 °C olduğu tespit edildi. İkinci olarak, ham ekstraktlarda enzimin optimum reaksiyon koşulları araştırıldı. β -glukozidaz enziminin optimum reaksiyon pH'ının 5 olduğu gözlemlendi. Optimum sıcaklığın ise pH 5 iken 40 °C, pH 6 iken 50 °C olduğu belirlendi. Proteaz enzimin karakterizasyonu çalışmalarında, katı ve sıvı ortamlarda üretilen ÇM4 ve ÇM7 izolatlarından elde edilen ham özütlerin çok güçlü süt pıhtılaşma aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Süt tozu içeriğindeki kazein proteinini parçaladığı SDS-PAGE yöntemi ile gösterildi. Enzimin kısmi saflaştırılması yapıldıktan sonra, 37 °C ve 60 °C'de reaksiyon sıcaklıklarında proteolitik aktivitenin her iki izolatta da 60 °C daha yüksek olduğu (ÇM4: 42,1 U/mL, ÇM7: 40,2 U/mL) belirlendi.

Enzim aktivite analizlerinde kullanılan maya izolatlarının moleküler karakterizasyonları sonucunda tür düzeyinde tanımlamaları yapıldı. Tanımlanan izolatlar şu şekildedir: *Cutaneotrichosporon curvatum* (Arm4), *Hanseniaspora uvarum* (Arm5), *Pichia membranifaciens* (EP23), *Kluyveromyces marxianus* (İ20, İ40), *Wickerhamiella pararugosa* (ÇM9, ÇP13), *Trichosporon inkin* (ÇM4, ÇM7, ÇM15, ÇM16, ÇM24). Aynı türe ait izolatlardan İ20 ve İ40 ile ÇM9 ve ÇP13 izolatlarının mitokondriyal RFLP sonuçlarında farklı paternler gözlemlendi. Farklı karakterizasyon bulguları ile bu izolatların tür içi varyantlar olabileceği sonucuna varıldı.

Bu tez çalışması kapsamında süt ve süt ürünlerinden izole edilen yeni maya suşlarının, farklı biyokimyasal özelliklere sahip yeni enzimlerin üretiminde önemli bir potansiyele sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, her biri çeşitli fenotipik ve metabolik farklılıkları sayesinde değişik uygulama alanlarında da kullanılabilir. Bu sonuçlar, doğal kaynaklardan elde edilen mayalar ve bunların özellikleri hakkındaki temel bilgimizi genişleterek, maya biyoteknolojisi çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Ocak 2025, 128 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyal enzimler, maya izolasyonu, mikrobiyal biyoteknoloji, tür tanımlanması.

SUMMARY

Ph.D. THESIS

ANALYSIS of MICROBIAL ENZYMES for FOOD BIOTECHNOLOGY and MOLECULAR CHARACTERIZATION of THEIR PRODUCERS

Burcu KARTAL SURAL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Nowadays, enzymes produced by yeasts have industrial applications, especially in the food industry. Furthermore, isolation of new microorganisms from natural sources and elucidation of their biotechnological application potential is one of the basic concepts of microbial biotechnology. Non-conventional yeasts have different biotechnological properties. So, it is important to conduct detailed characterization studies on the metabolic properties of various non-conventional yeasts, including existing and new strains.

The aim of this thesis was to isolate, identify and enzymatically characterize novel yeast strains capable of producing enzymes with biotechnological potential from milk and dairy products. A total of 137 yeasts were isolated from cow and water buffalo raw milk samples and local cheese samples. As a result of the screening, enzyme activity analyzes were performed in yeasts producing β -galactosidase, β -glucosidase, leucine arylamidase, acid phosphatase and protease enzymes. β -galactosidase activity was studied in isolates I20 and I40 under two different conditions (lactose-containing rich medium YPL and lactose-containing synthetic medium YNB-L). Accordingly, the highest enzyme activity was determined as 24.75 MU in I20 isolate cultured in YNB-L medium. β -glucosidase activity was analyzed in I40 and Arm5 isolates in two different medium conditions (rich medium YPD and synthetic medium YNBGlC). While

both isolates showed similar specific activity in YNBGlc condition, the highest specific activity (207 U/mg) was measured in Arm5 isolate cultured in YPD medium. Leucine arylamidase activity was examined in Arm4, CM9, CP13, EP23, Arm5, I40 and I20 isolates grown on rich medium. It was found that the specific activity was above 1400 U/mg in Arm4, EP13, Arm5 and I20 isolates. Acid phosphatase enzyme activity was studied in isolates of CM9, CP13, EP23, I40 and I20 grown on rich medium. Among these, the specific activity was calculated as 3731 U/mg and 4810 U/mg in isolates CM9 and I20, respectively. Protease activity was 14.25 and 18.80 U/mL in isolates ÇM4 and ÇM7, respectively.

Among these enzymes, detailed activity analysis of β -glucosidase and protease enzymes were performed. Within the scope of the characterization studies of the β -glucosidase enzyme produced by I40 isolate, the effect of different culture temperatures on the activity of the enzyme produced was examined. Accordingly, while the best growth temperature of I40 was 42 °C, the highest enzyme activity was measured at 28 °C culture temperature. The optimum reaction conditions of the enzyme in crude extracts were investigated. It was observed that the optimum reaction pH of β -glucosidase enzyme was 5. The optimum temperature was 40 °C at pH 5 and 50 °C at pH 6. In the characterization studies of the protease enzyme, it was determined that the crude extracts obtained from isolates ÇM4 and ÇM7 produced in solid and liquid media had very strong milk clotting activity. It was shown to degradation of casein protein in milk powder by SDS-PAGE method. After partial purification of the enzyme, the proteolytic activity was examined at reaction temperatures of 37 °C and 60 °C and the activity was higher in both isolates at 60 °C (ÇM4: 42.1 U/mL, ÇM7: 40.2 U/mL).

Yeast isolates used in enzyme activity assays were identified at species level as a result of molecular characterization. The identified isolates are as follows: *Cutaneotrichosporon curvatum* (Arm4), *Hanseniaspora uvarum* (Arm5), *Pichia membranifaciens* (EP23), *Kluyveromyces marxianus* (I20, I40), *Wickerhamiella pararugosa* (CM9, CP13), *Trichosporon inkin* (CM4, CM7, CM15, CM16, CM24). Different patterns were observed in the mitochondrial RFLP results of isolates I20 and I40 and isolates ÇM9 and ÇP13 belonging to the same species. It was concluded that these isolates may be intraspecies variants according to different characterization findings.

New yeast strains isolated from milk and dairy products within the scope of this study have significant potential in the production of new enzymes with different biochemical properties. Moreover, each of them can be used in different application areas due to their phenotypic and metabolic differences. These results will contribute to yeast biotechnology studies by expanding our basic knowledge about yeasts isolated from natural sources and their properties.

January 2025, 128 pages.

Keywords: Microbial enzymes, yeast isolation, molecular biotechnology, identification.

1. GİRİŞ

Mikrobiyal enzimler bakteri, maya ve mantarlardan elde edilen biyolojik katalizörlerdir. Bu biyokatalizörler gıda, tarım, ilaç, enerji, kağıt ve tekstil gibi çeşitli sektörlerdeki endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Chapman ve diğ., 2018; Raveendran ve diğ., 2018). Enzim aracılı süreçler verimli, spesifik, ekonomik açıdan değerli, güvenilir, istikrarlı, uygun maliyetli, değiştirilmesi kolay ve çevre dostudur (Gurung ve diğ., 2013; Choi ve diğ., 2015). Mikrobiyal enzimlerin kullanımını teşvik eden bu gibi avantajlarından dolayı bunların izolasyonu, karakterizasyonu, büyük ölçekli üretimi ve endüstride kullanımına yönelik çalışmalar günümüzde sürekli olarak artmaktadır (Nigam, 2013).

Mikroorganizmalar çok çeşitli enzimlere sahiptir ancak enzimlerin özellikleri mikroorganizmaların türüne ve hatta suşlarına göre farklılık göstermektedir (Singh ve diğ., 2016b; Mishra ve diğ., 2017). Enzimlerin stabilite, katalitik etkinlik ve özgüllük açısından istenmeyen özelliklerinin üstesinden gelmek için enzimlerin doğal kaynaklardan taranması, rastgele mutasyonlar, rekombinant enzim üretimi, enzim immobilizasyonu gibi çeşitli yaklaşımlar denenmektedir (Dinçer ve Telefoncu, 2007; Elleuche ve diğ., 2014). Ayrıca, mikrobiyal biyoteknolojiye yönelik mevcut yaklaşım, sentetik biyolojiyi kullanmak ve mikroorganizmaların fizyolojik sınırlarını kırmak için genetik mühendisliğinin kullanımına odaklanmaktadır. Öte yandan, doğal kaynaklardan mikroorganizmaların spesifik olarak araştırılması ve bu mikroorganizmaların seçilmesi, izole edilmesi ve biyoteknolojik potansiyelinin bilinmesinin hala mikrobiyal biyoteknolojinin temel kavramları olduğu vurgulanmıştır (Mishra ve diğ., 2017; Olicón-Hernández ve diğ., 2022).

Farklı kaynaklardan izole edilen enzimlerin çeşitli endüstriyel uygulamalara yönelik biyoteknolojik potansiyelinin araştırılması, özellikle gıda biyoteknolojisinde büyük önem kazanmıştır. Bu enzimler tat, aroma, renk, doku ve besin değeri gibi bileşenlerin iyileştirilmesinde etkili bir şekilde rol oynarlar. Örnek olarak, amilaz enzimleri ile glukoz oksidaz, fosfolipaz ve ksilanaz enzimleri gıda kalitesinin arttırılmasında; laktaz ve proteazlar bazı gıdalara karşı toleransın arttırılmasında; kimozin ve pektinaz üretimde, asparajinaz ürün güvenliğinin arttırılmasında kullanılmaktadır (Raveendran ve diğ., 2018).

Mayalar, çoğunlukla tomurcuklanarak vejetatif olarak üreyen tek hücreli ökaryotik organizmalardır. *Saccharomyces cerevisiae* başta olmak üzere, mayalar endüstriyel fermentasyonda eski çağlardan beri kullanılmaktadır (Giaever ve diğ., 2002; Mustacchi ve diğ., 2006; Suter ve diğ., 2006). Günümüzde 1500’den fazla maya türü tanımlanmış ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır. *S. cerevisiae* dışında kalan türler geleneksel olmayan mayalar (“non-conventional yeast”) olarak ifade edilmektedir. Geleneksel olmayan mayalar substrat kullanımı ve ürün oluşumu için alternatif metabolik yollar ve farklı düzenleyici modeller sağlayabilirler (Mattanovich ve diğ., 2014). Son yirmi yılda geliştirilen maya biyoteknolojisi, mevcut ve potansiyel endüstriyel öneme sahip türler de dahil olmak üzere çeşitli geleneksel olmayan mayaların metabolik özelliklerine ilişkin ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları yapma fırsatını sunmaktadır.

Maya biyoteknolojisinin en geniş alanlarından biri gıda uygulamalarıdır (Querol ve Fleet, 2006; Verstrepen ve diğ., 2006). Farklı uygulamalarda maya hücreleri tarafından üretilen enzimler ve biyoaktif metabolitler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bazı mayalar fermentasyon süreçlerinde başlangıç kültürü (“starter”) olarak ve probiyotik özellikleri nedeni ile de tercih edilmektedir (Arevalo-Villena ve diğ., 2017; Rai ve diğ., 2019). Mayalardan elde edilen enzimler pek çok endüstriyel kullanım alanlarına sahiptir (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011). Farklı özelliklere sahip enzimlerin üretimini sağlayacak ve uygun çalışma koşulları altında kullanılacak yeni üreticilerinin araştırılmasına devam edilmektedir (López ve diğ., 2015; Schlender ve diğ., 2016; Su ve diğ., 2021).

Çeşitli kaynaklardan yeni maya türleri izole edilmektedir. Süt besleyici bir gıdadır ve yüksek besin içeriği birçok mikroorganizmanın büyümesi için ideal bir ortam sağlar. Çiğ süt esas olarak bakteri türleri açısından zengin olsa da içerisinde çok çeşitli maya türleri de bulunmaktadır. Çiğ sütteki mayalar, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı birden fazla işlevi yerine getirerek süt fermantasyonlarında önemli bir rol oynamaktadır (Quigley ve diğ., 2013). Bununla birlikte, farklı şekilde üretilmiş peynir ürünleri de maya izolasyonu için kaynak olarak kullanılmaktadır (Bintsis, 2021).

Bu tez çalışmasında süt ve süt ürünlerinden yeni maya suşlarının izolasyonu, tanımlanması ve biyoteknolojik açıdan önemli enzimleri üretme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlandı. Farklı çiğ süt ve peynir örnekleri kaynak olarak kullanılarak uygun koşullar altında maya izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen maya izolatları enzim üretme özellikleri açısından araştırıldı.

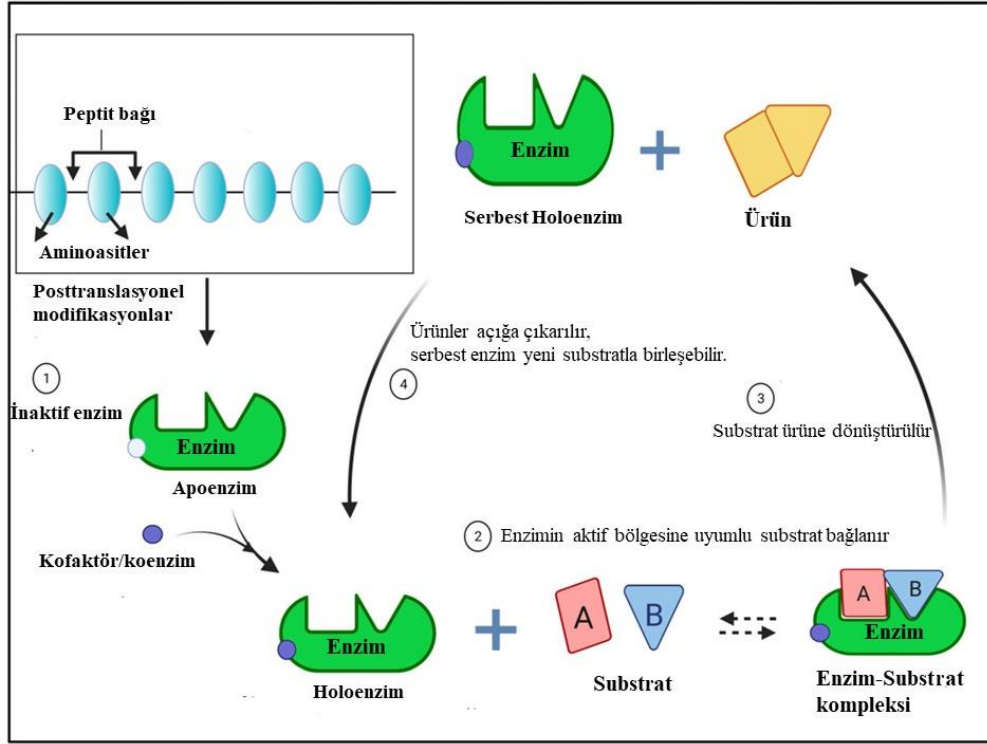
Biyoteknolojik öneme sahip β -galaktosidaz, β -glukozidaz, lösin arilamidaz, asit fosfataz ve proteaz enzimlerini üreten mayalarda çeşitli ortamlarda enzim aktiviteleri araştırıldı. Bu enzimlerin kaynak organizmaları moleküler düzeyde tanımlandı ve karakterize edildi. Sonuç olarak bu çalışma, Türkiye'den toplanan çiğ inek ve manda sütü ile yöresel peynir örneklerinden yeni maya izolatlarının saflaştırılmasına olanak sağladı. Seçilen maya suşlarının enzimatik karakterizasyonu, bu türlerin biyoteknolojik potansiyele sahip enzimlerin üretimi için yeni maya izolatları olabileceğini gösterdi. Tanımlanan maya izolatları, enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi ve geliştirilmesi için ileri araştırmalarda kullanıma sunuldu.



2. GENEL KISIMLAR

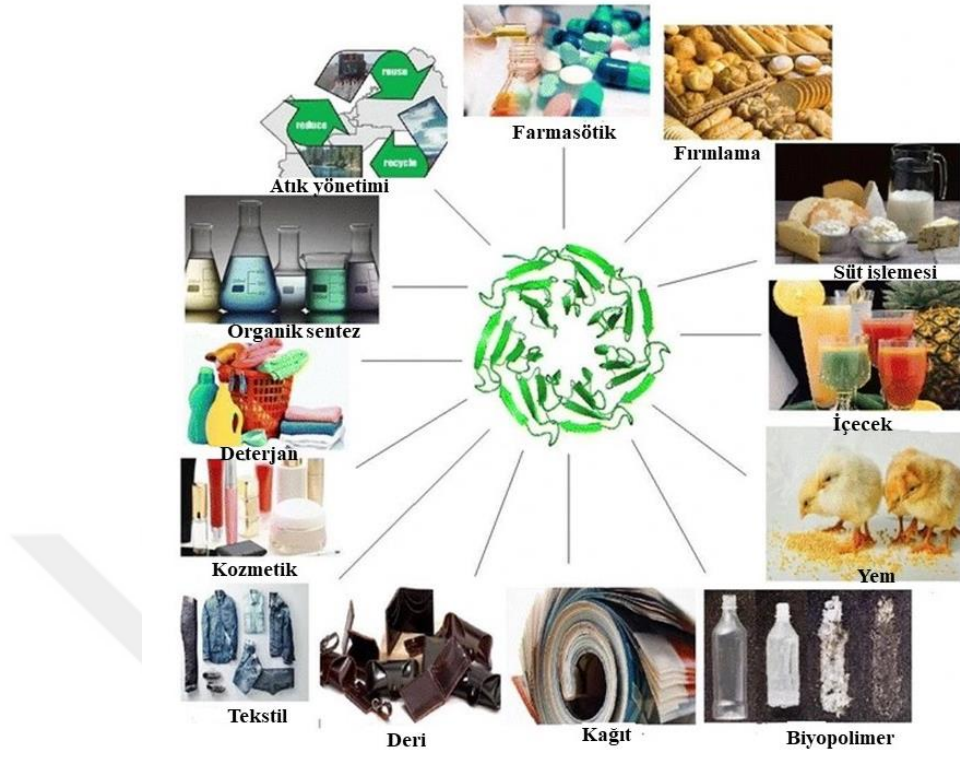
2.1. MİKROBİYAL ENZİMLER

Enzim kelimesi ilk defa 1877 yılında Wilhelm Kühne tarafından mayanın şekerden alkol üretme yeteneğini tanımlarken kullanılmış olup, Yunanca içinde anlamına gelen “en” ve maya anlamına gelen “zume” sözcüklerinden türetilmiştir (Robinson, 2015). Enzimler, kalıcı bir değişime uğramadan yalnızca aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal reaksiyonların hızını spesifik olarak arttıran biyolojik katalizörlerdir (Piccolino, 2000). Genellikle, peptit bağları ile bağlanan amino asit polimerlerinden oluşan ve boyutları kilodaltondan megadaltona kadar değişen protein makromolekülleridir. Enzimlerdeki amino asitlerin sıra, sayı ve dizi çeşitliliği enzim aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Enzim molekülündeki katalitik reaksiyona katılan ve az sayıda amino asidi içeren kısmı aktif (katalitik) bölge olarak adlandırılır. Çoğu enzim inaktif olarak sentezlenir ve farklı koenzimler/veya kofaktörlerin bağlanmasıyla holoenzime (aktif form) dönüşür. Genel olarak enzimler çok spesifik katalizörlerdir; ancak bazı enzimler geniş substrat spesifikliğine sahiptir ve birden fazla substrat ile çalışabilirler. Substrat özgüllüğünü makromolekül yapısındaki katalitik bölgeleri belirler (Şekil 2.1). Enzim ve substrat arasındaki spesifik etkileşimi açıklamak için ilk olarak kabul edilen teori Emil Fischer tarafından önerilen anahtar/kilit modelidir. Buna göre, enzimin aktif bölgesi, substratının şekline tam olarak uyan özel bir yapıya sahiptir. Ancak, daha sonraları enzimlerin yapısı hakkındaki bilgiler arttıkça, bu teori, katalitik reaksiyona uyması için enzim konfigürasyonunda meydana gelebilen değişiklikleri açıklayamamıştır. Enzimlerin esnek yapısını ve bağlanma sırasında geçirdiği yapısal değişiklikleri açıklayan “indüklenmiş uyum modeli” (“Induced-Fit Model”) Daniel Koshland tarafından sunulmuştur. Bu modelde, aktif bölge esnektir ve substrat ile en doğru uyumu elde etmek için yönelimini değiştirebilir (Lemieux ve Spohr, 1994; Koshland, 1994; Gurung ve diğ., 2013; El-Gendi ve diğ., 2021). Enzim-substrat özgüllüğü, Enzim Komisyonu (EC) tarafından yapılan enzimlerin sınıflandırmalarının ve adlandırmalarının temelini sağlar. Buna göre enzimler katalizledikleri reaksiyonların türüne göre; oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar ve translokazlar olmak üzere 7 ana başlıkta sınıflandırılmaktadır (McDonald ve Tipton, 2023).



Şekil 2.1: Enzim yapısı, aktivasyonu ve enzim ile substrat etkileşiminin şematik gösterimi (El-Gendi ve diğ., 2021).

Bakteri, maya ve mantarlar, bu sınıflandırmaya dahil olan, fiziksel ve kimyasal koşullar altında iyi çalışan, yüksek performanslı çeşitli enzimler üretmektedirler (Singh ve diğ., 2016b). Bunlar genel olarak mikrobiyal enzimler olarak isimlendirilir. Mikrobiyal enzimler fermantasyonda eski çağlardan beri yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Günümüzde gıda, ilaç, atık yönetimi, kağıt, tekstil, biyoyakıt gibi çok farklı sektörlerde kullanılan bu enzimler (Şekil 2.2) küresel bir pazar payına sahiptir (Singh ve diğ., 2016b; Chapman ve diğ., 2018; Raveendran ve diğ., 2018). Küresel enzim pazarının 2020-2026 dönemi için %6.3'lük bileşik yıllık büyüme oranıyla 6,4 milyar dolardan 8,7 milyar dolara kadar çıkması öngörülmektedir (Research B, 2021). Türkiye’de ise her geçen gün artan gıda üretimine paralel olarak enzim tüketimi de artmaktadır buna karşın enzim üretimi bu talebi karşılayacak kapasitede değildir. Ülkemizde bu kapsamda yapılan çalışmalar neticesinde, 6 Mayıs 2020 tarihinde 31119 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan karar ile ilk kez modern biyoteknolojik yöntemlerle ticari olarak yerli enzim (rekombinant *Aspergillus oryzae*’den α -amilaz, glukoamilaz ve hemiselülaz) üretimine onay verilmiştir (Sutay Kocabaş, 2021).



Şekil 2.2: Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel süreçlerdeki uygulama alanları (Singh ve diğ., 2016b).

Enzim aracılı süreçlerin kimyasal maddelerin kullanımına göre daha çevre dostu, güvenilir ve verimli olması enzimlerin endüstriyel uygulamalarda daha fazla tercih edilmelerine neden olmaktadır (Aldridge, 2013; Choi ve diğ., 2015). Bunun yanı sıra, bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere kıyasla ekonomik, teknik ve sürdürülebilir avantajlarından dolayı mikrobiyal enzimlerin uygulama alanları gün geçtikçe artış göstermiştir. Mikrobiyal enzimler daha stabil olduğu, modifikasyon ve optimizasyonları daha kolay olduğu, üretimleri daha ucuz olduğu ve ürün verimi daha yüksek olduğu için endüstriyel kullanımları daha avantajlıdır (Li ve diğ., 2012; Gurung ve diğ., 2013). Ek olarak, daha az enerji kullanımı, kimyasalların ve toksik yan ürünlerin azaltılması ve sera emisyonlarında ve atık bertarafında önemli bir azalma bu avantajlar arasında yer alır (Arbige ve diğ., 2019). Mikrobiyal enzimlerin kullanımını teşvik eden bu tür avantajlara dayanarak, farklı mikroorganizmalardan izolasyonları, karakterizasyonları, büyük ölçekte üretim ile endüstriyel uygulamalarda kullanımları üzerine yapılan çalışmalar sürekli artmaktadır (Nigam, 2013). Ancak üretilen enzim miktarı ve aktivitesi mikroorganizmanın türüne ve dahası suşuna göre farklılık göstermektedir. Bu

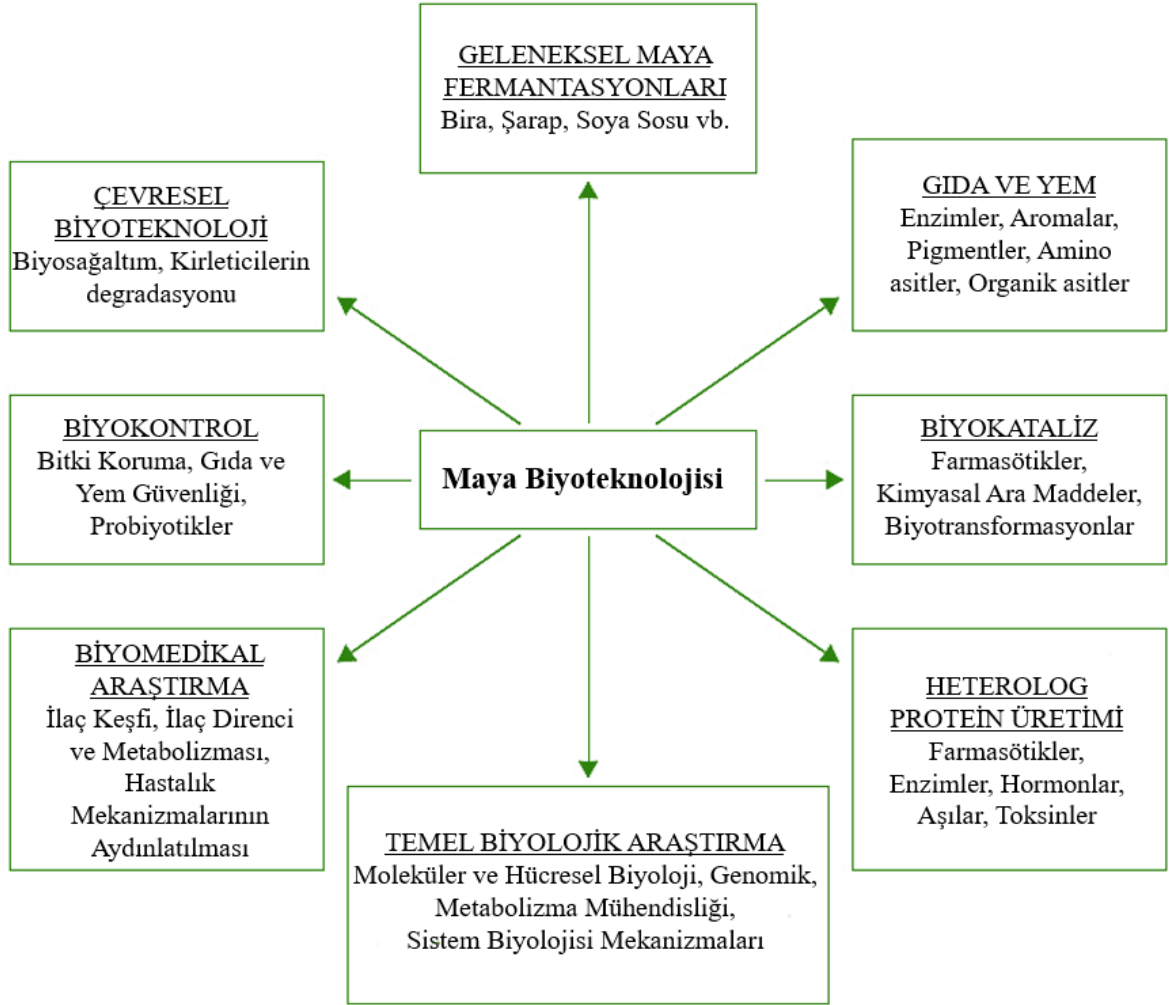
nedenle, endüstride kullanılacak enzimlerin üretiminde en önemli aşama, istenilen enzimleri en yüksek verimlilikle üretebilen mikroorganizmaların seçilmesidir (Mishra ve diğ., 2017). Bununla birlikte, enzimlerin kararlılık, verimlilik ve spesifiklik açısından istenmeyen özelliklerinin üstesinden gelmek için, doğal kaynaklardan yeni enzimlerin taranması, rekombinant enzim üretimi, enzim immobilizasyonu, rastgele mutasyonlar dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar denenmektedir (Dinçer ve Telefoncu, 2007; Elleuche ve diğ., 2014; Trono, 2019). Rekombinant DNA teknolojisi ile protein mühendisliği ve mikroorganizmaların üretim süreçleri için tasarlanması mikrobiyal biyoteknolojinin içinde hızla gelişen bir alandır. Bu alan yeni enzimler keşfetmeyi, mevcut enzimleri tasarım yoluyla iyileştirmeyi ve mikrobiyal/moleküler taramayı hedeflemektedir. Ancak bu tür yeni teknolojilerin ticari kabulden önce çeşitli kriterleri de karşılaması gerekmektedir (Arbige ve diğ., 2019). Öte yandan, doğal kaynaklardan yeni tür ve/veya suşların izole edilmesi, seçilmesi ve biyoteknolojik potansiyellerinin araştırılması mikrobiyal biyoteknolojinin temel alanları arasında yer almaktadır (Mishra ve diğ., 2017; Olicón-Hernández ve diğ., 2022).

Mikrobiyal enzimlerin yaygın olarak kullanıldığı alanlardan biri gıda endüstrisidir. Gıda endüstrisindeki süt işleme, fırınlama, içecek, yem, şekerleme gibi çok çeşitli sektörlerde farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerden yararlanılmaktadır. Gıda üretiminde ve tat, aroma, renk, doku ve besin değeri gibi bileşenlerin iyileştirilmesinde etkili bir şekilde rol oynarlar. Örnek olarak, amilaz enzimleri ile glukoz oksidaz, fosfolipaz ve ksilanaz enzimleri gıda kalitesinin arttırılmasında; laktaz ve proteazlar bazı gıdalara karşı toleransın arttırılmasında; kimozen ve pektinaz üretimde, asparajinaz ürün güvenliğinin arttırılmasında kullanılmaktadır (Raveendran ve diğ., 2018). Peynir mayası olarak bilinen rennet içerisindeki kimozen enzimi sütte bulunan kazeinin pıhtılaştırılmasını sağlar. Günümüzde, küresel peynir ihtiyacının yaklaşık %33'ü mikrobiyal rennet ile karşılanmaktadır. Sütün ana bileşeni olan laktoz, β -galaktosidaz (laktaz) enzimi tarafından hidrolize edilir ve laktoz intoleransı olan bireylerin tüketimine uygun süt ürünleri üretilir. Bu tür enzimlerin kullanımı süt teknolojisine büyük bir potansiyel kazandırmıştır (Carminati ve diğ., 2010; Ahlawat ve diğ., 2018).

2.2. MAYA BİYOTEKNOLOJİSİ

Mayalar, çoğunlukla tomurcuklanarak vejetatif olarak üreyen tek hücreli ökaryotik organizmalardır. Mantarlar grubuna giren bu canlılar, “Ascomycetes” veya “Basidiomycetes” olarak sınıflandırılmaktadırlar. Kurtzman ve diğ. (2011) yaklaşık 1500 maya türü listelenmiştir ve bunlar mantar türlerinin yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır.

Maya biyoteknolojisi temel bilim, gıda, tıp ve tarım disiplinlerinde geniş kapsamlı temel ve endüstriyel uygulama alanlarına sahiptir (Şekil 2.3) (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011). Antik çağlardan beri, geleneksel maya fermentasyonları ile üretilen gıdalar ve içecekler, insan toplumlarının dünya çapındaki sürdürülebilirliğine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (Legras ve diğ., 2007). Arkeologlar, dünyanın farklı bölgelerinde mayalar tarafından üretilen çeşitli fermente yiyecek ve içeceklerin tüketildiğine dair kanıtlar bulmuştur (McGovern ve diğ., 1997; Cavalieri ve diğ., 2003; McGovern ve diğ., 2004). Mayaların fermentasyondaki rolleri Pasteur tarafından fark edilmiş ve *Saccharomyces cerevisiae* ve diğer mayaların ilk saf bira ve şarap kültürleri 19. yüzyılın sonunda sırasıyla Hansen ve Müller-Thurgau tarafından elde edilmiştir (Barnett, 2000; Dequin, 2001; Marsit ve Dequin, 2015). Emil Fischer ve Eduard Büchner ve onların çağdaşları maya metabolizmasının temelini çözmeye başlamışlar; bu, maya biyokimyası ve metabolizması hakkında ayrıntılı çalışmalarla birlikte biyokimya ve hücre biyolojisinde temel keşiflere yol açmış (Barnett ve Lichtenthaler, 2001). Daha sonraları dönemin önde gelen bilim insanları, maya biyoteknolojisinin modern çağını başlatan maya ekolojisi, çeşitliliği, fizyolojisi ve biyoteknolojik uygulama alanlarını geliştirmişler (Bennett ve Phaff, 1993; Robertson, 2003).



Şekil 2.3: Maya biyoteknolojisinin çeşitli uygulama alanları (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011).

Geleneksel olarak maya, alkollü fermantasyon ve pişirme için kullanılan *S. cerevisiae* ve onun yakın akrabalarını ifade etmektedir. *S. cerevisiae* hem endüstriyel olarak hem de insanlar da dahil olmak üzere ökaryotlardaki temel biyolojik süreçlerin araştırılmasında iyi bir model organizma olarak öne çıkmaktadır (Giaever ve diğ., 2002; Mustacchi ve diğ., 2006; Suter ve diğ., 2006). Genetik manipülasyonunun kolay olması, tanımlanmış suş koleksiyonlarının bulunması ve genomu dizilenmiş ilk ökaryotik organizma olması bu duruma katkı sağlamaktadır (Dolinski ve Botstein, 2005; Fisk ve diğ., 2006). Bununla birlikte, günümüzde 1500'den fazla maya türü tanımlanmış ve bu sayı yapılan çalışmaların sonucuna göre hala değişkenlik gösterebilmektedir Mikrobiyolog ve biyoteknologlar, *S. cerevisiae* dışında kalan mayaları geleneksel olmayan maya olarak tanımlamaktadır. Bu mayalar substrat kullanımı ve ürün oluşumu için alternatif metabolik yollar ve farklı düzenleyici modeller sağlayabilirler

(Mattanovich ve diğ., 2014). Son 20 yılda geliştirilen maya biyoteknolojisi, mevcut ve potansiyel endüstriyel öneme sahip türler de dahil olmak üzere çeşitli geleneksel olmayan mayaların metabolik özelliklerine ilişkin ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları yapma fırsatını sunmaktadır. Endüstriyel olarak ilgili fenotipler açısından iyi çalışılmış geleneksel olmayan mayalar; *Pichia kudriavzevii*, *Yarrowia lipolytica*, *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Ogataea (Hansenula) polymorpha* şeklinde sıralanabilir, ancak bunlarla sınırlı değildir (Radecka ve diğ., 2015; Rebello ve diğ., 2018; Chu ve diğ., 2023). Bazı geleneksel olmayan mayalar, çok çeşitli ortam koşullarında büyüyebilir, glukozun dışında, yenilenebilir hammaddelerde bulunan farklı karbon kaynakları kullanabilir ve biyoproses kaynaklı streslere karşı oldukça toleranslıdırlar (Deparis ve diğ., 2017; Mukherjee ve diğ., 2017; Ravn ve diğ., 2021). Metabolitlerin birikmesi ve rekombinant proteinlerin sentezi ve salgılanması açısından üstünlükleri vardır (Corchero ve diğ., 2013). *K. marxianus*, *Y. lipolytica* ve *Hansiaspora* spp. gıda ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalar ile temel bilim çalışmaları için ilgi odağı haline gelmiştir (Karim ve diğ., 2020; Park ve Ledesma-Amaro, 2023; van Wyk ve diğ., 2024). Bununla birlikte, bu mikroorganizmaların henüz keşfedilmemiş potansiyel uygulamalarının ve biyoteknolojik avantajlarının açığa çıkarılması için ele alınması gereken çok sayıda konu vardır (Geijer ve diğ., 2022).

2.2.1. Mayalardan Elde Edilen Enzimler

Hem maya hücreleri hem de mayalardan izole edilmiş enzimler endüstride biyokatalizörler olarak kullanılmaktadır. Hücrenin doğrudan kullanımı saflaştırma prosedürlerini gerektirmediği için daha kararlı ve ucuz kaynak olarak tercih edilse de tek aşamalı biyotransformasyon durumunda izole edilmiş enzimler daha iyi bir seçenektir. İzole enzimler sulu veya organik ortamda serbest veya immobilize halde kullanılmaktadır (Żymańczyk-Duda ve diğ., 2017). Mayalardan elde edilen endüstriyel enzimler ile üretildikleri maya türleri ve kullanım alanları Tablo 2.1’de gösterilmektedir. Ayrıca, endüstriyel kimozin *K. lactis*’ten glikolat oksidaz ve fitaz enzimleri *K. pastoris* maya suşunda rekombinant olarak üretilmektedir (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011).

Tablo 2.1: Mayalardan elde edilen endüstriyel enzimler ve kullanım alanları (Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011).

Enzim	Maya	Kullanım alanı
Kimozin	<i>Kluyveromyces spp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gıda işleme
α -Galaktosidaz	<i>Saccharomyces spp</i>	Yem
L-Glutaminaz	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Farmasötik
Inulinaz	<i>Candida spp.</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Gıda uygulamaları
Invertaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gıda uygulamaları
Laktaz	<i>Kluyveromyces spp.</i> <i>Candida pseudotropicalis</i>	Gıda işleme
Lipaz	<i>Candida rugosa</i> <i>Pseudozyma antarctica A, B</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Trichosporon fermentum</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Deterjan, Farmasötik, Atık yöntemi, Gıda işleme
L-Fenilalanin amonyak liyaz	<i>Rhodotorula spp.</i> <i>Rhodospiridium spp.</i>	Farmasötik
Fenilalanin dehidrogenaz	<i>Candida boidinii</i>	Farmasötik
Fitaz	<i>Ogataea polymorpha</i>	Yem

Maya biyoteknolojisinin en geniş alanlarından biri olan gıda uygulamalarında mayaların kullanımları ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artış göstermektedir. Yiyecek ve içecek endüstrileri için yeni maya suşlarının geliştirilmesi ve bunların doğal ve rekombinant ürünleri gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Querol ve Fleet, 2006; Verstrepen ve diğ., 2006). Mayaların başlangıç kültürü olarak kullanılması, probiyotik mayaların keşfi ve maya hücreleri tarafından üretilen enzimlerin kullanılması bu artışta rol oynayan konular olarak vurgulanmaktadır (Arevalo-Villena ve diğ., 2017). Mayalardan elde edilen enzimler gıda endüstrisine kullanımına en iyi örnek *S. cerevisiae*'den izole edilen invertaz enziminin sukrozu parçalamak için şekerleme endüstrisinde kullanılmasıdır (Bhalla ve diğ., 2017). Günümüzde önemli ticari enzimlerden biri, *Kluyveromyces spp.* elde edilen mikrobiyal β -galaktosidaz enzimi birincil olarak laktozun hidrolizinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, prebiyotiklerin üretilmesinde, kristalizasyonun önlenmesinde ve gastrointestinal mikrobiyotanın korunmasında uygulanabilmektedir (Singh ve Sambyal, 2023). Mayaların kullanıldığı biyoproseslerde enzimlerinin aktivitesi sonucunda biyolojik olarak aktif peptitler (proteaz), serbest polifenoller (β -glukozidaz) ve biyoaktif oligosakkaritler (β -galaktosidaz, ksilanaz, fruktozil transferaz) gibi metabolitleri üretme potansiyelleri bulunmaktadır (Rai ve diğ., 2019).

