

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Kluyveromyces marxianus***  
**MAYA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE**  
**HÜCRE DIŞI BAZI ENZİMATİK AKTİVİTELERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

**Tuğba ÇELİK**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 12.07.2012**

**Tez Danışmanı:**

**Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

TUĞBA ÇELİK, tarafından YRD. DOÇ. DR. TÜLAY TURGUT GENÇ yönetiminde hazırlanan “SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Kluyveromyces marxianus* MAYA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE HÜCRE DIŞI BAZI ENZİMATİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

Danışman

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Jüri Üyesi

Sıra No :

Tez Savunma Tarihi: 12/07/2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans BAP tarafından 2012/007 no'lu Projeden desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Tuğba ÇELİK

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesi ile eğitimim ve çalışmamın her aşamasında desteği bulunan danışmanım Sayın Hocam **Dr. Tülay TURGUT GENÇ**' e bana bu konuda çalışma fırsatı tanıdığı, çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemediği için teşekkür ederim. Filogenetik analizlerin yapılması sırasında yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen Sayın **Doç. Dr. Serap MUTUN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, tüm araştırmalarımnda beraber çalıştığım, her türlü desteğini benden esirgemeyen çalışma ortağım ve çok değerli arkadaşım **İlknur Nezahat ÇILDIR**'a teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında laboratuvarını ve cihazlarını kullanmama izin veren ve bilgilerini esirgemeyen Sayın Hocam **Doç. Dr. Kemal Melih TAŞKIN**'a teşekkürü borç bilirim.

Eğitimim boyunca çalışmalarımın yürütülmesi esnasında manevi desteğinin yanı sıra çalışmalarımnda yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan arkadaşım **Fatih SEZER**'e teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca bana inanan ve her zaman yanımda olan gerek manevi gerek maddi desteğini esirgemeyen annem **Hacer ÇELİK**, babam **Habil ÇELİK**'e, kardeşim **Ufuk ÇELİK**'e ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

**Tuğba ÇELİK**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A	Absorbans
<i>ADH</i>	Alcohol Dehydrogenase
API	Analytical Profile Index
α	Alfa
β	Beta
bç	Baz çifti
CFU	Colony Forming Unit
CFW	Calcofluor White
CWA	Cell Wall-Associated
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
DR	Derepress
E.C.	Enzyme Code
ECC	European Culture Collection
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ETS	External Transcribed Spacer
FDA	Food and Drug Administration
GOD-POD	Glucose-Oxidase Peroxidase
gr	Gram
gr/l	Gram/Litre
GRAS	Generally Recognised As Safe
HFS	High Fructose Syrup
HGT	High Affinity Glucose Transporter
IGS	Intergenic Spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer
KHT	<i>Kluyveromyces</i> Hexose Transporter

LSU	Large Subunit
M	Molar
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mb	Megabaz
<i>MIG1</i>	Multicopy Inhibitor of GAL Gene Expression
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
NTS	Non-Transcribed Spacer
°C	Santigrat derece
OD	Optic Density
ONPG	O-Nitrophenyl - $\beta$ -D-Galactopyranoside
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCA-SM	Peptone from Casein-yeast extract-glucose-Agar-Skim Milk
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pmol	Pikomol
R	Repress
RAG	Resistance to Antimycin A on Glucose
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal DNA
REAP	Restriction Enzyme Analysis Package
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribo Nucleic Acid
RNP	Ribonucleoprotein
rpm	Rotation per minute
SC	Secreted Culture
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSU	Small Subunit
TAE	Trisma Base, EDTA, Acetic Acid
TE	Tisma Base- EDTA
U	Unit (Ünite)
UV	Ultraviole

w/v	Weight/Volume (Ağırlık/Hacim)
YGC	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar
YNBD	Yeast Nitrogen Base, Ammonium Sulfate, Agar, Dextrose
YNBG	Yeast Nitrogen Base, Ammonium Sulfate, Agar, Glycerol
YP-D	Yeast Extract, Bacto-Peptone, Agar, Dextrose
YP-G	Yeast Extract, Bacto Peptone, Glycerol
YP-Gal	Yeast Extract, Bacto Peptone, Galactose
YP-Lac	Yeast Extract, Bacto Peptone, Lactose
YP-Mal	Yeast Extract, Bacto Peptone, Maltose
YP-Suc	Yeast Extract, Bacto Peptone, Sucrose

## ÖZET

# SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Kluyveromyces marxianus* MAYA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE HÜCRE DIŞI BAZI ENZİMATİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Tuğba ÇELİK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

12. 07. 2012, 112 sayfa

Mayaların doğal olarak buldukları yaşam alanları oldukça çeşitlidir. Besin içerikleri nedeniyle süt ve süt ürünleri mayalar için oldukça uygun bir yaşam alanıdır. Süt ürünlerinden izole edilen ve tür tanımı yapılan mayaları içeren birçok araştırma bulunmaktadır. Araştırmamızda Çanakkale bölgesinden toplanan çiğ süt, yoğurt, ayran ve peynir örneklerindeki maya florası belirlenerek izole edilen *Kluyveromyces marxianus* maya türlerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır. Ayrıca tanımlanan maya suşlarının bazı hücre dışı enzimatik aktiviteleri belirlenerek glikoz baskılamasına uğrayan enzim aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızda süt ve süt ürünlerinden *Candida inconspicua*, *Candida norvegensis*, *Candida lambica*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Candida lipolytica*, *Candida utilis*, *Candida parapsilosis*, *Candida famata*, *Candida colliculosa*, *Candida pelliculosa*, *Candida lusitanae*, *Candida sake*, *Candida melibiosica*, *Candida intermedia*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula muciliginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum capitatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces marxianus* olmak üzere toplam 22 farklı maya türü tanımlanmıştır. Moleküler karakterizasyon sonrası tanımlanan 66 *K. marxianus* maya türünün 2 farklı haplotipe sahip olduğu bulunmuştur. *K. marxianus* maya suşlarının hücre dışı enzim profilleri maya suşları arasında farklılıklar göstermektedir. Ayrıca repres ve derepres koşullarda belirlenen hücre dışı invertaz, inülinaz ve  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitelerinin bazı suşlarda baskılandığı bazı suşlarda ise aynı üreme koşullarında baskılanmadığı görülmüştür.