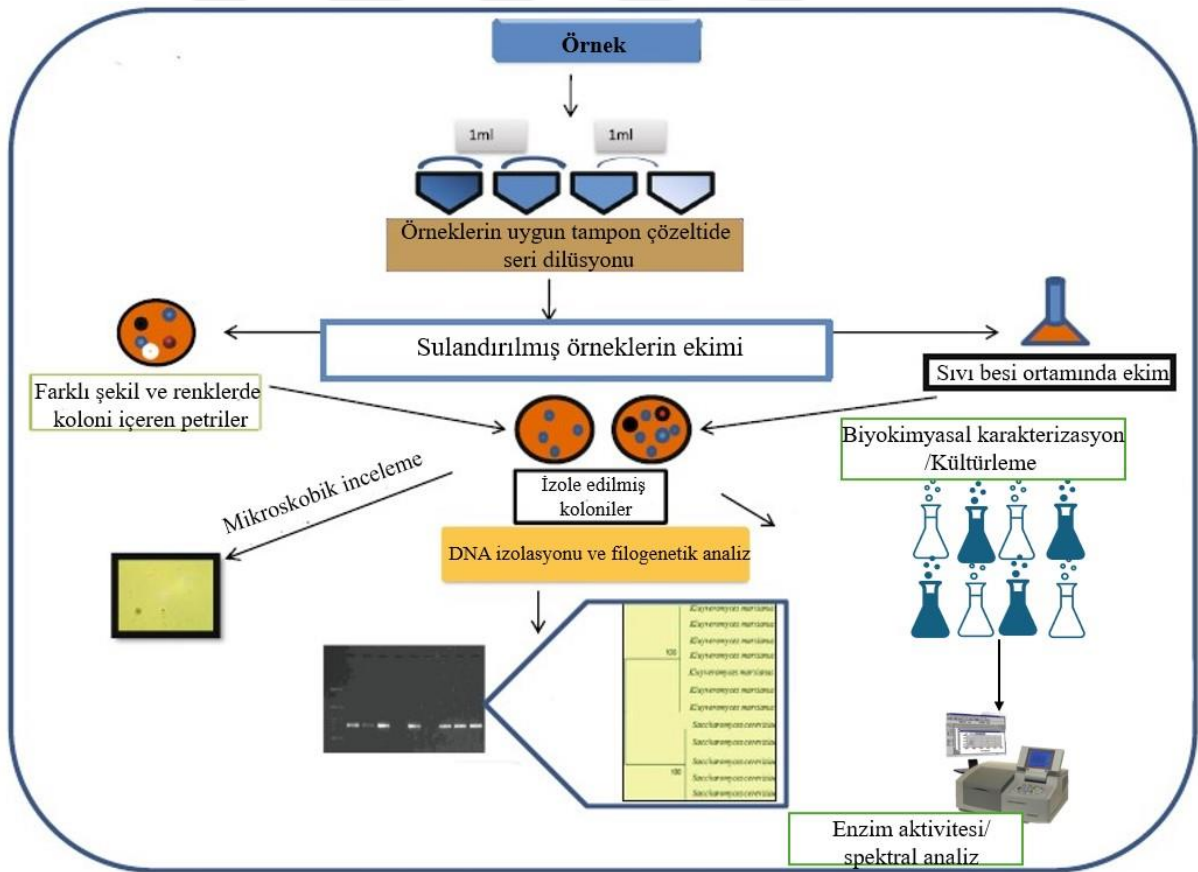
Mayalardan elde edilen enzimlerin çeşitli biyoteknolojik uygulamaları, belirli özelliklere sahip enzimlerin kullanılabilirliğini artıracak ve uygun çalışma koşulları altında kullanılabilecek yeni üreticilerinin araştırılmasına devam edilmesini gerektirmektedir. Su ve diğ., (2021) tarafından yürütülen çalışmada, *K. marxianus* suşunun soya küspesi ile fermantasyonunun β -glukozidaz üretimi için faydalı olabileceği gösterilmiştir. López ve diğ., (2015), farklı *Hanseniapora* spp. suşlarının şarap üretimi için potansiyel kullanım alanı olan enzimleri üretme yeteneklerini araştırarak proteaz, β -glukozidaz ve β -ksilosidaz enzim aktivitelerin belirlemişlerdir. Schlender ve diğ. (2016) tarafından yapılan araştırmalar ile *Wickerhamomyces anomalus* 227 ve *Metschnikovia pulcherrima* 446 maya türlerinden hücre dışı asit proteazlar saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

2.3. MAYA İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

Günümüzde endüstriyel biyoteknoloji daha sürdürülebilir biyolojik süreçlerle ürün elde etmeyi hedeflemektedir. Ancak bu tip uygulamaların başarısı büyük ölçüde uygun bir mikroorganizmanın kullanımına bağlıdır. Bunun için, mikroorganizmaların çeşitli kaynaklardan izolasyonu, doğal bileşiklerin biyoteknolojik üretiminde endüstriyel koşullara dayanıklılık gösteren ve yüksek verim sağlayan, biyokatalizör olarak kullanılabilecek daha uyumlu bir suş sağlayabilecek önemli bir yaklaşımdır (Pessôa ve diğ., 2019). Klasik mikrobiyal biyoteknoloji, doğal kaynaklardan farklı özelliklere sahip mikroorganizmaların izole edilmesine, taranmasına ve karakterize edilmesine dayanmaktadır. Genellikle, biyoteknolojik öneme sahip mikroorganizmaların izolasyonu için, mikroorganizmaların belirli substratlarla temas halinde olduğu ortamlar, yüksek sıcaklık veya farklı pH koşullarına ya da coğrafi koşullara sahip ortamlar tercih edilir (Mtibaà ve diğ., 2018; Olicón-Hernández ve diğ., 2022). Bununla birlikte, bir izolasyon kaynağı seçerken mikroorganizmaların büyümesi için gerekli minimum gereksinimleri sağlayan doğal koşulların dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır (Pessôa ve diğ., 2019).

Doğal kaynaklardan mayaların izolasyonu, karakterizasyonu ve tanımlanması basamakları Şekil 2.4'te şematize edilmiştir. Aseptik koşullar altında toplanan katı veya sıvı örnekler laboratuvarında uygun tampon çözeltiler içinde süspansiyon haline getirilir. Sulandırılmış örneklerden kolonilerin sayımı ve izolasyonu için uygun olan katı besi ortamlarına ekim yapılır. Elde edilen koloniler saflaştırılarak, biyoteknolojik aktiviteye göre belirlenen seçim kriterlerine göre seçme işlemi tamamlanır. Seçim kriteri, bir mikrobiyal toplulukta ilgilenilen özelliğe sahip

olan ve biyoteknolojik açıdan ilgi duyulan bir mikroorganizmanın seçilmesine temel oluşturan niceliksel ve/veya niteliksel özelliklerdir (Iris ve diğ., 2020). Birincil ve ikincil tarama şeklinde iki tür seçim şekli vardır. Birincil tarama, niteliksel ve genellikle dolaylı seçim kriterlerine dayalı olarak potansiyel olarak farklı olabilecek mikroorganizmaları izole etmek için tasarlanmıştır. Birincil tarama kriterlerinin bazı örnekleri; katı besiy ortamlarında hidrolize veya inhibisyona bağlı oluşan zonlar, pH değişiklikleri, katı ortamda büyüme ve makroskobik veya mikroskobik morfolojidir. Buna karşılık, ikincil tarama, istenilen özellik(ler)i daha hassas ve spesifik araştırmak için niteliksel ve niceliksel kriterlere dayanmaktadır. Burada ilgilenilen aktiviteyi (örneğin enzimatik aktiviteler) belirlemek için niceliksel teknikler kullanılır. Bununla birlikte, ikincil tarama, izolasyonun başarısını birincil taramaya dayandırdığından, birincil seçim kriterlerinin, yanlış pozitifleri önlemek için spesifik ve hassas olması gerektiği belirtilmiştir (Olicón-Hernández ve diğ., 2022).

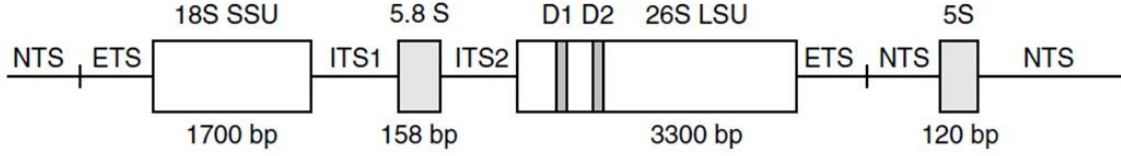


Şekil 2.4: Doğal kaynaklarda mayaların izolasyonu, karakterizasyonu ve tanımlanmasının şematik gösterimi. Mukherjee ve diğ. (2017)'den alınarak düzenlenmiştir.

İzole edilen mayaların tür tanımlamalarının yapılması gerekmektedir. Mayalar ilk olarak geleneksel metot olarak kabul edilen asimilasyon ve fermentasyon testleri ile fenotipik olarak sınıflandırılmışlardır. Daha sonra, mayaların tanımlamaları için basitleştirilmiş geleneksel teknikler, ticari olarak temin edilebilen kitler, otomatik bilgisayar sistemleri gibi daha pratik yöntemler geliştirilmiştir (Pincus ve diğ., 2007). Ancak, mayaların taksonomik olarak sınıflandırılması için biyokimyasal yöntemlerin yararlı olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, mayalar arasındaki filogenetik ilişkilerin aydınlatılması moleküler tekniklerin kullanılmaya başlanmasıyla mümkün olmuştur. DNA analizine dayalı yöntemler, farklı türlerin tanınmasının yanı sıra tür içindeki alt ilişkilerin de tanımlanması ile mayaların sınıflandırılmasında bir reform yaratmıştır (Kurtzman, 2006).

Yüksek düzeyde korunmuş bölgeleri içeren ribozomal RNA'yı (rRNA) kodlayan DNA (rDNA) dizileri türlerin tanımlanması için kullanılmaktadır. Ribozomlar tüm organizmalarda mevcuttur ve hem küçük hem de büyük alt birimleri (SSU ve LSU) birden fazla kopya halinde rDNA tarafından kodlanır. Woese (1987), prokaryotlar arasındaki filogenetik ilişkileri değerlendirmek için 16S rDNA dizilerinin etkili bir şekilde kullanıldığını göstermiştir. Daha sonraları, ökaryotik ribozomların küçük ve büyük alt birimlerindeki belirli bölgeleri kodlayan rDNA'ları incelemek için de yöntemler geliştirilmiştir (Blanz ve Gottschalk, 1984; Walker, 1985, Kurtzman ve Blanz, 1998). Mayalarda SSU'daki rDNA'nın boyutu 18S iken, LSU, 5S, 5.8S ve 26S rDNA moleküllerini içerir. Bu bölgeler iç "Internal transcribed spacer" (ITS) ve dış "External transcribed spacers" (ETS) ayırıcı dizileri ile birbirinden ayrılır. Her tekrar arasında, kopyalanmayan bir ayırıcı "non-transcribed spacer" (NTS) bölge vardır ve 5S rDNA genellikle bu bölgede yer alır ve gen kümesinin geri kalanından ayrı olarak kopyalanır (Şekil 2.5) (Deak, 2007). Filogenetik çalışmalarda bu genlerin belli nükleotid dizileri evrensel primerler ile çoğaltılarak aralarındaki benzerlikler ve farklılıklar karşılaştırılır. Benzerliğin ortak atayı yansıttığı varsayılırken dizi farklılığının derecesi evrimsel uzaklığı işaret eder (White ve diğ., 1990). Hızlı ve otomatik polimeraz zincir reaksiyonu bazlı dizileme yöntemleri kullanıma sunulduktan, birçok maya türünde 18S rDNA'nın kısmi ve tam dizileri, 26S rDNA'nın D1/D2 değişken alanları ve ITS1–5.8S–ITS2 bölgeleri belirlenmiştir. SSU rDNA'nın korunmuş dizileri daha geniş filogenetik analizlere olanak sunarken, D1/D2 alanları ile ITS dizileri daha değişkendir ve tür düzeyinde çözümleme sağlamaktadır, böylece türlerin tanımlanmasında evrensel olarak kullanılmaktadırlar (Wilmotte ve diğ., 1993; Kurtzman ve Robnett, 1998; Fell ve diğ., 2000). Bu dizilerin dışında, sitokrom oksidaz II (Belloch ve diğ., 2000), translasyonel

uzama faktörü 1α , RNAPolimeraz II (Kurtzman ve Robnett, 2003) ve aktin gibi çeşitli proteinleri kodlayan genlerin dizi bilgisi de mayaların tür tanımlaması için kullanılmaktadır (Daniel ve diğ., 2001; Daniel ve Meyer, 2003).



Şekil 2.5: Nüklear ribozomal DNA'nın yapısı (Deak, 2007).

2.3.1. Süt ve Süt Ürünlerinden Maya İzolasyonu

Mikroorganizmaların Dünya üzerinde %60'a yakın yer kapladığı bilinmekte olup, bu zengin çeşitliliğin gıda biyoteknolojisinde kullanılmak üzere geniş bir kaynak olduğu kabul edilmektedir (Ahlawat ve diğ., 2018). Çiğ ve fermente süt ürünleri mikroorganizmalar açısından çeşitliliğin yüksek olduğu kaynaklardır. Bu mikroorganizmalar çeşitli özellikleri ile süt ürünlerinin lezzetini ve dokusunu arttırmırlar. Bu kaynaklarda çok fazla sayıda bakteri türleri bulunmasına rağmen özellikle çiğ sütte oldukça yüksek sayıda maya türlerinin de bulunduğu bildirilmiştir. Mayalar bazı fermente ürünlerin hazırlanmasında ve bazı peynirlerin olgunlaştırılmasında önemli rol oynarlar (Quigley ve diğ., 2011; Ghosh ve diğ., 2019).

Süt çeşitli hayvansal kaynaklardan elde edilen besleyici bir besindir ve yüksek besin içeriği pek çok mikroorganizmanın büyümesi için ideal bir ortam oluşturur. Öte yandan, çevresel kontaminasyon sebebiyle de çiğ sütün mikrobiyotası çok çeşitlidir (Quigley ve diğ., 2013). İnek, koyun ve keçiden farklı zamanlarda toplanan çiğ süt örneklerinde bulunan mayalar; *Candida sake*, *Candida parapsilosis*, *Candida inconspicua*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus victoriae*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum catenulate*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon cutaneum* ve *Trichosporon lactis* olarak sıralanmıştır (Delavenne ve diğ., 2011). Çiğ sütte bulunan bu tür mayaların biyoteknoloji uygulamalarında kullanımları farklı yönleriyle değerlendirilmektedir. Örneğin; *K. marxianus* büyüme hızı, termotoleransı,

çok çeşitli şekerleri asimile etme yeteneği, litik enzimlerin salgılanması ve fermantasyon yoluyla etanol üretimi gibi özellikleri ile biyoteknolojik olarak öneme sahiptir (Lane ve diğ., 2011). Chen ve diğ., (2010) tarafından yürütülen çalışmada, safra tuzuna tolerans, düşük pH ve mide suyu altında hayatta kalma, kolesterol asimilasyonu gibi özelliklerine dayanarak dört farklı maya suşu “*P. fermentans* BY5, *P. kudriavzevii* BY10, *P. kudriavzevii* BY15 ve *Y. lipolytica* HY4”, insan bağırsağında kolesterolü asimile edecek potansiyel probiyotikler olarak belirlenmiştir.

Mayalar fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı süt fermantasyonlarında önemli bir rol oynayabilir. Bintsis, (2021) derleme çalışmasında farklı peynir çeşitlerinde hangi tür mayaların bulunduğunu ve bu mayaların peynir yapım sürecindeki rolünü açıklamaktadır. Çalışmalar çiğ sütte bulunan mayaların çiğ süttten peynire geçebileceğini ve peynirin olgunlaşmasını etkileyebileceğini göstermektedir (Lavoie ve diğ., 2012). Farklı peynir türlerinden maya türlerini izole etmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Banjara ve diğ., 2015, Ozturkoglu-Budak ve diğ., 2016; Fröhlich-Wyder ve diğ., 2019). Türkiye’de üretilen bazı geleneksel peynirlerin içerdiği mayalar tanımlanmış ve enzimatik karakterizasyonları yapılmıştır (Karasu-Yalcin ve diğ., 2012; Günay ve Genç, 2023). Geleneksel bir peynirden izole edilen mayalar probiyotik özellikler açısından incelendiğinde, *P. fermentans* ve *K. lactis* suşlarının daha yüksek antioksidan, oto-agregasyon ve hidrofobiklik kapasitesi sergilediği ve gastrointestinal streslere daha iyi uyum sağladığı gözlenmiştir (Merchán ve diğ., 2020). Farklı bölgelere ait peynirlerden izole edilen mayalardan *D. hansenii*’nin laktoz ve galaktoz kullanma yeteneği, *Y. lipolytica* suşunun yüksek lipolitik aktivite ve *G. candidum* suşunun yüksek proteolitik veya lipolitik aktivite yetenekleri olduğu gösterilmiştir (Van den Tempel ve Jakobsen, 2000; Sacristán ve diğ., 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

Mayaların izolasyonu, karakterizasyonu, kültürlenmesi ve farklı enzimatik aktivitelerin belirlenmesi için kullanılan besiyeri içerikleri Tablo 3.1’de verildi. Besiyeri bileşenleri amaca uygun olarak dH₂O içinde çözüldü ve 121 °C’da 1.2 atmosfer basınç altında 15 dakika otoklav ile steril edildi. Maya suşlarının kaynağı olan süt ve peynir örneklerinin ekiminde kullanılan katı YGC besiyerine sterilizasyon sonrası son konsantrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde kloramfenikol antibiyotiği eklendi (Türkel ve Ener, 2009). Kloramfenikol stok çözeltisi 10 mg/mL olacak şekilde saf etanol içerisinde hazırlandıktan sonra 0.22 µm çapında filtreden geçirilerek steril edildi.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan besiyerlerinin adı ve içerikleri.

Besiyeri adı	Bileşen	Miktar
“Yeast Extract Glucose Chloramphenicol” (YGC)	Maya özütü	5 g/L
	Glukoz	20 g/L
	Kloramfenikol	0,1 g/L
	Agar	15 g/L
“Yeast Extract Peptone Dextrose” (YPD)	Maya özütü	10 g/L
	Pepton	20 g/L
	Glukoz	20 g/L
	Agar	20 g/L
“Malt Extract Agar” (MEA)	Malt özütü	30 g/L
	Pepton	5 g/L
	Agar	15 g/L
“Potato Dextrose Agar” (PDA)	Patates dekstrozu	24 g/L
	Agar	15 g/L
Kazein-agar	Yağsız süt tozu	100 g/L
	Agar	20 g/L
Nişasta-agar	Et suyu özütü	3 g/L
	Nişasta	10 g/L
	Agar	12 g/L
Tribütirin-agar	Tribütirin agar	20 g/L
	Sıvı tribütirin	10 ml/L
Sentetik besiyeri (“Yeast Nitrogen Base”) (YNB)	YNB (Amonyum sülfat içeren, amino asit içermeyen) Glukoz	6.75 g/L 20 g/L

Tablo 3.1 (devam):

Glukozidaz için sentetik besiyeri ("Yeast Nitrogen Base Glucosidase") (YNBGlc)	YNB (Amonyum sülfat içeren, amino asit içermeyen) Glukoz Maya özütü Pepton	6.75 g/L 5 g/L 5 g/L 5 g/L
"Minimal medium" (MMA)	(NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O Glukoz Vitamin stok solüsyonu Agar	5 g/L 1 g/L 0.5 g/L 1 g/L 1 mL/L 20 g/L
"Yeast Extract Liquid" (YEL)	Maya özütü Glukoz Agar	5 g/L 30 g/L 20 g/L

3.2. MAYALARIN İZOLASYONU

3.2.1. Propiyonik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Besiyerinde küflerin üremesini engellemek için mayaların izolasyonunda kullanılan YGC besiyerine sterilizasyon sonrası propiyonik asit (Merck; S:23-36-45) eklendi. Kullanılacak propiyonik asit oranını belirlemek için propiyonik asitin YGC besiyerindeki küf engelleme özelliği ve etkin dozu test edildi. %0.05, %0.075 ve %0.1 (v/v) konsantrasyonlarında propiyonik asit (Higgins ve Brinkhaus, 1999) içeren katı YGC ve zengin besiyeri olarak katı YPD besiyerleri hazırlandı. Referans ırk olarak *Fusarium graminearum* küf mantarı propiyonik asit içeren ve içermeyen besiyerlerine ekildi ve büyüme kabinde 25 °C ve %50 nemde 3 gün yetiştirildi. Ticari bir maya olan *Saccharomyces boulardii* (ATCC® MYA-796™) de maya referans ırkı olarak kullanıldı. Hücrelerin propiyonik asit içeren ve içermeyen besiyerlerindeki canlılıkları spot ekim tekniği ile belirlendi. *S. boulardii* hücreleri bir gece sıvı YPD içerisinde çalkalayıcı etüvde 180 devir/dakika 28 °C'de çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler doğrudan ve 10¹,10²,10³ kat sulandırılmış şekilde propiyonik asit içeren ve içermeyen besiyerlerine ekildi. 2 gece 28 °C'de üremeye bırakıldı.

3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Ekimi

Mayaların izolasyonu için kaynak olarak 1 tane çiğ inek sütü, 2 tane çiğ manda sütü ve 2 farklı peynir örneği kullanıldı. İşlenmemiş taze süt ve peynir örnekleri Çatalca/İstanbul ve Arnavutköy/İstanbul bölgeleri ile Lüleburgaz/Kırklareli bölgesindeki süt ve süt ürünleri üreticilerinden temin edildi. Ayrıca Erzincan iline ait işlenmiş bir peynir türü de örnek olarak kullanıldı. Örnekler aseptik koşullar altında 50 mL'lik falkon tüplere alındıktan sonra soğuk şartlar sağlanarak laboratuvara getirildi. Süt ve peynir örneklerine temin edildikleri bölgelere göre kod numaraları verildi ve laboratuvar analizleri boyunca +4 °C'de bekletildi. Süt örneklerinin sulandırılmasında kullanılan Ringer çözeltisinin içeriği Tablo 3.2'de verildi. Bileşenler distile su ile çözülerek hazırlandı, otoklavda 121 °C'da 1.2 atmosfer basınç altında 15 dakika steril edildi. Süt örneklerinden doğrudan ve $10^1, 10^2, 10^3$ kat sulandırılmış olarak propiyonik asit içeren katı YGC besiyerlerine ekim yapıldı. Peynirlerin iç kısımlarından örnek alınıp tartıldı ve 1:9 oranında %2'lik sodyum sitrat (LaChema, 30095) çözeltisi içerisinde çözüldü (ISO, 2010). Çözünmenin tamamen sağlanması için, örnekler önceden az miktarda ısıtılmış sodyum sitrat çözeltisi içinde ezilerek vorteks ve sonikatör yardımı ile parçalandı. Peynir örneklerinin çözeltilerinden doğrudan ve Ringer çözeltisi içinde (10 ve 100 kat) sulandırılmış olarak propiyonik asit eklenmiş katı YGC besiyerlerine ekim yapıldı. Besiyerleri 28 °C'da 3 gün inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda petrilere oluşan maya kolonileri sayıldı. Maya konsantrasyonları 1 gram peynirden veya 1 mL taze süttten YGC agar petrilere üreyen maya kolonisi sayısı ("colony forming unit", cfu) şeklinde ifade edildi.

Tablo 3.2: Ringer çözeltisi içeriği.

Bileşen	Miktar
NaCl	2.25 g/L
KCl	0.105 g/L
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.12 g/L
NaHCO ₃	0.05 g/L

Toplanan süt ve peynir örneklerinin her birinin ekiminin sonucunda elde edilen maya kolonilerinin sayımı yapıldıktan sonra YGC besiyerinde iyi izole olmuş koloniler rastgele seçilerek katı YPD besiyerine küçük pasajlar şeklinde ekimleri yapıldı. Koloniler 28 °C etüvde 2 gün süre ile üremeye bırakıldı. Üretilen hücrelerin gliserol stokları alınarak -80 °C'de

saklandı. Çalışma boyunca hücreler +4 °C’de katı besiyerlerinde saklandı ve belirli aralıklarla alt kültürleme işlemi yapıldı

3.3. GENEL TARAMA

Elde edilen tüm maya izolatları, farklı karbon kaynaklarını kullanma özellikleri, farklı besiyerlerindeki koloni morfolojileri ve mikroskop altındaki morfolojileri ile proteaz, amilaz ve lipaz aktiviteleri bakımından ayrı ayrı analiz edildi.

3.3.1. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Analizi

YPD besiyerine alınıp kültürlemesi yapılan kolonilerin her birinin morfolojik yapısı mikroskop altında incelendi. Bu amaçla tüm izolatlar bir gece sıvı YPD içerisinde çalkalayıcı etüvde 180 devir/dakika 28 °C’de üremeye bırakıldı. Üreyen hücrelerden mikroskopik preparatlar hazırlandı. Hücreler 40x objektif kullanılarak OLYMPUS BX53 mikroskopunda gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

Her bir örnekten elde edilen izolatların katı YPD, MEA ve PDA besiyerlerindeki koloni yapılarının benzerlikleri ve farklılıkları incelendi. Her bir izolattan steril kürdan ile örnek alınarak katı YPD, MEA ve PDA besiyerlerine küçük pasaj şeklinde ekimler yapıldı. İzolatlar 2 gece 28 °C’de üremeye bırakıldı. Koloni morfolojilerinin farklılıkları veya benzerlikleri fotoğraflanarak kaydedildi.

3.3.2. İzolatların Farklı Karbon Kaynaklardaki Üreme Profillerinin İncelenmesi

Toplanan süt ve peynir örneklerinden elde edilen izolatların farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerindeki üreme profilleri incelendi. Bu amaçla %2 (w/v) galaktoz, maltoz, laktoz, süktroz ve gliserol içeren 5 farklı besiyeri hazırlandı. Besiyerleri hazırlanırken katı YPD besiyerinin içeriğindeki (Tablo 3.1) glukoz yerine belirtilen farklı karbon kaynakları kullanıldı. Her bir izolattan steril kürdan ile örnek alınarak farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerine küçük pasaj şeklinde ekimler yapıldı. İzolatlar 2 gece 28 °C’de üremeye bırakıldı. Üreme yetenekleri fotoğraflanarak kaydedildi.

3.3.3. Proteaz, Amilaz ve Lipaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Her bir örnekten elde edilen izolatların hidrolitik karakterli proteaz, amilaz ve lipaz enzimlerini üretim potansiyelleri sırası ile kazein-agar, nişasta-agar ve tribütirin-agar seçici besiyerleri kullanılarak belirlendi. Her bir izolattan steril kürdan ile örnek alınarak seçici besiyerlerine küçük pasaj şeklinde ekimler yapıldı ve 28 °C’de inkübasyona bırakıldı. Besiyerinde üreyen kolonilerin etrafında bir zon oluşup oluşmadığı değerlendirildi. Bu değerlendirme yapılırken, kolonideki hücrelerin salgıladığı enzimler ile besiyerindeki substratların hidrolizi sonucu oluşan berrak zon pozitif (+) sonuç olarak kaydedildi. Proteaz ve lipaz aktivitelerinin aksine, amilolitik aktivitede, inkübasyonun ardından nişasta-agar besiyerlerindeki nişastanın iyot ile reaksiyona girerek mavi renk oluşturması için lugol (%1 iyot, %2 potasyum iyodür) ayırıcı damlatılarak, kolonilerin etrafındaki zon görünür hale getirildi. Bu aşamada, bulanık beyaz renkte oluşan zon pozitif (+) sonuç olarak kaydedildi.

3.4. SEÇİLEN MAYA İZOLATLARININ API-ZYM TESTİ İLE TARANMASI

Genel tarama sonuçları dikkate alınarak, enzim üretimi ve türü açısından farklılık gösterebilecek maya izolatları seçildi. Seçilen izolatların ürettikleri enzimleri incelemek amacı ile üretici firma tarafında açıklandığı şekilde API® ZYM (Ref: 25200, Semi-quantitative enzyme activity tests, Biomerieux) testi uygulandı. Maya kolonileri API süspansiyon solüsyonu ile yoğunlukları “McFarland 5.0” olacak şekilde karıştırıldı. 65 µL örnek, kit içerisindeki şeritlere uygulandı. Reaksiyon işlemleri kit içerisindeki yönergeye bağlı kalınarak gerçekleştirildi. API-ZYM testi, kit içerisinde yer alan 19 farklı enzimin mikroorganizmalar tarafından üretilip üretilmediğini anlamak için kullanılan hızlı bir yöntemdir. Yöntemin temeli, kromojenik substratları içeren şeritlere eklenen hücre süspansiyonlarının reaktifler ile verdikleri tepkimeler sonucu renk değişiminin gözlenmesine dayanmaktadır. Sonuçlar üretici firmadan temin edilen renk çizelgesine göre sonuç tablosuna kaydedildi. Sonuç tablosunda her bir enzim için izolatlara 0-5 arası değerler verildi. 0 negatif sonucu 3,4 ve 5 değerleri pozitif sonucu ifade etmektedir. Pozitif sonuçlar arasında, 5 değeri enzim aktivitesinin en yüksek yoğunlukta olduğu anlamına gelmektedir.

3.5. BELİRLİ ENZİMLERİN SEÇİLEN MAYA İZOLATLARINDAKİ ÜRETİM KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

API-ZYM testi (Bölüm 3.4) ile aktiviteleri taranan 19 farklı enzim arasında, pozitif aktivitesi tespit edilen ve gıda biyoteknolojisinde de sıklıkla kullanılan 4 enzimin (β -galaktosidaz (β -gal), β -glukozidaz (β -glu), lösin arilamidaz, asit fosfataz) seçilen maya izolatlarındaki üretim kapasiteleri araştırıldı. Ek olarak, Bölüm 3.3.3'te anlatılan yöntemle proteaz aktivitesi tespit edilen maya izolatlarının da proteaz üretim potansiyeli incelendi.

3.5.1. β -galaktosidaz Aktivitesi

Hücreler sıvı YPD içerisinde çalkalayıcı etüvde 180 devir/dakika 28 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Kültürlerin 600 nm dalga boyundaki optik dansite (OD₆₀₀) değerleri ölçüldü ve hücreler 7000 rpm 10 dk santrifüj işlemi ile çöktürüldü. Ardından hücreler OD₆₀₀:0.2 olacak şekilde, karbon kaynağı olarak laktoz içeren YP ve YNB besiyerlerine (Tablo 3.1) transfer edildi ve çalkalayıcı etüvde 180 devir/dakika 28 °C'de 24 saat üremeye bırakıldı (Martins ve diğ., 2002). 24 saatlik inkübasyondan sonra, izolatların ürettiği β -galaktosidaz enzim aktivitesi 2 farklı yöntem ile belirlendi. Her iki yöntemin temeli, β -galaktosidaz enziminin o-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG) substratını indirgeyerek o-nitrophenol ürününü oluşturmaya dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda o-nitrophenol oluşumuna bağlı açığa çıkan sarı rengin absorbansı ölçülerek enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmektedir. SDS-kloroform yönteminde hücreler kimyasal uygulama ile geçirgen hale getirilirken, homojenizasyon yönteminde mekanik parçalama gerçekleştirilmektedir (Bansal ve diğ., 2008).

Hücreler 7000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve soğuk Z tamponu (Tablo 3.3) ile süspanse edildi. Süspansiyonun OD₆₀₀ değeri ölçüldü. SDS-kloroform yöntemi için, 100 μ L hücre 900 μ L Z tamponu içerisine eklendi. Üzerine 100 μ L kloroform ve 50 μ L %0,1 SDS eklendi. Vorteks ile karıştırıldı ve 28 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Bansal ve diğ. (2008) önerdiği homojenizasyon yöntemi ise bazı değişiklikler yapılarak uygulandı. Z tamponu içerisinde süspanse hale getirilen hücreler 0.5 mL çizgisine kadar asitle yıkanmış cam boncuk (0.45-0.52 mm) içeren mikrosantrifüj tüplerine alındı. Üç defa, 2-2-1 dakika olacak şekilde, vorteks ile maksimum hızda karıştırıldı. Bu aşamalardan sonra, yöntemlere aynı şekilde devam edildi. Örneklerin üzerine 4 mg/mL ONPG stoğundan 200 μ L eklenerek vortekslendi ve 28

°C’de inkübasyona bırakıldı. Bu aşamada zaman kaydedildi. Enzim-substrat arasında gerçekleşen reaksiyona bağlı olarak sarı renk oluşana kadar inkübasyon işlemine devam edildi. 500 µL 1 M Na₂CO₃ eklenerek reaksiyon durduruldu. Bu aşamada da zaman kaydedildi. Santrifüj işlemi ile çöktürülerek hücre kalıntıları ve kloroform uzaklaştırıldı. Örneklerin optik dansiteleri 420 ve 550 nm dalga boylarında spektrofotometre cihazında ölçüldü.

Tablo 3.3: β-galaktosidaz aktivitesinde kullanılan Z tamponu (pH:7) içeriği.

Bileşen	Miktar
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	16 g/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5.6 g/L
1 M KCl	10 mL/L
1 M MgSO ₄	1 mL/L
β-merkaptöetanol	2.7 mL/L

β-galaktosidaz aktivitesi Denklem 3.1 kullanılarak Miller ünitesi (MU) olarak hesaplandı (Miller, 1972).

$$\text{Miller ünitesi} = 1000 \times [(\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})) / (t \times V \times \text{OD}_{600})] \quad (3.1)$$

t: Reaksiyon süresi (dakika)

V: Reaksiyonda kullanılan örnek hacmi

OD₆₀₀: Reaksiyonda kullanılan hücrelerin yoğunluğu

3.5.2. β-glukozidaz Aktivitesi

Hücreler YPD besiyeri (Tablo 3.1) içerisinde çalkalayıcı etüvde 180 devir/dakika 28 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Kültürlerin OD₆₀₀ değerleri ölçüldü ve santrifüj işlemi ile hücreler çöktürüldü. Ardından bu hücreler OD₆₀₀:0.2 olacak şekilde hem YPD besiyerine hem de Rodríguez ve diğ. (2004) önerdiği şekilde hazırlanan YNBGl_c (Tablo 3.1) besiyerine transfer edildi ve çalkalayıcı etüvde 180 devir/dakika 28 °C’de 24 saat üremeye bırakıldı.

Protein izolasyonu için kültürlerden 1’er mL örnek toplandı. Hücreler 7000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve 200 µL parçalama tamponu (Tablo 3.4) ile süspanse edildi. Süspanse hale getirilen hücreler 0.2 mL çizgisine kadar cam boncuk (0.45-0.52 mm) eklenmiş mikrosantrifüj tüplerinin içerisine alındı. Vorteks ile maksimum hızda 1 dakika karıştırıldı, bu

işlem beş defa tekrarlandı. Parçalama işleminden sonra örnekler +4 °C’de 7000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı yeni tüpe alınarak protein kaynağı olarak kullanıldı.

Tablo 3.4: Protein izolasyonunda kullanılan parçalama tamponu içeriği.

Bileşen	Miktar
Sodyum fosfat tamponu (pH: 7.5)	50 mM
Gliserol	%10
NaCl	500 mM
PMSF	1 mM
EDTA içermeyen proteaz inhibitör kokteyli	1 tablet

Ham özütlerin protein konsantrasyonları bikinkoninik asit (BCA) yöntemine göre (Smith ve diğ., 1985), ticari bir kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda belirlendi. Analiz için kitte yer alan sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin, BSA) protein standartı dH₂O ile sırasıyla 25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL olacak şekilde seyreltilerek hazırlandı. Örnekler ve parçalama tamponu içeren kör örnek de dH₂O ile 10 kat seyreltilerek analiz için uygun hale getirildi. Reaktif çözeltisi, kitte bulunan reaktif A ve reaktif B solüsyonlarının sırasıyla 50:1 (v/v) oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. Her bir standart, örnek ve kör örnekten 25 µL 96 kuyucuklu bir mikropalkanın kuyularına eklendi ve ardından üzerlerine 200 µL reaktif çözeltisi ilave edildi. Mikropalka, 37 °C’de 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oluşan renkli ürünlerin 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri bir mikropalka okuyucu (EON, BioTek Instruments Inc.) ile ölçüldü. BSA standartlarının konsantrasyon ve absorbans verileri temel alınarak bir standart grafiği oluşturuldu ve doğru denklemi belirlendi. Örneklerin absorbans değerlerinin bu doğru denkleminde yerine konulmasıyla protein konsantrasyonları hesaplandı.

β-glukozidaz enziminin pNPG (4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside) substratı ile aktivite analizi için Swangkeaw ve diğ. (2011) önerdiği yöntem kullanıldı. Bu yöntem, enzimin pNPG substratını hidrolize etmesi sonucu açığa çıkan paranitrofenol (pNP) ürününün 405 nm dalga boyundaki absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Bunun için, 30 µL örnek ile 0.1 M sitrat-fosfat tamponu (pH:5) içerisinde hazırlanmış 70 µL 3 mM pNPG substratı 96 kuyucuklu mikropalka kuyularına eklendi. Mikropalka 30 °C’de 30 dakika

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda kuyulara 100 μL 1 M Na_2CO_3 eklenerek reaksiyon durduruldu. Örneklerin optik dansiteleri 405 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında ölçüldü. Bir ünite enzim (U) bir dakikada 1 μmol pNP açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edilmektedir. Enzim aktivitesi Denklem 3.2, spesifik aktivite Denklem 3.3 ile hesaplandı.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L): } (V_t \times \text{OD}_{405} \times \text{SF} \times 1000) / V_0 \times T_d \times \epsilon \quad (3.2)$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg): Enzim aktivitesi}/V_0 \times \text{total protein konsantrasyonu (mg/mL)} \quad (3.3)$$

V_t : Reaksiyonun toplam hacmi (mL)

OD_{405} : Reaksiyonun sonunda 405 nm dalga boyunda ölçülen veri

SF: Seyreltme faktörü

V_0 : Kullanılan örnek hacmi (mL)

T_d : Reaksiyonun toplam süresi (dakika)

ϵ : Molar ekstinksiyon katsayısı. pNP için verilen koşullardaki milimolar ekstinksiyon katsayısı $18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak hesaba katıldı.

Sonuçların μmol cinsinden ifadesi için 1000 katsayısı kullanıldı.

3.5.3. Lösin Arilamidaz Aktivitesi

Hücreler bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde ve YPD sıvı besiyeri kullanılarak kültürlendi ve protein izolasyonu yapılarak ham ekstraktların içerisinde bulunan proteinlerin miktarları tayin edildi.

Lösin arilamidaz enziminin aktivitesi “L-Leucine-p-nitroanilide” (L-Leu-p-NA) substratı kullanılarak analiz edildi. Yöntemin temeli, enzim ile substratın reaksiyonu sonucunda açığa çıkan p-nitroaniline (p-NA) bileşiğinin 410 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. 50 mM Tris-HCl tamponu (pH:7.6) içerisinde hazırlanan 190 μL 1 mM substrat ve 10 μL protein örneği 96 kuyucuklu mikrolplaka kuyularına eklendi. 30 $^{\circ}\text{C}$ 410 nm dalga boyunda toplamda 15 dakika sürede 1 dakika aralıklarla kinetik okuma yapıldı (Requena ve

diğ., 1993). Enzim aktiviteleri Denklem 3.2 ve Denklem 3.3 ile hesaplandı. p-NA için verilen koşullardaki milimolar ekstinksiyon katsayısı $9,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak hesaba katıldı.

3.5.4. Asit Fosfataz Aktivitesi

Asit fosfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi için, öncelikle bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde, YPD sıvı besiyerinde kültüre edilen hücrelerden ham protein ekstraksiyonu ve miktarları tayini yapıldı.

Asit fosfataz enziminin aktivite analizi “p-Nitrophenyl-phosphate” (pNPP) substratı kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntemin temeli, enzim ile substratın reaksiyonu sonucunda açığa çıkan p-nitrofenol (p-NP) bileşiğinin 405 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. 200 μl 200 mM asetat tamponu (pH:5) ve 50 μl örnek karıştırıldı. Ardından 200 μl 2 mM pNPP substratı eklendi ve örnekler 20 dakika 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 1 mL 0.5 M Na_2CO_3 eklenerek reaksiyon durduruldu. Örneklerin optik dansiteleri 405 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında ölçüldü (Tagad ve Sabharwal, 2018). Enzim aktiviteleri Denklem 3.2 ve Denklem 3.3 ile hesaplandı.

3.5.5. Proteaz Aktivitesi

Hücrelerin kazein-agar petrilinde 10 günlük inkübasyonları sonucu oluşan zonlardan ve zon içermeyen besiyerinden protein izolasyonu yapıldı. Bu amaçla, her bir örnek için, zon petriden kesilerek küçük parçalara ayrıldı ve önceden soğutulmuş havan içerisine koyuldu, sıvı azot eklenerek havan eli yardımı ile toz haline getirildi. Toz haline getirilen örneğin üzerine 3-4 katı hacminde izolasyon tamponu (Tablo 3.5) eklendi. Örnekler +4 °C’de karıştırıcı üzerinde 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ardından, +4 °C’de 10000xg’de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı yeni tüpe aktarıldı ve santrifüj işlemi tekrar edildi. Üst sıvı tekrardan yeni tüpe alınarak 0.22 μm çapında filtreden geçirildi ve protein kaynağı olarak kullanıldı.

Tablo 3.5: Agar zondan protein izolasyonu için kullanılan tamponun içeriği.

Bileşen	Miktar
Tris-HCl (pH:7.0-7.7)	20 mM
NaCl	150 mM
SDS	%0,1 (v/v)
EDTA	2 mM

Proteaz aktivitesinin spektrofotometrik analizi, kazein çözeltisinden proteaz varlığında açığa çıkan tirozin bakiyelerinin Folin belirteci ile reaksiyona girerek oluşturduğu renkli ürünün ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Takami ve diğ., 1989). Standart grafiği oluşturmak için tirozin aminoasitinin 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL oranlarında sulandırım serileri hazırlandı. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak 50 mM glisin-NaOH (pH:9.0) tamponu içerisinde %0,6 konsantrasyonda kazein çözeltisi hazırlandı. Kazein çözeltisinden 500 µl alınarak üzerine 100 µL protein örneği eklendi. 37 °C'da 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, 500 µL 110 mM TCA eklenerek 20 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından, +4 °C'da 12000 rpm'de 7 dk süre ile santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Oluşan süpernatanttan 25 µL alınarak 96 kuyulu mikropłaka kuyularına eklendi. Üzerine 125 µL 0.5 M Na₂CO₃ ve 25 µL Folin belirteci eklendi. Mikropłaka oda ısısında 30 dk inkübasyona bırakıldı. Açığa çıkan renkli ürünün absorbansı 660 nm dalga boyunda mikropłaka okuyucu ile ölçüldü. Tirozin standartlarına ait konsantrasyon ve absorbans verileri temel alınarak bir standart grafiği ve grafiğe ait doğru denklemi oluşturuldu. Örneklerin absorbans değerlerinin bu doğru denkleminde yerine konulmasıyla reaksiyon sonucunda açığa çıkan tirozin miktarları hesaplandı. Proteaz aktivitesi Denklem 3.4 ile hesaplandı.

$$\text{Proteaz aktivitesi (U/L): } (V_t \times \mu\text{g tirozin} \times \text{SF}) / V_o \times T_d \quad (3.4)$$

3.6. TÜR TAYİNİ VE KARAKTERİZASYON

Ele alınan 5 farklı enzimi üreten maya izolatlarının tür tayini ve karakterizasyonu birbirini tamamlayan farklı yöntemlerle gerçekleştirildi.

3.6.1. API-20C Uygulaması

Tür tayini için API 20C AUX (Ref: 20210, Yeast identification system, Biomerieux) testi uygulandı. Kit, içerisinde yer alan 19 farklı substratın mikroorganizmalar tarafından kullanılıp kullanılmadığına bağlı olarak gösterdikleri üreme profilleri sonucu tür tayinlerinin yapılmasına olanak sağlayan hızlı bir yöntemdir. Maya kolonileri tuz solüsyonu ile yoğunlukları "McFarland 2.0" olacak şekilde karıştırıldı. 100 µL örnek, kit içerisindeki şeritlere uygulandı. İşlem kit içerisindeki yönergeye bağlı kalınarak gerçekleştirildi Mikroorganizmaların üreme profilleri üretici firmadan temin edilen sonuç tablosuna kaydedildi. Açığa çıkan sayısal sonuçlar İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi kullanımında olan APIWEB uygulaması kullanılarak değerlendirildi ve benzerlik analizleri yapıldı.

3.6.2. Moleküler Tür Tanısı

3.6.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Moleküler tür tanımlamasında kullanılan gen dizilerinin karşılaştırmalı analizleri için öncelikle genomik DNA (gDNA) izolasyonu yapıldı (Hanna ve Xiao, 2006). Hücreler 14-16 saat sıvı YPD besiyerinde üretildi ve 7000 rpm 10 dk santrifüj işlemi ile çöktürüldü. Hücre çökeltisinin üzerine 400 µL DNA parçalama tamponu (Tablo 3.6) eklendi. Süspanse hale getirilen hücreler, 0.4 mL çizgisine kadar asitle yıkanmış cam boncuk (0.45-0.52 mm) eklenen mikrosantrifüj tüpe alındı ve üzerine 200 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi eklendi. Vorteks ile 2 dk karıştırılarak parçalama işlemi gerçekleştirildi. Sıvı faz yeni tüpe alınarak 16000xg'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 3 faz oluşumu gözlenirken genomik DNA içeren en üst faz yeni bir mikrosantrifüj tüpe alındı. Üst fazın üzerine 600 µL soğuk %95 etanol eklenerek karıştırıldı ve -20 °C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından, 16000xg'de 15 dk santrifüj edilerek DNA pelleti elde edildi. Üst sıvı uzaklaştırılarak pellet kurumaya bırakıldı. Pellet tamamen kuruduktan sonra 200 µL Tris-EDTA çözeltisi (TE) (Tablo 3.6) ile süspanse hale getirildi. Süspansiyonun içerisine 20 mg/mL RNaz A enziminden 5 µL eklendi ve 37 °C'da 30 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından, 8 µL 5 M NaCl ve 430 µL soğuk %95 etanol eklenerek -20 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, 16000xg'de 15 dk santrifüj edildi, üst sıvı uzaklaştırıldı ve pellet kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruyan pellet 30 µL TE çözeltisi ile süspanse hale getirildi. İzole edilen DNA'lar, ayrıntısı aşağıda verildiği şekilde (Bölüm 3.6.2.2.), analizleri yapıldıktan sonra -20 °C'da saklandı.

Tablo 3.6: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponların içerikleri.

Tampon	Bileşen	Miktar
Parçalama Tamponu	Triton X-100	%2 v/v
	SDS	%1 v/v
	NaCl	100 mM
	Tris (pH:8)	10 mM
	EDTA	1 mM
Tris-EDTA (pH:8)	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	0.1 mM

3.6.2.2. *gDNA'nın Elektroforetik ve Spektrofotometrik Analizi*

gDNA'ların elektroforetik analizi için 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponunda hazırlanan (50X TAE (500 mL): 121 g Trizma-baz, 50 mL 0.5 M EDTA, 28.6 Glasiyel asetik asit) %0,8'lik agaroz jel kullanıldı. Belirli miktarda agaroz tartılıp 1X TAE tamponun içerisine eklendikten sonra ısıtılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Hazırlanan jel 50-55 °C gelene kadar soğutuldu. Daha sonra, son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür (EtBr) (10 mg/mL) eklendi ve homojen bir şekilde dağılması için yavaşça karıştırıldı. Jel karışımını dökmek için yatay jel kaseti hazırlandı ve örnek yükleme kuyularının oluşması için kasete uygun jel tarağı yerleştirildi. Jel karışımı hazırlanan kasetin içerisine yavaş bir şekilde dökülerek tamamen polimerize olana kadar oda sıcaklığında bırakıldı. Jel polimerize olduktan sonra kaset tarağı çıkartılıp içerisinde yürütme tamponu (1X TAE) bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. gDNA örnekleri 6X DNA yükleme tamponu ile final konsantrasyonu 1X olacak şekilde karıştırılıp jel kuyularına yüklendi. Molekül ağırlığı bilinen standart DNA molekülü olarak "Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas, SM0101)" kullanıldı. Elektroforez işlemi 90 V akımda 40 dakika gerçekleştirildi.

gDNA konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla örneklerin UV ışığın 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları spektrofotometre cihazında ("Nanodrop 2000 Spectrophotometer", Thermo Scientific) ölçüldü. Öncelikle, gDNA'ların süspansiyonunda kullanılan TE tamponundan 1 µL alınarak kör örnek ölçümü yapıldı. Ardından, aynı şekilde 1 µL gDNA örnekleri ile ölçüm alındı ve cihazın yazılımı tarafından hesaplanan DNA konsantrasyonları (ng/µL) kaydedildi. Ayrıca, A_{260}/A_{280} oranları da kaydedilerek örneklerin saflık dereceleri belirlendi.

3.6.2.3. *DNA Barkod Dizilerinin Belirlenmesi*

Maya izolatlarının moleküler tanımlanması için, gDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak rRNA'ları kodlayan gen bölgesindeki ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ve D1/D2 alanları ile *tef1* (translasyon elongasyon faktör 1) ve aktin genleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. Çoğaltımda Tablo 3.7'de verilen primer çiftleri kullanıldı (White ve diğ., 1990, Kan, 1993, Kurtzman ve Robnett, 2003, Sipiczki, 2022).

Tablo 3.7: Barkod dizilerin çoğaltılması için yapılan PZR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri.

Primer adı	Çoğalttığı bölge	Primer dizisi
ITS5	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
ITS4	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
NL1	D1/D2	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
NL4	D1/D2	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
YTEF-1G	tef1	5'-GGTAAGGGTTCTTTCAAGTACGCTTGGG-3'
YTEF-6G	tef1	5'-CGTTCTTGGAGTCACCACAGACGTTACCTC-3'
CA1	actin	5'-GCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCTG-3'
CA5R	actin	5'-GTGAACAATGGATGGACCAGATTTCGTCG-3'

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgelerinin gen dizilerinin karşılaştırmalı analizleri için Tablo 3.8'de verilen bileşenler belirtilen konsantrasyonlarda kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyonda "High-Fidelity DNA Polymerase" (Thermo Scientific F-530S) enzimi üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Sentez işlemi "Bio-RAD T100 Thermal Cycler" cihazında Tablo 3.9'da gösterilen aşamalar ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesinin PZR ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Son konsantrasyon
Nükleaz içermeyen su	-
5X Buffer	1X
10 mM dNTP	0.2 mM
50 mM MgCl ₂	2 mM
10 µM ileri primer	0.2 µM
10 µM geri primer	0.2 µM
gDNA	100 ng
2 U/µL DNA Polimeraz	0.4 U

Tablo 3.9: ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesinin PZR ile sentez aşamasında kullanılan koşullar.

Reaksiyon aşaması	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç denatürasyonu	1	98	30 sn
Denatürasyon	35	98	10 sn
Primer Bağlanma		57	30 sn
Uzama		72	40 sn
Son uzama	1	72	10 dk

D1/D2 bölgesi ile *tef1* ve *act* gen dizilerinin çoğaltımında ise DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) kullanıldı. Reaksiyonda kullanılan bileşenler ve son konsantrasyonları Tablo 3.10’da verildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda Tablo 3.11’de gösterilen aşamalar ile sentez işlemi gerçekleştirildi. NL1-NL4 primer çifti için bağlanma sıcaklığı 58 °C, Ytef1G-Ytef6G ve actinCA1-actinCA5R primer çiftleri için ise 65 °C kullanıldı.

Tablo 3.10: D1/D2 bölgesi ile *tef1* ve *act* gen dizilerinin PZR ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.

Bileşen	Son konsantrasyon
Nükleaz içermeyen su	-
2X Master Mix	1X
10 µM ileri primer	0.4 µM
10 µM geri primer	0.4 µM
gDNA	100 ng

Tablo 3.11: D1/D2 bölgesi ile *tef1* ve *act* gen dizilerinin sentez aşamasında kullanılan PZR koşulları.

Reaksiyon aşaması	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç denatürasyonu	1	95	2 sn
Denatürasyon	35	95	30 sn
Primer Bağlanma		-	30 sn
Uzama		72	1 dk
Son uzama	1	72	10 dk

Sentezlenen DNA bölgeleri Bölüm 3.6.2.2’de anlatıldığı şekilde %1,2’lik agaroz jel kullanılarak 75 V akımda 45 dakika elektroforez işlemi ile analiz edildi. Molekül ağırlığı bilinen standart DNA molekülü olarak “GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311)” kullanıldı. gDNA’lardan PZR ile çoğaltılan bölgelerin nükleotid dizileri hizmet alımı ile çift yönlü dizileme yapılarak belirlendi. Dizileme işleminde her spesifik bölge için Tablo 3.7’de belirtilen primer çiftleri kullanıldı. Nükleotid dizilerinin benzerlik analizleri “NCBI Nucleotide Blast” veritabanı kullanılarak yapıldı.

3.6.2.4. GenBank Erişim Numaralarının Alınması

ITS1-5.8S rRNA-ITS2 ve D1/D2 bölgelerini içeren nükleotid dizi bilgileri, NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) tarafından oluşturulan ve nükleotit dizilerinin depolanmasını destekleyen kapsamlı bir veri tabanı olan GenBank’a (Benson ve diğ., 2012), elektronik başvuru yapılarak kaydedildi ve erişim numaraları alındı. Bunu yapmak için, öncelikle, her bir bölgenin ileri ve geri okumalarına ait dizi bilgileri Clustal Omega programı kullanılarak hizalandı.

3.6.3. Elektroforetik Karyotipleme

Maya hücrelerinin kromozomları Sipiczka ve diğ. (2001) tarafından açıklandığı şekilde “pulse-field” jel elektroforezi yöntemi ile analiz edildi. Bu amaçla, hücreler YEL besiyeri (Tablo 3.1) içerisine inoküle edilerek çalkalamalı etüvde 28 °C sıcaklıkta bir gece üremeye bırakıldı. Üreyen hücrelerin OD₆₀₀ değerleri ölçüldü ve 1.3×10^9 hücre/mL örnek 7000 rpm 10 dk santrifüj işlemi ile çöktürüldü. Pellet 2 mL 50 mM EDTA ile süspanse edilerek 7000 rpm 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Pellet 500 µL CPES tamponu (Tablo 3.12) ile süspanse edilerek 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve süspansiyon 37 °C 10 dk inkübe edildi. CPE tamponu (Tablo 3.12) içerisinde %1 w/v düşük erime ısısı (“Low-melting”) agaroz hazırlandı ve 52 °C’de tutuldu. Örneklerin üzerine 500 µL agaroz karışımı eklenerek homojenize olana kadar hassas bir şekilde karıştırıldı ve agaroz kalıbına döküldü. Kalıp +4 °C’de inkübe edilerek agaroz dolgularının oluşması sağlandı. Agaroz dolguları 1.5 mL CPE tamponu içeren steril tüplerin içerisine aktarıldı ve 37 °C 5 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından, CPE tamponu döküldü, tüplerin içerisine 1.5 mL lizis tamponu (Tablo 3.12) eklendi ve 1 gece 52 °C’de tutuldu. Yıkama işlemi için, lizis tamponu 1 mL 1X TE tamponu ile değiştirilerek 52 °C 30 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından, her seferinde taze 1X TE tamponu eklenerek yıkama işlemi 2 defa oda sıcaklığında tekrar edildi. Agaroz dolguları elektroforetik ayırım için 0.5X Tris-borat-EDTA (TBE) tamponu (Tablo 3.12) içerisinde hazırlanmış %1.1 w/v agaroz jeline (Bio-Rad) yüklendi. Elektroforez işlemi 0.5X TBE tamponu içinde CHEF-Mapper sistemi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) kullanılarak, 4 V/cm voltajda, sırası ile 90–325 saniyelik başlangıç ve bitiş anahtarlama süreleriyle, toplam 48 saat, 14 °C sıcaklık koşulları altında gerçekleştirildi (Lee ve diğ., 2007). Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel 0.5 µg/mL etidyum bromür ile 30 dakika boyandı ve dH₂O ile yıkandı. Bantlar UV ışığı altında

görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. *S. cerevisiae* (X4005-11A) kromozomları molekül ağırlığı bilinen standart olarak kullanıldı (Antunovics ve diğ., 2023).

Tablo 3.12: Elektroforetik karyotipleme işleminde kullanılan tamponlar.

Tampon	Bileşen	Miktar
CPES	Sitrat fosfat tamponu (pH:6)	40 mM sitrik asit+120 mM Na ₂ HPO ₄
	EDTA	20 mM
	Sorbitol	1.2 M
	DTT	5 mM
	Zimoliyaz	0.25 mg/mL
CPE	Sitrat fosfat tamponu (pH:6)	40 mM sitrik asit+120 mM Na ₂ HPO ₄
	EDTA	20 mM
Lizis (pH:8)	Tris	10 mM
	EDTA	0.45 M
	SDS	%1
	Proteinaz K	0.5 mg/mL
10X TBE	Tris-base	108 g
	Borik asit	55 g
	EDTA (pH:8)	20 mM
	dH ₂ O	900 mL

3.6.4. Mitokondriyal DNA Ekstraksiyonu ve Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi

Logaritmik fazdaki maya kültürlerinden Nguyen ve diğ. (2000)'da anlatılan yöntemle mitokondriyal DNA izole edildi. Bunun için hücreler 100 mL YEL besiyerine (Tablo 3.1) ekilerek çalkalamalı inkübatörde 28 °C sıcaklıkta bir gece inkübasyon bırakıldı. Hücrelerin tamamı 7000 rpm 10 dakika santrifüj işlemi ile çöktürüldü soğuk 50 mM EDTA (pH:8) ile yıkandı. Pellet 10 mL solüsyon 1 (Tablo 3.13) ile yeniden süspanse edildi ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Hücreler 5000 rpm 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve pellet 6 mL solüsyon A (Tablo 3.13) ile süspanse edildi. Süspansiyonun üzerine 0,25 mg/mL zimoliyaz enzimi eklendikten sonra 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sferoplastlar problu ultrasonikatör cihazında 2 dakika süreli ultrasonikasyon işlemi ile parçalandı ve 2800 rpm 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne alındı ve maksimum hızda 10 dk santrifüj edildi. Pellet 500 µL solüsyon A ile süspanse edilerek tekrardan santrifüj edildi. Bu işlem iki defa daha tekrarlandı. Pellet yeniden 500 µL solüsyon A ile süspanse edilerek üzerine 2 µL 50 mM MgCl₂ ve 1 µL 20 mg/mL DNaz I enzimi eklendi. Oda ısısında 10 dk inkübasyonun ardından 1 mL solüsyon A eklendi ve maksimum hızda 10 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant uzaklaştırıldı, pelletin üzerine 500 µL solüsyon B (Tablo 3.13) ve 500 µL fenol-kloroform-izoamilalkol eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Maksimum hızda 10 dk santrifüj işleminin ardından üst faz yeni tüpe aktarıldı ve üzerine eşit miktarda izopropanol eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, maksimum hızda 10 dk santrifüj edildi, üst sıvı uzaklaştırıldı ve pellet %70 etanol ile yıkandı. Tekrardan santrifüj ile çöktürülen pellet kurumaya bırakıldı. Kuruyan pellet 50 µL 1X TE tamponu ile çözüldü ve içerisine 2 µL 10 mg/mL RNaz A enziminden eklenerek 37 °C’da 30 dk inkübe edildi.

Tablo 3.13: mtDNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.

Solüsyon	Bileşen	Miktar
Solüsyon 1 (pH:7.5)	Sorbitol	1.2 M
	EDTA	50 mM
	β-merkaptoetanol	%2
Solüsyon A (pH:7.5)	Sorbitol	0.5 M
	EDTA	10 mM
	Tris	50 mM
Solüsyon B (pH:7.5)	NaCl	100 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	%1
	Tris	50 mM

Elde edilen mitokondriyal DNA’ların (mtDNA) restriksiyon profillerinin belirlenmesi için mtDNA’lar *MboI* restriksiyon endonükleazı ile kesildi (Tablo 3.14) ve 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Sipiczki ve diğ., 2024). Restriksiyon fragmentleri 1X TBE tamponu içerisinde hazırlanmış %1.2 (w/v) agaroz jelde 100 V 180 dk elektroforez işlemi ile ayrıldı. Jel UV ışık altında kontrol edilerek fotoğraflar kaydedildi.

Tablo 3.14: mtDNA restriksiyon fragmentlerinin analizi için uygulanan kesim reaksiyonu.

Bileşen	Miktar
mtDNA	10 µL
10X Tampon	2 µL
10 U/µL <i>MboI</i>	0,5 µL
Nükleaz içermeyen su	7,5 µL
Toplam	20 µL

3.6.5. Morfolojik Karakterizasyon

Maya tipi büyümeden miselyal büyümeye geçiş, lam ve bir lamel arasına sıkıştırılmış ince YEA (Tablo 3.1) filmlerinde (0,5–1 mm) incelendi (Sipiczki ve diğ., 1998). İçerisinde lam bulunan steril cam petrilerin içerisine yaklaşık 5 mL YEA besiyeri döküldü. Maya hücreleri üzerinde ince bir YEA tabakası bulunan lamın üzerine ekildi. Daha sonra preparat bir lamel ile kapatıldı ve 28 °C inkübasyona bırakıldı. Preparatlar belirli aralıklarla Olympus BX51 mikroskobu altında incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.6.6. Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Asimilasyonunun Değerlendirilmesi

Mayaların klasik tanımlanmasında da kullanılan karbon ve azot kaynaklarını asimilasyon yetenekleri, Barnett ve diğ. (1990) tarafından açıklandığı şekilde değerlendirildi. Karbon kaynaklarının asimilasyonunun değerlendirilmesi için glukoz içermeyen katı YNB besiyeri (Tablo 3.1) 5 farklı karbon kaynağı (laktoz, galaktoz, sükroz, maltoz, gliserol) ile hazırlandı. Azot kaynakları için ise amonyum sülfat içermeyen MMA (Tablo 3.1) besiyeri nitrat, kreatin, etilamin, L-lizin, glukozamin eklenerek hazırlandı. Taze maya kültürlerinden dH₂O ile yoğun süspansiyonlar hazırlandı. Süspansiyonlardan 5 µL alınarak her bir besiyerinin üzerine inoküle edildi. Petriler 28 °C sıcaklıkta 3-4 gün inkübasyona bırakıldı ve hücrelerin üreme durumları kaydedildi.

3.6.7. Antagonistik Etkileşimlerin Belirlenmesi

Maya izolatlarının birbirlerine karşı antagonistik etkisi Sipiczki (2023) tarafından önerilen “Yeast on indicator (YOI)” yöntemi ile test edildi. Bunun için, öncelikler hücreler YEA besiyerinde tazelendi. Taze kültürlerden yoğun hücreler toplanarak dH₂O içerisinde süspanse edildi ($\sim 10^8$ hücre/ml) ve indikatör organizma olarak kullanıldı. İndikatör organizmanın yoğun süspansiyonu MMA besiyerinin (Tablo 3.1) yüzeyine homojen şekilde yayıldı ve besiyeri kurumaya bırakıldı. Diğer hücrelerden bir öze dolusu alınarak, ~ 5 mm çapında noktalar oluşturacak şekilde indikatör organizmanın yüzeyine ekildi. Petriler 20 °C 7 gün inkübasyona bırakıldı. Maya hücrelerinin antagonistik etkileri üzerine ekildiği indikatör organizmanın üremesini engelleyerek etrafında berrak bir inhibisyon bölgesi oluşturmaya göre değerlendirildi.

3.7. ENZİM KARAKTERİZASYONU

Çalışmada ele alınan 5 farklı enzimin seçilen maya izolatlarındaki üretim kapasiteleri Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi yapıldıktan sonra, bunlardan iki tanesinin (proteaz ve beta-glukozidaz) karakterizasyonunun yapılmasına karar verildi.

3.7.1. Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

3.7.1.1. İzolatların Kültürlenmesi

Hücre dışına salgılanan proteaz enziminin analizlerinde maya hücrelerinin kültürlenmesi için yağsız süt tozu ile hazırlanmış hem katı hem de sıvı besiyerleri kullanıldı. Taze kültürlerden bir öze dolusu toplanan hücreler kazein-agar besiyerlerine ekilerek 10 gün 30 °C'da üremeye bırakıldı. Hücrenin etrafında oluşan berrak zon kesilerek analizlerde kullanıldı. Öte yandan, sıvı kültürler için, YPD besiyerinde bir gece üretilen hücreler çöktürülerek dH₂O ile yıkandı ve sıvı besiyeri içerisine inoküle edildi. Sıvı kültürler çalkalayıcı etüvde 180 rpm 30 °C'de üremeye bırakıldı. 1., 2., 3. ve 4. günlerde kültürlerden örnek toplanarak 7000 rpm 5 dk santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Üst sıvıların OD₆₀₀ değerleri ölçüldü ve proteaz enziminin aktivite analizleri için kullanıldı.

3.7.1.2. Üst Sıvıların Kısmi Saflaştırılması

Yukarıda belirtildiği şekilde elde edilen üst sıvıların içerdiği proteinler amonyum sülfat ile çöktürüldü. Bunun için, 20-50 mL protein örneği içeren bir beher buz dolu bir kabın içerisine yerleştirildi. %70 doyumluk oranında olacak şekilde eklenmesi gereken amonyum sülfat tuzu miktarı hesaplandı. Amonyum sülfat örneklerin üzerine azar azar eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde tamamen çözünmesi sağlandı. Çözünmenin tamamlandığı gözle tespit edildikten sonra yaklaşık 1 saat daha karıştırmaya devam edildi. +4 °C 10000xg 10 dk santrifüj işlemi ile proteinler çöktürüldü ve pellet 50 mM Tris-HCl (pH:8) tamponu içerisinde çözüldü. Daha sonra, 30 kDa cut-off filtreli santrifüj tüp (Merck) kullanılarak örneklerdeki tuzlar arındırıldı ve konsantre edildi. Örneklerin tamamı santrifüj tüplerinin içerisine alınarak 5000xg 30 dk santrifüj edildi. Filtrenin üst kısmında kalan hacmin üzerine tekrardan 50 mM Tris-HCl tamponu eklendi ve santrifüj işlemi tekrar edildi. Santrifüj sonunda filtrenin üst kısmında kalan örnekler yeni tüpe alınarak aktivite analizlerinde kullanıldı.

3.7.1.3. Süt Pıhtılaştırma Etkinliğinin İncelenmesi

Agar zonlar ile sıvı kültürlerin üst sıvılarında bulunan ve kısmi saflaştırılan proteaz enziminin süt pıhtılaştırma etkinliği Ersöz ve İnan (2019) tarafından önerilen şekilde incelendi. Bu amaçla, %26 (w/v) yağsız süt tozu 40 mM CaCl₂ içerisinde çözöldü ve süt tozunun tamamen çözönməsi için 30 dk karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan süt solösyonu kullanılmadan önce 37 °C’da 20 dk inkübe edildi. 10. günde kazein-agar petrilerinden kesilen agar zonlar ve süpernatant örnekleri süt solösyonunun içerisinde eklendi. Ayrıca içerisinde kimozin enzimi olduğu bilinen ticari bir peynir mayası pozitif kontrol olarak ve zon içermeyen boş besiyeri negatif kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 37 °C’da inkübasyona bırakıldı. Sütün pıhtılaşmasına bağılı olarak meydana gelen çökelmeler incelendi ve fotoğraflar kaydedildi.

3.7.1.4. Elektroforetik Analiz

Proteinlerin elektroforetik analizi denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (Walker, 2002). Jel kaseti, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde hazırlandı. Proteinlerin ayrımı için %10’luk ayırma jeli ve %5’lik yükleme jeli hazırlandı. Jellerin hazırlanmasında ve örneklerin yürütölmesinde kullanılan tüm çözeltiler Tablo 3.15’te, hazırlanan jellere ait içerikler ise Tablo 3.16’da belirtildi. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı ve jel karışımı hazırlanan kasetin iki camı arasına dököldü. Jelin üst yüzeyinin düz bir şekilde oluşmasını sağlamak ve polimerizasyonu için oksijenle temasını engellemek amacıyla jel yüzeyi dH₂O ile kaplandı. Polimerizasyon tamamlanana kadar bekletildikten sonra jel yüzeyindeki su uzaklaştırıldı ve %5’lik yükleme jeli yine Tablo 3.16’daki miktarlara göre hazırlanarak, polimerize olan ayırma jelinin üzerine dököldü. Yükleme jelinde örnek yükleme kuyularının oluşması için kaset tarağı yerleştirildi. Jel polimerize olduktan sonra kaset tarağı çıkarıldı ve kaset 1X yürütme tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Örnekler 30 µg protein olacak şekilde 2X örnek yükleme tamponu ile 1:1 (v:v) oranında karıştırılıp 95 °C’de 5 dakika kaynatıldı. Kaynatılan örneğin tamamı jel kuyusuna yüklendi ve ayrıca jelin ilk cebine moleköl ağırlığı bilinen standart protein karışımı (“Pierce™ Prestained Protein MW Marker”, Thermo Scientific 26612) yüklendi. Elektroforez işlemi 200 V akımda gerçekleştirildi ve örnek yükleme tamponundaki bromofenol mavisine ait bant jelin alt kenarına ulaşınca kadar sürdüröldü.

Tablo 3.15: SDS-PAGE yönteminde jellerin hazırlanmasında ve örneklerin yürütülmesinde kullanılan solüsyonlar.

Solüsyon	Bileşen	Miktar
%30 Akrilamid Solüsyonu (100 mL)	Akrilamid Bis-akrilamid	29.2 g 0.8 g
4X Ayırma Jeli Tamponu (pH:8.8)	Trizma-Baz	1.5 M
4X Yükleme Jeli Tamponu (pH:6.8)	Trizma-Baz	0.5 M
%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (100 mL)	SDS	10 g
%10 Amonyum Persülfat (APS) (1 mL)	APS	0.1 g
2X Örnek Yükleme Tamponu (pH:6.8) (10 mL)	4X Yükleme Jeli Tamponu %10 SDS Gliserol β -merkaptoetanol Bromofenol mavisi	2.5 mL 4 mL 2 mL 1 mL 0.02 g
10X Tank Tamponu (pH:8.3)	Trizma-Baz Glisin SDS	0.025 M 0.192 M %0,1

Tablo 3.16: SDS-PAGE yönteminde kullanılan ayırma ve yükleme jellerinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Ayırma jeli (%10)	Yükleme jeli (%5)
4X Ayırma Jeli Tamponu	1 mL	-
4X Yükleme Jeli Tamponu	-	250 μ L
dH ₂ O	2.262 mL	1.875 mL
%30 Akrilamid Solüsyonu	1.662 mL	337.5 μ L
%10 (SDS)	50 μ L	25 μ L
%10 (APS)	25 μ L	12.5 μ L
TEMED	1.75 μ L	3.5 μ L

Elektroforez işleminden sonra protein bantlarını görüntülemek için jel Tablo 3.17’de belirtilen boyama çözeltisi ile boyandı (Ausubel ve diğ., 2003). Coomassie parlak mavisinin proteinlere bağlanması için, jel alkol ve aside dayanıklı bir kapta boyama çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında bir gece çalkalandı. Daha sonra boyama çözeltisi döküldü ve jel yıkama (“destaining”) çözeltisi (Tablo 3.17) içerisine alındı. Fazla boya jelden tamamen uzaklaştırılana kadar yıkama işlemine devam edildi. Protein bantları ChemiDoc MP (Bio-Rad) görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Tablo 3.17: Coomassie boyama yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözelti	Bileşen	Miktar
Boyama çözeltisi	Metanol	50 mL
	Asetik asit	10 mL
	%0.05 Coomassie parlak mavisi	40 mL
Yıkama çözeltisi	Metanol	125 mL
	Asetik asit	175 mL
	dH ₂ O	2200 mL

3.7.2. β -glukozidaz Enziminin Karakterizasyonu

3.7.2.1. Florojenik Substrata Karşı Aktivite

β -glukozidaz enzim aktivitesi 4-MUG (“4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside”) substratı ile kalitatif olarak analiz edildi. 4-MUG β -glukozidaz aktivitesinin araştırılmasında sıklıkla kullanılan bir florojenik substrattır. Enzim ile hidrolizi sonucunda açığa çıkan ürün floresan ışığa göstermektedir. Buna göre, bu çalışmada üç farklı yöntemde 4-MUG substratı kullanılarak izolatların ürettiği β -glukozidaz enziminin aktivitesi analiz edildi.

Katı besiyerinde kültürleme

%0,002, %0,004 ve %0,006 oranlarında 4-MUG substratı içeren katı besiyerleri Swangkeaw ve diğ. (2011) tarafından belirtildiği şekilde hazırlandı. Stok 4-MUG substratı DMSO içerisinde çözüldü ve 0.22 μ m çapındaki filtreden geçirildikten sonra besiyerlerine eklendi. Daha sonra, hazırlanan bu besiyerlerine nokta ekim yapıldı. Substrat içermeyen ancak kontrol olarak DMSO içeren besiyerine de aynı şekilde ekimler yapıldı. Hücreler 28 °C etüvde 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Petrilerin fotoğrafları UV ışık altında çekildi.

Sıvı besiyerinde kültürleme

Hücreler %0,006 4-MUG substratı içeren YNBGl_c besiyeri (Tablo 3.1) içerisine Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde ekilerek üretildi. 24. saatin sonunda kültürlerden örnekler toplanarak 7000 rpm 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü ve üst sıvılar UV ışık altında görüntülendi. Üst sıvıların 360 nm eksitasyon-440 nm emisyon dalga boylarındaki değerleri spektrofotometre cihazı ile ölçüldü.

Ham özütlerde aktivite analizi

4-MUG hidrolizine dayalı bir diğer yöntem protein ham özütleri kullanılarak yapıldı. Ham özütler Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde elde edildi ve aynı bölümde anlatıldığı gibi içerdikleri protein miktarları hesaplandı. 0.1 M sitrat-fosfat tamponu (pH:5) içerisinde hazırlanan 1 mM 4-MUG substratı ve eşit miktarda protein içeren ham özütler karıştırıldı. Karışım, %0,8 agar içeren katı ortama 5 µL spotlar şeklinde uygulandı. 5 dakika inkübasyonun ardından örnekler UV ışık altında görüntülendi.

3.7.2.2. Kısmi Saflaştırma

Florojenik substrat ile kurulan sıvı kültürlerden elde edilen ham özütler ile üst sıvı örnekleri metanol/kloroform ve aseton ile çöktürülerek kısmi olarak saflaştırıldı. Metanol/kloroform yönteminde 1 hacim örnek üzerine 4 hacim metanol 1 hacim kloroform ve 3 hacim su eklenerek iyice karıştırıldı. Örnekler +4 °C 10000xg 10 dakika santrifüjlendi. En üstte oluşan sulu faz uzaklaştırıldı ve kalan örneğin üzerine 4 hacim metanol eklenerek karıştırıldı. Tekrar 10000xg 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırılarak pellet kurumaya bırakıldı. Kuruyan pellet uygun bir tampon çözeltide (25 mM Tris-HCl, %2 SDS (pH:6,8)) çözüldü. Aseton ile çöktürme yönteminde, 200 µL örnek üzerine 1 mL soğuk aseton eklendi ve -20 °C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından, +4 °C 10000xg 10 dakika santrifüj işlemi ile örnekler çöktürüldü. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve aynı işlem tekrar edildi. Pellet kuruduktan sonra tampon çözelti eklenerek tamamen çözünmesi sağlandı. Çöktürme işlemlerinin sonucunda elde edilen proteinlerin miktarı BCA testi (Bölüm 3.5.2) ile belirlendi.

3.7.2.3. Elektroforetik Analiz

Ham özütlerdeki ve üst sıvılardaki proteinlerinin elektroforetik analizi için Bölüm 3.7.1.4’te anlatıldığı şekilde %10 ayırma jeli ile %5 yükleme jeli hazırlandı ve örnekler 400 ng protein miktarı olacak şekilde jel kuyularına yüklenerek aynı koşullarda yürütüldü. Protein bantlarını görünür hale getirmek için Gümüş boyama yöntemi kullanıldı. Bunun için Tablo 3.18’de verilen çözeltiler hazırlandı. Jel yürütme işleminin ardından, alkol ve aside dayanıklı bir kapta formaldehitli fiksatif çözeltisi içinde 20 dakika çalkalandı. Fiksatif dökülerek iki kez 10 dk saf su ile yıkandı. Su uzaklaştırıldı ve sodyum tiyosülfat çözeltisi eklenerek 2 dk çalkalandı. Çözelti dökülerek iki defa 40 sn saf su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra, gümüş nitrat çözeltisi eklendi ve 20 dk düşük hızda çalkalandı. Gümüş nitrat çözeltisi uzaklaştırılıp jel tekrar saf su

ile yıkandı. Su uzaklaştırıldıktan sonra görüntü oluşturma çözeltisi eklendi ve kahverengi protein bantları oluşana kadar hafifçe çalkalandı. Çözelti fazla bekletilmeden uzaklaştırıldı ve jelin üzerine sitrik asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Protein bantları ChemiDoc MP (Bio-Rad) görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Tablo 3.18: Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözelti	Bileşen	Miktar
Formaldehitli fiksatif çözeltisi	Metanol %37 Formaldehit	400 mL/L 0.5 mL/L
Sodyum tiyosülfat	Na ₂ S ₂ O ₃	0.2 g/L
Gümüş nitrat	AgNO ₃	1 g/L
Görüntü oluşturma çözeltisi	Na ₂ CO ₃ Sodyum tiyosülfat çözeltisi %37 Formaldehit	30 g 20 mL 0.5 mL/L
Sitrik asit	Sitrik asit	2.3 M

3.7.2.4. Üreme pH'ı ve Sıcaklığının Üretilen Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Maya izolatlarının farklı pH ve sıcaklık ortamlarında kültürlenmesinin hücrelerinin ürettiği β -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla, farklı pH koşullarının oluşturulması için YPD besiyeri içeriği Tablo 3.1'e göre eklendikten sonra, NaOH veya HCl çözeltileri kullanılarak pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9 değerlerinde besiyerleri hazırlandı ve hücreler 28 °C'de inkübe edildi. Üreme sıcaklığının etkisinin belirlenmesi için ise, hücreler YPD (pH:6,8) besiyerine ekilerek 24 °C, 28 °C ve 42 °C olacak şekilde üç farklı sıcaklık değerinde üretildi. Kültürlerin OD₆₀₀ değerleri inkübasyonun başlangıcından itibaren her iki saatte bir spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Ölçüm verileri kullanılarak zamana bağlı optik dansitedeki değişimi gösteren üreme eğrileri çizildi. Bu koşullarda üretilen hücrelerden Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı şekilde protein izolasyonu yapıldı, ham özütlerin protein miktarları ve β -glukozidaz enzim aktivitesi belirlendi.