Çalışmamız sonucunda *K. marxianus* maya suşlarının çevresel faktörlere karşı



oluşturdukları genetik ve buna bağlı metabolik cevapları farklılıklar göstermektedir. *K. marxianus* maya hücrelerinin bulunduğu ortam şartlarına karşı oluşturdukları fizyolojik cevapları tamamen değişiktir. Glikoz farklı karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili genleri baskılamakta tek başına yetersizdir. *K. marxianus* maya türünde henüz tanımlanmamış ancak büyük olasılıkla var olan glikoz sensör ve transporter proteinlerinin bu duruma neden olması kuvvetli bir ihtimaldir.

**Anahtar sözcükler:** *Kluyveromyces marxianus*, 5,8S rDNA, invertaz, inülinaz,  $\beta$ -galaktozidaz.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF SOME EXTRACELLULAR ENZYMATIC ACTIVITIES AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Kluyveromyces marxianus* YEAST SPECIES ISOLATED FROM DIARY PRODUCTS

Tuğba ÇELİK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Asist. Prof. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

July 12, 2012, 112 pages

Natural habitats of yeast are quite varied. Due to its content, dairy products is very suitable environment for the yeasts. Many studies conducted on the identification of yeast species isolated from dairy products. In our research, we described yeast in raw milk, yoghurt, ayran and cheese samples collected from Çanakkale, Turkey. In addition molecular characterization of isolated *Kluyveromyces marxianus* yeast species were done. Extracellular enzyme activities of yeast species were determined and their glucose repression patterns uncovered.

In our study, twenty two different yeast species were identified from dairy products as *Candida inconspicua*, *Candida norvegensis*, *Candida lambica*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Candida lipolytica*, *Candida utilis*, *Candida parapsilosis*, *Candida famata*, *Candida colliculosa*, *Candida pelliculosa*, *Candida lusitaniae*, *Candida sake*, *Candida melibiosica*, *Candida intermedia*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula muciliginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum capitatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. After molecular analysis of 66 *K. marxianus* yeast strains, 2 haplotype patterns were found. Extra cellular enzyme profiles of *K. marxianus* yeast strains were different between the strains. Invertase, inulinase and  $\beta$ -galactosidase enzyme activities determined in both repres and derepres conditions were very changeable between strains.

The metabolic, and so genetic, responses of *K. marxianus* yeast strains against environmental factors were different. Physiological responses of yeast cells to environmental conditions were also different. Glucose, itself, was not enough for

repressing the genes related with the utilization of other carbon sources. Glucose sensors and transporters that are not identified yet in *K. marxianus* species may responsible from these variable results.

**Keywords:** *Kluyveromyces marxianus*, 5,8S rDNA, invertase, inulinase,  $\beta$ -galactosidase.

<b>İÇERİK</b>	<b>Sayfa</b>
TEZ SINAVI SONUÇ FORMU .....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET .....	viii
ABSTRACT .....	x
<b>BÖLÜM 1 – GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Süt ve Süt Ürünlerindeki Maya Florası ve <i>K. marxianus</i>     Maya Türlerinin Dağılımı.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. <i>K. marxianus</i> Maya Türlerinin Hücre Dışı Enzim Aktiviteleri.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. <i>K. marxianus</i> Maya Türünde Glikoz Baskılaması</b>	<b>12</b>
<b>BÖLÜM 3- MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Süt Örneklerinin Toplanması ve Maya İzolasyonu.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. İzole Edilen Maya Örneklerinin Tür Tanımlamaları.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. <i>K. marxianus</i> Maya Suşlarının Asimilasyon ve Fermentasyon Testleri</b>	<b>17</b>
<b>3.4. Genomik DNA İzolasyonu.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. ITS1- 5,8S- ITS2 Bölgelerinin Amplifikasyonu.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6. Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi.....</b>	<b>20</b>
<b>3.7. Restriksiyon Veri Analizi.....</b>	<b>21</b>

<b>3.8. <i>K. marxianus</i> Maya Suşlarının Hücre Dışı Proteaz, Lipaz ve Üreaz Enzim Aktivitelerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi.....</b>	<b>21</b>
3.8.1. Hücre dışı proteaz aktivitesi.....	21
3.8.2. Hücre dışı lipaz aktivitesi.....	22
3.8.3. Hücre dışı üreaz aktivitesi.....	22
<b>3.9. <i>K. marxianus</i> Maya Suşlarının İvertaz ve <math>\beta</math>-galaktozidaz Enzim Aktivitelerinin Kantitatif Olarak Repres–Derepres Şartlarda Belirlenmesi.....</b>	<b>22</b>
<b>3.10. <i>K. marxianus</i> Maya Suşlarının İvertaz ve İnülinaz Enzim Aktivitelerinin Repres–Derepres Şartlarda Belirlenmesi.....</b>	<b>23</b>
<b>3.11. <i>K. marxianus</i> Maya Suşlarının Hidrolitik Enzim Profillerinin Belirlenmesi.....</b>	<b>24</b>
<b>BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>26</b>
4.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Maya Yoğunlukları.....	26
4.2. Tanımlanan Maya Türlerinin Süt ve Süt Ürünlerine Göre Dağılımı... ..	28
4.3. <i>K. marxianus</i> Maya Suşlarının Asimilasyon ve Fermentasyon Testleri	31
4.4. <i>K. marxianus</i> Maya Türünden Genomik DNA İzolasyonu ve Amplifikasyonu.....	36
4.5. Restriksiyon Kesim Profilleri.....	39
4.6. Restriksiyon Bant Profilleri ve Veri Analizleri.....	64
4.7. Filogenetik Analiz Sonuçları.....	67
4.8. <i>K. marxianus</i> Maya Suşlarının Hücre Dışı Proteaz, Lipaz ve Üreaz Enzim Aktivitelerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi.....	69
4.9. Maya Türlerinin Repres ve Derepres Şartlarda İvertaz ve $\beta$ -Galaktozidaz Enzim Aktiviteleri.....	71
4.10. Maya Türlerinin Repres ve Derepres Şartlarda İvertaz ve İnülinaz Enzim Aktiviteleri.....	77