3.7.2.5. Reaksiyon pH'ı ve Sıcaklığının Ham Özütlerdeki Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

β -glukozidaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla hücreler Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı şekilde kültürlendi, protein izolasyonu yapıldı ve ham özütlerin içerdiği protein miktarları belirlendi. İlk olarak aktivitenin en yüksek olduğu pH

değeri pH:3-10 değerleri arasında araştırıldı. pH:3-7 koşulları için 0.2 M sitrat-fosfat tamponu pH:8-10 koşulları için ise 0.2 M Glisin-NaOH tamponu hazırlandı. pNPG substratı farklı pH'lardaki bu tamponlar içerisinde hazırlandı ve Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı şekilde aktivite testi uygulandı. Her bir pH değeri için ham özütlerdeki β -glukozidaz aktivitesi göreceli olarak değerlendirildi. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için optimum pH değerinde hazırlanan pNPG substratı kullanıldı. Ham özütlerin β -glukozidaz aktivitesi 30, 40, 50, 60, 70 °C olmak üzere beş farklı reaksiyon sıcaklığında incelendi ve göreceli olarak değerlendirildi.

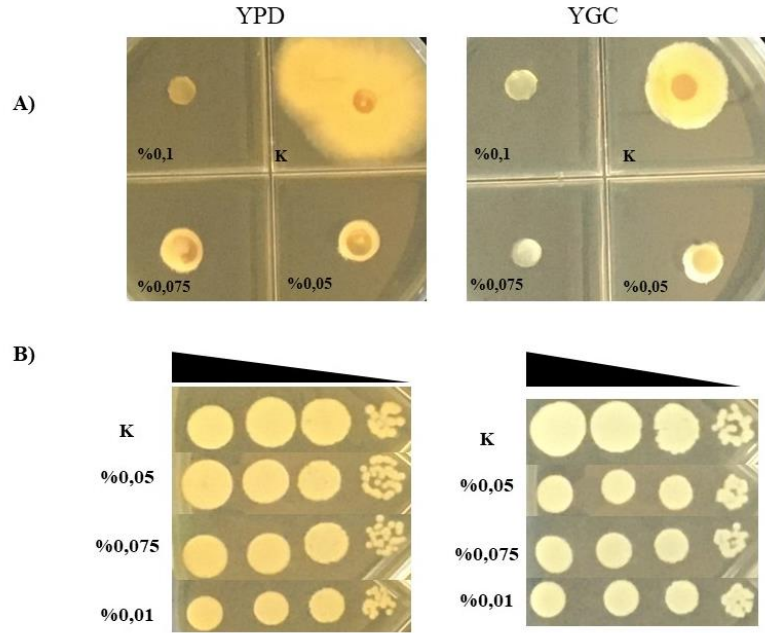
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmada deneyler biyolojik ve teknik tekrarlar üzerinden gerçekleştirildi. Her deney seti en az ikişer biyolojik ve üçer teknik tekrar verisi içerecek şekilde elde edildi. Bilimsel olarak anlamlı farklılıklar $p < 0.05$ -güven aralığı ölçütü ele alınarak tek yönlü veya iki yönlü varyans analizine (One-way/2way ANOVA) göre değerlendirildi. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 9.0.2 yazılımı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. PROPİYONİK ASİT KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Mayaların izolasyonunda kullanılan YGC besiyeri içerisine eklenen propiyonik asitin küf engelleme özelliği ve etkin dozu test edildi. Buna göre, %0.05, %0.075 ve %0.1 (v/v) konsantrasyonlarında propiyonik asit içeren katı YGC ve YPD besiyerlerinde yetiştirilen *F. graminearum* kültürlerinde propiyonik asit içermeyen ortamda üreme gözlenirken, en iyi inhibisyon %0.075 propiyonik asit içeren besiyerinde gözlemlendi. *F. graminearum* kültürleri propiyonik asit içermeyen YPD besiyerinde daha iyi üreme gösterirken her iki besiyeri için %0.075 etkin doz olarak belirlendi (Şekil 4.1A). *S. boulardii* hücre canlılıklarının %0.075 propiyonik asit değerinden etkilenmediği ve hem YPD hem YGC besiyerinde kontrole yakın üreme gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.1B). Bu sonuçlardan yola çıkarak %0.075 değeri YGC besiyerine eklenecek propiyonik asit konsantrasyonu olarak belirlendi.



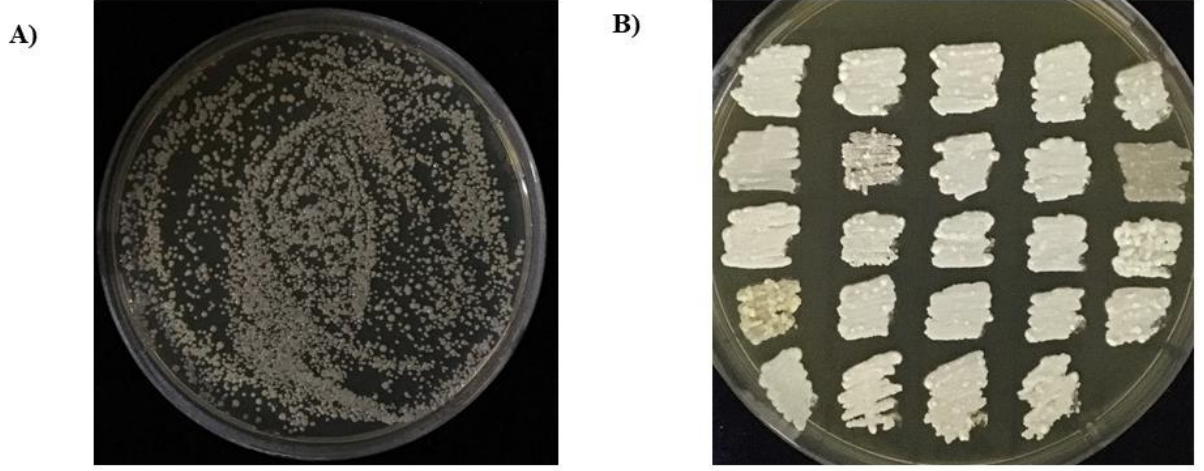
Şekil 4.1: Propiyonik asit konsantrasyonunun belirlenmesi. **A)** *F. graminearum* kültürlerinin propiyonik asit içeren (%0.05, %0.075, %0.1) ve içermeyen (K) besiyerlerindeki canlılık profilleri. **B)** *S. boulardii* hücrelerinin propiyonik asit içeren (%0.05, %0.075, %0.1) ve içermeyen (K) besiyerlerindeki canlılık profilleri.

4.2. MAYALARIN İZOLASYONU

Çalışmanın amacına uygun olarak toplanan çiğ süt ve peynir örnekleri bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanarak %0.075 propiyonik asit içeren katı YGC besiyerine ekildi. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde gözlenen maya kolonilerinin sayısı Tablo 4.1’de verildi. Buna göre, çiğ süt ve peynirlerdeki maya derişimlerinin farklı bölgelere ve farklı kaynaklara göre değiştiği gözlemlendi. Çiğ inek sütündeki maya konsantrasyonu 20680 cfu/mL olarak belirlendi ve diğer kaynaklara göre en yüksek maya içeriğine sahip olduğu gözlemlendi. Arnavutköy ve Çatalca bölgelerinden toplanan çiğ manda sütlerindeki maya konsantrasyonları sırası ile 1500 cfu/mL ve 340 cfu/mL olarak belirlendi. Erzincan yöresine ait işlenmiş peynir örneğinin içerdiği maya konsantrasyonu 5500 cfu/g olarak hesaplandı. En düşük maya konsantrasyonu ise Çatalca bölgesinden alınan peynir örneğinde 21 cfu/g olarak bulundu. Her bir örneğe ait petrilere renk, şekil ve boyutlarına bakılarak rastgele olacak şekilde koloniler seçildi ve bu koloniler katı YPD besiyerine ekildi. Sonuçta, 5 farklı kaynaktan elde edilen maya kolonilerinden çiğ süt örneklerinden 87 ve peynir örneklerinden 50 olmak üzere toplamda 137 tane iyi izole olmuş koloni seçildi ve üretildi (Tablo 4.1). YGC besiyerinde oluşan kolonileri ve YPD besiyerinde kültürlen kolonileri gösteren bir örnek fotoğraf Şekil 4.2’te verildi.

Tablo 4.1: Mayaların izolasyonunda kullanılan kaynaklar ile ekimleri sonucu elde edilen ve seçilen koloni sayıları.

Bölge	Kaynak	Maya konsantrasyonu	Rastgele seçilen koloni sayısı
Lüleburgaz- Kırklareli	İnek sütü	20680 cfu/mL	57
Arnavutköy- İstanbul	Manda sütü	1500 cfu/mL	6
Erzincan	Peynir	5500 cfu/g	29
Çatalca- İstanbul	Peynir	21 cfu/g	21
Çatalca- İstanbul	Manda sütü	340 cfu/mL	24



Şekil 4.2: A) YGC besiyerinde inkübasyon sonrası oluşan koloniler. B) Seçilen kolonilerin YPD besiyerinde kültürlenmesi.

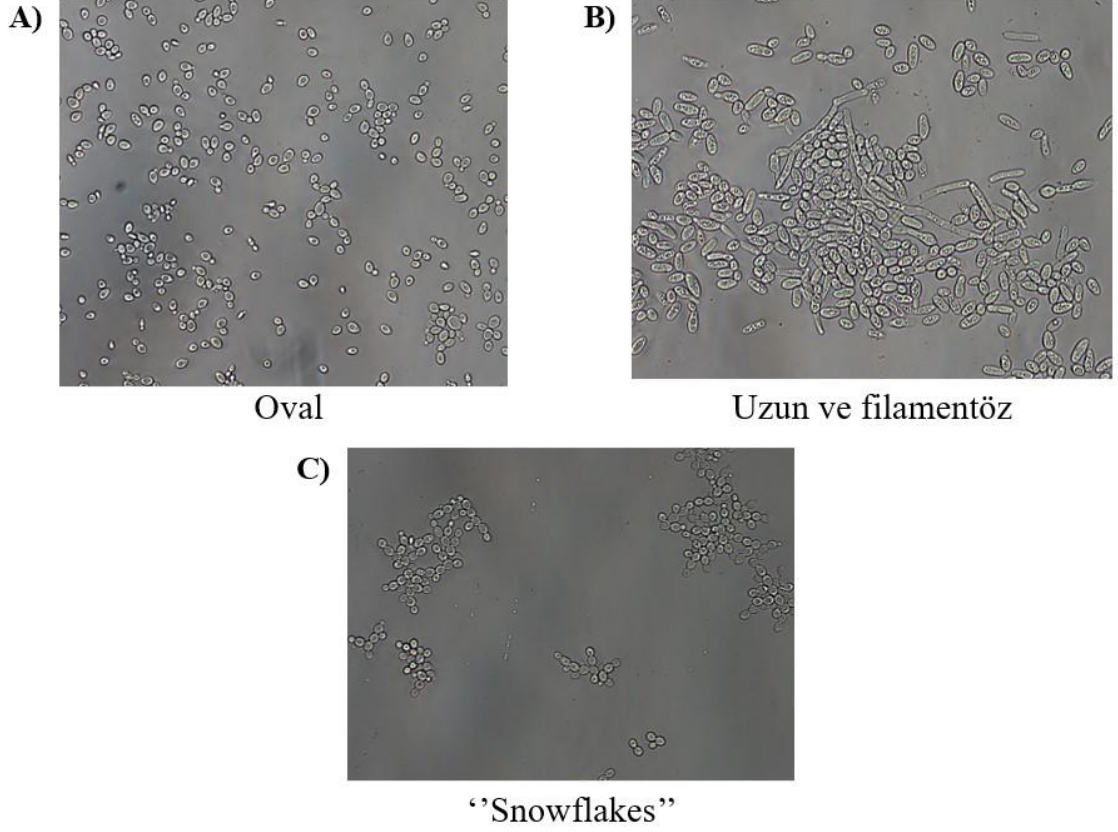
4.3. GENEL TARAMA SONUÇLARI

İzolasyon sonucunda elde edilen toplam 137 maya izolatu, mikroskobik/makroskobik morfolojileri, farklı karbon kaynaklarını kullanma özellikleri ve proteaz, amilaz ve lipaz enzimlerini üretme yetenekleri bakımından ayrı ayrı analiz edildi.

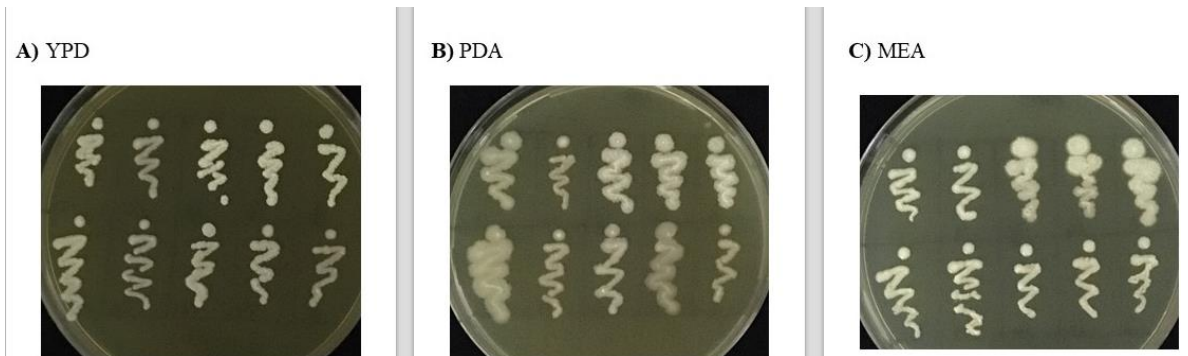
Sıvı YPD besiyerine alınıp kültürlenmesi yapılan maya izolatlarının her birinin morfolojik yapısı mikroskop altında incelendiğinde mayaların çoğunlukla tomurcuklanan bölünme ile çoğaldığı, bazı izolatların bipolar tomurcuklanma şeklinde karşılıklı her iki uçta tomurcuk oluşturarak bölündüğü gözlemlendi. Maya izolatlarının boyut ve şekillerinin birbirlerinden farklı olduğu görüldü. Küresel, oval, “apiculate” (sivri uçlu oval), uzun ve filamentöz (hifli) gibi farklı formlara sahip oldukları belirlendi. Ayrıca, bazı izolatlar “snowflakes” olarak adlandırılan, maya hücrelerinin birbirlerine tutunarak dallanan çoğalma şekli gösterdi. Tespit edilen farklı mikroskobik morfolojiler ile ilgili örnek fotoğraflar Şekil 4.3’te verildi.

Makroskobik morfolojilerin incelenmesi amacıyla izolatlar YPD, MEA ve PDA besiyerlerine ekilerek koloni yapılarının benzerlikleri ve farklılıkları kaydedildi. İzolatların besiyerlerine pasaj ekimlerini gösteren örnek fotoğraflar Şekil 4.4’te gösterildi. Yapılan inceleme sonucunda, Erzincan yöresine ait peynirden elde edilen izolatlarda üç farklı besiyerindeki koloni morfolojisi açısından farklılık gözlenmedi. Çatalca yöresine ait peynir örneğinden elde edilen

izolatlar koloni morfolojilerine göre iki farklı gruba ayrılırken, diğer kaynaklardan elde edilen izolatların üç farklı besiyerindeki koloni morfolojileri açısından daha çeşitli oldukları tespit edildi.



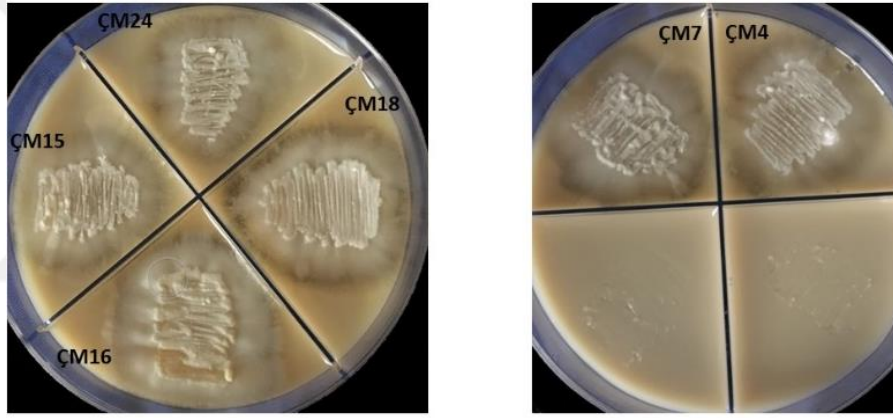
Şekil 4.3: İzolatların mikroskopik analizlerinde tespit edilen farklı morfolojik yapılar ile ilgili örnek fotoğraflar. **A)** Oval hücreler. **B)** Uzun ve filamentöz hücreler. **C)** Bir arada durarak tomurcuklanan hücrelerin oluşturduğu "Snowflakes" yapısı. Hücre fotoğrafları 40x objektif kullanılarak OLYMPUS BX53 mikroskobunda çekildi.



Şekil 4.4: İzolatların **(A)** YPD, **(B)** PDA ve **(C)** MEA besiyerlerine ekimlerini gösteren örnek fotoğraflar.

İzolatların galaktoz, gliserol, laktoz, maltoz ve sükroz olmak üzere beş farklı karbon kaynağındaki üreme durumları incelendi (EK 1). Hücrelerin üreme durumu; pozitif (+): üreme var, negatif (-): üreme yok veya zayıf (z): üreme az olarak değerlendirildi. Buna göre, izolatlar arasında farklı karbon kaynaklarının kullanımına göre yüksek oranda çeşitlilik gözlemlendi.

İzole edilen tüm mayaların hücre dışı proteaz, amilaz ve lipaz enzimlerini üretme potansiyelleri seçici besiyerleri ile analiz edildi. Buna göre, izolatlarda amilaz ve lipaz aktivitesi belirlenemezken, Çatalca yöresine ait manda sütünden elde edilen ÇM4, ÇM7, ÇM15, ÇM16, ÇM18, ÇM24 kodlu izolatlarda hücre dışı proteaz aktivitesi belirlendi. Şekil 4.5'te kazein-agar besiyerinde 28 °C'da 10 gün inkübe edilen izolatların üreme durumları ve proteolitik aktiviteye bağlı olarak petrilere oluşturdukları zonlar gösterildi.



Şekil 4.5: Proteaz aktivitesi gösteren ÇM4, ÇM7, ÇM15, ÇM16, ÇM18, ÇM24 kodlu izolatların kazein-agar besiyerinde 10 günlük inkübasyonu sonucu oluşturduğu zonlar.

4.4. SEÇİLEN MAYA İZOLATLARININ ENZİM PROFİLLERİ

Farklı karbon kaynaklarını kullanma özellikleri, farklı besiyerlerindeki koloni morfolojileri ve mikroskopik morfolojileri dikkate alınarak karşılaştırılmaları sonucunda enzim üretimi ve türü açısından farklılık gösterebilecek 12 tane maya izolatu çalışma için seçildi. Bunların arasından 8 tane izolatu API-ZYM testi ile belirlenen enzim aktivite değerleri Tablo 4.2'de verildi. Buna göre, seçilen maya izolatları arasında enzim üretimi açısından farklılıklar olduğu tespit edildi. İzolatlarda lipaz, tripsin, α -kimotripsin, α -galaktosidaz, β -glukuronidaz, N-asetil- β -glukozaminidaz, α -mannozidaz, α -fukozidaz üretimi belirlenmedi. Proteaz grubundan lösin arilamidaz enziminin tüm izolatlarda üretildiği; valin arilamidaz ve sistin arilamidaz

enzimlerinin ise sırası ile İ20, İ40, EP23, ÇM9, ÇP13 ve EP23, ÇP13 izolatlarında üretildiği gözlemlendi. β -galaktosidaz aktivitesi İ20 ve İ40; β -glukozidaz enzim aktivitesi Arm5 ve İ40; α -glukozidaz aktivitesi Arm4 ve ÇM7; alkalın fosfataz aktivitesi İ20, Arm5, EP23; esteraz aktivitesi İ20, Arm4, Arm5, EP23, ÇM7, ÇM9, ÇP13; esteraz lipaz aktivitesi Arm4, EP23, ÇM7; asit fosfataz ve naftol-AS-BI-fosfohidrolaz aktiviteleri İ20, İ40, EP23, ÇM9, ÇP13 kodlu izolatlarda tespit edildi.

Tablo 4.2: Seçilen maya izolatlarının API-ZYM test sonuçları.

İzolat	Enzimler																		
	Alkalın fosfataz	Esteraz	Esteraz lipaz	Lipaz	Lösün arilamidaz	Valin arilamidaz	Sistin arilamidaz	Tripsin	α -Kimotripsin	Asit fosfataz	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	α -galaktosidaz	β -galaktosidaz	β -glukuronidaz	α -glukosidaz	β -glukosidaz	N-asetil- β -glukozaminidaz	α -mannozidaz	α -fukozidaz
İ20	5	3	0	0	5	4	2	0	0	5	5	0	5	0	0	2	0	0	0
İ40	0	0	0	0	5	4	2	0	0	4	4	0	5	0	0	3	0	0	0
Arm4	0	4	3	0	5	1	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	0
Arm5	3	3	1	0	5	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	5	0	0	0
EP23	3	3	3	0	5	3	3	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0
ÇM7	0	3	3	0	5	1	1	0	0	2	2	0	0	0	5	0	0	0	0
ÇM9	0	4	1	0	5	3	2	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
ÇP13	0	4	2	0	5	4	4	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0

4.5. BELİRLİ ENZİMLERİN SEÇİLEN MAYA İZOLATLARINDAKİ ÜRETİM KAPASİTELERİ

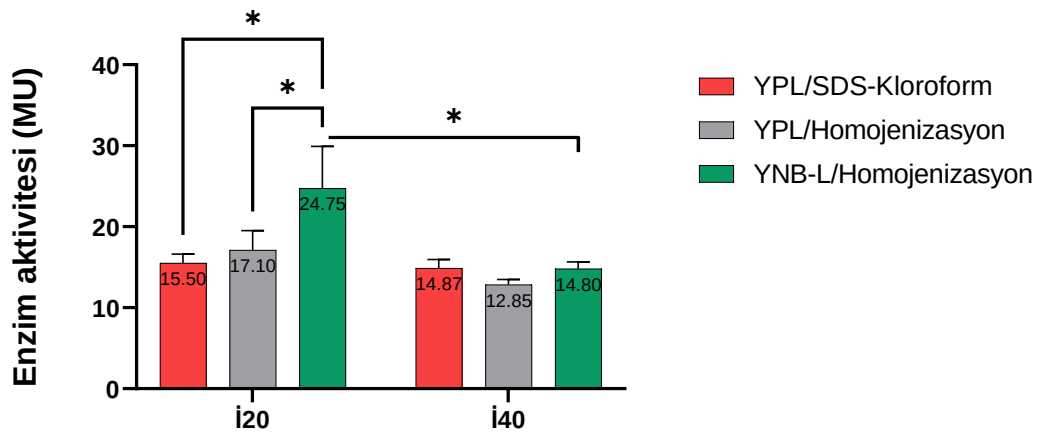
Gıda biyoteknolojisinde kullanım alanına sahip β -galaktosidaz, β -glukozidaz, lösin arilamidaz, asit fosfataz enzimlerinin aktiviteleri API-ZYM test sonuçlarına göre üretildikleri izolatlarda ayrı ayrı analiz edildi. Ek olarak, genel tarama sonuçlarına göre belirlenen hücre dışı proteaz enziminin seçilen maya izolatlarındaki üretim kapasiteleri de incelendi. Çalışma kapsamında aktiviteleri spektrofotometrik olarak analiz edilen enzimlerin isimlerini ve hangi maya izolatı tarafından üretildiklerini içeren liste Tablo 4.3'te verildi.

Tablo 4.3: Spektrofotometrik olarak analiz edilen enzimlerin ve üretildikleri maya izolatlarının isimleri.

Enzim	Üretildiği İzolat
β -galaktosidaz	İ20, İ40
β -glukozidaz	Arm5, İ40
Lösin arilamidaz	İ20, İ40, Arm5, Arm4, ÇM9, ÇP13, EP23
Asit fosfataz	İ20, İ40, EP23, ÇM9, ÇP13
Proteaz	ÇM4, ÇM7, ÇM15, ÇM16, ÇM24

4.5.1. β -galaktosidaz Aktivitesi

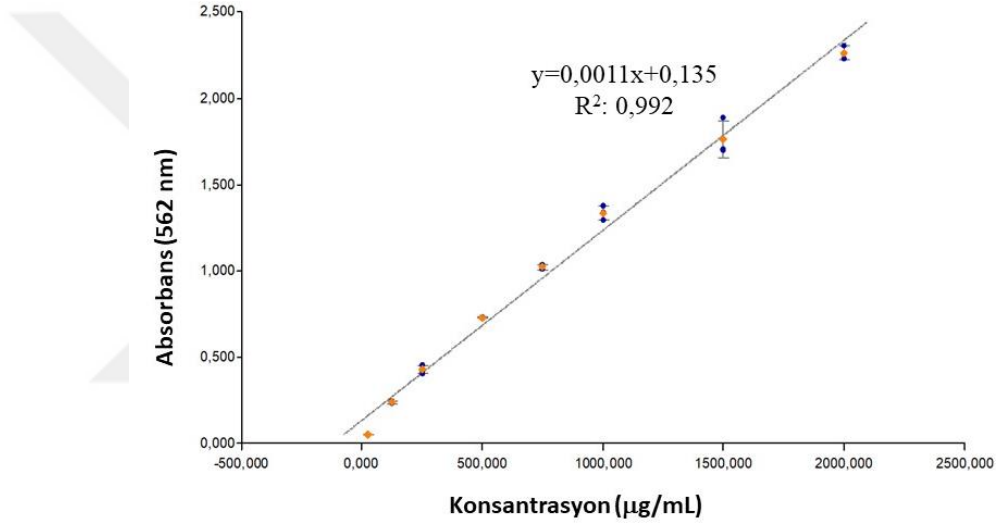
İ20 ve İ40 izolatlarının laktoz içeren YPL ve YNB-L besiyerlerinde ürettikleri β -galaktosidaz enziminin ONPG substratına karşı aktivitesinin spektrofotometrik analizleri sonucunda “Miller ünitesi” biçiminde hesaplanan enzim aktiviteleri Şekil 4.6’da verildi. YPL besiyerinde üretilen İ20 izolatında SDS/kloroform ve homojenizasyon yöntemleri ile belirlenen β -galaktosidaz aktiviteleri sırası ile 15.50 ve 17.10 MU’dır. İ20 izolatı YNB-L besiyerinde kültürlendiği zaman ise homojenizasyon yöntemi ile belirlenen β -galaktosidaz aktivitesinin 24.75 MU olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Gözlenen bu aktivite İ40 izolatının YPL/SDS-kloroform, YPL/homojenizasyon ve YNB-L/homojenizasyon örneklerinde gözlenen aktivitelere, sırası ile 14.87, 12.85 ve 14.80 MU, göre de istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ancak, YNB-L besiyerinde üretilen hücrelerde enzim aktivitesi SDS/kloroform yöntemi ile belirlenemedi.



Şekil 4.6: β -galaktosidaz aktivitesinin spektrofotometrik analizi. Karbon kaynağı olarak laktoz içeren YPL ve YNB-L besiyerleri kullanıldı. Enzim aktivitesi SDS/kloroform ve homojenizasyon olmak üzere iki farklı yöntem ile analiz edildi. **MU:** Miller ünitesi. (Sidak’s test, *: $P < 0.05$).

4.5.2. β -glukozidaz Aktivitesi

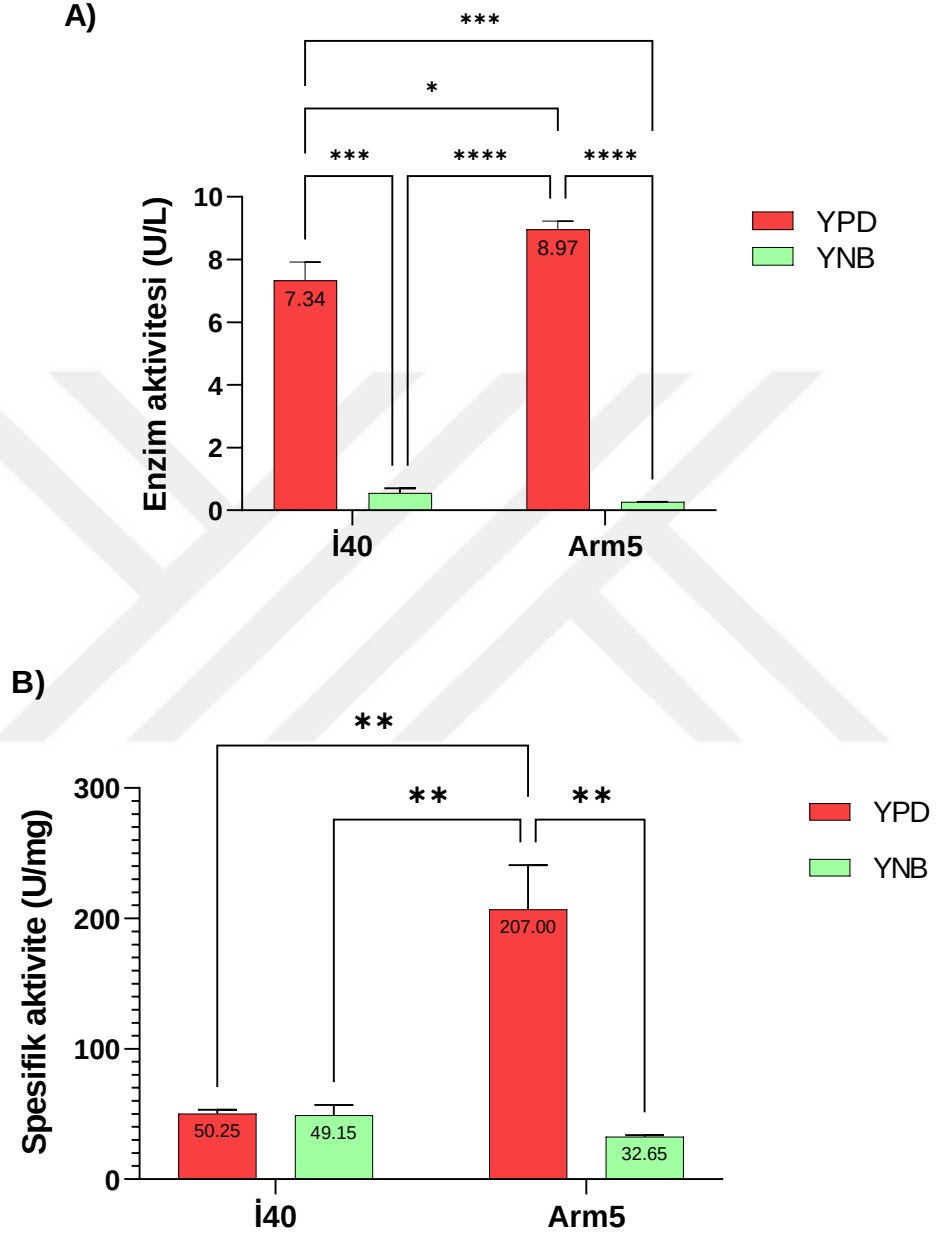
İ40 ve Arm5 izolatlarının β -glukozidaz aktivitelerinin spektrofotometrik analizleri için ilk olarak, YPD ve YNBGlç besiyerlerindeki 24 saatlik kültürlerinden protein izolasyonu gerçekleştirildi. Sığır serum albümin standart proteininin sulandırım serileri ile elde edilen standart grafiği ve doğru denklemi Şekil 4.7’de verildi. Doğru denklemi kullanılarak ham ekstrelerin içerdiği total protein konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 4.7: Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için sığır serum albümine göre hazırlanan standart grafiği.

Ham ekstrelerde belirlenen β -glukozidaz enzim aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri Şekil 4.8’de verildi. YPD besiyerinde üretilen hücreler karşılaştırıldığında enzim aktivitesinin Arm5 izolatında İ40 izolatına göre daha yüksek olduğu görüldü. YPD besiyerinde üretilen İ40 ve Arm5 izolatlarının β -glukozidaz aktiviteleri sırası ile 7.34 U/L ve 8.98 U/L olarak belirlendi. Ayrıca, bu aktivitelerin her iki izolat için YNBGlç besiyerinde gözlenen enzim aktivitelerine göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, İ40 izolatının β -glukozidaz için spesifik aktivitesi besiyerine bağlı olarak değişmedi ve YPD besiyerinde 50.25 U/mg ve YNB besiyerinde 49.15 U/mg olarak belirlendi. YPD besiyerinde kültürlenmiş Arm5 izolatında ise spesifik aktivite 207.00 U/mg bulundu. Bu değer, hem YNBGlç besiyerinde

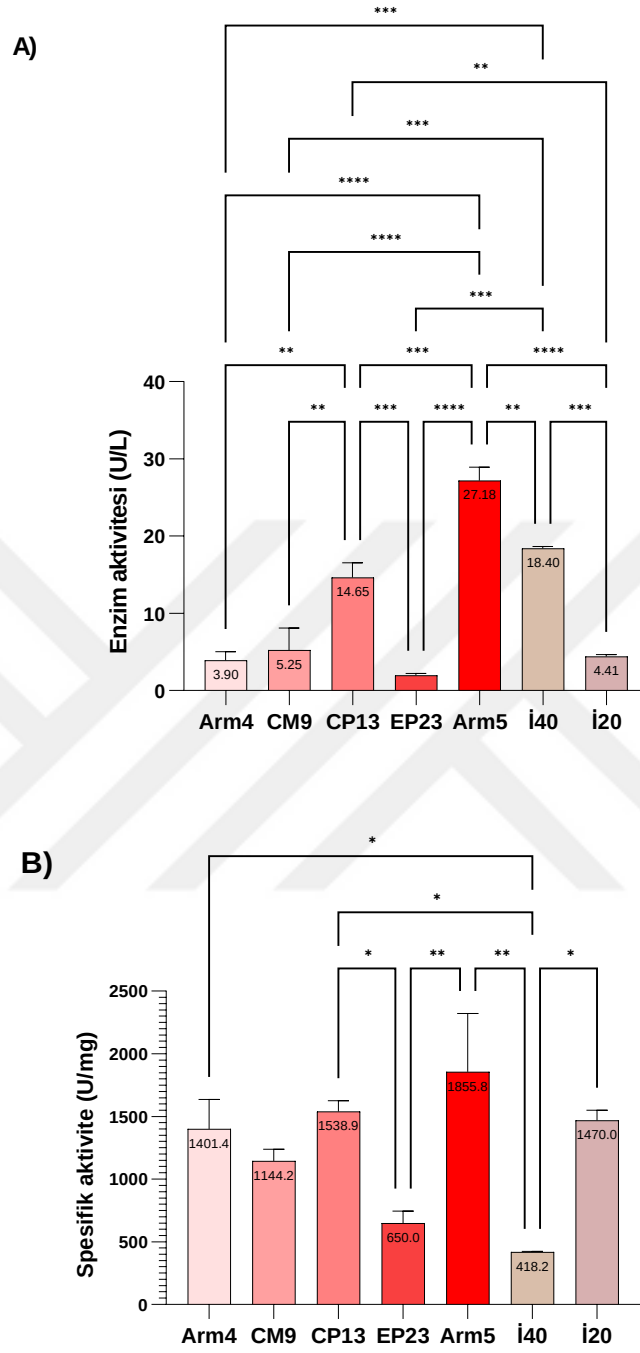
kültürlenen Arm5'te belirlenen 32.65 U/mg spesifik aktiviteye hem de İ40 izolatında her iki besiyerinde belirlenen spesifik aktivitelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti.



Şekil 4.8: β -glukozidaz enzim aktivitesi. **A)** Enzim aktivitesi (U/L), **B)** Spesifik aktivite (U/mg). Bir ünite enzim (U) bir dakikada 1 μ mol pNP açığa çıkaran enzim miktarı olarak hesaplandı. (Sidak's test, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$).

4.5.3. Lösin Arilamidaz Aktivitesi

Lösin arilamidaz aktivitesinin belirlenmesi için, 24 saat YPD besiyerinde üretilen yedi izolat (Arm4, ÇM9, ÇP13, EP23, Arm5, İ40, İ20) protein izole edilerek ham ekstratların içerdiği total protein konsantrasyonu Şekil 4.7’de verilen doğru denklemi ile hesaplandı. Bu koşullarda izolatların ürettiği lösin arilamidaz enziminin L-Leu-p-NA substratına karşı aktivitesi şu şekildedir: Arm4: 3.90 U/L, ÇM9: 5.25 U/L, ÇP13: 14.65 U/L, EP23: 1.95 U/L, Arm5: 27.18 U/L, İ40: 18.40 U/L, İ20: 4.41 U/L (Şekil 4.9A). Buna göre, tüm izolatlar arasında en yüksek lösin arilamidaz aktivitesine sahip olan izolatın Arm5 olduğu tespit edildi. ÇP13 ve İ40 izolatlarının lösin arilamidaz aktiviteleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken, bu iki izolatın enzim aktivitesinin Arm4, ÇM9, EP23 ve İ20 izolatların aktivitesine göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlendi. Spesifik aktivite sonuçları Şekil 4.9B’de verildi. İzolatların ürettiği lösin arilamidaz enzimi için spesifik aktivite değerleri; Arm4: 1401.4 U/mg, ÇM9: 1144.2 U/mg, ÇP13: 1538.9 U/mg, EP23: 650 U/mg, Arm5: 1855.8 U/mg, İ40: 418.2 U/mg, İ20: 1470.0 U/mg olarak hesaplandı. İ40 izolatının en düşük spesifik aktivite değerine sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, Arm4, ÇP13, Arm5 ve İ20 izolatlarının spesifik aktivitesi İ40’ta gözlenen spesifik aktiviteye göre anlamlı derecede daha yüksekti. EP23 izolatının spesifik aktivitesinin de diğer izolatlarla kıyasla daha düşük olduğu gözlemlendi. Ancak bu fark sadece ÇP13 ve Arm5 izolatlarında belirlenen spesifik aktiviteye göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

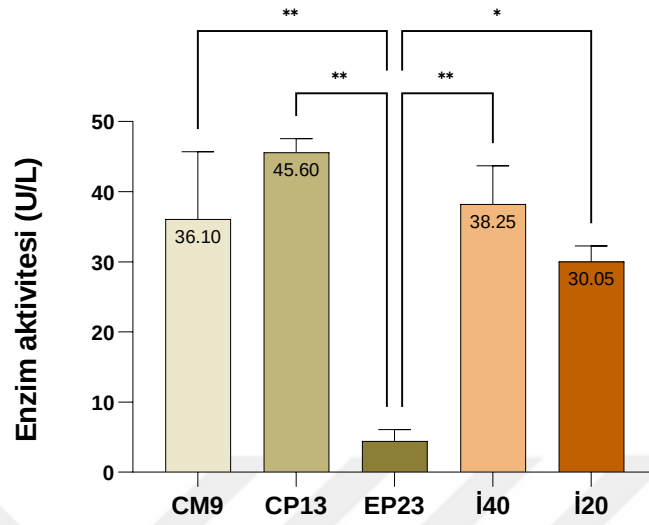


Şekil 4.9: Lösin arilamidaz enzim aktivitesi. **A)** Enzim aktivitesi (U/L), **B)** Spesifik aktivite (U/mg). Bir ünite enzim (U) bir dakikada 1 μ mol p-NA açığa çıkaran enzim miktarı olarak hesaplandı. (Tukey's test, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$).