<b>4.11. <i>K. marxinaus</i> Maya Türünün Hidrolitik Enzim Profiline Belirlenmesi.....</b>	<b>79</b>
<b>BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>87</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>96</b>
<b>Çizgeler.....</b>	<b>I</b>
<b>Şekiller.....</b>	<b>III</b>
<b>Özgeçmiş.....</b>	<b>VII</b>

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

*Kluyveromyces marxianus* maya türü oldukça değişik habitatlarda bulunmakla birlikte genel olarak süt ve süt ürünlerinde yoğun dağılım göstermektedir. Pek çok süt ürününün fermantasyonun da ve çeşitli peynirlerin olgunlaştırılmasında mayalardan yararlanılmakla beraber mayalar aynı zamanda süt ürünlerinde bozulmalara yol açmaktadır. Patojenik etkisi olmadığı için endüstride ve biyoteknolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Alkolün, farklı enzimlerin, tek hücre proteinlerinin ve bazı aroma bileşiklerinin üretimi gibi farklı biyoteknolojik uygulamalarda *K. marxianus* maya suşları kullanılmaktadır. Bunun yanında *K. marxianus* maya suşları arasında yüksek oranda metabolik farklılıklar ve intraspesifik polimorfizm görülmektedir (Gustavo ve ark., 2008).

*Kluyveromyces* cinsine ait maya türleri Ascomycetes sınıfında olup oval, küresel veya uzamış hücre fenotiplerine sahiptirler. Hücreler vejetatif olarak ürerler ve aseksüel üremeleri multilateral tomurcuklanma ile gerçekleşmektedir. Diploid olan *Kluyveromyces* türleri spor oluşturabilmekte ancak hücrelerde gerçek hif oluşumu gözlenmemektedir (Wesolowski-Louvel ve ark., 1996; Kurtzman, 2003).

*K. marxianus* ilk defa 1888 yılında E. C. Hansen tarafından *Saccharomyces marxianus* olarak tanımlanmıştır (Lodder ve Krager-van Rij, 1952). *Kluyveromyces* cinsi ise *Kluyveromyces polysporus* tip örneği üzerinden ilk defa 1956 yılında tanımlanmıştır (van der Walt, 1956). Daha sonra *Saccharomyces* cinsi içerisinde tanımlanan *S. marxianus*, *S. lactis* ve *S. fragilis* maya türlerinin *K. polysporus* ile benzer özellikleri taşıdığı görülerek bu üç türde dahil olmak üzere toplam 18 maya türü *Kluyveromyces* cinsi içinde yer almıştır (Lodder, 1970). İlerleyen zaman içerisinde tür tanımlamalarında moleküler tekniklerin kullanılmasıyla *Kluyveromyces* cinsi *K. marxianus*, *K. lactis*, *K. aesturarii*, *K. nonfermentas*, *K. wickerhamii* ve *K. dozhanskii* olmak üzere 6 türe indirgenmiştir. Daha önce tip örneği olan *K. polysporus* ise yeni bir cins olan *Vanderwaltozyma* içerisinde yer almıştır (Kurtzman, 2003; Lachance, 2007).

Klasik yöntemlerle yapılan tanımlamalarda oluşan bu tür hatalar ve bazı belirsizlikler aynı taksona farklı isimlerin verilmesine veya farklı gruplarda sınıflandırılmalarına neden olmaktadır. Maya türlerinin hızlı bir şekilde tanımlanmasına yönelik test sistemleri geliştirilmiş olmakla beraber güvenilirlikleri %100 değildir (Spencer ve ark., 2011).