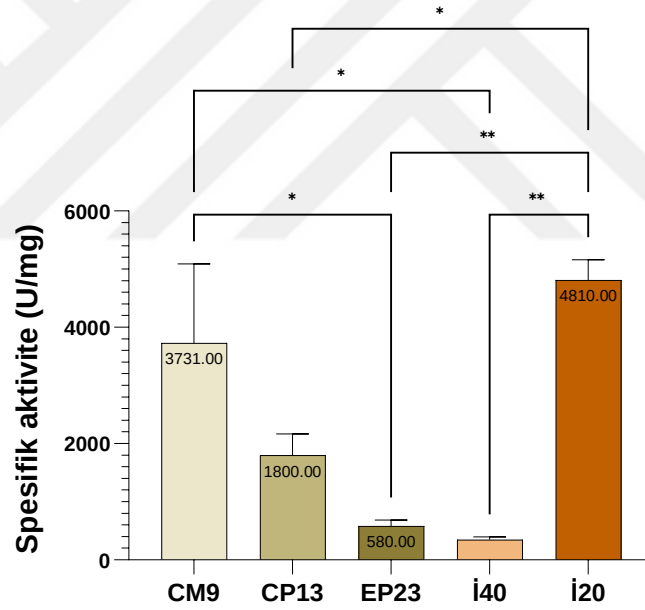
4.5.4. Asit Fosfataz Aktivitesi

YPD besiyerinde 24 saat üretilen ÇM9, ÇP13, EP23, İ20 ve İ40 izolatlarının ürettiği asit fosfataz enziminin p-NPP substratına karşı aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri hesaplandı (Şekil 4.10). EP23 izolatının asit fosfataz aktivitesi 4.45 U/L olarak belirlendi ve bu aktivitenin diğer dört izolatın enzim aktivitesinden anlamlı derecede daha düşük olduğu gözlemlendi. ÇM9, ÇP13, İ40 ve İ20 izolatlarının asit fosfataz aktivitelerinin ise sırası ile 36.10 U/L, 45.6 U/L, 38.25 U/L ve 30.05 U/L olduğu bulundu (Şekil 4.10A). Spesifik aktivite sonuçları ise; ÇM9: 3731.00 U/mg, ÇP13: 1800.00 U/mg, EP23: 580.00 U/mg, İ40: 347.00 U/mg ve İ20: 4810.00 U/mg olacak şekilde belirlendi. Buna göre, İ20 izolatının asit fosfataz enzimi açısından en yüksek spesifik aktiviteye İ40 izolatının ise en düşük spesifik aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, İ20 ve ÇM9 izolatlarında belirlenen spesifik aktiviteler hem EP23 hem de İ40 izolatlarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bunun yanı sıra, İ20 izolatında görülen spesifik aktivitenin ÇP13 izolatındaki aktiviteden de anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.10B).

A)



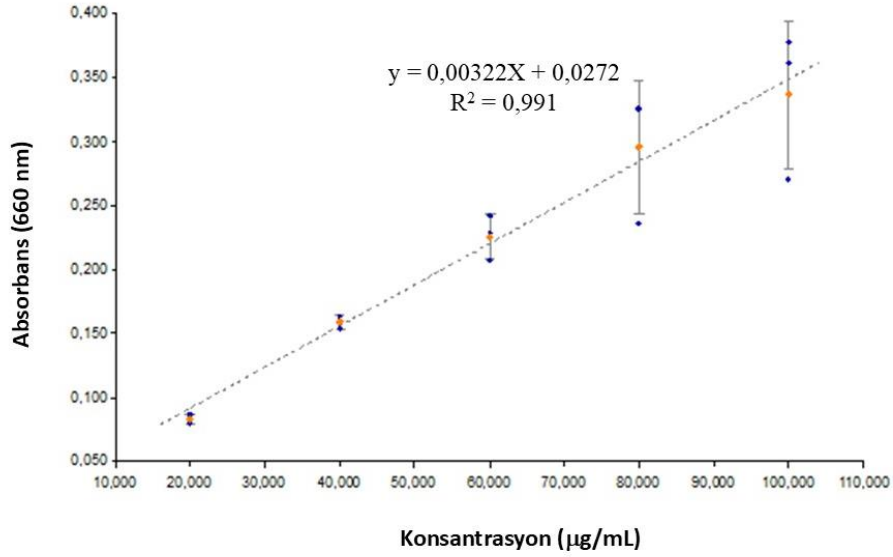
B)



Şekil 4.10: Asit fosfataz enzim aktivitesi. **A)** Enzim aktivitesi (U/L), **B)** Spesifik aktivite (U/mg). Bir ünite enzim (U) bir dakikada 1 μ mol p-NP açığa çıkaran enzim miktarı olarak hesaplandı. (Tukey's test, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

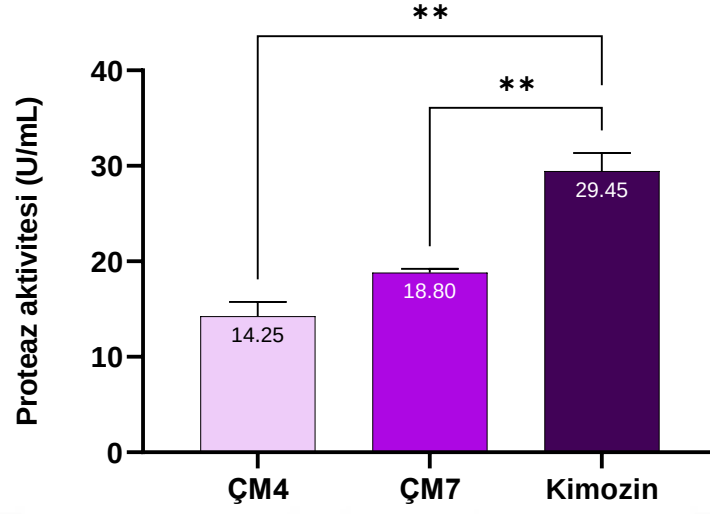
4.5.5. Proteaz Aktivitesi

ÇM4 ve ÇM7 izolatlarının kazein-agar besiyerinde oluşturduğu zonlardan elde edilen protein örneklerinin ve ticari peynir mayası içerisinde bulunan enzim(ler)in kazein substratına karşı proteolitik aktiviteleri analiz edildi. ÇM15, ÇM16 ve ÇM24 kodlu izolatlar ön denemeler sonucunda elendi ve çalışmaya ÇM4 ve ÇM7 izolatları ile devam edildi. Enzim aktivitelerinin hesaplanması için tirozin aminoasidinin sulandırım serileri ile elde edilen standart grafiği ve doğru denklemi Şekil 4.11’de verildi.



Şekil 4.11: Tirozin aminoasidine göre hazırlanan standart grafiği.

Standart grafiğinden elde edilen doğrusal denklem baz alınarak örneklerin kazein substratı ile reaksiyonu sonucunda açığa çıkan tirozin bakiye miktarları hesaplandı ve Denklem 3.4’te yerine koyularak proteaz aktiviteleri hesaplandı. Buna göre, agar zonlardan elde edilen ham özütlerinde ÇM4 proteaz aktivitesinin 14.25 U/mL ve ÇM7 proteaz aktivitesinin 18.80 U/mL olduğu belirlendi. Buna göre, izolatların proteaz aktiviteleri benzerdi. Ticari peynir mayası içerisindeki kimozin enziminin aktivitesi ise 29.45 U/mL değerinde idi. Bu değer, izolatlarda gözlenen aktiviteye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Proteaz aktivitesi. (Tukey's test, **: $P < 0,01$).

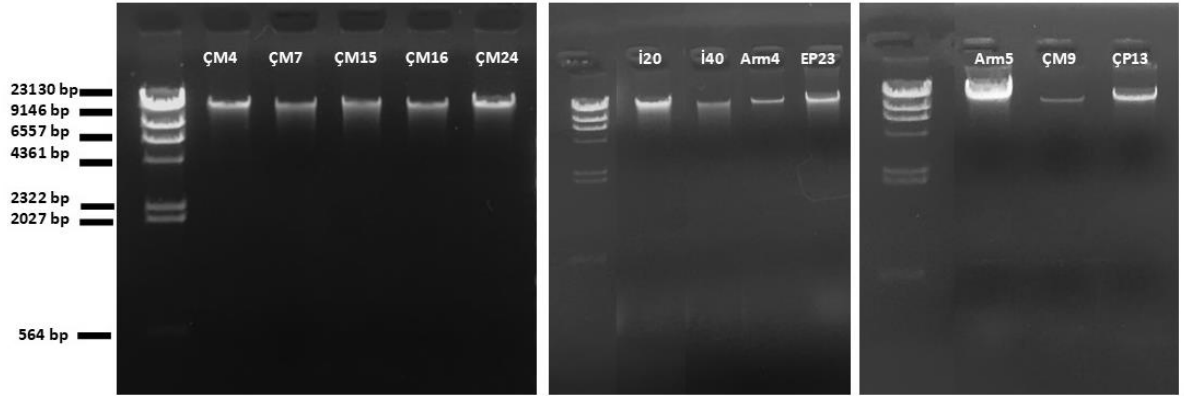
4.6. TÜR TAYİNİ VE KARAKTERİZASYON

4.6.1. gDNA Analizleri

Çalışmanın amacına uygun olarak enzimlerin analizlerinde kullanılmak üzere seçilen maya izolatlarının türlerinin tayin edilmesi için, ilk olarak gDNA'ları izole edildi ve analizleri yapıldı. İzole edilen genomik DNA'lara ait spektrofotometrik veriler Tablo 4.4'te, jel elektroforezi sonuçları Şekil 4.13'te verildi. DNA konsantrasyonları değişiklik göstermekle birlikte, A_{260}/A_{280} saflık dereceleri 1,80-1,95 aralığında belirlendi. DNA bantlarının kırılmadan yüksek kalitede izole edildiği gözlemlendi.

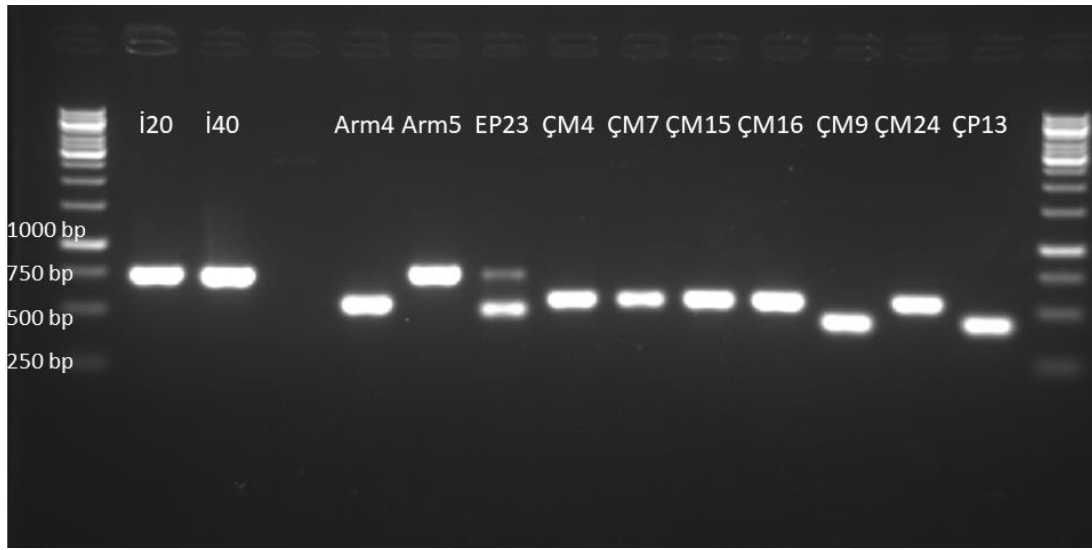
Tablo 4.4: Genomik DNA'ların spektrofotometrik analizi.

İzolat	DNA konsantrasyonu (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
İ20	6687,7	1,95
İ40	4511,4	1,94
Arm4	1259,4	1,91
Arm5	2308,1	1,94
EP23	1928,2	1,92
ÇM4	819,7	1,80
ÇM7	1584,6	1,89
ÇM15	767,9	1,88
ÇM16	501,4	1,80
ÇM9	320,6	1,86
ÇM24	1097,6	1,94
ÇP13	969,9	1,90

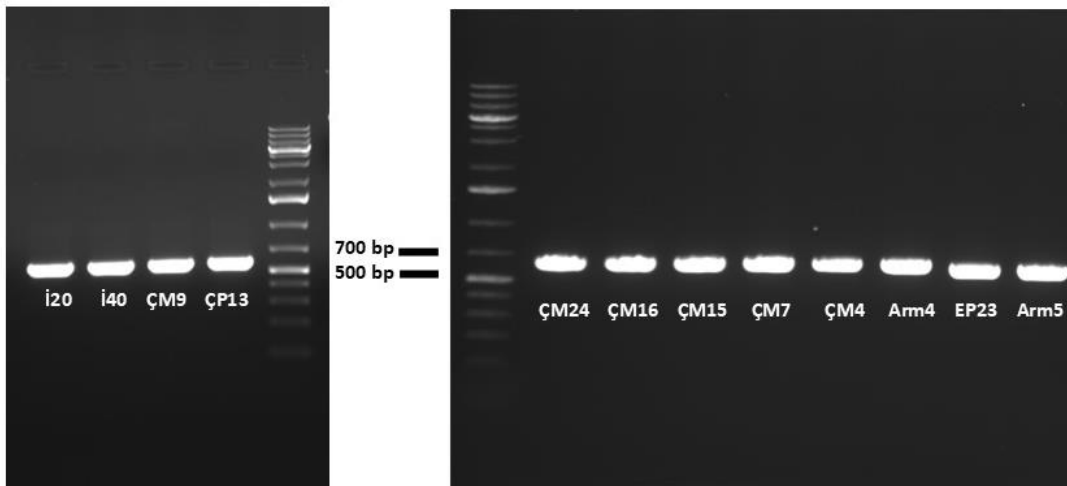
**Şekil 4.13:** Genomik DNA'ların elektroforetik analizi. DNA marker: "Lambda DNA/HindIII Marker".

4.6.2. Barkod Dizilerin Çoğaltılması

PZR ile çoğaltılan ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ve D1/D2 bölgelerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verildi. İzolatların ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgelerinin baz çifti uzunluklarının farklı olduğu ve 450-750 bp arasında dağılım gösterdiği gözlemlendi. D1/D2 alanlarına ait çoğaltım ürünleri standart DNA molekülü ile karşılaştırıldığında 500-700 bp bantları arasında belirlendi.

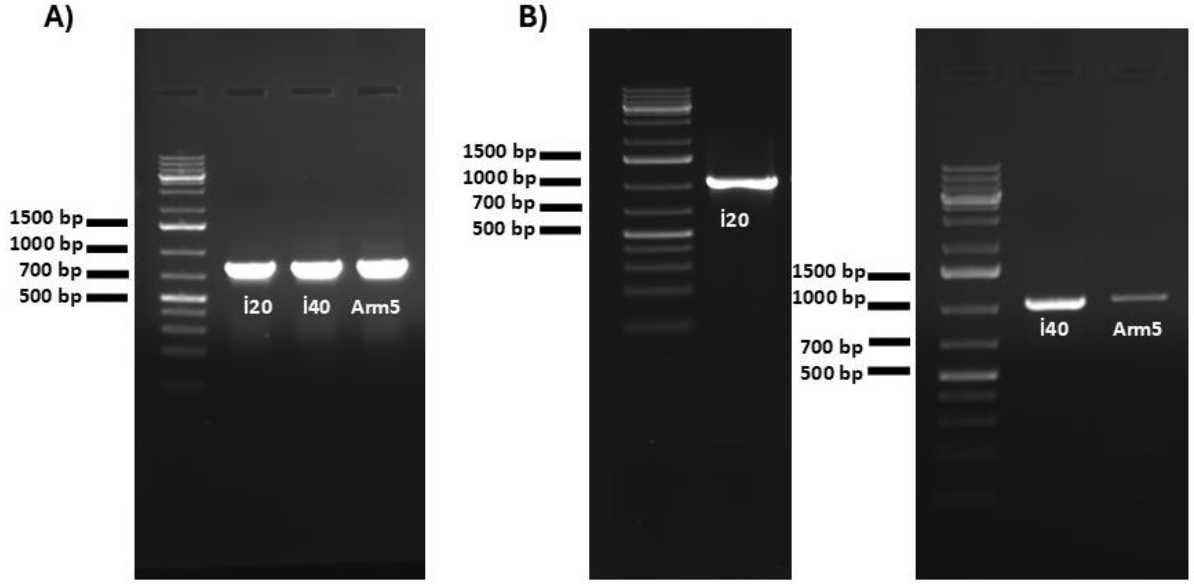


Şekil 4.14: PZR ile çoğaltılan ITS1-5SrDNA-ITS2 bölgelerinin elektroforetik analizi. DNA marker: “GeneRuler 1 kb DNA Ladder”.



Şekil 4.15: PZR ile çoğaltılan D1/D2 alanlarının elektroforetik analizi. DNA Marker: “GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder”.

İ20, İ40 ve Arm5 kodlu izolatların moleküler tür tanısı için ek olarak *tef1* ve *act1* gen dizileri bu genlere özgü primerler (Tablo 3.7) kullanılarak çoğaltıldı. PZR ürünlerine ait elektroforetik analiz sonuçları Şekil 4.16’da verildi. Buna göre, *tef1* gen bölgesinin 700-1000 bp uzunluğundaki DNA fragmentlerine karşılık geldiği, *act1* gen bölgesinin ise ~1000 bp boyutunda olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.16: PZR ile çoğaltılan *tef1* (A) ve *act1* (B) gen bölgelerinin elektroforetik analizi. DNA Marker: “GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder”.

4.6.3. Tür Tanı Sonuçları

Barkod dizilerin PZR ürünleri dizileme hizmeti alınarak Tablo 3.7’de verilen her bölgeye özgü ileri ve geri primerler ile çift yönlü dizilendi. Dizileme sonuçları BLAST veri tabanında karşılaştırmalı analiz için kullanıldı ve 12 tane maya izolatının hangi türe ait olduğu ~%98 olasılıkla belirlendi (Tablo 4.5). İzolatların ITS1-5.8s rRNA-ITS2 ve D1/D2 nükleotit dizilerinin GenBank veri bankasındaki erişim numaraları da Tablo 4.5’te verildi. Bu sonuçlara göre, maya izolatlarının *Kluyveromyces* spp. (İ20, İ40), *Cutaneotrichosporon curvatum* (Arm4), *Hanseniaspora* spp. (Arm5), *Pichia membranifaciens* (EP23), *Trichosporon inkin* (ÇM4, ÇM 7, ÇM15, ÇM16, ÇM24), *Wickerhamiella pararugosa* (ÇM9, ÇP13) tür/genuslarına ait olduğu belirlendi. Ayrıca, seçilen izolatların tür tanımlaması için API 20C testi de uygulandı. Moleküler dizi analizlerine göre benzer tür olarak tespit edilen izolatların API 20C test sonuçlarının da aynı olduğu gözlemlendi. Buna göre, İ20 ve İ40 izolatların %99.9 benzerlik oranında *K. marxianus*’un sinonimi olan *Candida kefyr* olabileceği sonucuna varıldı. Benzer şekilde *W. pararugosa* türünde olduğu belirlenen ÇM9 ve ÇP13 izolatlarının, bu tür ile sinonim kabul edilen *Candida rugosa* ile yüksek benzerlik gösterdiği saptandı. Ayrıca Arm5 izolatının

Hanseniaspora spp. ile sinonim olan *Kloeckera* spp. genusunda, ÇM4-7-15-16-24 izolatlarının her iki analiz türü ile *Trichosporon* genusunda olduğu sonucuna varıldı.

Tablo 4.5: Seçilen maya izolatlarının ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ile D1/D2 bölgeleri dizi homolojileri ve API-20C testine göre tanımlanan türleri, benzerlik oranları ve GenBank erişim numaraları.

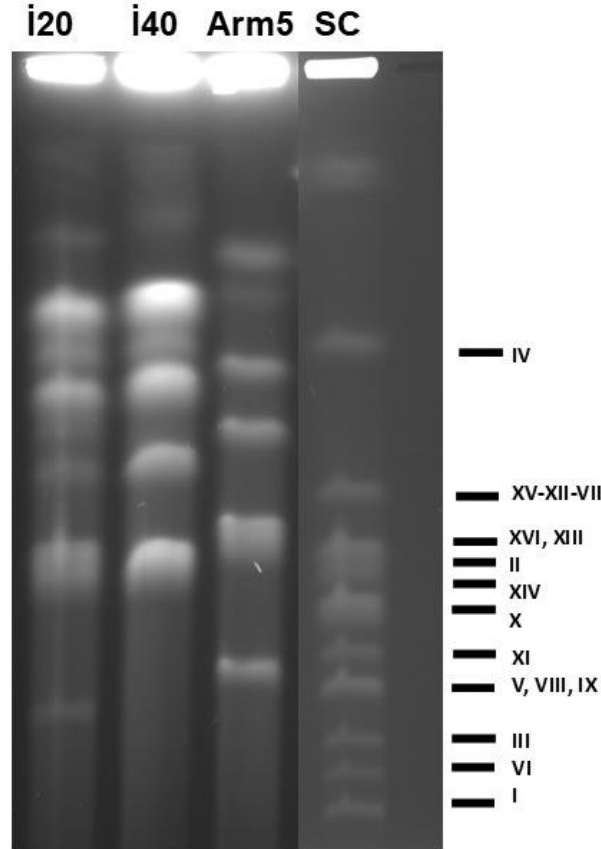
Suş kodu (İzolat)	ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (Erişim numarası) (Bit skor) ("Query cover") (% benzerlik)	D1/D2 (Erişim numarası) (Bit skor) ("Query cover") (% benzerlik)	API 20C AUX (% benzerlik)
BKC20 (İ20)	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (OP881439) (1158) (%94) (%99,84)	<i>Kluyveromyces</i> spp. (PQ839639) (%100)	<i>Candida kefyr</i> (99.9%)
BKC40 (İ40)	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (OP881440) (1016) (%93) (%99,64)	<i>Kluyveromyces</i> spp. (PQ839640) (%100)	<i>Candida kefyr</i> (99.9%)
BKAWB4 (Arm4)	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i> (OP881441) (941) (%100) (%99,61)	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i> (PQ839641) (1013) (%100) (%98,6)	<i>Cryptococcus laurenti</i> (72.8%)
BKAWB5 (Arm5)	<i>Hanseniaspora</i> spp. (OP881442) (%100)	<i>Hanseniaspora</i> spp. (PQ839642) (%100)	<i>Kloeckera</i> spp. (99.9%)
BKEC23 (EP23)	<i>Pichia membranifaciens</i> (OP881445) (809) (%100) (%99,33)	<i>Pichia membranifaciens</i> (PQ839645) (1050) (%98) (%99,82)	<i>Candida</i> <i>krusei/inconspicua</i> (33.2%)
BKCWB4 (ÇM4)	<i>Trichosporon inkin</i> (OP800200) (941) (%100) (%99,42)	<i>Trichosporon inkin</i> (PQ839646) (1037) (%100) (%99,3)	<i>Trichosporon asahii</i> (99.1%)
BKCWB7 (ÇM7)	<i>Trichosporon inkin</i> (OP881446) (941) (%100) (%99,42)	<i>Trichosporon inkin</i> (PQ839647) (1099) (%100) (%99,34)	<i>Trichosporon asahii</i> (99.1%)
BKCWB15 (ÇM15)	<i>Trichosporon inkin</i> (OP881447) (941) (%100) (%99,42)	<i>Trichosporon inkin</i> (PQ839648) (1053) (%100) (%99,31)	<i>Trichosporon asahii</i> (99.1%)
BKCWB16 (ÇM16)	<i>Trichosporon inkin</i> (OP881448) (941) (%100) (%99,42)	<i>Trichosporon inkin</i> (PQ839649) (1081) (%100) (%99,33)	<i>Trichosporon asahii</i> (99.1%)
BKCWB9 (ÇM9)	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> (OP881444) (702) (%100) (%97,35)	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> (PQ839644) (926) (%100) (%98,84)	<i>Candida rugosa</i> (91.1%)
BKCWB24 (ÇM24)	<i>Trichosporon inkin</i> (OP881449) (941) (%100) (%99,42)	<i>Trichosporon inkin</i> (PQ839650) (966) (%100) (%99,25)	<i>Trichosporon asahii</i> (99.1%)
BKCC13 (ÇP13)	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> (OP881443) (645) (%100) (%96,68)	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> (PQ839643) (769) (%100) (%100)	<i>Candida rugosa</i> (83.7%) <i>Candida boidinii</i> (15.6%)

*Verilen benzerlik analizi sonuçlarının tümünde E değeri sıfır (0)'dır.

İ20, İ40 ve Arm5 izolatlarının *tef1* gen dizilerinin BLAST analizi sonuçları değerlendirildiğinde, İ20 ve İ40 izolatlarının ITS1-5.8SrDNA-ITS2 dizi benzerliği ve API-20C test sonuçlarına uyumlu şekilde %99,86 olasılıkla *K. marxianus* türünde olduğu belirlendi. Arm5 kodlu maya izolatının ise %99,83 benzerlik oranı ile *Hanseniaspora uvarum* türüne ait olduğu saptandı.

4.6.4. Elektroforetik Karyotipleme

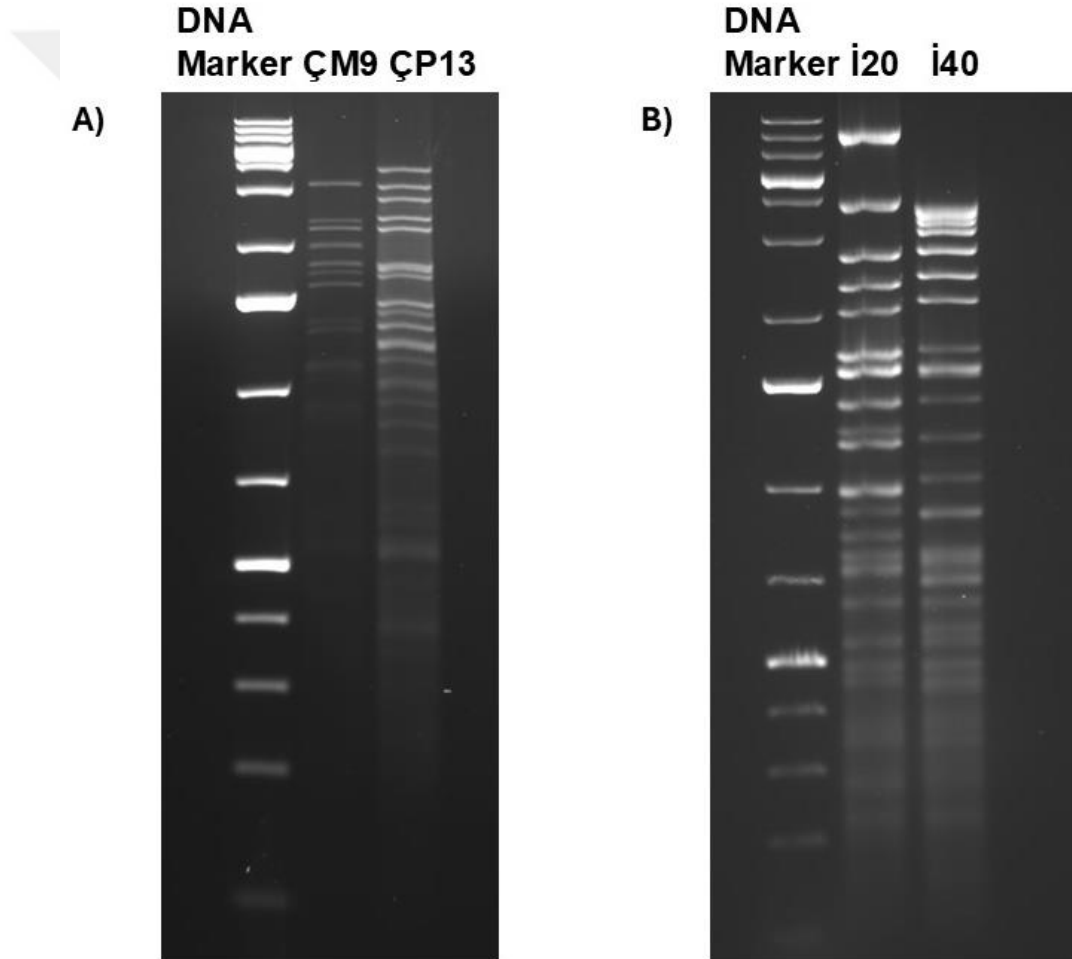
Çalışmada kullanılan tüm izolatların karyotipleri elektroforetik olarak analiz edildi, ancak yalnızca İ20, İ40 ve Arm5 izolatlarının karyotipleri net olarak elde edildi (Şekil 4.17). Buna göre, *K. marxianus* İ20 ve *K. marxianus* İ40 suşlarının kromozom profilleri benzerdi. Bu suşlarda 900-1500 kb aralığında dört bant, 1500 kb'den daha büyük uzunlukta bir bant olmak üzere toplam beş tane kromozomal DNA bandı ayrıldı. Farklı olarak, *K. marxianus* İ20 suşunda ek bir küçük bant (316-576 kb aralığında) gözlemlendi. *H. uvarum* Arm5 suşunun karyotip profilinde ise altı bant görüldü. Bu bantların dört tanesinin boyutları 576-1500 kb aralığında iken, kalan iki tanesinin boyutu 1500 kb'den daha büyük bulundu.



Şekil 4.17: İ20, İ40 ve Arm5 suşlarının elektroforetik karyotipleri. *S. cerevisiae* (SC) kromozomlarının numaralandırılması sağ tarafta gösterilmiştir: **I:** 230.218 bç, **VI:** 270.161 bç, **III:** 316.620 bç, **IX:** 439.888 bç, **VIII:** 562.643 bç, **V:** 576.874 bç, **XI:** 666.816 bç, **X:** 745.751 bç, **XIV:** 784.333 bç, **II:** 813.184 bç, **XVI:** 948.066 bç, **XIII:** 924.431 bç, **XV:** 1.091.291 bç, **XII:** 1.078.177 bç, **VII:** 1.090.940 bç, **IV:** 1.531.933 bç.

4.6.5. Mitokondriyal RFLP

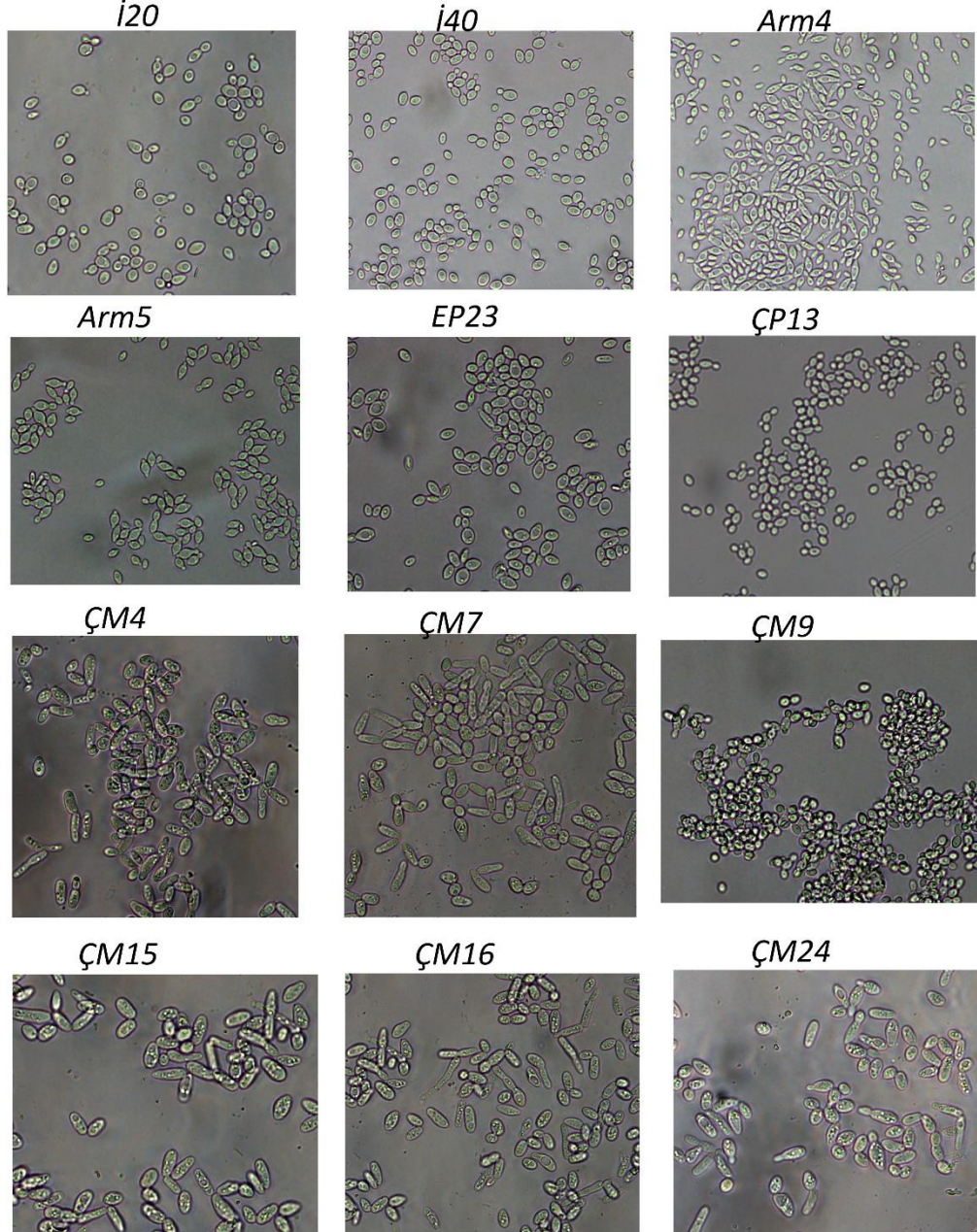
K. marxianus İ20 ve *K. marxianus* İ40 suşları ile *W. pararugosa* ÇM9 ve *W. pararugosa* ÇP13 suşlarının mtDNA'larının RFLP motifleri karşılaştırıldı. Her iki karşılaştırma grubunda da izolatların mtDNA RFLP paternlerinin birbirlerinden farklı olduğu gözlemlendi. İzole edilen mtDNA'ların *MboI* restriksiyon enzimi ile kesimi, *W. pararugosa* ÇM9 ve *W. pararugosa* ÇP13 arasında özellikle 1 kb'den büyük bantlar arasında çeşitliliği gösterdi (Şekil 4.18A). *K. marxianus* İ20 ve *K. marxianus* İ40 izolatlarının mtDNA paternlerinin ise 500 bp'den daha büyük bantlar arasında farklılaştığı görüldü (Şekil 4.18B).



Şekil 4.18: *MboI* restriksiyon endonükleazı ile kesilen mitokondriyal DNA'ların RFLP motifleri. **A)** ÇM9/ÇP13 (*W. pararugosa*), **B)** İ20/İ40 (*K. marxianus*).

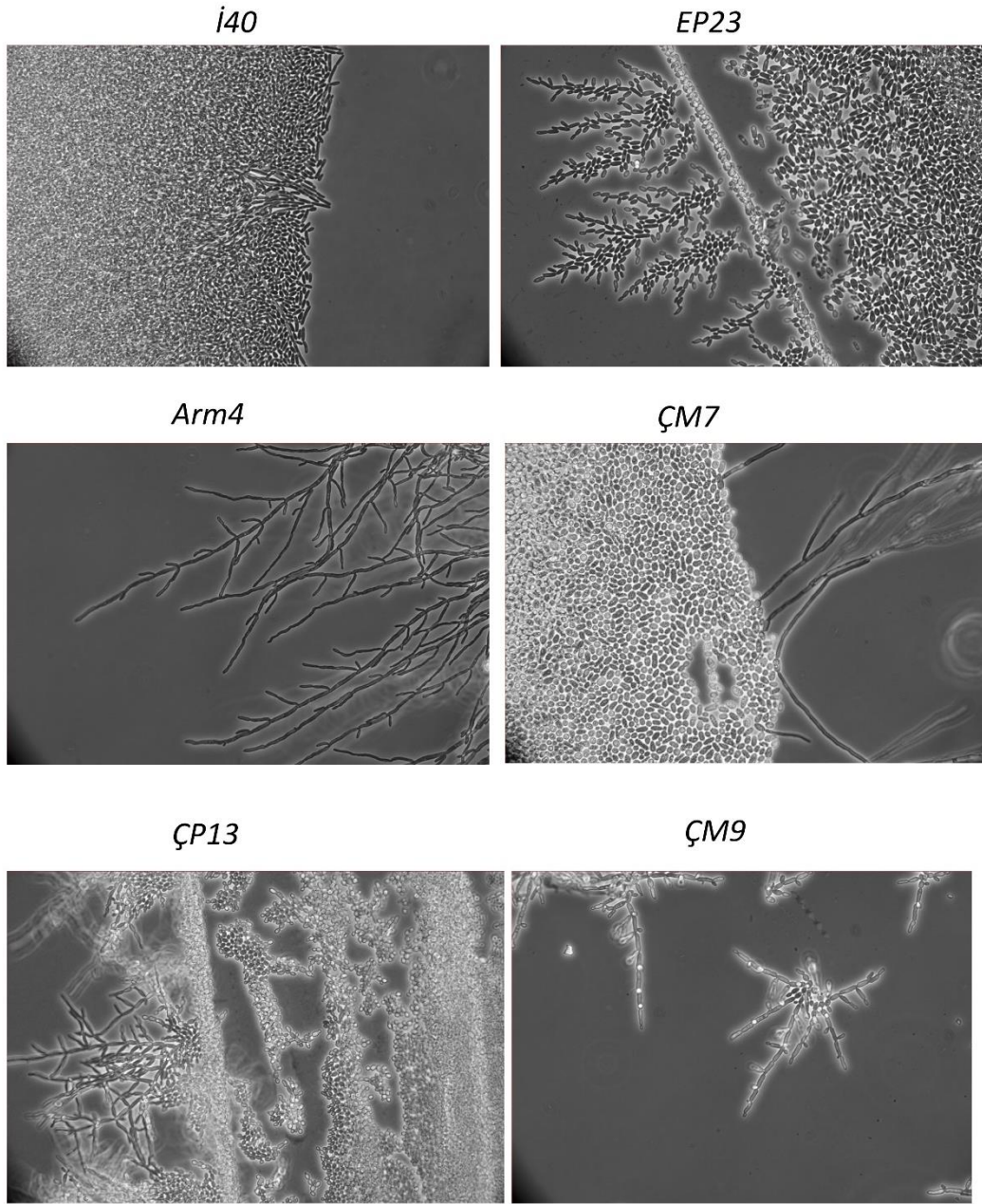
4.6.6. Morfolojik Karakterizasyon

Sıvı YPD besiyerinde üretilen hücrelerden mikroskobik preparatlar hazırlanarak morfolojik yapıları incelendi. Şekil 4.19’da maya izolatlarının boyut ve şekil bakımından birbirlerinden oldukça farklı hücre yapıları görülmektedir.



Şekil 4.19: Sıvı YPD üretilen 12 maya suşunun mikroskobik morfolojisi. Hücreler 40x objektif altında gözlendi.

Mayadan miselyal forma dimorfik geçişin mikroskopik inceleme sonuçları şekil 4.20’de verildi. Buna göre, farklı türlerin farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu tespit edildi. İ40 (*K. marxianus*) hücrelerinde dimorfik geçiş olmadığı görüldü. Bazı hücrelerde uzama görüldü ancak uzayan hücrelerin birbirine bağlı olmadığı tespit edildi. EP23 (*P. membranifaciensis*) izolatlarında ise gevşek şekilde bağlı hücrelerin oluşturduğu psdohifler görülürken, Arm4 (*C. curvatum*)’te çok daha sağlam yapıda psdohifler oluştuğu gözlendi. Septalı hifler sadece M7 (*T. inkin*) izolatında görüldü. Hiflerin maya hücrelerinden, hatta bazen maya hücresinin her iki ucundan dışarı doğru uzadığı belirlendi. Aynı türde olan P13 ve M9 (*W. pararugosa*) izolatlarında ise daha yumuşak yüzeyle nüfuz etmek veya yüzeyde film (pellikl) oluşturmak için uygun tipte psödohif oluşumu gözlendi. Arm5 (*H. uvarum*) hücrelerinde sadece maya tipi büyüme belirlendi.



Şekil 4.20: İnce bir YEA filminde üreyen hücrelerin morfolojik incelemesi.

4.6.7. Maya İzolatlarının Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarını Asimilasyon Profilleri

Maya suşlarının farklı karbon kaynaklarındaki üreme durumları Tablo 4.6 'da verildi. Sonuçlar, “Westerdijk Fungal Biodiversity Institute” tarafından oluşturulan veri bankasında (“Fungal&yeast collection”, CBS) depolanan aynı türlere ait tip suşlarının üreme profilleri ile karşılaştırıldı. Hücrelerin üreme durumu; pozitif (+): üreme var, negatif (-): üreme yok veya zayıf (z): üreme az olarak değerlendirildi. Buna göre, *T. inkin* (ÇM4, ÇM7, ÇM15, ÇM16, ÇM24) ve *C. curvatum* (Arm4) suşları test edilen tüm karbon kaynaklarında üreme gösterdi. Sükrozdaki üreme durumu Arm4 suşunda tip suşa göre farklılık gösterdi. Öte yandan, *K. marxianus*'un iki suşu İ20 ve İ40 ile *W. pararugosa* türündeki iki suş ÇM9 ve ÇP13 ve *P. membranifaciens* EP23, galaktoz, sükroz, laktozda büyüyebilirken gliserol ve maltozda zayıf üreme gösterdi. Bu sonuçların tip suşların üreme durumlarından farklı olduğu tespit edildi. *H. uvarum* türündeki Arm5 suşu ise glukoz dışında yalnızca sükrozda pozitif üreme gösterirdi. Ancak *H. uvarum* tip suşunun sükrozda üremediği not edildi.

Tablo 4.6: Seçilen maya suşlarının farklı karbon kaynaklarını asimilasyonunun değerlendirilmesi. (+): üreme var, (-): üreme yok, (z): zayıf üreme.

Tür adı	İzolat	Karbon kaynakları					
		Glukoz	Galaktoz	Sükroz	Laktoz	Gliserol	Maltoz
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	İ20	+	+	+	+	z	z
	İ40	+	+	+	+	z	z
	CBS 712	+	+	+	+	+	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Arm5	+	-	+	-	-	z
	CBS 314	+	-	-	-	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	EP23	+	+	+	+	z	z
	CBS 107	+	-	-	-	+	-
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	ÇM9	+	+	+	+	z	z
	ÇP13	+	+	+	+	z	z
	CBS 1010	+	+	z	-	z	-
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	Arm4	+	+	+	+	+	+
	CBS 570	+	+	-	+	+	+
<i>Trichosporon inkin</i>	ÇM4	+	+	+	+	+	+
	ÇM7	+	+	+	+	+	+
	ÇM15	+	+	+	+	+	+
	ÇM16	+	+	+	+	+	+
	ÇM24	+	+	+	+	+	+
	CBS 5585	+	+	+	+	-, d, z	+

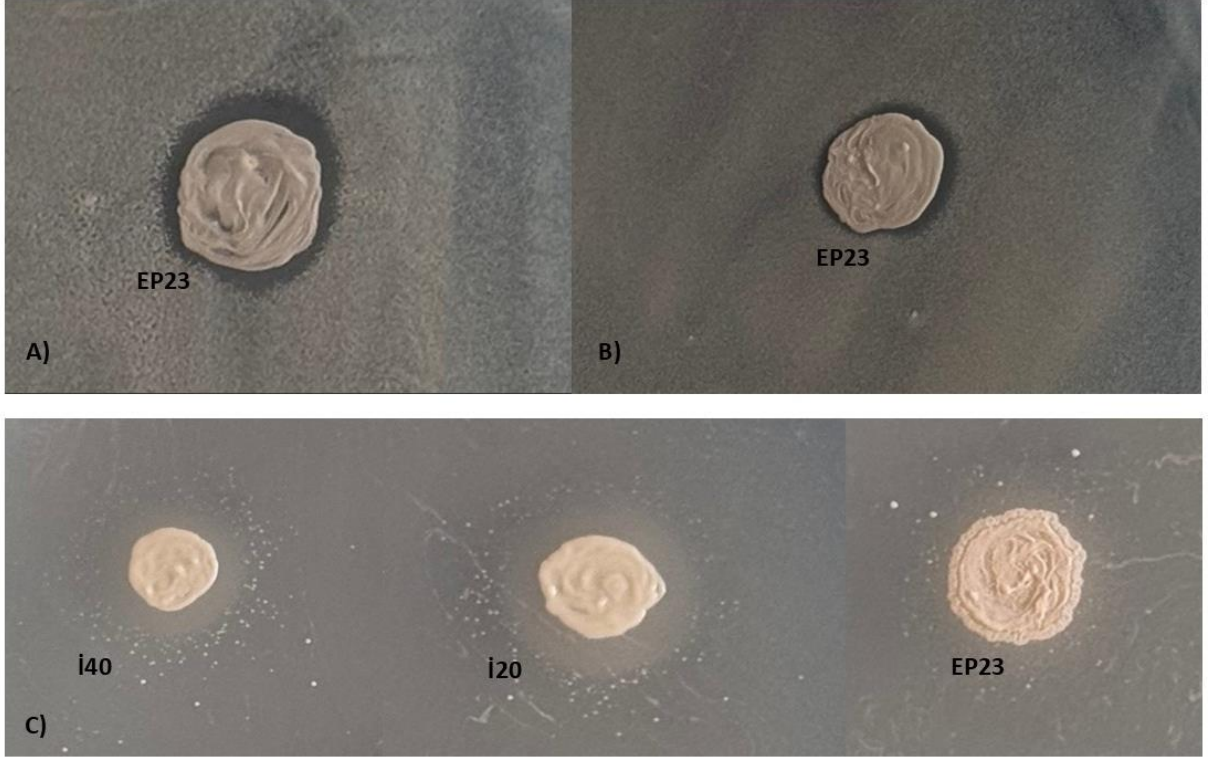
Maya suşlarının farklı azot kaynaklarındaki üreme durumları karbon kaynakları ile aynı şekilde değerlendirildi ve diğer suşlar ile karşılaştırıldı (Tablo 4.7). İzolatlar nitrat, kreatin ve etilamin kaynaklarında üreyemezken, tamamı glukozamini azot kaynağı olarak kullanarak pozitif üreme gösterdi. Bununla birlikte, tip suşlarının glukozamindeki üreme durumlarına bakıldığında, *P. membranifaciensis* tip suşu hariç diğerlerinin bu azot kaynağında üremedikleri görüldü. Benzer şekilde, etilamin kaynağı için *W. pararugosa* türündeki suşlar ÇM9 ve ÇP13 hariç diğerlerinde tip suşları ile farklı sonuçlar tespit edildi. L-lizin içeren besiyerinde ise Arm4 (*C. curvatum*), ÇM4, ÇM7, ÇM15, ÇM16, ÇM24 (*T. inkin*) ve ÇP13 (*W. pararugosa*) üreme gösterdi. Bu durum, *C. curvatum* ve *T. inkin* suşları için tip suşları ile aynı sonucu gösterdi, ancak *W. pararugosa* tip suşunun bu azot kaynağında üreme göstermediği not edildi.

Tablo 4.7: Seçilen maya suşlarının farklı azot kaynaklarını asimilasyonunun değerlendirilmesi. (+): üreme var, (-): üreme yok, (z): zayıf üreme.

Tür adı	Suşlar	Nitrojen kaynakları					
		Amonyum sülfat	Nitrat	L-lizin	Glukozamin	Kreatin	Etilamin
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	İ20	+	z	z	+	z	-
	İ40	+	z	-	+	z	-
	CBS 712	+	-	+	-	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Arm5	+	z	-	+	z	-
	CBS 314	+	-	+	-	-	+
<i>Pichia membranifaciensis</i>	EP23	+	z	-	+	z	-
	CBS 107	+	-	+	+	-	+
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	ÇM9	+	z	z	+	z	-
	ÇP13	+	z	+	+	z	-
	CBS 1010	+	-	-	-	-	-
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	Arm4	+	z	+	+	z	-
	CBS 570	+	-	+	-	-	+
<i>Trichosporon inkin</i>	ÇM4	+	z	+	+	z	-
	ÇM7	+	z	+	+	z	-
	ÇM15	+	z	+	+	z	-
	ÇM16	+	z	+	+	z	-
	ÇM24	+	z	+	+	z	-
	CBS 5585	+	-	+	-	-	+

4.6.8. Antagonistik Etkileşimlerin Analizi

Maya izolatları arasındaki antagonistik etkileşimleri belirlemek için test edilen çoğu kombinasyonda inhibisyon tespit edilmedi. Ancak, İ20 ve İ40 (*K. marxianus*) indikatör organizmalarının yüzeyindeki EP23 (*P. membranifaciensis*) kolonilerinin etrafında berrak inhibisyon bölgeleri görüldü (Şekil 4.21). Ayrıca, Arm5 (*H. uvarum*) hücrelerinin yüzeyinde üreyen İ20 ve İ40 ile EP23 kolonilerinin etrafında üremenin yavaşladığı ve buna bağlı olarak bulanık inhibisyon bölgeleri olduğu gözlemlendi. Bu bölgeler, İ20 ve İ40 suşlarında daha belirgindi.



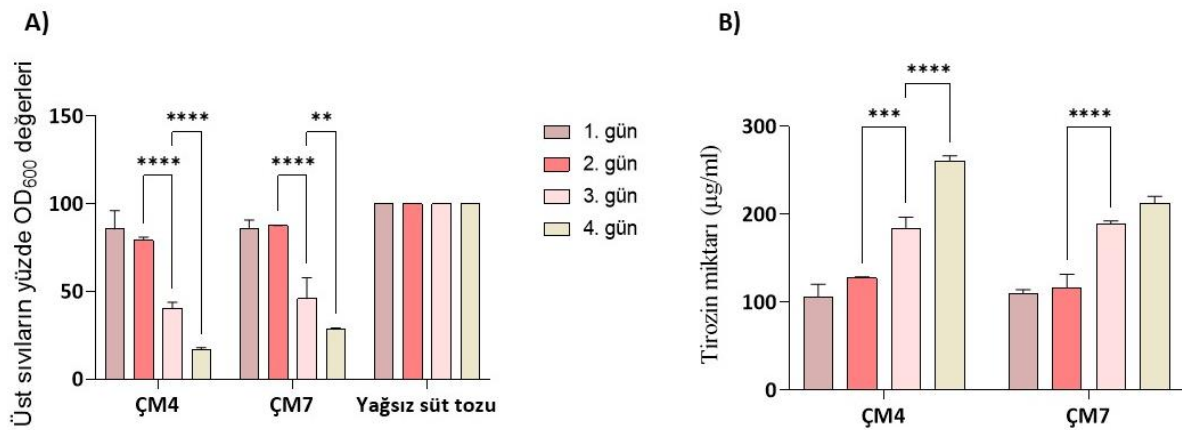
Şekil 4.21: Antagonistik etkileşimlerin belirlenmesi. İndikatör organizmalar; **A)** *K. marxianus* İ20, **B)** *K. marxianus* İ40, **C)** *H. uvarum* Arm5. EP23: *P. membranifaciensis*.

4.7. ENZİM KARAKTERİZASYONU

4.7.1. Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

4.7.1.1. Sıvı Kültürlerde İncelenen Proteolitik Aktivite Sonuçları

Hücre dışına salınan proteaz enziminin üretimini teşvik etmek için yağsız süt tozu içerisinde ÇM4 ve ÇM7 kültürlerinin üst sıvılarının optik dansitesindeki azalmayı ve proteolitik aktiviteye bağlı oluşan tirozin bakiyelerinin miktarlarını gösteren grafikler Şekil 4.22’de verildi. Tirozin miktarlarının hesaplanması için Şekil 4.11’de verilen standart grafiği kullanıldı. Buna göre, her iki izolatın kültürlerinden elde edilen üst sıvıların OD₆₀₀ değerlerinde besiyerine oranla anlamlı bir azalma gözlemlendi. En belirgin azalma ise 3. günde tespit edildi ve 4. günde azalma devam etti (Şekil 4.22A). Paralel olarak, üst sıvılardaki tirozin bakiyelerinin miktarı her iki örnekte de 3. günde anlamlı derecede artış gösterdi (Şekil 4.22B).



Şekil 4.22: Üst sıvılar ile analiz. **A)** Üst sıvıların 600 nm dalga boyunda ölçülen yüzde optik dansite değerleri. **B)** Üst sıvılarda belirlenen tirozin miktarları. (Tukey’s test, **: P<0,01, ***: P<0,001, ****: P<0,0001).

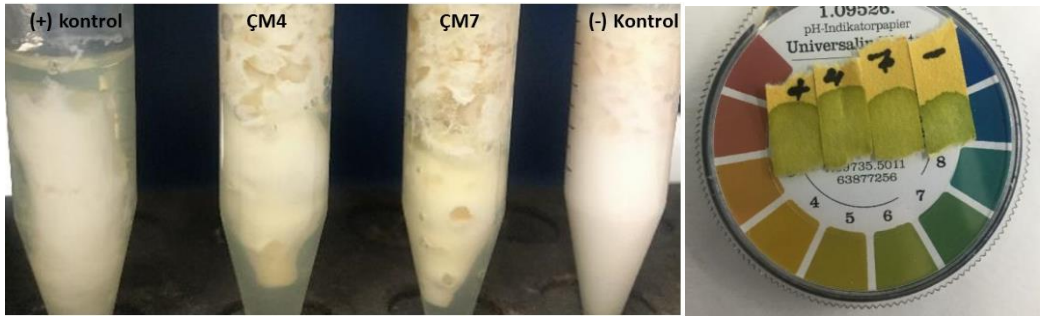
Bu sonuçlara göre, kültürlerin 4. gününde hücreler çöktürülerek üst sıvılar toplandı ve amonyum sülfat ile kısmi saflaştırıldı. Örneklerin kazein substratına karşı proteolitik aktiviteleri iki farklı sıcaklıkta (37 ve 60 °C) incelendi. Tablo 4.8’de görüldüğü gibi ticari kimozinin proteolitik aktivitesi sıcaklığa bağlı olarak değişmezken, izolatlardaki aktivite 60 °C’de ~2 kat artış gösterdi (ÇM4: 42,1 U/mL, ÇM7: 40,2 U/mL). İzolatların proteolitik aktivite değerlerinin benzer olduğu ve 60 °C’de ticari kimozinden yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 4.8: Kısmi saflaştırılmış üst sıvı örneklerinin proteolitik aktivitesi.

Örnek	Sıcaklık	Proteolitik aktivite (U/mL)
ÇM4	37 °C	19,1
	60 °C	42,1
ÇM7	37 °C	24
	60 °C	40,2
Ticari kimozen	37 °C	33,4
	60 °C	33,7

4.7.1.2. Süt Pıhtılaştırma Etkinliği

Kazein-agar besiyerinde oluşan berrak zonların ve üst sıvılardan kısmi saflaştırılan örneklerin süt pıhtılaştırma etkinlikleri araştırıldı. Kazein-agar besiyerinde oluşan zonlar kesilerek, doğrudan süt solüsyonu içerisine eklendi ve 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, örneklerde kimozen enzimi içeren ticari peynir mayasına benzer şekilde çökeltme meydana getirdiği tespit edildi. Negatif kontrol olarak kullanılan boş besiyerinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Bu koşullarda tüplerin pH değerlerinde (pH:6-6,5) bir değişim olmadığı da gösterildi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Agar zonların ve kimozen enziminin süt pıhtılaştırma etkinliği. 37 °C 1 gece inkübasyon sonrası gözlenen aktivite ve pH ölçüm sonuçları. (+) kontrol: Ticari peynir mayası. (-) kontrol: Boş kazein-agar besiyeri.

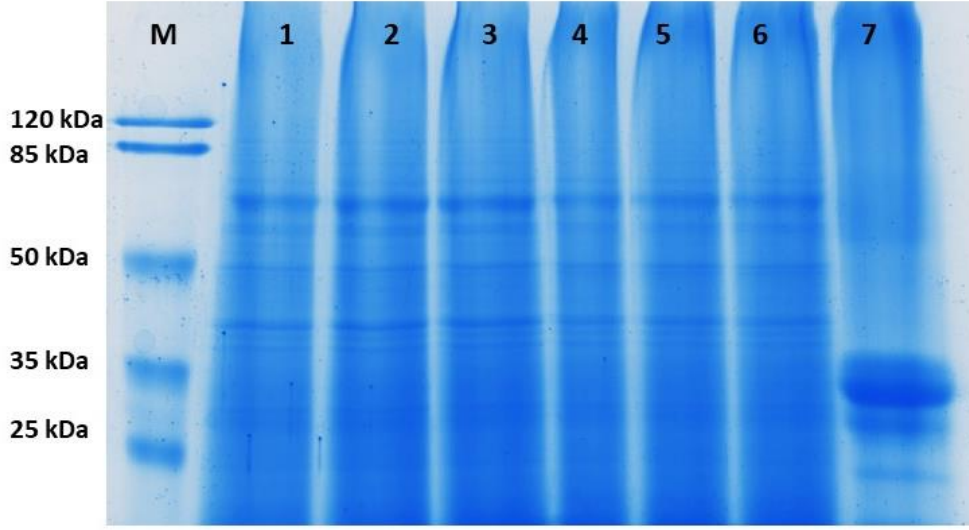
Kısmi olarak saflaştırılmış ve 30 kDa filtrelili tüpler ile ayrımı yapılmış olan üst sıvı örneklerinin süt pıhtılaştırma etkinliği incelendiğinde, benzer şekilde çökelmeler gözlemlendi. Buradaki aktivitede sıcaklığa bağlı bir değişim belirlenmedi (Şekil 4.24). Bu bulgulara göre, süt pıhtılaştırma aktivitesi olduğu gözlenen proteaz enziminin polipeptit boyutunun ≥ 30 kDa olabileceği sonucuna varıldı.



Şekil 4.24: Kısmi saflaştırılmış üst sıvıların ve kimozin enziminin süt pıhtılaştırma etkinliği. 37 °C ve 60 °C 1 gece inkübasyon sonrası elde edilen sonuçlar.

4.7.1.3. Elektroforetik Analiz

Kısmi saflaştırılan ÇM4 ve ÇM7 zonları ve süt tozundan elde edilen protein özütlerinin elektroforetik analizlerine ait jel görüntüsü Şekil 4.25'te verildi. Negatif kontrol örneğinde süt tozu içerisinde bulunan kazein proteinine ait olduğu düşünülen bantların 25-35 kDa arasında olduğu gözlemlendi. Agar zonlardan elde edilen örneklerde ise bu protein bandı gözlemlenmedi. Örneklerin içerisindeki proteinlere ait bantların ise 50-120 kDa arasında yer aldığı belirlendi.

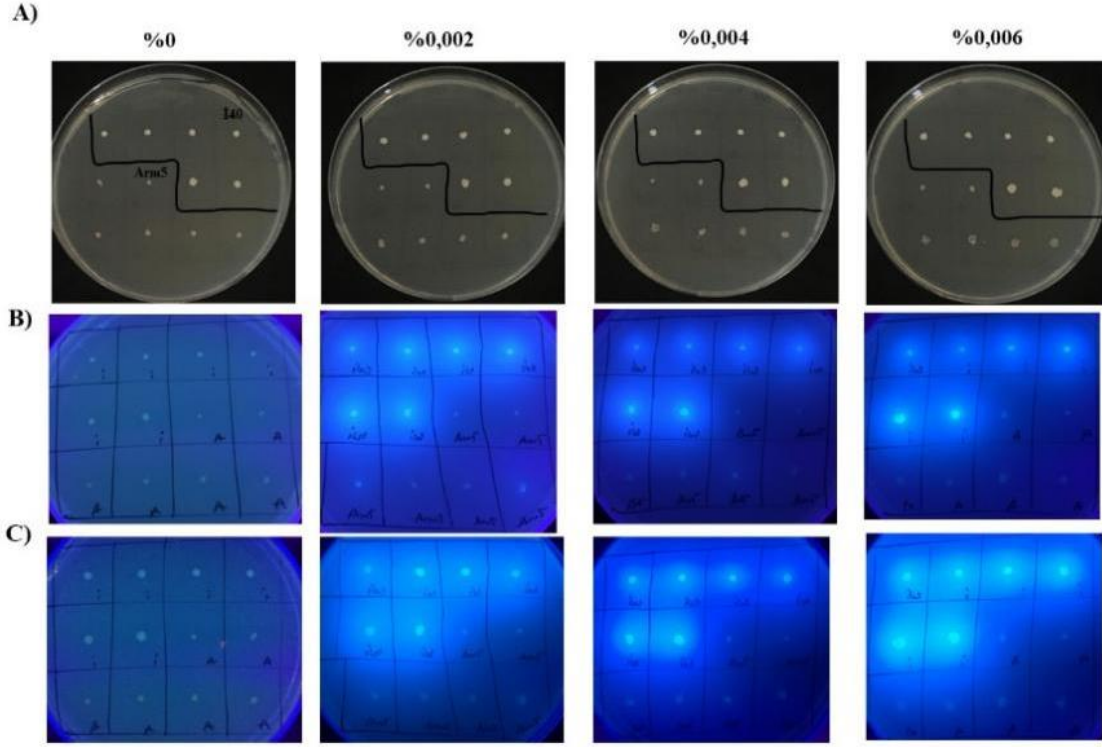


Şekil 4.25: Proteinlerin elektroforetik analizi. M: Marker protein karışımı; 1: ÇM4-40 µg; 2: ÇM4-50 µg; 3: ÇM4-60 µg; 4: ÇM7-40 µg; 5: ÇM7-50 µg; 6: ÇM7-60 µg; 7: (-) kontrol-40 µg.

4.7.2. β -glukozidaz Enziminin Karakterizasyonu

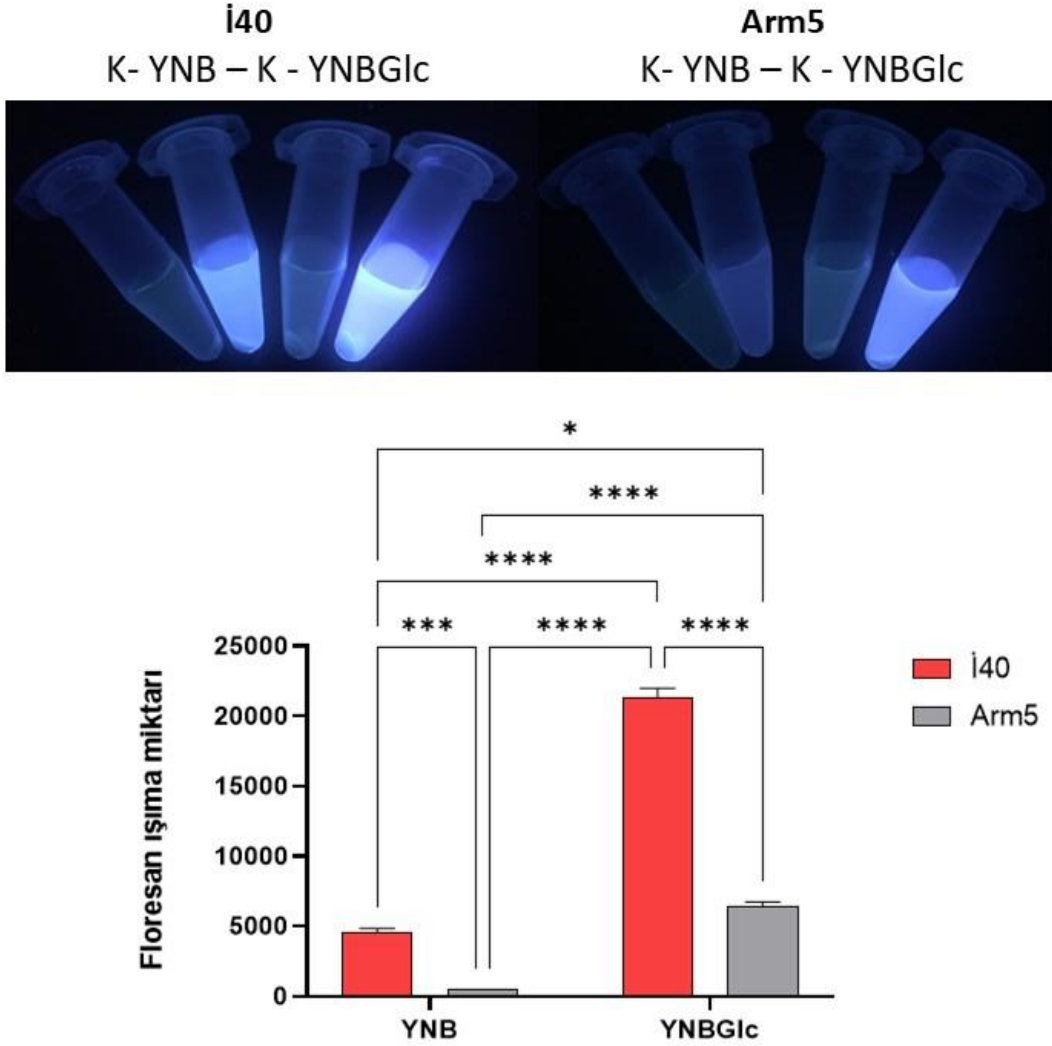
4.7.2.1. 4-MUG Substratı ile Aktivite Analizi

%0,002, %0,004 ve %0,006 4-MUG substratı içeren katı besiyerlerine nokta şeklinde ekilen İ40 ve Arm5 izolatlarının kalitatif analiz bulguları Şekil 4.26'da verildi. Bu koşullar altında İ40 izolatının Arm5'e göre daha iyi ürediği ve daha yüksek β -glukozidaz aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi. İ40 izolatında gözlenen aktivitenin %0,0006 MUG substratı içeren ortamda en fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca, İ40 izolatının 48 saat inkübe edilen kültürlerindeki β -glukozidaz aktivitesinin 24 saatlik kültürlerle göre daha fazla olduğu gözlemlendi.



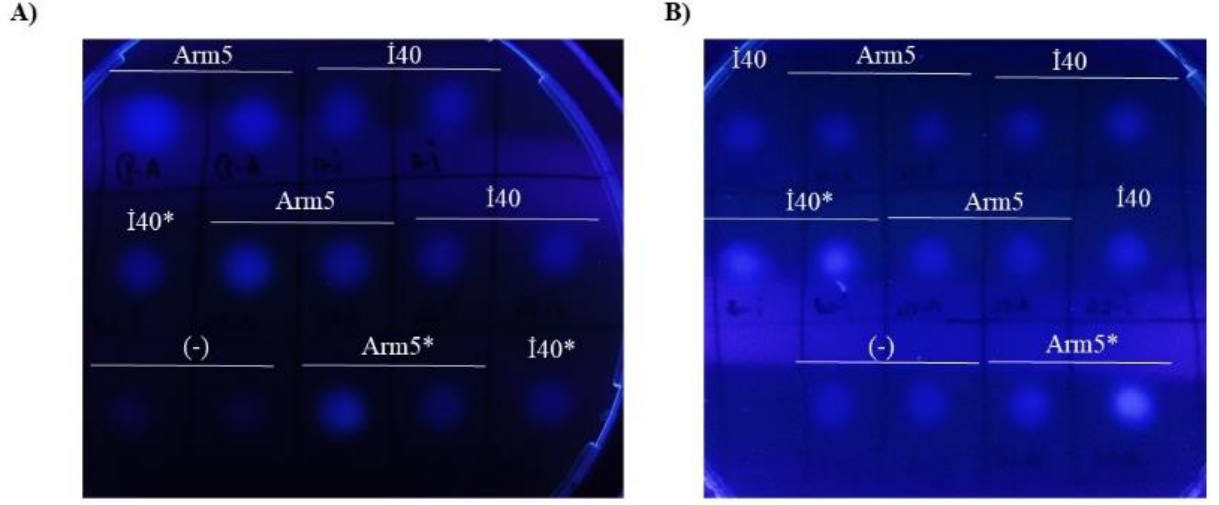
Şekil 4.26: 4-MUG substratı içeren (%0, %0,002, %0,004, %0,006) besiyerlerinde β -glukozidaz enzim aktivitesinin incelenmesi. **A)** Petrilerin normal ışık altındaki görüntüleri. **B)** Petrilerin 24 saat inkübasyonu sonucunda UV ışık altındaki görüntüleri. **C)** Petrilerin 48 saat inkübasyonu sonucunda UV ışık altındaki görüntüleri.

İ40 ve Arm5 izolatları %0,006 4-MUG substratı içeren sıvı besiyerlerine ekilerek üst sıvıların floresan ışımaları kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. Buna göre, her iki izolatın sadece glukoz içeren besiyerindeki (YNB) floresan ışımasının glukoz ile maya özütü ve pepton içeren besiyerinde (YNBGlc) gözlenen ışımaya göre anlamlı derecede daha az olduğu gözlemlendi. Floresan ışımalar miktarlarının İ40/YNB: 4599, İ40/YNBGlç: 21303.7, Arm5/YNB: 447.5, Arm5/YNBGlç: 6354.5 olduğu tespit edildi. Besiyerlerine göre değerlendirme yapıldığında, İ40 örneklerindeki floresan ışımanın Arm5 örneklerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. İstatistiksel analiz sonucunda en yüksek β -glukozidaz aktivitesinin İ40 izolatında ve YNBGlç besiyerinde olduğu belirlendi (Şekil 4.27). Buna göre, bu koşullarda İ40 izolatı tarafından üretilen β -glukozidaz aktivitesinin daha yüksek olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 4.27: 4-MUG içeren sıvı besiyerlerinde β -glukozidaz enzim aktivitesinin incelenmesi. YNB ve YNBGlc besiyerlerinde 24 saat boyunca substrat içermeyen (kontrol) ve içeren ortamlarda üretilen İ40 ve Arm5 kültürlerinin üst sıvılarının UV ışık altındaki görüntüleri. UV ışık altında gözlenen ışımların 360 nm eksitasyon-440 nm emisyon dalga boylarındaki absorbans değerleri. (Sidak's test, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$).

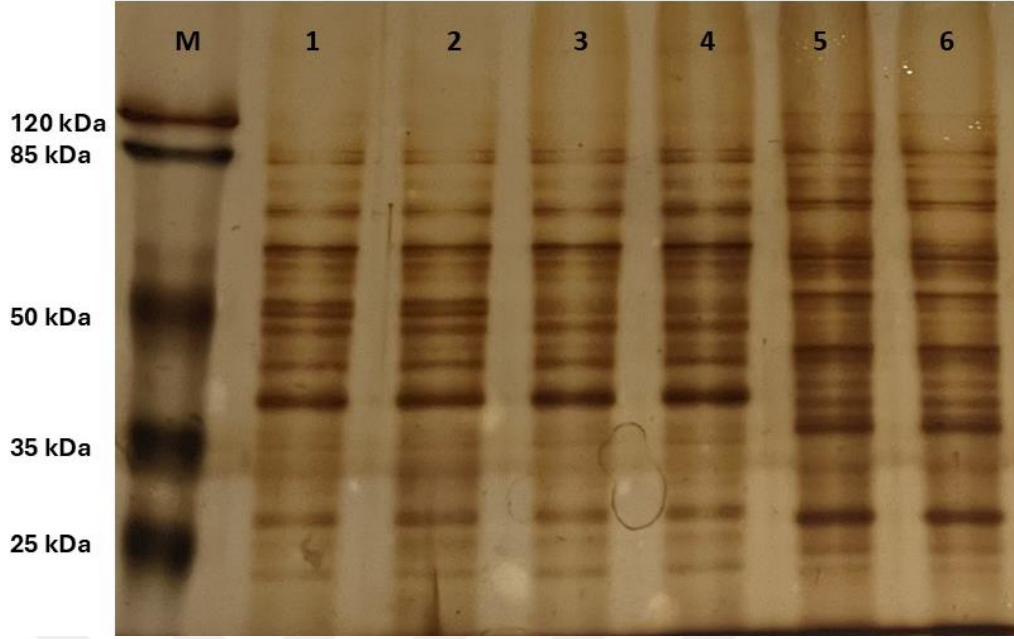
Ham ekstratlerde 4-MUG hidrolizine bağlı olarak UV ışık altında ışımlar gözlemlendi (Şekil 4.28). YPD besiyerinde üretilen izolatlarda YNBGlc besiyerine göre daha yüksek ışıma olduğu görüldü. Ayrıca, uzun süreli büyümenin etkisini incelemek için 48 saatlik inkübasyon sonunda da örnekler toplanarak protein izolasyonu yapıldı ve enzim aktiviteleri değerlendirildi. Buna göre, YNBGlc besiyerinde 48 saat üreyen hücrelerde enzim aktivitesinde artış oldu.



Şekil 4.28: 4-MUG substratı ile ham ekstraktlerdeki enzim aktivitesinin incelenmesi. **A)** YPD besiyeri, **B)** YNBGlc besiyeri. *48 saatlik kültürlerden elde edilen örnekler.

4.7.2.2. Elektroforetik Analiz

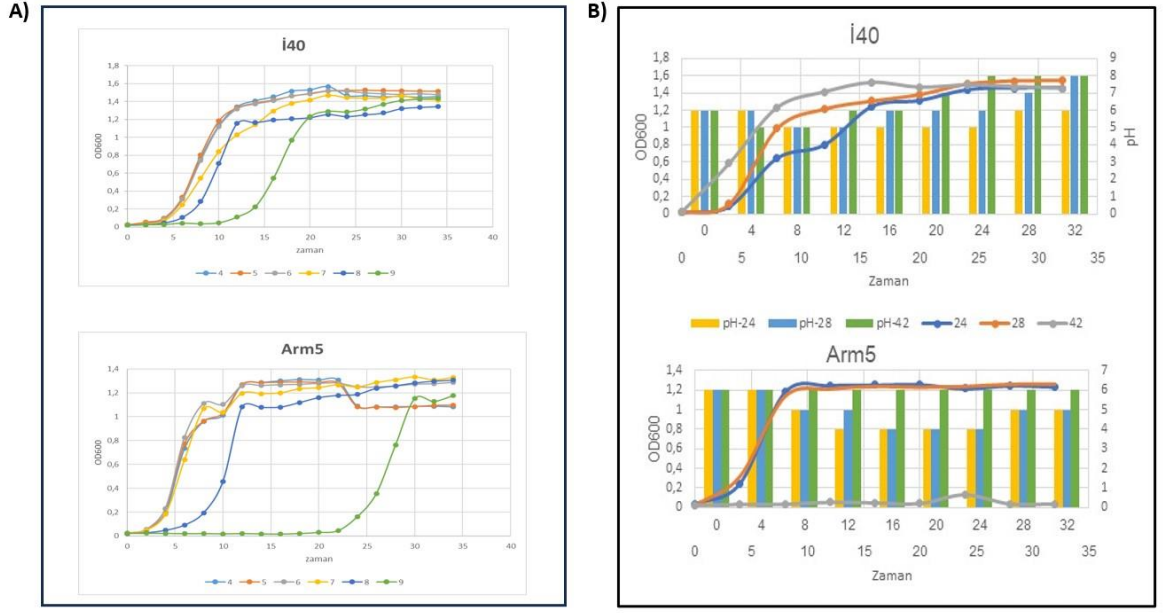
Kısmi saflaştırılan ham özütler ve üst sıvı örneklerinin elektroforetik analizine ait jel görüntüsü Şekil 4.29’da verildi. Kısmi olarak saflaştırılan ham ekstraktlerde protein ayırımı başarılı şekilde gerçekleştirildi. İ40 ve Arm5 izolatlarının kontrol ve substratla indüklenmiş ham ekstre örnekleri arasında farklı bir protein bandı gözlenmedi. Ancak, üst sıvıların elektroforetik analizi ile protein bantları belirlenemedi.



Şekil 4.29: Kısmi saflaştırılmış ham ekstratlarının elektroforetik analizi. **M:** Protein marker, **1:** Arm5-kontrol (aseton çöktürmesi) **2:** Arm5-4MUG (aseton çöktürmesi) **3:** Arm5-kontrol (metanol/kloroform çöktürmesi) **4:** Arm5-4MUG (metanol/kloroform çöktürmesi) **5:** İ40-kontrol (metanol/kloroform) **6:** İ40-4MUG (metanol/kloroform çöktürmesi).