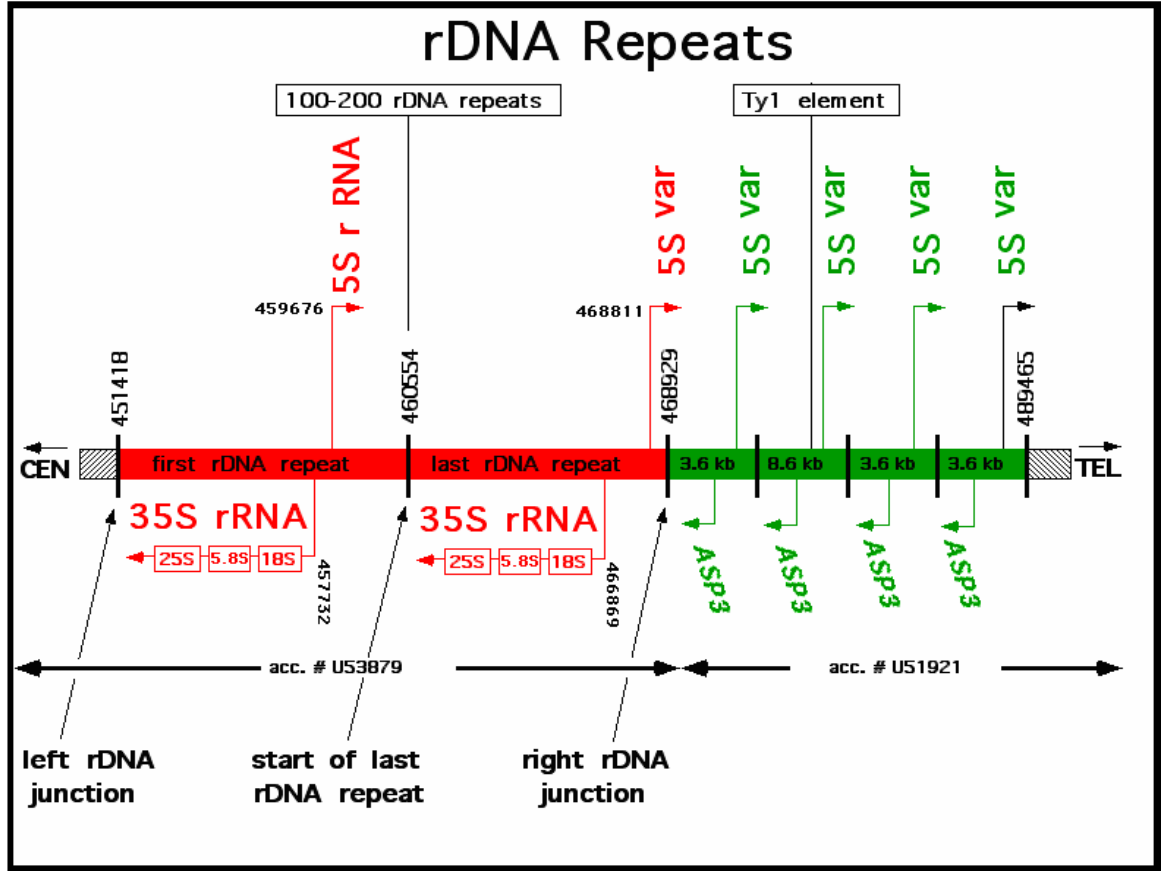
Son yıllarda moleküler biyolojide gerçekleşen gelişmeler mayaların identifikasyonu için yeni yöntemler ortaya çıkarmıştır. DNA-DNA hibridizasyonu, mikrosatellit analizleri, genomik ve mitokondriyel DNA'dan rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) analizleri ve restriksiyon parça uzunluğu

polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) gibi değişik moleküler teknikler mayaların tür tanımlamalarında kullanılmaya başlanmıştır (Torok ve ark., 1993; Vaughan Martini ve Martini, 1985; Vaughan Martini ve Martini, 1987; Baleiras Couto ve ark., 1996; Lopandic ve ark., 2004; Versavaud ve Hallet, 1995; Belloch ve ark., 1997; Guillamon ve ark., 1994, 1997; Perez ve ark., 1995; Romano ve ark., 1996). Bu teknikler hızlı ve klasik yöntemlere göre daha güvenilir olmalarına rağmen bazı türlerin tanımlanabilmesinde ve tür içi sınıflandırmalarda yeterli olmamıştır. Maya türlerinin hızlı şekilde identifikasyonu için ribozomal DNA bölgeleri son yıllarda sıklıkla çalışmalarda kullanılmaktadır (Esteve-Zarzoso ve ark., 1999; Taylor ve ark., 2000).

Ribozomlar protein sentezinden sorumlu büyük ribonükleoproteinler (RNP) olup diğer ökaryotik hücrelerde olduğu gibi mayalarda da büyük 60S alt ünite (Large subunit, LSU) ve küçük 40S alt ünitelerden (Small subunit, SSU) oluşmuştur. 25S, 5,8S, 5S ribozomal RNA molekülleri ile 42 protein büyük alt üniteyi (60S), 18S ribozomal RNA molekülü ve 32 protein ise küçük alt üniteyi (40S) oluşturmaktadır (Venema ve Tollervey, 1999; Verschoor ve ark., 1998).

Ribozomal RNA genlerinin kodlandığı DNA bölgeleri funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenerek mikroorganizmalar arasındaki evrimsel ilişkilere göre filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılmaktadır (Madigan ve ark., 2003). Mayaların nükleer ve mitokondriyel DNA'sında rRNA gen dizileri ardışık tekrar eden oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden oluşan diziler olarak bulunur (Salazar ve ark., 2000; White ve ark., 1990). Nükleer rRNA genleri her genomda yaklaşık birkaç yüz kopya bulunabilir. *S. cerevisiae* maya türünde ribozomal DNA RDN1 geni tarafından kodlanır. RDN1 geni 12. kromozomda, her biri 9,1 Kb büyüklüğünde olan yaklaşık 100-200 tekrardan oluşan 1-2 Mb büyüklüğünde bir gendir (Venema ve Tollervey, 1999). Tekrar eden her birim içinde 5S için RDN5, 5,8S için RDN58, 25S için RDN25 ve 18S için RDN18 geni bulunur. Ayrıca her tekrar içinde Internal Transcribed Spacer (ITS1, ITS2) ve External Transcribed Spacer (5'ETS, 3'ETS) olarak adlandırılan ayırıcı bölgeler içermektedir. Bu tekrar eden üniteler RNA polimeraz I tarafından transkribe edilir ve transkripsiyonu yapılmayan Intergenic Spacer (IGS) veya Non-transcribed Spacer (NTS1, NTS2) adı verilen bölgeler ile birbirlerinden ayrılırlar. 5.8S rRNA geni mayalarda mitokondriyel DNA içinde bulunmaz. Tekrar eden diziler sonunda yer alan 5S rDNA maya türüne bağlı olarak tekrar eden diziler içinde veya gen kümesinin sonunda bulunabilir (Şekil 1.1) (Venema ve Tollervey, 1999; Johnston ve ark., 1997).





Şekil 1.1. *Saccharomyces cerevisiae* maya türünde ribozomal DNA tekrarları ve çevresindeki diziler (Johnston ve ark., 1997).

ITS, ETS ve NTS bölgelerinin transkripsiyonu yapılmadığından (veya, ITS gibi, transkripsiyon sonrası kesilerek çıkarıldığından) korunmuş olan 25S, 5,8S, 18S ve 5S alt birim dizilerinden değişkendir. Bu nedenle bu bölgeler türler arasında (interspesifik) veya tür içi (intraspesifik) çalışmalarda kullanılmaktadır. Kompleks ITS bölgeleri ve korunmuş 5,8S rRNA kodlu gen bölgesi tür içi (intraspesifik) akrabalıkların belirlenmesinde kullanılırken, 18S ve 25S rRNA gen bölgeleri türler arası (interspesifik) akrabalıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Cai ve ark., 1996; James ve ark., 1996; Kurtzman, 1992, 1993).

*K. lactis* maya türü ile karşılaştırıldığında *K. marxianus* maya türünde yapılan metabolik ve moleküler çalışmalar oldukça azdır. Ancak *K. marxianus* maya türü, *K. lactis* maya türüne göre daha geniş substrat aralığına sahip olması, yüksek üreme hızına sahip olması, sıcaklığa toleransının (thermotolerance) fazla olması ve yüksek şeker içeren ortamlarda fermentasyon eğiliminin yüksek oluşundan dolayı son yıllarda oldukça ilgi

gören bir maya türü olmuştur (Gustavo ve ark., 2008).

*K. lactis* ve *K. marxianus* maya türleri üreme ortamına verdiği organik esterlerden dolayı hoş meyvemsi kokusuyla diğer maya türlerinden ayırt edilebilmektedir. *K. marxianus* maya türleri *K. lactis* türleri gibi aerobik organizmalar olup oksijen varlığında fermentasyon yaparak etanol üretebilirler. Mayaların aerobik koşullarda etanol oluşturmaya Crabtree etkisi adı verilir (Breunig ve ark., 2000). *K. marxianus* maya türü Crabtree negatif bir maya olup biomass üretimi, *S. cerevisiae* gibi Crabtree pozitif mayalardan daha yüksektir (Fonseca ve ark., 2007). *K. marxianus* maya türünde aerobik metabolizma *K. lactis* maya türünde olduğu gibi glikoz baskılanmasından etkilenmemektedir (Breunig ve ark., 2000; van Dijken ve ark., 1993).

*K. marxianus* maya türlerinde kromozom sayısı 6 ile 12 arasında değişmekle birlikte genellikle 8 kromozom içermektedir. Örneğin, *K. marxianus* var. *marxianus* maya suşu 14Mb uzunluğunda 10 kromozoma sahiptir (Belloch ve ark., 1998).

Yaklaşık olarak 700 den fazla bilinen maya türü arasında yalnızca %1'i laktozu fermente edebilmektedir (Barnett ve ark., 2000). *K. fragilis*, *K. marxianus* ve *K. lactis* maya türleri laktozu fermente edebilme özelliğine sahip nadir maya türlerindedir.  $\beta$ -galaktozidaz enzimi ile laktozu glikoz ve galaktoza hidrolize ederek enerji kaynağı olarak kullanırlar (Dickson ve Markin, 1979).  $\beta$ -galaktozidaz (laktaz; E.C. 3.2.1.23) hidrolaz grubu enzim olup özellikle gıda ve ilaç sektöründe oldukça önemlidir. Farklı popülasyonların bireylerinde yaygın olarak görülen ve laktoz intoleransı (Lactose Intolerance, Lactase deficiency, hypolactasia) olarak bilinen sağlık probleminde, bireyler enzim eksikliğinden dolayı süt ve süt ürünleri içinde bulunan laktozu parçalayamazlar (Bayless ve ark., 1971; Gekas ve Lopez-Leiva, 1985). Süt ve süt ürünlerinde bulunan laktozun büyük kısmının veya tümünün hidrolize edilmesi durumunda bu bireyler süt ve süt ürünlerini tüketebilmektedir. Laktoz içermeyen veya çok az laktoz içeren bu tür ürünlerin eldesi mümkündür (Rao ve ark., 1988). Bu ürünlerde bulunan laktoz,  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesine sahip patojen olmayan mikroorganizmalar kullanılarak veya saf enzimi kullanılarak hidrolize edilmektedir. Laktaz enziminin kullanımı oldukça maliyetli bir sistem olduğundan bu tür ürünlerin fiyatları da oldukça yüksektir. *K. marxianus* Gıda ve İlaç Uygulamaları (Food and Drug Administrations, FDA) örgütü tarafından GRAS (Generally Recognised As Safe) olarak sınıflandırılan maya türlerinden biri olup  $\beta$ -galaktozidaz enzimini üretmek için kullanılan mikroorganizmalardandır. Gıda

ve ilaç sektöründe laktozun parçalanması ve kullanımı ile ilgili çalışmalarda  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi oldukça önemlidir (Belem ve Lee, 1998).

*K. marxianus* maya türlerinde, laktaz enzimine ilave olarak diğer endüstriyel öneme sahip inülinaz, invertaz, protein fosfataz, karboksipeptidaz ve aminopeptidaz gibi enzimlerle yapılan çalışmalarda bulunmaktadır (Rouwenhorst ve ark., 1990a, b; Jolivet ve ark., 2001; Ramirez-Zavala ve ark., 2004). İvertaz ve inülinaz enzimleri  $\beta$ -glikozidaz ailesine ait enzimler olup sukroz ve inülinin hidrolizinden sorumludur. İnülin molekülü  $\beta$ -2 $\rightarrow$ 1 fruktozidik bağdan oluşan ve bir sukroz molekülü ile sonlanan bir polifruktozdur (Vandamme ve Dercke, 1983). Sukroz ise  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2 glikozidik bağ ile bağlı glikoz ve fruktoz molekülünden oluşan bir disakkarittir. Maya hücreleri invertaz ve inülinaz aktiviteleri ile sukrozu ve inülinü karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. *K. marxianus* maya suşlarında yüksek oranda invertaz ve inülinaz enzim aktivitesi bulunmaktadır (Snyder ve Phaff, 1960; Vandamme ve Derycke, 1983).