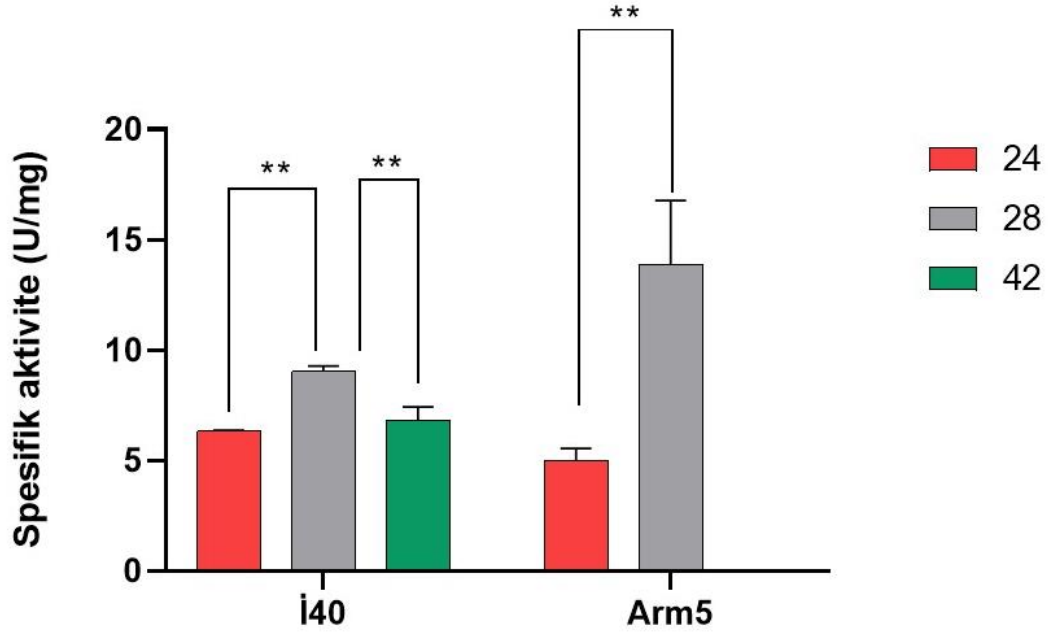
4.7.2.3. Üreme pH'ı ve Sıcaklığının Üretilen Enzimin Aktivitesi Üzerine Etkisi

İlk olarak Arm5 ve İ40 izolatlarının farklı pH ve farklı sıcaklık değerlerinde zamana bağlı üreme eğrileri çıkarıldı. Bazik ortamlarda (pH:8, pH:9) İ40 ve Arm5 izolatlarının üremeleri yavaşladı. Arm5 hücrelerinde pH:9 olan besiyerinde 22. saate kadar bir artış gözlemlenmedi (Şekil 4.30A). Üç farklı sıcaklık değerinde çıkarılan üreme grafiklerine göre, İ40 izolatının üreme profili 42 °C'de en hızlı 24 °C'de ise en yavaş bulundu. Arm5 hücreleri ise 42 °C'de üreyemezken, 24 °C ve 28 °C sıcaklıklarda aynı üreme profilini gösterdi. Ayrıca, kültür ortamında üreme boyunca çok fazla pH değişimlerinin olduğu belirlendi (Şekil 4.30B).



Şekil 4.30: Farklı pH (A) ve sıcaklık (B) değerlerinde İ40 ve Arm5 hücrelerinin üreme profilleri.

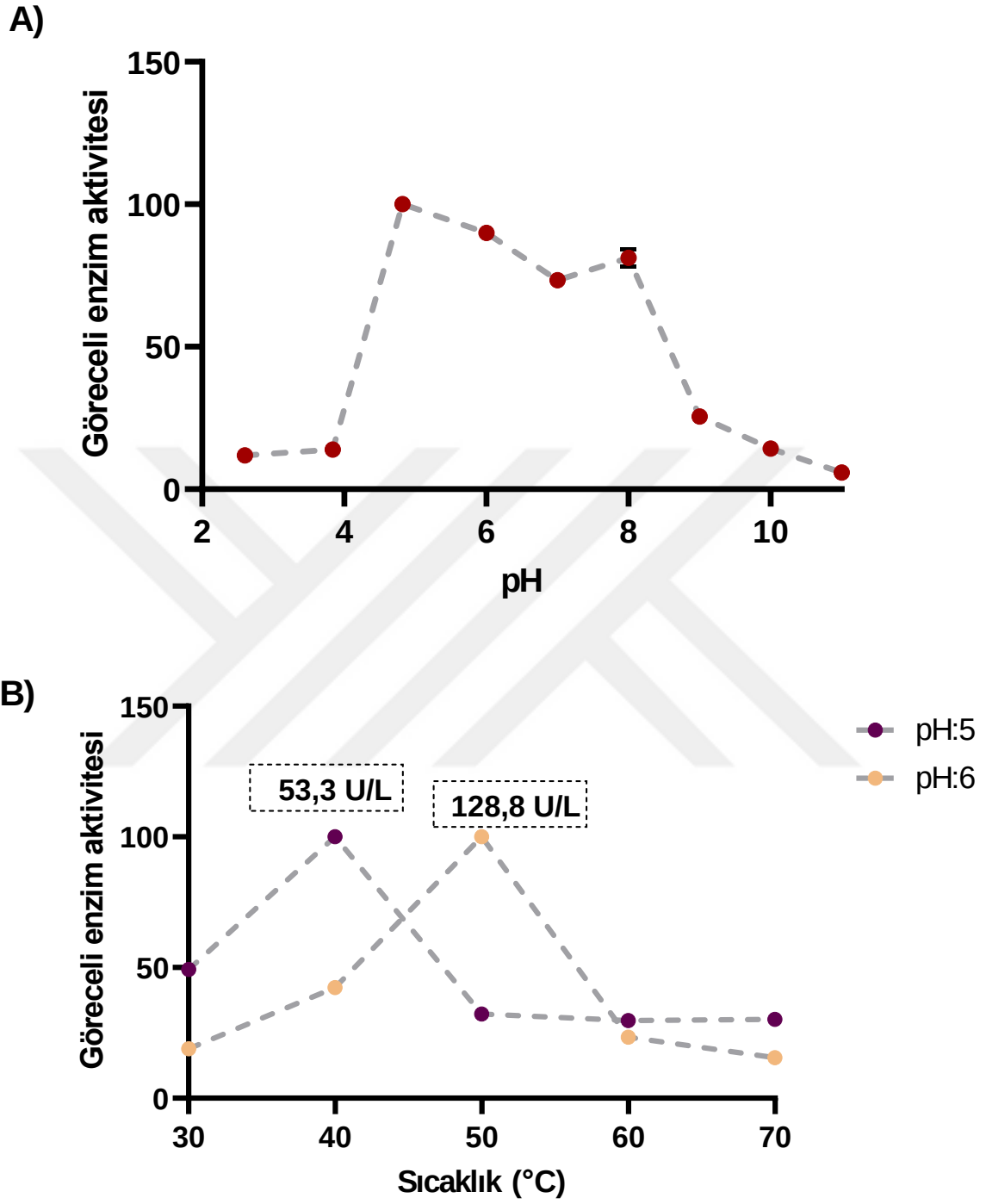
İ40 hücreleri üç farklı sıcaklık değerinde (24-28-42 °C), Arm5 hücreleri ise iki farklı sıcaklık değerinde (24-28 °C) üretildi. 24 saat sonunda kültürlerden örnek toplanarak protein izolasyonu yapıldı ve ham ekstraktlerdeki enzim aktiviteleri analiz edildi. Buna göre, 28 °C sıcaklıkta üretilen İ40 ve Arm5 izolatlarının enzim aktivitelerinin 24 °C sıcaklıkta üretilenlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlendi. İ40 hücrelerinde çoğalmanın en hızlı görüldüğü 42 °C üreme sıcaklığında da β -glukozidaz enzim aktivitesi 28 °C kültürlerinde bulunan aktiviteden anlamlı derecede daha düşük bulundu (Şekil 4.31).



Şekil 4.31: Farklı sıcaklıklarda üretilen İ40 ve Arm5 hücrelerinde β -glukozidaz enzim aktivitesinin karşılaştırılması. (Tukey's test, **: $P < 0,01$).

4.7.2.4. Reaksiyon pH'ı ve Sıcaklığının Ham Özütlerdeki Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

İ40 izolatının ürettiği β -glukozidaz enziminin aktivite gösterdiği optimum reaksiyon pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla, ham özütlerdeki göreceli enzim aktivitesi öncelikle pH:3-11 aralığında 30 °C reaksiyon sıcaklığında değerlendirildi. Bu koşullar altında en yüksek enzim aktivitesi pH:5'te gözlemlendi. Ancak pH:6'daki aktivite de en yüksek aktiviteye yakın bulundu. Asidik ve bazik ortamlarda enzim aktivitesi düştü (Şekil 4.32A). Reaksiyon sıcaklığının etkisinin belirlenmesi için hem pH:5 hem pH:6 değerlerinde 30-40-50-60-70 °C sıcaklıklarda aktivite analizi yapıldı. Optimum sıcaklık değeri pH değerine bağlı olarak değişiklik gösterdi. En yüksek enzim aktivitesi pH:5 koşulunda 40 °C reaksiyon sıcaklığında gözlenirken, pH:6 koşulunda 50 °C'de gözlemlendi. Dahası, pH:6 50 °C koşulunda β -glukozidaz aktivitesi yaklaşık 2,5 kat arttı (Şekil 4.32B).



Şekil 4.32: Reaksiyon pH'ı (A) ve sıcaklığının (B) ham özütlerdeki enzim aktivitesi üzerine etkisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrobiyal enzimler, bakteri, maya ve mantar gibi mikroorganizmalardan elde edilen, stabilitesi yüksek, modifikasyonu kolay ve düşük maliyetli biyomoleküllerdir. Endüstriyel süreçlerde gıda, ilaç, biyoyakıt ve atık yönetimi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Chapman ve diğ., 2018; Raveendran ve diğ., 2018). Bununla birlikte, farklı doğal ortamlardan yeni mikroorganizmaların izolasyonu ve enzim üretimi gibi biyoteknolojik özelliklerinin detaylı analizi, hala mikrobiyal biyoteknolojinin temel unsurlarından biridir (Mishra ve diğ., 2017; Olicón-Hernández ve diğ., 2022). Maya biyoteknolojisindeki güncel çalışmalar, geleneksel olmayan maya türlerinin alternatif metabolik yollara sahip olduğunu ve bu sayede yeni endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyellerini ortaya koymaktadır (Mattanovich ve diğ., 2014). Böylece, potansiyel endüstriyel öneme sahip hem mevcut hem de yeni türlerin metabolik özelliklerini detaylı şekilde karakterize ederek farklı biyoteknolojik özelliklerinin açığa çıkarılması önem kazanmıştır. Bu tez çalışmasında süt ve süt ürünlerinden yeni maya suşlarının izolasyonu, tanımlanması ve biyoteknolojik açıdan önemli enzimleri üretim potansiyellerinin belirlenmesi için yapılan araştırmalar sunuldu.

Maya izolasyonu için kaynak olarak inek ve mandalardan elde edilen çiğ süt örnekleri ile yöresel peynir örnekleri kullanıldı. Farklı bölgelerden toplanan iki farklı çiğ manda sütü örneklerindeki maya koloni sayıları $1,5 \times 10^3$ cfu/mL ve $3,4 \times 10^2$ cfu/mL olarak belirlendi (Tablo 4.1). Manda sütlerinde belirlenen maya konsantrasyonları, literatüre göre genel olarak çiğ sütlerde gözlenen 10^2 - 10^3 cfu/mL aralığındaki maya sayısı ile tutarlı bulundu (Lavoie ve diğ., 2012b). Ancak, çiğ sütlerin içerdikleri maya sayılarının 10^2 - 10^4 cfu/mL olarak da tespit edilebildiği belirtilmiştir (Quigley ve diğ., 2013). Bu çalışmada da inek sütü örneğinde maya konsantrasyonu manda sütü örneklerine göre daha yüksek bulundu ve $>2 \times 10^4$ cfu/mL olarak hesaplandı. İki farklı peynir örneğinin içerdikleri maya sayıları ise $5,5 \times 10^3$ cfu/g ve 21 cfu/g olmak üzere birbirlerinden tamamen farklı bulundu (Tablo 4.1). Peynirlerde bulunan maya miktarının, olgunlaşma süresi ve peynirin türü gibi faktörlere bağlı olarak 10^2 ve 10^9 cfu/g arasında değişebilir. Buna ek olarak süt mikrobiyotası, sodyum klorür konsantrasyonu, sıcaklık, oksijen seviyeleri, substrat mevcudiyeti ve diğer mikroorganizmalarla etkileşimler peynirlerde maya sayılarındaki değişikliklere neden olan etmenlerdir (Addis ve diğ., 2001, Bintsis, 2021).

İzole edilen tüm maya kolonilerinin renk, şekil ve boyutlarına bakılarak rastgele olacak şekilde çiğ süt örneklerinden 87, peynir örneklerinden 50 olmak üzere toplamda 137 tane maya izolatu seçildi ve üretildi (Tablo 4.1). İlk olarak, maya izolatları mikroskopik ve makroskopik morfolojileri, farklı karbon kaynaklarını kullanabilme kapasiteleri ve hücre dışı proteaz, amilaz, lipaz enzim aktiviteleri açısından analiz edildi. Bu kriterlerden ortaya çıkan belirgin farklılıklara dayanarak, enzim üretimi ve türü açısından farklılık gösterebilecek maya izolatları seçildi. Seçilen maya izolatlarının enzimatik aktivitelerini belirlemek için uygulanan API-ZYM test sonucuna göre (Tablo 4.2), izolatlarda lipaz, trypsin, α -kimotripsin, α -galaktosidaz, β -glukuronidaz, N-asetil- β -glukoaminidaz, α -mannosidaz, α -fukosidaz aktivitesi gözlenmedi. Test edilen diğer enzimlerin ise izolatların en az bir tanesi tarafından üretildiği belirlendi. Bunların arasından β -galaktosidaz, β -glukozidaz, lösin arilamidaz, asit fosfataz enzimleri ile genel tarama sonuçlarına göre belirlenen proteaz enziminin aktiviteleri üretildikleri izolatlarda ayrı ayrı incelendi ve karşılaştırıldı. Bu beş enzim gıda biyoteknolojisi dahil olmak üzere farklı endüstriyel uygulamalarda kullanım alanlarına sahiptir (Kaur ve Satyanarayana, 2009, Singh ve diğ., 2016a, Singh ve diğ., 2016b). Ayrıca, biyoteknolojik potansiyele sahip bu enzimleri ürettiği tespit edilen 12 maya izolatu moleküler düzeyde tanımlandı ve karakterize edildi.

Mikroorganizmaların doğru tanımlanması çoğunlukla rDNA'nın belirli bölgelerinde korunmuş dizilerin tespitine dayanan moleküler teknikleri gerektirir (Spencer ve diğ., 2011, Rodrigues ve diğ., 2018). Ayrıca Vu ve diğ., (2016) ITS ve LSU dizi benzerliğine dayalı olarak maya türleri arasında ayırım yapmak için spesifik eşik değerlerini sırasıyla %98,41 ve %99,51 olarak önermişlerdir. Burada, seçilen maya izolatlarının tür kimlikleri, ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgeleri ve D1/D2 alanlarının dizi homolojilerine göre belirlendi. Bu bölgelere ait nükleotid dizilerinin BLAST analizi sonuçlarına göre, çalışma kapsamında seçilen maya izolatlarının; *Kluyveromyces* spp. (İ20, İ40), *Cutaneotrichosporon curvatum* (Arm4), *Hanseniaspora* spp. (Arm5), *Pichia membranifaciens* (EP23), *Trichosporon inkin* (ÇM4, ÇM7, ÇM15, ÇM16, ÇM24), *Wickerhamiella pararugosa* (ÇM9, ÇP13) olmak üzere 6 farklı cinse ait olduğu bulundu (Tablo 4.5). D1/D2 ve ITS bölgelerinin analizleri ile sağlanan çözünürlük genel olarak benzer olmasına rağmen, bazen ITS dizileri D1/D2 alanında hiçbir farklılık olmaksızın türler arasında farklılık gösterebilir veya bunun tersi de geçerlidir (Kurtzman ve Robnett, 2003). Bu çalışmada benzer bir durum, İ20 ve İ40 türlerinin dizilerinde gözlemlendi. Bu nedenle İ20 ve İ40 izolatları için iki ek gen, *tef1* ve *act*, dizilendi. BLAST analizi ile, İ20 ve İ40 izolatlarının *K. marxianus* türüne ait oldukları belirlendi. Ek olarak, bu iki gen, rRNA dizilerine göre cins

düzeyinde *Hanseniaspora* spp. olarak tanımlanan ama türü belirlenemeyen Arm5 izolatu için de dizilendi. Bu genlere ait dizi homolojileri Arm5 izolatının *H. uvarum* türünde olduğunu gösterdi. Yapılan filogenetik analizler, *Hanseniaspora* spp. cinsinde yakın ilişkili türlerde rRNA nükleotid farklılıklarının çok az olduğunu, her iki protein kodlayan gen ribozomal gen bölgeleriyle karşılaştırıldığında, *Hanseniaspora* spp. cinsinin yakın ilişkili türleri arasında çözümleme için daha uygun olduğunu göstermiştir (Cadez ve diğ., 2006; Čadež ve diğ., 2021). Sonuç olarak, maya taksonlarının yalnızca tek bir gendeki nükleotid farklılıklarının sayısına dayalı olarak tanımlanmasının her zaman güvenilir olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte API-20C testi ile özellikle cins bazında barkod diziler ile benzer sonuçlar elde edilirken, tür sonuçları farklı bulunmuş veya belirlenememiştir (Tablo 4.5). Spencer ve diğ. (2011), birden fazla maya izolatını tanımlamak için karbon asimilasyon testlerinin yanı sıra DNA dizi analizinden de yararlanmıştır. Çalışmanın sonuçları, yalnızca karbon asimilasyon testlerine dayanıldığında maya izolatlarının yaklaşık %67'sinin yanlış tanımlandığını ortaya çıkarmıştır. Bu, doğru maya tanımlaması için geleneksel fenotipik yöntemlerin sınırlamalarını vurgulamaktadır ve daha kesin sınıflandırma için moleküler teknikleri birleştirmenin önemini altını çizmektedir. Karakterizasyon deneyleri kapsamında da seçili maya izolatların farklı karbon ve azot kaynaklarını asimilasyonu değerlendirildiğinde, izolatların tayin edilen türlerine ait tip suşlarına göre farklılıklar olduğu gösterildi (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

Literatürde süt ve süt ürünlerindeki maya çeşitliliğine ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Çiğ sütte çoğunlukla bulunan maya türleri; *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum catenulate*, *Pichia fermentans*, *Pichia anomala*, *Candida krusei*, *Candida sake*, *Candida parapsilosis*, *Candida inconspicua*, *Trichosporon Cutaneum*, *Trichosporon lactis*, *Trichosporon beigeli*, *Cryptococcus curvatus* (sinonim *Cutaneotrichosporon curvatum*), *Cryptococcus carnescens* ve *Cryptococcus victoriae* olarak bildirilmiştir (Lopandic ve diğ., 2006, Delavenne ve diğ., 2011, Quigley ve diğ., 2013). Ayrıca mayaların peynir yapımına önemli katkılarda bulunduğu bildirilmekte ve farklı peynir türlerinden yeni maya türleri izole edilmiştir (Ozturkoglu-Budak ve diğ., 2016; Fröhlich-Wyder ve diğ., 2019). Bu çalışmada kaynak olarak kullanılan peynir örneklerinin birinden izole edilen *P. membranifaciens* türünün peynirlerde baskın tür olarak bulunabileceği gösterilmiştir (Lioliou ve diğ., 2001). Ayrıca bu tez çalışmasında elde edilen sonuçla benzer olarak, farklı peynir türlerinden *C. pararugosa* (sinonim *W. pararugosa*) izole edilmiştir (Lavoie ve diğ., 2012a, Souza ve diğ., 2021). *W.*

pararugosa türünde mayalar, hem peynir örneğinde (ÇP13), hem de aynı bölgeden toplanan manda sütü örneğinde (ÇM9) belirlendi.

Çalışma kapsamında ele alınan mikrobiyal enzimlerden β -galaktosidaz enziminin aktivitesi İ20 ve İ40 kodlu maya izolatlarında incelendi (Tablo 4.3). Laktaz olarak da bilinen β -galaktosidaz enzimi, endüstriyel açıdan önemli farklı reaksiyonları katalizler. Özellikle, laktozun (disakkarit, süt ürünlerinde bulunan ana karbonhidrat) glukoz ve galaktoza hidrolizini katalizlediği için süt endüstrisinde laktozsuz süt ürünlerinin üretiminde oldukça önemlidir. Bu ürünler artan sayıda laktoz intoleransına sahip bireylerin kullanımına sunulmaktadır ve geniş bir pazar payına sahiptir. Dolayısıyla, laktozsuz ürünlerin çeşitliliği nedeniyle, β -galaktosidaz enzimi de büyük bir pazar potansiyeline sahiptir (Movahedpour ve diğ., 2022, Singh ve Sambyal, 2023). β -galaktosidazların uygulamaları, sadece laktozsuz ürünlerin üretimi ile sınırlı değildir. Aynı zamanda peynir altı suyu işleme ve prebiyotik üretimi için de kullanılabilirler (Saqib ve diğ., 2017). Bu enzimler, çeşitli kaynaklardan izole edilebilir, ancak mantar ve maya kaynaklarından elde edilen β -galaktosidazlar, yüksek verimlilikleri, pH ve sıcaklığa karşı dirençleri nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir (Movahedpour ve diğ., 2022) Mayalar arasında *K. lactis*'ten elde edilen β -galaktosidazlar, çevre, gıda ve biyoteknoloji endüstrilerine sağladığı pek çok uygulamalar nedeniyle literatürde en çok rapor edilenler arasındadır (de Albuquerque ve diğ., 2021). Bu çalışmada, moleküler tür tayini sonuçlarına göre, İ20 ve İ40 maya izolatlarının *K. marxianus* türünde olduğu belirlendi. *K. marxianus*, farklı metabolik özelliklerinden dolayı, gıda ve biyoteknoloji uygulamaları için en umut verici geleneksel olmayan mayalardan biridir. Ancak, biyoetanol üretimi, biyokütle birikimi, inulinaz ve β -galaktosidaz gibi değerli enzim üretimi gibi uygulamalarına rağmen henüz *K. lactis* kadar kapsamlı bir şekilde incelenmemiştir. Bununla birlikte, farklı *K. marxianus* suşlarının beta-galaktosidaz enzim etkinliğini ve farklı ortam koşullarının enzim aktivitesi üzerine etkisini araştıran çalışmalar artmaktadır (Manera ve diğ., 2011; Braga ve diğ., 2012; Zhou ve diğ., 2013; Padilla ve diğ., 2015; Karim ve diğ., 2020). Maya izolatlarının karbon kaynağı olarak laktoz içeren iki farklı besiyerlerinde üretilmesi sonucunda, YNB-L besiyerinde üretilen İ20 izolatında aktivitenin arttığı belirlendi. Ayrıca bu aktivite İ40 izolatına göre de daha yüksek bulundu (Şekil 4.6). Besiyerindeki substrat konsantrasyonu enzim aktivitesini olumlu ya da olumsuz etkileyen bir faktördür ve mikroorganizmanın suşuna göre bu durum farklılık göstermektedir (Martins ve diğ., 2002; Kamran ve diğ., 2016). Ayrıca, burada elde edilen farklı aktivite sonuçları izolatların farklı metabolik özelliklerine dayalı olabilir. Lane ve diğ. (2011), 13 farklı *K. marxianus* suşunu

karşılaştırarak, bu maya türünün fenotipik olarak çeşitli bir tür olduğu ve özelliklerine ilişkin geniş genellemelerin doğru olmayabileceği sonucuna varmıştır. İki izolatin mitokondriyal RFLP analizinde (Şekil 4.18B) ve API-ZYM test sonuçlarında gösterilen farklı profilleri bu durumu desteklemektedir. Bununla birlikte, β -galaktosidaz aktivitesinin incelenmesi için iki farklı yöntem kullanılmış olup, YNB-L besiyerinde üretilen hücrelerde SDS/kloroform yöntemi ile aktivite belirlenemedi. Ancak, Bansal ve diğ. (2008) farklı ekstraksiyon yöntemlerini uyguladıkları çalışmada, SDS/Kloroform ile aktivite belirlemenin en iyi yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ise, farklı üreme koşulları için farklı yöntemlerin uygulanması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışma kapsamında ele alınan bir diğer mikrobiyal enzim β -glukozidaz'dır. Glikozit hidrolazlar arasında β -glukozidaz enzimi, çok önemli bir endüstriyel enzimdir ve biyoyakıt üretimi, gıda ve içecek endüstrisi, aktif bileşik üretimi vb. alanlar için ilgi çekici bir biyokatalizördür. Mikrobiyal β -glukozidazlar, farklı fizikokimyasal özellikleri ve yüksek verimli fermantasyon kapasiteleri nedeniyle üretiminin ana kaynağı haline gelmiştir. Bu nedenle, bakteriler, mantarlar ve mayalardan elde edilecek β -glukozidaz enzimlerinin endüstriyel uygulanabilirliğini değerlendirmek ve yeni enzimleri üretmek, saflaştırmak, karakterize etmek için sürekli çalışmalar yapılmaktadır (Magwaza ve diğ., 2024, Yang ve diğ., 2024). API-ZYM test sonucuna göre *K. marxianus* İ40 izolatinın β -glukozidaz enzimini de ürettiği belirlendi ve bu enzimi üreten bir diğer izolat olan *H. uvarum* Arm5 ile enzim aktiviteleri test edildi (Tablo 4.3). Ham ekstrelerde bulunan β -glukozidaz enziminin p-NPG substratına karşı aktiviteleri her iki izolatta da daha zengin bir ortam olan YPD besiyerinde artış gösterdi. Bu artış, Arm5 izolatındaki spesifik aktivitede de tespit edildi. Bununla birlikte, YPD besiyerindeki aktivitelerin Arm5 izolatında İ40 izolatına göre daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.8). *Hanseniaspora* spp. cinsi yüksek aktiviteye sahip glikolitik enzimlerin en iyi maya üreticileri arasında tanımlanmaktadır (Manzanares ve diğ., 1999; Lopez ve diğ., 2015.). Aroma üreticisi olarak β -glukozidaz aktivitesine sahip olduğu bilinen *Hanseniaspora* spp.'nin farklı suşları üzerinde pek çok çalışma yürütülmektedir (Manzanares ve diğ., 2000; van Wyk ve diğ., 2024). Üzüm meyvelerinin fermantasyonu ile şarap elde edilmesi sürecinde “non-*Saccharomyces*” mayaların kullanımı yaygın hale gelmiştir. Bu sürece katkı sağlayacak enzimleri (β -glukozidaz gibi) üreten yeni “non-*Saccharomyces*” izolatlarının bulunmasının kaliteli şarap üretimine katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır (Lopez ve diğ., 2015). *H. uvarum* suşları da söz konusu mayalar arasındadır. Fan ve diğ. (2022) *H. uvarum* Yun268

suşundan yeni bir beta-glukozidaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. β -glukosidaz üreten *H. uvarum* suşları şarap yapımında başlangıç kültürü olarak kullanılmaktadır (Rompkovski ve diğ., 2022). Son yıllarda, *Hanseniaspora* spp.'nin sadece fermentasyonda değil, biyolojik kontrol ve tüm hücre biyokatalizörü gibi farklı biyoteknolojik potansiyelini ortaya koyan çalışmalarda da artış gözlenmiştir. Yine de bu cins, ekolojik işlevi, türler arası ve tür içi çeşitliliği açısından hala yeterince anlaşılmamıştır (van Wyk ve diğ., 2024). Diğer taraftan, *K. marxianus* suşlarının da β -glukozidaz enzimi üretebildiği ve farklı fermantasyon yaklaşımları kullanılarak aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Su ve diğ., 2021). *K. marxianus* İ40 yüksek hassasiyetli bir florojenik substrat olan 4-MUG (Graf ve Buchhaupt, 2022) içeren ortamda üretildiği zaman enzim aktivitesi Arm5 izolatına göre yüksek derecede arttı (Şekil 4.26, Şekil 4.27). *K. marxianus* suşlarının uygun ortam koşullarında hücre dışı beta-glukozidaz salgıladığı rapor edildiğinden (Rajoka ve diğ., 2004; Zhang ve diğ., 2019; Su ve diğ., 2021), üst sınırlarda gözlenen ürün miktarındaki artışa neden olan aktivitenin bir hücre dışı β -glukozidaz enzimi ile sağlanmış olabileceği düşünüldü. Ancak bu enzimin belirlenmesi ve karakterize edilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bunun yanı sıra, florojenik substrata karşı gözlenen bu aktivite, glukoz ile maya özütü ve pepton içeren besiyerinde üretilen hücrelerde çok daha fazla bulundu (Şekil 4.27). Rajoka ve diğ. (2004) tarafından yürütülen çalışmada da farklı karbon ve azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiş ve besiyeri içeriğinde maya özütü ve peptonun üremeyi destekleyerek *K. marxianus*'ta β -glukozidaz üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Enzimlerinin sentezi ve salgılanması besiyeri bileşiminin yanı sıra, sıcaklık, pH, inkübasyon süresi veya mikrobiyal suş türü gibi fermentasyon ve kültür ortamının değişkenlerine de bağlıdır (Karim ve diğ., 2020). İ40 ve Arm5 izolatları farklı pH ve sıcaklıklarda üretildi. Yapılan çalışmalarda *H. uvarum* türünün yüksek üreme sıcaklıklarında üreyemediği gösterilmiştir (Cadez ve diğ., 2002). Bu çalışmada da benzer olarak, *H. uvarum* Arm5 suşu 42 °C sıcaklık koşulunda üremedi. Aksine, *K. marxianus* İ40 suşu en hızlı bu sıcaklıkta üredi ve 24 °C ve 28 °C sıcaklıklara göre daha iyi bir üreme profili gösterdi (Şekil 4.30b). *K. marxianus* türünün en önemli özelliklerinden biri thermotolerant olmasıdır ve 42 °C gibi yüksek sıcaklıklarda daha hızlı üreme yeteneğine sahiptir. Bu özelliği adaptasyon kapasitesinin iyi olduğunu göstermektedir (Karim ve diğ., 2020). Üreme boyunca ortam sıcaklığına bağlı olarak değişen besiyeri pH'nın bu adaptasyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, yüksek sıcaklıkta ham özütlerdeki beta-glukozidaz aktivitesinde artış olmadı. Her iki izolat için de en yüksek enzim aktivitesi 28 °C derecede

kültürlenmiş hücrelerde gözlemlendi (Şekil 4.31). *H. uvarum* Arm5 için bu durum Rompkovski ve diğ. (2022) tarafından uygulanan optimum üreme koşulu ile aynıdır. *K. marxianus* suşları ile yapılan çalışmalarda ise, 35 °C üreme sıcaklığı β -glukozidaz üretimi için optimum sıcaklık olarak kullanılmıştır (Rajoka ve diğ., 2004, Su ve diğ., 2021). Ek olarak, *K. marxianus* İ40 suşunda ham özütlerdeki enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri araştırıldı. pH: 3-11 aralığında yapılan taramaya göre en yüksek aktivite pH:5'te gözlemlendi (Şekil 4.32A). Bu sonuç Su ve diğ., (2021) tarafından bulunan sonuç ile uyumludur. Ancak, pH:6 koşulunda en yüksek aktiviteye yakın bir enzim aktivitesi gözlemlendiği için, sıcaklık taraması her iki pH koşulunda beş farklı sıcaklık değerinde gerçekleştirildi. İlginç olarak, optimum sıcaklığın reaksiyon pH'ına göre değiştiği gözlemlendi. pH:5 koşulunda en yüksek aktivite 40 °C'de gözlenirken pH:6 iken 50 °C'ta belirlendi (Şekil 4.32B). Su ve diğ. (2021) ise optimum sıcaklık değerini 60 °C olarak bildirmiştir. Farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen β -glukozidaz enzimlerinin optimum sıcaklığının ise 40-60 °C aralığında olduğu rapor edilmiştir (Magwaza ve diğ., 2024).

Seçilen maya izolatlarında (*Trichosporon* spp. hariç) lösin arilamidaz spektrofotometrik yöntemle incelendi ve izolatlar arasında enzim aktiviteleri açısından çeşitlilik gözlemlendi. En yüksek lösin arilamidaz aktivitesine sahip olan izolatın *H. uvarum* Arm5 olduğu görüldü (Şekil 4.9). Lösin arilamidaz, amino asitleri serbest bırakarak istenilen tatların oluşması için önemli bir enzimdir ve acılık giderici etkiye sahiptir (Herreros ve diğ., 2003). Önceki çalışmalarda, fermente ürünlerden ve süt ürünlerinden izole edilen mayalarda lösin arilamidaz aktiviteleri belirlenmiş ve bu mayaların istenen bileşikler ürete ve aroma oluşumunda önemli rolleri olabileceği farklı araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Bonatsou ve diğ., 2018, Kahve ve diğ., 2022, Karasu-Yalcin ve diğ., 2012).

Asit fosfataz aktivitesi beş farklı maya suşunda incelendi. Asit fosfatazlar doğada bulunan en yaygın enzimlerden biridir ve ester bağlarını kırarak organik fosfor hidrolize ederler (Tagad ve Sabharwal, 2018). Mayalar da asit fosfataz üretimi için ideal bir mikrobiyal kaynak adaydır. Bu enzimlerin çeşitli alanlarda uygulama potansiyeli bulunmaktadır; bunların en önemlileri yem ve gıda endüstrisinde fitat giderimindedir (Kaur ve Satyanarayana, 2009). Ekmek mayasında asit fosfataz ve fitaz aktivitesi üzerine bazı çalışmalar vardır (Greiner ve diğ., 2001, Haraldsson ve diğ., 2005) ve birçok araştırmacı bu maya enzimlerinin ekmek yapımındaki rolünü vurgulamıştır (Kaur ve Satyanarayana, 2009). Bu çalışmada tanımlanan maya türleri çeşitli enzimatik aktiviteler ve endüstriyel uygulamalar açısından incelenmiş olsa da genel olarak

mayaların lösin arilamidaz ve asit fosfataz aktivitelerine ilişkin ayrıntılı araştırmalar yetersizdir. İki enzim için de farklı türlerin hatta aynı türdeki izolatların enzim aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri arasında anlamlı farklılıklar belirlendi (Şekil 4.9, Şekil 4.10). En düşük asit fosfataz aktivitesi *P. membranifaciensis* EP23 izolatında gözlenirken, aynı türdeki “*K. marxianus* İ20 ve İ40” ve *W. pararugosa* ÇM9 ve ÇP13” spesifik aktivite bakımından farklılaştı. Spesifik aktivite daha çok enzimin özüt içerisindeki saflığı ile ilişkili bir birimdir. Bu izolatlar aynı türde olsa da ham özütlerindeki protein miktarları farklıdır. Bu durumun *K. marxianus* için yukarıda açıklandığı gibi metabolik farklılıklardan kaynaklandığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, ÇM9 ve ÇP13 mtRFLP sonuçları farklı profiller gösterdi (Şekil 4.18A) ve dahası bu mayaların mikroskobik ve makroskobik morfolojilerinde farklılıklar bulundu. Bu aşamada bu suşlar tür içi varyantlar (“intraspecific variants”) olarak değerlendirildi. Genotipleme ve filogenetik analizler için, günümüzde en uygun yöntem olarak Multi-locus Sequence Typing (MLST) olarak bilinen teknik (Eeom ve diğ., 2018) ve buna ek olarak da fenotipik, fizyolojik ve kemotaksonomik özellikler dikkate alınmaktadır. Ayrıca birçok mikroorganizmada kesin tür tayini için DNA-DNA hibridizasyon tekniği altın standart olarak kabul edilmektedir (Rossello-Mora ve diğ., 2011). Tez araştırmalarımız kapsamında elde edilen izolatların tür tayinlerinin ve filogenetik daha ayrıntılı analizlerinin belirtilen teknikler ile ileri aşamalarda değerlendirilmesi planlanmaktadır. Bu analiz sonuçları izole edilen mayaların hangi ölçüde tip türlerden farklı olduğunu, yakın türler ile olan filogenetik yakınlıklarını ve yeni tür olup olmadıklarını kesin olarak ortaya koyacaktır.

Agar plakaları üzerinde tarama tekniği kullanılarak hücre dışı proteaz aktivitesi *Trichosporon inkin* suşlarında tespit edildi. Bu yüksek aktivite sıvı kültürlerde de gözlemlendi (Şekil 4.22) Benzer şekilde farklı süt ürünlerinden elde edilen *Trichosporon* spp. yüksek düzeyde proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirtildi (Suzzi ve diğ., 2003). Üretilen bu enzimin süt pıhtılaştırma etkinliği incelendi ve içerisinde kimozen enzimi bulunan ticari bir peynir mayası ile karşılaştırıldı. Kimozen, diğer adıyla “rennet”, hayvansal kaynaklardan elde edilen ve peynir üretiminde kullanılan bu nedenle yüksek talebe sahip bir enzimdir (Jacob ve diğ., 2011). Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen pek çok proteaz enziminde süt pıhtılaştırma aktivitesi bulunmaktadır. Bu tür enzimler genellikle aspartik proteaz sınıfından olup, kimozen benzeri olarak tanımlanmaktadır. (Merheb-Dini ve diğ., 2010). Ancak mayalardan ziyade mantarlarda bu proteazlar daha fazla belirlenmiştir ve ticari kullanıma sunulmuştur (Solanki ve diğ., 2021). *T. inkin* ÇM4 ve ÇM7 izolatlarında kimozen benzeri süt pıhtılaştırma aktivitesi tespit edildi. Bu

tür basidiomycetes sınıfından olup “yeast-like fungi” olarak da kabul edilmektedir. Mikroskobik incelemeler sonucunda mayadan hif formuna dimorfik geçiş gözlemlendi (Şekil 4.20). Süt tozu ile üretilen kültürlerin protein ekstraktları SDS-PAGE ile incelendiğinde besiyeri içeriğinde bulunan kazein bandı enzim ekstraktlarında gözlemlenmedi (Şekil 4.25). SDS-PAGE sonuçları, ham ekstraktlarda kazein proteinin yıkıldığını göstermesi nedeniyle aktivite sonuçları ile uyumludur. Benzer sonuçlar, Ozturkoglu-Budak ve diğ. (2016) tarafından yürütülen çalışmada çiğ koyun sütünden izole edilen mantarlarda belirlenmiştir. Bu enzimi rekombinant enzim olarak üretmek, saflaştırarak karakterize etmek ve biyoteknolojik açıdan kullanım potansiyelini tam olarak ortaya çıkarmak için ek analizlerin yapılması gerekmektedir.

Farklı enzimlerden ve farklı izolatlardan elde edilen enzim aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri, eğer literatürde mevcut ise, diğer çalışmalarda elde edilen değerler ile karşılaştırıldı. Literatür değerlerine kıyasla enzim aktivite verilerinde değişkenlik gözlemlendi. Bu farklı izolatlar kullanıldığı ve deneyler farklı koşullar altında gerçekleştirildiği için beklenen bir durumdur. Dahası, Baltierra-Trejo ve diğ. (2015) tarafından literatürdeki lakkaz enzim sonuçları incelendiğinde, lakkaz için 3,5 ila 484.000 U/L arasında değişen nihai değerler bildirildiğini gözlemlenmiştir. Bu durumun, enzim aktivitesi hesaplamasında kullanılan yöntemlerle ilgili olarak literatürdeki belirgin bir tutarsızlıktan kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Mevcut çalışmadan farklı olarak, literatürdeki birçok çalışma aktivitenin nasıl hesaplandığını ayrıntılandırmamaktadır.

Mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler fermentasyon süreçleri için önemlidir ve son ürünün kalitesini etkileyen bir özelliktir (Mayo ve diğ., 2021). Başlangıç kültürleri ya da geleneksel yöntemler ile başlatılan fermentasyon süreçlerinde, ortamın başka organizmalarla kontamine olmaması gerekir. Bu nedenle, peynirden izole edilen *P. membranifaciensis* EP23 izolatının *K. marxianus* İ20 ve İ40 izolatlarına karşı antagonistik etkisi (Şekil 4.21), bu suşun peynir yapımında kullanımı için bir avantaj olarak değerlendirilebilir. *P. membranifaciensis* türünde iki tane toksin tanımlanmıştır ve diğer mayalarla etkileşimler, bu etkileşimlerin mekanizmaları ve potansiyel uygulama alanları üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Alonso ve diğ., 2015, Belda ve diğ., 2017). Bu çalışmada belirlenen antagonistik etkileşime yol açan etkenlerin ve mekanizmaların belirlenmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Sonuç olarak, biyoteknolojik açıdan önemli mikrobiyal enzimlerin doğal kaynaklarını izole edip tanımlamak ve bu enzimlerin hedefler doğrultusunda kullanım alanları bulması,

endüstriyel sektörler için önem arz etmektedir. Sunulan bu tez kapsamında yapılan çalışmalar Türkiye'den toplanan süt ve süt ürünlerinden 137 tane yeni maya izolatının elde edilmesine olanak sağladı. Bunlar arasından seçilen maya izolatları tür düzeyinde tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Maya izolatlarının farklı metabolik ve genetik özelliklere sahip olduğu başarılı şekilde gösterilmiştir. Farklı maya suşlarında β -galaktosidaz, β -glukozidaz, lösin arilamidaz, asit fosfataz ve proteaz enzim aktiviteleri analiz edilerek üretim potansiyelleri açığa çıkarılmıştır. Elde edilen çıktılar, doğal kaynaklardan elde edilen mayalar ve bunların özelliklerine ilişkin bilgileri genişleterek literatüre katkı sağlamıştır.



KAYNAKLAR

- Addis, E., Fleet, G., Cox, J., Kolak, D. and Leung, T., 2001, The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses, *International journal of food microbiology*, 69, 25-36.
- Ahlawat, S., Kumawat, M. and Babel, P.K., 2018, *Microbial enzymes in food technology*, Enzymes in food technology: Improvements and innovations.
- Aldridge, S., 2013, Industry backs biocatalysis for greener manufacturing, *Nature biotechnology*, 31, 95-96.
- Alonso, A., Belda, I., Santos, A., Navascués, E. and Marquina, D., 2015, Advances in the control of the spoilage caused by *Zygosaccharomyces* species on sweet wines and concentrated grape musts, *Food control*, 51, 129-134.
- Antunovics, Z., Szabo, A., Heisteringer, L., Mattanovich, D. and Sipiczki, M., 2023, Synthetic two-species allodiploid and three-species allotetraploid *Saccharomyces* hybrids with euploid (complete) parental subgenomes, *Scientific reports*, 13, 1112.
- Arbige, M.V., Shetty, J.K. and Chotani, G.K., 2019, Industrial Enzymology: The Next Chapter, *Trends in biotechnology*, 37, 1355-1366.
- Arevalo-Villena, M., Briones-Perez, A., Corbo, M., Sinigaglia, M. and Bevilacqua, A., 2017, Biotechnological application of yeasts in food science: starter cultures, probiotics and enzyme production, *Journal of applied microbiology*, 123, 1360-1372.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K., 2003, *Current protocols in molecular biology*, vol. 1 John Wiley & Sons, Inc, Brooklyn, New York, 3, 1994-2005.
- Baltierra-Trejo, E., Marquez-Benavides, L. and Sanchez-Yanez, J.M., 2015, Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase, *Journal of microbiological methods*, 119, 126-131.
- Banjara, N., Suhr, M.J. and Hallen-Adams, H.E., 2015, Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types, *Current microbiology*, 70, 792-800.
- Bansal, S., Oberoi, H.S., Dhillon, G.S. and Patil, R., 2008, Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity, *Indian journal of microbiology*, 48, 337-341.
- Barnett, J.A., 2000, A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880, *Yeast*, 16, 755-771.
- Barnett, J.A. and Lichtenthaler, F.W., 2001, A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900, *Yeast* 18, 363-388.

- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D., 1990, *Yeasts: Characteristics and Identification*, Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D. and Santos, A., 2017, The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins, *Toxins*, 9, 112.
- Belloch, C., Querol, A., García, M.D. and Barrio, E., 2000, Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 1, 405-416.
- Bennett, J. and Phaff, H.J., 1993, *Early biotechnology: the Delft connection*, ASM News, 59, 401-404.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Sayers, E.W., 2012, GenBank, *Nucleic acids research*, 41, 36-42.
- Bhalla, T.C., Thakur, N. and Thakur, N., 2017, Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides, *LWT*, 77, 178-185.
- Bintsis, T., 2021, Yeasts in different types of cheese, *AIMS microbiology*, 7, 447-470.
- Blanz, P.A. and Gottschalk, M., 1984, A comparison of 5S ribosomal RNA nucleotide sequences from smut fungi, *Systematic and applied microbiology*, 5, 518-526.
- Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E. and Panagou, E.Z., 2018, Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation, *International journal of food microbiology*, 271, 48-59.
- Braga, A.R.C., Gomes, P.A. and Kalil, S.J., 2012, Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, *Food and bioprocess technology*, 5, 1653-1663.
- Čadež, N., Bellora, N., Ulloa, R., Tome, M., Petković, H., Groenewald, M., Hittinger, C.T. and Libkind, D., 2021, *Hanseniaspora smithiae* sp. nov., a novel apiculate yeast species from Patagonian forests that lacks the typical genomic domestication signatures for fermentative environments, *Frontiers in microbiology*, 12, 679894.
- Cadez, N., Raspor, P., de Cock, A.W., Boekhout, T. and Smith, M.T., 2002, Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*, *FEMS yeast research*, 1, 279-289.
- Cadez, N., Raspor, P. and Smith, M.T., 2006, Phylogenetic placement of *Hanseniaspora-Kloeckera* species using multigene sequence analysis with taxonomic implications: descriptions of *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* sp. nov. and *Hanseniaspora occidentalis* var. *citrica* var. nov., *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56, 1157-1165.

- Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V. and Reinheimer, J., 2010, *Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations*, Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications.
- Cavaliere, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R. and Polsinelli, M., 2003, Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine, *Journal of molecular evolution*, 57, 226-232.
- Chapman, J., Ismail, A.E. and Dinu, C.Z., 2018, Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks, *Catalysts*, 8, 238.
- Chen, L.S., Ma, Y., Maubois, J.L., He, S.H., Chen, L.J. and Li, H.M., 2010, Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol, *Dairy science & technology*, 90, 537-548.
- Choi, J.M., Han, S.S. and Kim, H.S., 2015, Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnology advances*, 33, 1443-1454.
- Chu, Y., Li, M., Jin, J., Dong, X., Xu, K., Jin, L., Qiao, Y. and Ji, H., 2023, Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries, *Journal of fungi*, 9, 170.
- Corchero, J.L., Gasser, B., Resina, D., Smith, W., Parrilli, E., Vázquez, F., Abasolo, I., Giuliani, M., Jäntti, J. and Ferrer, P., 2013, Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics, *Biotechnology advances*, 31, 140-153.
- Daniel, H.M. and Meyer, W., 2003, Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts, *International journal of food microbiology*, 86, 61-78.
- Daniel, H.M., Sorrell, T.C. and Meyer, W., 2001, Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51, 1593-1606.
- de Albuquerque, T.L., de Sousa, M., Gomes, E.S.N.C., Girao Neto, C.A.C., Goncalves, L.R. B., Fernandez-Lafuente, R. and Rocha, M.V.P., 2021, beta-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review, *International journal of biological macromolecules*, 191, 881-898.
- Deak, T., 2007, *Handbook of food spoilage yeasts*, CRC press.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.L., Barbier, G. and Le Blay, G., 2011, Fungal diversity in cow, goat and ewe milk, *International journal of food microbiology*, 151, 247-251.
- Deparis, Q., Claes, A., Foulquié-Moreno, M.R. and Thevelein, J.M., 2017, Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories, *FEMS yeast research*, 17, fox036.
- Dequin, S., 2001, The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts, *Applied microbiology and biotechnology*, 56, 577-588.

- Dinçer, A. and Telefoncu, A., 2007, Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads, *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 45, 10-14.
- Dolinski, K. and Botstein, D., 2005, Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence, *Genome research*, 15, 1611-1619.
- Eeom, Y.J., Son, S.Y., Jung, D.H., Hur, M.S., Kim, C.M., Park, S.Y., ... & Park, C.S., 2018, Diversity analysis of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from natural sources by multilocus sequence typing (MLST), *Food science and biotechnology*, 27, 1119-1127.
- El-Gendi, H., Saleh, A.K., Badierah, R., Redwan, E.M., El-Maradny, Y.A. and El-Fakharany, E.M., 2021, A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges, *Journal of fungi*, 8.
- Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K. and Antranikian, G., 2014, Extremozymes--biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms, *Current opinion in biotechnology*, 29, 116-123.
- Ersöz, F. and İnan, M., 2019, Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*, *Protein expression and purification*, 154, 126-133.
- Fan, T., Jing, S., Zhang, H., Yang, X., Jin, G. and Tao, Y., 2022, Localization, purification, and characterization of a novel beta-glucosidase from *Hanseniaspora uvarum* Yun268, *Journal of food science*, 87, 886-894.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. and Statzell-Tallman, A., 2000, Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 3, 1351-1371.
- Fisk, D.G., Ball, C.A., Dolinski, K., Engel, S.R., Hong, E.L., Issel-Tarver, L., Schwartz, K., Sethuraman, A., Botstein, D. and Michael Cherry, J., 2006, *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis, *Yeast*, 23, 857-865.
- Fröhlich-Wyder, M.T., Arias-Roth, E. and Jakob, E., 2019, Cheese yeasts, *Yeast*, 36, 129-141.
- Geijer, C., Ledesma-Amaro, R. and Tomás-Pejó, E., 2022, Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology, *FEMS yeast research*, 22, foab071.
- Ghosh, T., Beniwal, A., Semwal, A. and Navani, N.K., 2019, Mechanistic Insights Into Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Associated With Ethnic Fermented Dairy Products, *Frontiers in microbiology*, 10, 502.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K. and André, B., 2002, Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Nature*, 418, 387-391.
- Graf, F.M.R. and Buchhaupt, M., 2022, Comparative investigations on different β -glucosidase surrogate substrates, *Fermentation*, 8, 83.

- Greiner, R., Alminger, M.L. and Carlsson, N.G., 2001, Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of baker's yeast, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 2228-2233.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V., 2013, A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond, *BioMed research international*, 2013, 329121.
- Günay, M. and Genç, T.T., 2023, Molecular identification of yeasts from Turkish traditional cheeses: Extracellular enzyme activities and physiological properties important for dairy industry, *Nusantara bioscience*, 15.
- Hanna, M. and Xiao, W., 2006, *Isolation of nucleic acids*, Yeast Protocol, 15-20.
- Haraldsson, A.K., Veide, J., Andlid, T., Alminger, M.L. and Sandberg, A.S., 2005, Degradation of phytate by high-phytase *Saccharomyces cerevisiae* strains during simulated gastrointestinal digestion, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 5438-5444.
- Herreros, M., Fresno, J., Prieto, M.G. and Tornadizo, M., 2003, Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese), *International dairy journal*, 13, 469-479.
- Higgins, C. and Brinkhaus, F., 1999, Efficacy of several organic acids against molds, *Journal of applied poultry research*, 8, 480-487.
- Iris, L., Antonio, M., Antonia, B.M. and Antonio, S.L.J., 2020, *Isolation, selection, and identification techniques for non-Saccharomyces yeasts of oenological interest*, Biotechnological progress and beverage consumption. Elsevier.
- ISO, E., 2010, 6887-5; Microbiology of the Food Chain—Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination—Part 1: General Rules for the Preparation of the Initial Suspension and Decimal Dilutions, International Organization of Standardization (ISO): Geneva, Switzerland.
- Jacob, M., Jaros, D. and Rohm, H., 2011, Recent advances in milk clotting enzymes, *International journal of dairy technology*, 64, 14-33.
- Johnson, E.A. and Echavarri-Erasun, C., 2011, *Yeast biotechnology*, The yeasts. Elsevier.
- Kahve, H.I., Akbulut, M. and Coklar, H., 2022, Identification and technological characterization of endogenous yeast isolated from fermented black carrot juice, shalgam, *LWT*, 154, 112823.
- Kamran, A., Bibi, Z., Aman, A. and Qader, S.A.U., 2016, Lactose hydrolysis approach: isolation and production of β -galactosidase from newly isolated *Bacillus strain B-2*, *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 5, 99-103.
- Kan, V. L., 1993, Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia, *The journal of infectious diseases*, 168, 779-783.

- Karasu-Yalcin, S., Senses-Ergul, S. and Ozbas, Z.Y., 2012, Identification and enzymatic characterization of the yeasts isolated from Erzincan tulum cheese, *Dairy/Mljekarstvo*, 62.
- Karim, A., Gerliani, N. and Aïder, M., 2020, *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology, *International journal of food microbiology*, 333, 108818.
- Kaur, P. and Satyanarayana, T., 2009, *Yeast acid phosphatases and phytases: production, characterization and commercial prospects*, *Yeast biotechnology: diversity and applications*, 693-714.
- Koshland Jr, D.E., 1994, Das Schlüssel-Schloß-Prinzip und die Induced-fit-Theorie, *Angewandte Chemie*, 106(23-24), 2468-2472.
- Kurtzman, C. and Blanz, P., 1998, *Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships*, *The Yeasts*. Elsevier.
- Kurtzman, C., Fell, J.W. and Boekhout, T., 2011, *The yeasts: a taxonomic study*, Elsevier.
- Kurtzman, C.P., 2006, Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods, *Mycoscience*, 47, 65-71.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J., 1998, Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J., 2003, Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses, *FEMS yeast research*, 3, 417-432.
- Lane, M.M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K.H., O'Byrne, C.P. and Morrissey, J.P., 2011, Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 100, 507-19.
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D. and Labrie, S., 2012, Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec, *Dairy science & technology*, 92, 455-468.
- Lee, J.S., Shin, J.H., Kim, M.N., Jung, S.I., Park, K.H., Cho, D., Kee, S.J., Shin, M.G., Suh, S.P. and Ryang, D.W., 2007, *Kodamaea ohmeri* isolates from patients in a university hospital: identification, antifungal susceptibility, and pulsed-field gel electrophoresis analysis, *Journal of clinical microbiology*, 45, 1005-1010.
- Legras, J.L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.M. and Karst, F., 2007, Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history, *Molecular ecology*, 16, 2091-2102.
- Lemieux, R.U. and Spohr, U., 1994, How Emil Fischer was led to the lock and key concept for enzyme specificity, *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 50, 1-20.

- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. and Wang, X., 2012, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering, *Computational and structural biotechnology journal*, 2, e201209017.
- Lioliou, K., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. and Robinson, R., 2001, Changes in the microflora of Manouri, a traditional Greek whey cheese, during storage, *International journal of dairy technology*, 54, 100-106.
- Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L., Eliskases-Lechner, F. and Prillinger, H., 2006, Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques, *Food microbiology*, 23, 341-350.
- Lopez, M.C., Mateo, J.J. and Maicas, S., 2015, Screening of beta-Glucosidase and beta-Xylosidase Activities in Four Non-*Saccharomyces* Yeast Isolates, *Journal of food science*, 80, C1696-704.
- López, S., Mateo, J.J. and Maicas, S., 2015, Screening of *Hanseniaspora* strains for the production of enzymes with potential interest for winemaking, *Fermentation*, 2, 1.
- Magwaza, B., Amobonye, A. and Pillai, S., 2024, Microbial beta-glucosidases: Recent advances and applications, *Biochimie*, 225, 49-67.
- Manera, A.P., Kuhn, G., Polloni, A., Marangoni, M., Zabet, G., Kalil, S.J., de Oliveira, D., Treichel, H., Oliveira, J.V. and Mazutti, M.A., 2011, Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of β -galactosidase, *Food chemistry*, 125, 1235-1240.
- Manzanares, P., Ramón, D. and Querol, A., 1999, Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of β -D-xylosidase activity, *International journal of food microbiology*, 46, 105-112.
- Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S. and Vallés, S., 2000, A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts, *International journal of food science & technology*, 35, 95-103.
- Marsit, S. and Dequin, S., 2015, Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review, *FEMS yeast research*, 15, fov067.
- Martins, D.B.G., de Souza Jr, C.G., Simoes, D.A. and de Morais Jr, M.A., 2002, The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose, *Current microbiology*, 44, 379-382.
- Mattanovich, D., Sauer, M. and Gasser, B., 2014, Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks, *Microbial cell factories*, 13, 1-5.
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L. and Flórez, A. B., 2021, Microbial interactions within the cheese ecosystem and their application to improve quality and safety, *Foods*, 10, 602.
- McDonald, A.G., & Tipton, K.F., 2023, Enzyme nomenclature and classification: The state of the art, *The FEBS journal*, 290 (9), 2214-2231.

- McGovern, P.E., Hartung, U., Badler, V.R., Glusker, D.L. and Exner, L.J., 1997, The beginnings of winemaking and viniculture in the ancient Near East and Egypt, *Expedition*, 39, 3-21.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P. and Wang, C.S., 2004, Fermented beverages of pre-and proto-historic China, *Proceedings of the national academy of sciences*, 101, 17593-17598.
- Merchán, A.V., Benito, M.J., Galván, A.I. and de Herrera, S.R.M.S., 2020, Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese, *LWT*, 124, 109173.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M. and da Silva, R., 2010, Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Food chemistry*, 120, 87-93.
- Miller, J. H., 1972, *Experiments in molecular genetics*.
- Mishra, S.S., Ray, R.C., Rosell, C.M. and Panda, D., 2017, *Microbial enzymes in food applications: history of progress*, Microbial enzyme technology in food applications. CRC Press.
- Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M. and Savardashtaki, A., 2022, beta-Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form, *Biotechnology and applied biochemistry*, 69, 612-628.
- Mtibaa, R., Olicón-Hernández, D.R., Pozo, C., Nasri, M., Mechichi, T., González, J. and Aranda, E., 2018, Degradation of bisphenol A and acute toxicity reduction by different thermo-tolerant ascomycete strains isolated from arid soils, *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 87-96.
- Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K.J., Lievens, B. and Thevelein, J.M., 2017, Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation, *Biotechnology for biofuels*, 10, 1-19.
- Mustacchi, R., Hohmann, S. and Nielsen, J., 2006, Yeast systems biology to unravel the network of life, *Yeast*, 23, 227-238.
- Nguyen, H.V., Lepage, A. and Gaillardin, C.A., 2000, Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380, *Systematic and applied microbiology*, 23, 71-85.
- Nigam, P.S., 2013, Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, *Biomolecules*, 3, 597-611.
- Olicón-Hernández, D.R., Guerra-Sánchez, G., Porta, C.J., Santoyo-Tepole, F., Hernández-Cortez, C., Tapia-García, E.Y. and Chávez-Camarillo, G.M., 2022, Fundaments and

Concepts on Screening of Microorganisms for Biotechnological Applications. Mini Review, *Current microbiology*, 79, 373.

- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P.A. and de Vries, R.P., 2016, Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese, *International journal of food microbiology*, 237, 17-27.
- Padilla, B., Frau, F., Ruiz-Matute, A.I., Montilla, A., Belloch, C., Manzanares, P. and Corzo, N., 2015, Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by β -galactosidases from dairy *Kluyveromyces*, *Journal of dairy research*, 82, 356-364.
- Park, Y.K. and Ledesma-Amaro, R., 2023, What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry?, *Trends in biotechnology*, 41, 242-254.
- Pessôa, M.G., Vespermann, K.A., Paulino, B.N., Barcelos, M.C., Pastore, G.M. and Molina, G., 2019, Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology, *Biotechnology advances*, 37, 319-339.
- Piccolino, M., 2000, Biological machines: from mills to molecules, *Nature reviews molecular cell biology*, 1, 149-153.
- Pincus, D., Orena, S. and Chatellier, S., 2007, Yeast identification—past, present, and future methods, *Medical mycology*, 45, 97-121.
- Querol, A. and Fleet, G.H., 2006, *Yeasts in food and beverages*.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Cotter, P.D., 2011, Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese, *International journal of food microbiology*, 150, 81-94.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Cotter, P.D., 2013, The complex microbiota of raw milk, *FEMS microbiology reviews*, 37, 664-698.
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R.Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M.R. and Thevelein, J.M., 2015, Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation, *FEMS yeast research*, 15, fov053.
- Rai, A.K., Pandey, A. and Sahoo, D., 2019, Biotechnological potential of yeasts in functional food industry, *Trends in food science & technology*, 83, 129-137.
- Rajoka, M., Khan, S., Latif, F. and Shahid, R., 2004, Influence of carbon and nitrogen sources and temperature on hyperproduction of a thermotolerant β -glucosidase from synthetic medium by *Kluyveromyces marxianus*, *Applied biochemistry and biotechnology*, 117, 75-92.

- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S.B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A., Rebello, S. and Pandey, A., 2018, Applications of Microbial Enzymes in Food Industry, *Food technology and biotechnology*, 56, 16-30.
- Ravn, J.L., Engqvist, M.K., Larsbrink, J. and Geijer, C., 2021, CAZyme prediction in ascomycetous yeast genomes guides discovery of novel xylanolytic species with diverse capacities for hemicellulose hydrolysis, *Biotechnology for biofuels*, 14, 1-18.
- Rebello, S., Abraham, A., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Karthika Bahuleyan, A., Aneesh, E.M. and Pandey, A., 2018, Non-conventional yeast cell factories for sustainable bioprocesses, *FEMS microbiology letters*, 365, fny222.
- Requena, T., Pelaez, C. and Fox, P.F., 1993, Peptidase-und Proteinase-Aktivität von *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus plantarum*, *Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und forschung*, 196, 351-355.
- Research B., 2021, *BCC Research Report, Global Markets for Enzymes in Industrial Applications*, USA, BCC Research LLC, Bio030L.
- Robertson, L.A., 2003, The Delft school of microbiology, from the nineteenth to the twenty-first century, *Advances in applied microbiology*, 52, 357-388.
- Robinson, P.K., 2015, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays in biochemistry*, 59, 1-41.
- Rodrigues, A., Pinheiro, R., Costa, J., Santos, J., Poli, J., Rosa, C., Soares, M., Muratori, M. and Nóbrega, M., 2018, Comparison between morphophysiological and molecular methods for the identification of yeasts isolated from honey, *International food research journal*, 25, 418-422.
- Rodríguez, M., Lopes, C., Van Broock, M., Valles, S., Ramón, D. and Caballero, A., 2004, Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities, *Journal of applied microbiology*, 96, 84-95.
- Rompkovksi, C., Agustini, B.C., Deffert, F., Stadtlober, M.G.A., Brand, D., da Silva, G.A. and Bonfim, T.M.B., 2022, Microbial dynamics in industrial-scale wine fermentation employing *Hanseniaspora uvarum* beta-glucosidase-producer strain, *Journal of food science and technology*, 59, 1570-1576.
- Rossello-Mora, R., Urdiain, M., & López-López, A., 2011, DNA–DNA Hybridization. In *Methods in microbiology*, Academic Press, 38, 325-347.
- Sacristán, N., González, L., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.A., 2012, Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese, *Food microbiology*, 30, 260-266.
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S.A. and Tassaduq, R., 2017, Sources of beta-galactosidase and its applications in food industry, *3 Biotech*, 7, 79.

- Schlender, M., Distler, U., Tenzer, S., Thines, E. and Claus, H., 2016, Purification and properties of yeast proteases secreted by *Wickerhamomyces anomalus* 227 and *Metschnikovia pulcherrima* 446 during growth in a white grape juice, *Fermentation*, 3, 2.
- Singh, G., Verma, A.K. and Kumar, V., 2016a, Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of beta-glucosidases, 3 *Biotech*, 6, 3.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P.K., 2016b, Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, 3 *Biotech*, 6, 174.
- Singh, R.V. and Sambyal, K., 2023, β -Galactosidase as an industrial enzyme: Production and potential, *Chemical papers*, 77, 11-31.
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I. and Antunovics, Z., 2001, Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery, *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 97-105.
- Sipiczki, M., 2022, When barcoding fails: Genome chimerization (admixing) and reticulation obscure phylogenetic and taxonomic relationships, *Molecular ecology resources*, 22, 1762-1785.
- Sipiczki, M., 2023, Identification of antagonistic yeasts as potential biocontrol agents: Diverse criteria and strategies, *International journal of food microbiology*, 406, 110360.
- Sipiczki, M., Czentye, K. and Kallai, Z., 2024, High intragenomic, intergenomic, and phenotypic diversity in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeasts indicates a special mode of genome evolution, *Scientific reports*, 14, 10521.
- Sipiczki, M., Takeo, K., Yamaguchi, M., Yoshida, S. and Miklos, I., 1998, Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast, *Microbiology (Reading)*, 144 (5), 1319-1330.
- Smith, P.e., Krohn, R.I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. and Klenk, D., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical biochemistry*, 150, 76-85.
- Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R. and Walia, A., 2021, Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses, 3 *Biotech*, 11, 428.
- Souza, P.V.d., Grecellé, C.B.Z., Barreto, F., Ramírez-Castrillon, M., Valente, P. and Costa, M. d., 2021, Bacteria and yeasts associated to Colonial cheese production chain and assessment of their hydrolytic potential, *Brazilian journal of food technology*, 24, e2020286.
- Spencer, J., Rawling, S., Stratford, M., Steels, H., Novodvorska, M., Archer, D. and Chandra, S., 2011, Yeast identification: Reassessment of assimilation tests as sole universal identifiers, *Letters in applied microbiology*, 53, 503-508.

- Su, M., Hu, Y., Cui, Y., Wang, Y., Yu, H., Liu, J., Dai, W. and Piao, C., 2021, Production of β -glucosidase from okara fermentation using *Kluyveromyces marxianus*, *Journal of food science and technology*, 58, 366-376.
- Sutay Kocabaş, D., 2021, *Gıda endüstrisinde enzimlerin rolü ve ilgili yasal düzenlemeler*, Gıda Biyoteknolojisi, Ögel, Z.B., editör, 1. Baskı, Ankara: Türkiye Klinikleri, 29-38.
- Suter, B., Auerbach, D. and Stagljar, I., 2006, Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond, *Biotechniques*, 40, 625-644.
- Suzzi, G., Schirone, M., Martuscelli, M., Gatti, M., Fornasari, M.E. and Neviani, E., 2003, Yeasts associated with Manteca, *FEMS yeast research*, 3, 159-166.
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C.E. and Vichitphan, K., 2011, Characterization of β -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine, *World journal of microbiology and biotechnology*, 27, 423-430.
- Tagad, C.K. and Sabharwal, S.G., 2018, Purification and characterization of acid phosphatase from *Macrotyloma uiflorum* seeds, *Journal of food science and technology*, 55, 313-320.
- Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K., 1989, Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101, *Applied microbiology and biotechnology*, 30, 120-124.
- Trono, D., 2019, *Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries*, Advances in enzyme technology. Elsevier.
- Türkel, S., & Ener, B., 2009, Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin, *Zeitschrift für naturforschung C*, 64 (5-6), 405-410.
- Van den Tempel, T. and Jakobsen, M., 2000, The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu, *International dairy journal*, 10, 263-270.
- van Wyk, N., Badura, J., von Wallbrunn, C. and Pretorius, I.S., 2024, Exploring future applications of the apiculate yeast *Hanseniaspora*, *Critical reviews in biotechnology*, 44, 100-119.
- Verstrepen, K.J., Chambers, P.J. and Pretorius, I.S., 2006, *The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: challenges, opportunities and potential benefits*, Yeasts in food and beverages.
- Vu, D., Groenewald, M., Szöke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., De Vries, M., Verkleij, G., Crous, P. and Boekhout, T., 2016, DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation, *Studies in mycology*, 85, 91-105.

- Walker, J.M., 2002, *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins*, The protein protocols handbook, 61-67.
- Walker, W.F., 1985, 5S ribosomal RNA sequences from ascomycetes and evolutionary implications, *Systematic and applied microbiology*, 6, 48-53.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J., 1990, *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR protocols: a guide to methods and applications.
- Wilmotte, A., Van De Peer, Y., Goris, A., Chapelle, S., De Baere, R., Nelissen, B., Neefs, J.-M., Hennebert, G.L. and De Wachter, R., 1993, Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis, *Systematic and applied microbiology*, 16, 436-444.
- Woese, C.R., 1987, Bacterial evolution, *Microbiological reviews*, 51, 221-271.
- Yang, W., Su, Y., Wang, R., Zhang, H., Jing, H., Meng, J., Zhang, G., Huang, L., Guo, L., Wang, J. and Gao, W., 2024, Microbial production and applications of beta-glucosidase- A review, *International journal of biological macromolecules*, 256, 127915.
- Zhang, B., Wendan, Y., Wang, F., Omedi, J.O., Liu, R., Huang, J., Zhang, L., Zou, Q., Huang, W. and Li, S., 2019, Use of *Kluyveromyces marxianus* prefermented wheat bran as a source of enzyme mixture to improve dough performance and bread biochemical properties, *Cereal chemistry*, 96, 142-153.
- Zhou, H.X., Xu, J.L., Chi, Z., Liu, G.L. and Chi, Z.M., 2013, β -Galactosidase over-production by a mig1 mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose, *Biochemical engineering journal*, 76, 17-24.
- Żyłańczyk-Duda, E., Brzezińska-Rodak, M., Klimek-Ochab, M., Duda, M. and Zerka, A., 2017, *Yeast as a versatile tool in biotechnology*. Yeast: Industrial Applications.

EKLER

EK 1. Maya izolatlarının galaktoz, gliserol, laktoz, maltoz ve sükroz içeren besiyerlerindeki üreme profilleri.

İzolat	Karbon Kaynakları				
	Galaktoz	Gliserol	Laktoz	Maltoz	Sükroz
İ1	+	+	+	Z	+
İ2	+	+	+	Z	+
İ3	+	+	+	Z	+
İ4	+	+	+	Z	+
İ5	+	+	+	Z	+
İ6	+	+	+	Z	+
İ7	+	+	+	Z	+
İ8	+	+	+	Z	+
İ9	+	+	+	Z	+
İ10	+	+	+	Z	+
İ11	+	Z	+	Z	+
İ12	+	Z	+	Z	+
İ13	+	+	+	Z	+
İ14	+	Z	+	Z	+
İ15	+	+	+	Z	+
İ16	+	Z	+	Z	+
İ17	+	+	+	Z	+
İ18	+	Z	+	Z	+
İ19	+	Z	+	Z	+
İ20	+	Z	+	Z	+
İ21	+	+	+	Z	+
İ22	+	Z	+	Z	+
İ23	+	Z	+	Z	+
İ24	+	+	+	Z	+
İ25	+	Z	+	Z	+
İ26	+	Z	+	Z	+
İ27	+	Z	+	Z	+
İ28	+	+	+	Z	+
İ29	+	+	+	Z	+
İ30	+	+	+	Z	+
İ31	+/-	+	+	Z	+
İ32	Z	+	+	Z	+
İ33	+	+	+	Z	+
İ34	+	+	+	Z	+
İ35	+	+	+	Z	+
İ36	+	+	+	Z	+
İ37	+	+	+	Z	+

İ38	+	Z	+	Z	+
İ39	+	+	+	Z	+
İ40	+	Z	+	Z	+
İ41	+	+	+	Z	+
İ42	+	+	+	Z	+
İ43	+	Z	+	Z	+
İ44	+	Z	+	Z	+
İ45	+	+	+	Z	+
İ46	+	+	+	Z	+
İ47	+	Z	+	Z	+
İ48	+	Z	+	Z	+
İ49	+	Z	+	Z	+
İ50	+	+	+	Z	+
İ51	+	Z	+	Z	+
İ52	+	Z	+	Z	+
İ53	+	+	+	Z	+
İ54	+	+	+	Z	+
İ55	+	Z	+	Z	+
Arm1	-	+	Z	Z	Z
Arm2	+	+	+	+	+
Arm3	+	+	+	+	+
Arm4	+	+	+	+	+
Arm5	-	-	-	-	Z
Arm6	+	+	+	+	+
EP1	-	+	-	-	-
EP2	-	+	-	-	-
EP3	-	+	-	Z	Z
EP4	-	+	-	Z	Z
EP5	-	+	-	Z	Z
EP6	-	+	-	Z	Z
EP7	-	+	-	Z	Z
EP8	-	+	-	Z	Z
EP9	-	+	-	Z	Z
EP10	-	+	-	Z	Z
EP11	-	+	-	Z	Z
EP12	-	+	-	Z	Z
EP13	-	+	-	Z	Z
EP14	-	+	-	Z	Z
EP15	-	+	-	Z	Z
EP16	-	+	-	Z	Z
EP17	-	+	-	Z	Z
EP18	-	+	-	Z	Z
EP19	-	+	-	Z	Z
EP20	-	+	-	Z	Z
EP21	-	+	-	Z	Z

EP22	-	+	-	Z	Z
EP23	-	+	-	Z	Z
EP24	-	+	-	Z	Z
EP25	-	+	-	Z	Z
EP26	-	+	-	Z	Z
EP27	-	+	-	Z	Z
EP28	-	+	-	Z	Z
EP29	-	+	-	Z	Z
ÇM1	+	+	+	+	+
ÇM2	+	+	+	+	+
ÇM3	+	+	+	+	+
ÇM4	+	+	+	+	+
ÇM5	+	+	+	+	+
ÇM6	+	+	+	+	+
ÇM7	+	+	+	+	+
ÇM8	+	+	+	+	+
ÇM9	+	Z	Z	Z	Z
ÇM10	Z	+	Z	Z	Z
ÇM11	+	+	+	+	+
ÇM12	+	+	+	+	+
ÇM13	+	+	+	+	+
ÇM14	+	+	+	+	+
ÇM15	+	+	+	+	+
ÇM16	+	+	+	+	+
ÇM17	+	+	+	+	+
ÇM18	+	+	+	+	+
ÇM19	+	+	+	+	+
ÇM20	+	+	+	+	+
ÇM21	+	+	+	+	+
ÇM22	+	+	+	+	+
ÇM23	+	+	+	+	+
ÇM24	+	+	+	+	+
ÇP1	+	+	Z	Z	+
ÇP2	+	+	Z	Z	+
ÇP3	+	-	-	-	+
ÇP4	+	+	Z	Z	+
ÇP5	+	+	Z	Z	Z
ÇP6	+	-	-	-	+
ÇP7	+	+	Z	Z	+
ÇP8	+	+	Z	Z	Z
ÇP9	+	+	Z	Z	Z
ÇP10	+	+	Z	Z	+
ÇP11	+	+	Z	Z	+
ÇP12	+	+	Z	Z	+
ÇP13	+	+	Z	Z	+

ÇP14	+	+	Z	Z	+
ÇP15	+	+	Z	Z	+
ÇP16	+	+	Z	Z	+
ÇP17	+	+	Z	Z	+
ÇP18	+	+	Z	Z	+
ÇP19	+	+	Z	Z	+
ÇP20	+	+	Z	Z	+
ÇP21	+	+	Z	Z	+



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Burcu KARTAL SURAL
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	2015

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
<u>Makaleler</u> Yemenici, M., Kartal Sural, B., Karaer Uzuner, S., & Palabiyik, B. (2022). Involvement of Sec71 and Ubp2 in tunicamycin-induced ER stress response in the fission yeast. <i>Molecular Biology Reports</i>, 49(6),4719-4726. Yilmazer, M., Bayrak, B., Kartal, B., Uzuner, S. K., & Palabiyik, B. (2021). Identification of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ird mutants resistant to glucose suppression and oxidative stress. <i>FOLIA BIOLOGICA</i>, vol.67, pp.163-173, 2021. Sandal, A. İ., Şenlikci, H., Yilmazer, M., Kartal, B., Palabiyik, B., & Özdaş, Ö. B. (2021). Determination of oxidative stress parameters and DNA fragmentation on post-thawed buck semen in the presence of ram seminal plasma and fetal calf serum. <i>Andrologia</i>, 53(5), e14032.	

Yilmazer, M., **Kartal, B.**, Tarhan, Ç., Özarabacı, I., Akçaalan, S., Özkan, E., ... & Palabiyik, B. (2019). A Genome-Wide Screen for Wortmannin-Resistant Mutants in *Schizosaccharomyces pombe*: The Phosphorylation-Impaired Mutants Are Resistant to Signaling Defect. *DNA and Cell Biology*, 38(12), 1427-1436.

Özkan, E., **Kartal, B.**, Yilmazer, M., & Palabiyik, B. (2019). Iron regulates hexose transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of basic microbiology*, 59(5), 458-464.

Kartal, B., & Palabiyik, B. (2019). Thiamine leads to oxidative stress resistance via regulation of the glucose metabolism. *Cellular and Molecular Biology*, 65(1), 73-77.

Kartal, B., Akçay, A., & Palabiyik, B. (2018). Oxidative Stress Upregulates the Transcription of Genes Involved in Thiamine Metabolism. *Turkish Journal of Biology*, 42(5), 447-452.

Bildiriler

Kartal Sural B., Pekmez M., Turkel S., Palabiyik B., “Partial characterization of the milk-clotting protease produced by *Trichosporon* spp. strains isolated from water buffalo raw milk” 48th Annual Conference on Yeast, Smolenice, Slovakia, 14-17 May 2024

Kartal Sural B., Turkel S., Palabiyik B., "Isolation, characterization, and identification of yeasts species from dairy products, and characterization of their industrial enzyme profiles" V. INTERNATIONAL AGRICULTURAL, BIOLOGICAL & LIFE SCIENCE CONFERENCE, Edirne, Turkey, 17-20 September 2023

Türk A., Uçar Y., Kurt E., Palabiyik B., **Kartal Sural B.**, “Determination of fluconazole susceptibility in *Schizosaccharomyces pombe*” 2nd INTERNATIONAL AQUATIC BIOTECHNOLOGY SYMPOSIUM, İstanbul, Turkey, 13-14 October 2021

Yilmazer M., **Kartal B.**, Tarhan Ç., Özarabacı İ., ... & Palabiyik B., “A genome-wide screen for wortmannin and hydrogen peroxide resistant mutants in *Schizosaccharomyces pombe*” 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Turkey, 27-29 September 2019

Kartal B., Yilmazer M., Palabiyik, B., “A genome-wide screening of fluconazole resistant mutants in *Schizosaccharomyces pombe*” 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Turkey, 27-29 September 2019

Kartal, B., Palabiyik, B., “Thiamine-mediated cellular stress response related to glucose metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*”, 6th International Molecular Biology and Biotechnology Congress (MOLBIOTECH), December-2017, Afyon, TURKEY.

Kartal, B., Palabiyik, B., “The Role of Thiamine (Vitamin B1) in Cellular Stress Responses and Metabolism, 6th National Molecular Biology and Biotechnology Congress”, October-2017, Adana, TURKEY

Kartal, B., Palabiyik, B., “Investigation of the Role of Thiamine on the Oxidative Stress Response, 18th National Biotechnology Congress”, 18-19 December 2015, Konya, TURKEY