Araştırmamızda süt ve süt ürünlerinden izole edilen *K. marxianus* maya türlerinin identifikasyonları kit sistemi ve 5,8S rDNA ITS1 ve ITS2 bölgeleri kullanılarak yapılmıştır. Tanımlanan *K. marxianus* maya türlerinin asimilasyon ve fermentasyon testleri ile birlikte hücre dışı proteaz, lipaz ve üreaz aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca diğer hücre dışı enzim profilleri belirlenerek invertaz, inülinaz ve  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitelerine glikoz baskılmasının ve ozmotik stresin etkileri araştırılmıştır.

## **BÖLÜM 2**

### **ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

#### **2.1. Süt ve Süt Ürünlerindeki Maya Florası ve *K. marxianus* Maya Türlerinin Dağılımı**

Süt ve süt ürünleri gerek işlenmeleri sırasında gerekse raf ömürleri sırasında mayaların da dâhil olduğu birçok mikroorganizma için mükemmel bir besi ortamıdır. Yapılan çalışmalarda süt ve süt ürünlerinde en çok *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida stellata*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida holmii*, *Saccharomyces exiguus*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula glutinis* ve *Rhodotorula rubra* maya türlerine rastlanmıştır (Fleet,1990). Bazı maya türleri peynirlerin olgunlaşması gibi, süt ürünlerinde olgunlaşma aşamasında rol alarak pozitif katkı sağlarken bazıları bu sürece negatif olarak etki etmektedir. Örneğin *K. lactis*, *K. marxianus*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *Trichosporon moniliforme*, *Saccharomyces dairensis*, *Saccharomyces unisporus* ve *Rhodotorula spp.* cinsine ait bazı maya türleri laktoz asimilasyonu yaparak süt ürünlerinin bozulmasına ve kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (Fleet, 1990; Deak ve Beuchat, 1996; Pitt ve Hocking, 1999; Loureiro ve Querol, 1999; Jakobsen ve Narvhus, 1996).

Değişik ülkelerde farklı bölgelere ait süt ve süt ürünlerinde maya florasını belirleyici çalışmalar yapılmıştır (Fadda ve ark., 2004; Cosentino ve ark., 2001; Westall ve Filtenborg, 1998; Eliskases-Lechner ve Ginzinger, 1995; Fleet, 1990; Pereira-Dias ve ark., 2000; Romano ve ark., 2001; Roostita ve Fleet, 1996; Tornadijo ve ark., 1998; Welthagen ve Viljoen, 1999; Öztürk ve Uçar, 2001; Devoyod, 1990; Lenoir, 1984; Viljoen and Greyling, 1995). Mısır'da yürütülen bir çalışmada çiğ süt örneklerinden izole edilen 126 maya türünün tanımlanması sonucu, *D. hansenii*, *Clavispora lusitaniae*, *K. marxianus*, *Trichosporon beigeli* ve *R. mucilaginosa* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Haridy, 1992). Avustralya'nın Sydney kentinde satışa sunulan çeşitli süt ve süt ürünlerinden (pastörize süt, krema, yağ, dondurma, yoğurt ve peynir) oluşan toplam 161 örnek üzerinde maya florası belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, en yüksek maya sayısının yoğurt ve peynir örneklerinde olduğu saptanmış ve peynirlerde özellikle *C. famata*, *K. marxianus* ve *Candida diffluens* türlerinin yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Fleet ve Mian, 1987).

Bulgaristan'ın farklı yörelerinde geleneksel süthane ürünlerinden (yoğurt, peynir ve tereyağı) izole edilen ve yoğun olarak bulunan 12 farklı mayanın tanımlanması sonucunda

yoğurttta *K. marxianus* türlerinin floraya hâkim olduğu görülmüştür (Savova ve Nikolova, 2002).

Yunanistan'ın geleneksel peyniri olan feta peyniriyle yapılan değişik çalışmalarda *Torulasporea delbrueckii*, *D. hansenii*, *C. sake*, *C. famata*, *S. cerevisiae*, *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra*, *Candida tropicalis*, *K. lactis* ve *K. marxianus* maya türlerinin florada bulunduğu gösterilmiştir (Kaminarides ve Laskos, 1992; Westall ve Filterborg, 1998; Fadda ve ark., 2001). İtalyanın yöresel süt ürünlerinden Pecorino peynirinin olgunlaşma sürecinde maya florası belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada *S. cerevisiae* ve *K. lactis* maya türlerinin olgunlaşma işleminin başlangıcında yoğun olarak bulunduğu ancak daha sonra tuza dirençli olan *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin florada yoğunluk kazandığı belirlenmiştir (Gardini ve ark., 2006). Gouda peynirinin işleme ve olgunlaşması sırasında maya profili üzerine yapılan çalışmada *D. hansenii* maya türünün florada yoğun bulunduğu tespit edilerek florada *K. marxianus* türlerine de rastlanmıştır. İzole edilen *K. marxianus* maya türleri üzerinde yapılan hücre dışı enzim aktivitelerini belirlemeye yönelik çalışmada maya suşlarının hücre dışı lipolitik aktiviteye sahip olduğu fakat hücre dışı proteolitik aktivite göstermediği belirtilmiştir (Viljoen ve Welthagen, 1998). Fakat daha önce yapılan benzer çalışmada *K. marxianus* maya türlerinin hücre dışı proteolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Devoyod, 1990).

Geleneksel yöntemlerle yapılan tür tanımlamalarının yerini zamanla hazır kit sistemleri ve devamında moleküler yöntemler almıştır. İzole edilen mayaların genomik ve mitokondriyel DNA'ları PCR yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra farklı restriksiyon enzimleri ile kesilerek RFLP yöntemiyle tanımlamaları yapılmıştır (Esteve-Zarzoso ve ark., 1999; Tempel ve Jakobsen, 2000, Hall ve ark., 2003; Lopandic ve ark., 2004). Geliştirilen yöntemlerin çoğu ITS bölgesinin analizine dayanmaktadır. ITS dizileri düşük tür içi polimorfizmi ve yüksek türler arası değişkenlik gösterdiğinden farklı fungus ve mayaların tanımlanmasında yaygın olarak tercih edilen bölgelerdir (Accensi ve ark., 1999; La Guerche ve ark., 2004; Lee ve Taylor, 1992).

Polonya'ya özgü mavi-küflü peynir olarak bilinen Rokpol peynirinden izole edilen 24 maya türü API ID 32C kit sistemi ile ve PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanmıştır. Her iki yöntem sonunda 11 maya türü *C. famata* olarak, 5 maya suşu *C. lipolytica* ve 4 maya suşu *C. sphaerica* olarak tanımlanmıştır. Geriye kalan 4 maya suşu API ile *C. sphaerica* olarak tanımlanırken restriksiyon profillerinin *C. famata* türleri ile aynı olduğu görülmüştür

(Wojtatowicz ve ark., 2007). Tüm Rus Mikroorganizma Koleksiyonunda (All-Russian Collection of Microorganisms, ARCM) bulunan *Kluyveromyces* türleri moleküler yöntemlerle tekrar tanımlandığında daha önce *K. lactis* olarak tanımlanan maya türlerinin birçoğunun *K. marxianus* maya suşları olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *K. lactis* suşlarını *K. marxianus* maya suşlarından ayıran temel fizyolojik özelliğin, *K. marxianus* maya suşlarının maltoz, melezitoz ve  $\alpha$ -metil-glikoziti asimile edememesi olarak bulunmuştur (Naumova ve ark., 2012).

Türkiyede süt ürünlerinden izole edilerek klasik yöntemle tanımlamaları yapılan araştırmalar bulunmaktadır. İzmir ve Aydın yöresine ait değişik peynir ve yoğurt çeşitlerinde *Candida sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Trichosporon sp.*, ve *Saccharomyces sp.* cinslerine ait türlerin maya florasında yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Kavas ve ark., 2006). Diğer bir araştırmada ev yapımı yoğurt ve peynir örneklerinde maya florası belirlenmiş, *D. hansenii* maya türünün her iki ürünün florasında da yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada izole edilen *D. hansenii* maya suşlarının moleküler tanımlaması yapılarak hücre dışı lipolitik ve proteolitik aktiviteleri belirlenmiştir (Çorbacı ve ark., 2011).

## **2.2. *K. marxianus* Maya Türlerinin Hücre Dışı Enzim Aktiviteleri**

Son yıllarda *K. marxianus* maya türü oldukça yüksek biyoteknolojik potansiyele sahip bir maya türü olmaya başlamıştır (Gustavo, 2008). *K. marxianus* maya suşları bazı aroma bileşiklerinin, tek hücre proteinlerinin, değişik endüstriyel enzimlerin ve alkolün üretimi için biyoteknolojide kullanılmaktadır. Son yıllarda doğal yollarla aroma bileşiklerinin biyoteknolojik eldesi önem kazanmıştır. Oldukça önemli bir aroma bileşiği olan 2-feniletanol ağırlıklı olarak petrokimyasal yolla elde edilmektedir. *K. marxianus* ve *S. cerevisiae* maya suşları L-fenilalanin'den 2-feniletanol ve 2-feniletasetat bileşiğini sentezleyebilmektedir (Fabre ve ark., 1998, Albertazzi ve ark., 1996). Yapılan bir çalışmada 21 maya suşu arasında *K. marxianus* maya türünün optimal üretim özelliklerine sahip olduğu ve uygun şartlarda oldukça yüksek oranda bu aroma bileşiğini üretebildiği belirlenmiştir (Fabre ve ark., 1997, Fabre ve ark., 1998).

Pektinaz enzimi meyvelerin içindeki pektinleri parçalayarak olgunlaşmasını sağlamakta olup özellikle içecek endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Visser ve Voragen, 1996). Poligalakturanaz (EC 3.2.1.15) (PG) pektin hidrolize eden ve endüstride meyve sularının viskozitesini azaltmada kullanılan önemli bir enzimdir (Schwan ve ark.,

1996). *K. marxianus* maya türünde endoPG geni klonlanarak *S. cerevisiae* maya türü ile karşılaştırması yapılmıştır (Siekstele ve ark., 1999). Bu genin doğal diploid *K. marxianus* maya suşlarında tek kopya olduğu, polimorfizm içermediği ve hücre dışına salgılandığı gösterilmiştir (Jia ve Wheals, 2000).

*K. marxianus* maya türünde Pectin-degrading endopolygalacturonase için kodlu EPG1 geni klonlanmıştır (Siekstele ve ark., 1999). *K. marxianus* maya türünde klonlanan diğer bazı genler ise endüstriyel öneme sahip inülinaz,  $\beta$ -glikozidaz, pirüvat dekarboksilaz ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz için kodlu genlerdir (Laloux ve ark., 1991; Holloway ve Subden, 1993; Raynal ve Guerineau, 1984; Fernandes ve ark., 1995). Benzer şekilde *ADH1* ve *ADH2* tarafından kodlanan alkol dehidrogenaz gibi diğer biyoteknolojik öneme sahip genlerin de dizileri ve düzenlenmelerine yönelik çalışmalar mevcuttur (Ladriere ve ark., 1993; Ladriere ve ark., 2000). Ayrıca  $\beta$ -galaktozidaz için kodlu *LAC4* ve inülinaz için kodu *INU1* genlerinin dizileri belirlenerek regülasyonlarına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Huo ve Li, 1995; Laloux ve ark., 1991).

Mikroorganizmalar içinde en iyi inülinaz üreticisi *K. marxianus* maya türüdür (Selvakumar ve Pandey, 1999). İnülinaz enzimi inülini ve sukrozu hidrolize ederek yüksek fruktoz şurubu (high fructose syrups, HFS) üretimi için endüstride kullanılmaktadır. Fruktoz, sukrozdan daha tatlı ve daha ucuz olup diabetik hastaların kullandığı tatlandırıcılarda, meyve sularında ve endüstriyel gıdalarda tat verici olarak kullanılmaktadır. İnülinaz enzimi inülinin hidrolizi sonucu % 95 oranında HFS açığa çıkarken sukrozun hidrolizi sonrası % 45 oranında HFS açığa çıkmaktadır (Pandey ve ark, 2000; Otha ve ark, 2002; Pandey, 2003).

Polifruktozit olan inülin molekülü,  $\beta$ -2 $\rightarrow$ 1 fruktozidik bağ içeren uzun bir polifruktoz zincirinden (n $\approx$ 35) ve zincirin sonunda bir sukroz molekülünden oluşmaktadır. İnülin, inülinaz enzimi tarafından hidrolize edilmektedir (Vandamme ve Dercke, 1983). Sukroz ise  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2 glikozidik bağ ile bağlı glikoz ve fruktoz molekülünden oluşan bir disakkarit olup invertaz enzimi ile hidrolize edilmektedir. İvertaz ve inülinaz enzimleri hem sukrozu hemde inülini hidrolize edebilme yeteneğine sahip olmalarına rağmen, invertaz enziminin büyük moleküler ağırlığa sahip inülin molekülünü hidrolize edebilme yeteneği oldukça düşüktür (Vandamme ve Derycke, 1983).

*K. marxianus* maya türünde inülinaz (EC 3.2.1.7) enzimi %34'ü karbonhidrattan oluşan bir glikoprotein olup hücre duvarına bağlı (Cell Wall Associated, CWA) ve üreme

ortamına salgılanan (Secreted in Culture, SC) olmak üzere iki formda bulunur. CWA-inülinaz tetramer yapıda 350 kDa ağırlığında iken SC-inülinaz iki alt üniteden oluşup 165 kDa ağırlığındadır (Rouwenhorst ve ark., 1990). *S. cerevisiae* maya türünde invertaz (EC 3.2.1.26) enzimi hücre duvarına bağlı (CWA) ve üreme ortamına salgılanan (SC) iki formda bulunup % 50'si karbonhidrattan oluşan bir glikoproteindir. CWA-invertaz oktamer yapıda ve 800 kDa büyüklüğünde, SC-invertaz ise dimer yapıda olup 270 kDa ağırlığındadır. *S. cerevisiae* maya türünde CWA-invertaz aktivitesi ağırlıklı olarak sukrozun hidrolizinden sorumludur (Esmon ve ark., 1987; Rouwenhorst ve ark., 1990).

İnvertaz ve inülinaz enzimlerinin sukroza karşı afiniteleri yüksektir. Sukroz molekülü küçük olduğu için hücre duvarından geçebilir ve CWA-invertaz tarafından hidrolize edilir. Ancak büyük molekül olan inülin hücre duvarından geçemediği için CWA-invertaz tarafından hidroliz edilemez fakat SC-invertaz tarafından hidroliz edilebilmektedir (Nam ve ark., 1993). Bu nedenle invertaz enziminin inüline karşı afinitesi düşüktür. İnülinaz enzimi ise hücre duvarını geçen sukrozu CWA-inülinaz enzimi ile hidrolize ederken hücre duvarı bariyerini geçemeyen inülini hidrolize edemez. İnülin yalnızca SC-inülinaz tarafından hidrolize edilir. Benzer şekilde trisakkarit olan rafinozda (glikoz-fruktoz-galaktoz) büyük molekül olup inülin gibi hidrolize edilir (Phelps, 1965; Scherrer ve ark., 1974). Bu nedenle inülinaz enzimi sukroz ve inüline aynı oranda affinite göstermesine rağmen invertazın inüline afinitesi düşüktür.

*K. marxianus* gibi her iki enzim aktivitesinde sahip maya suşlarında invertaz ve inülinaz aktiviteleri Sukroz/İnülin oranına (S/I ratio) göre belirlenmektedir. Düşük S/I oranı inülinaz aktivitesinin, yüksek S/I oranı ise invertaz aktivitesinin varlığını göstermektedir (Snyder ve Phaff, 1960; Vandamme ve Derycke, 1983).

*K. marxianus* maya suşunda inülinaz üretimi ile ilgili çalışmalar diğer enzimlere göre daha fazladır. Sıcaklık, pH, üreme ortamı, çalkalama ve havalandırma gibi değişik parametreleri içeren koşullarda ve farklı *K. marxianus* maya suşlarında inülinaz aktivitesi belirlenmiştir (Cruz-Guerrero ve ark., 1995; Kalil ve ark., 2001, Singh ve ark., 2007; Lertwattanasakul ve ark., 2011). Bu çalışmaların tümü SC-inülinaz ve CWA-inülinaz enzim aktiviteleri ile ilgilidir. Ancak bu çalışmalarda inülinaz enziminin düzenlenme mekanizması ile ilgili elde edilen sonuçlar birbirlerine benzerlik göstermemektedir. *K. marxianus* maya türünde inülinaz geni (*KmINU1*) klonlanarak dizisi belirlenmiştir (Laloux ve ark., 1991). *KmINU1* geninin transkripsiyon seviyesinde, *K. lactis* maya türünün tersine, *KmMig1* proteini aracılığıyla baskılandığı gösterilmiştir (Cassart ve ark. 1997).



Başka bir çalışmada, farklı karbon kaynaklarında (sukroz, rafinoz ve inülin) üretilen *K. marxianus* maya suşunda (DMKU-3-1042) glikoz baskılamasının inülinaz enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır (Lertwattanasakul ve ark., 2011). *KmINUI* geninin transkript miktarının karbon kaynağına bağlı olmaksızın Mig1 proteini (*KmMig1p*) aracılığıyla azaldığı belirlenmiştir. Ancak transkripsiyon seviyesinde gözlenen baskılamının translasyon seviyesinde kullanılan karbon kaynağına göre farklı olduğu görülmüştür. Bu durum oldukça şaşırtıcı ve tutarlı olmayan bir sonuç olarak değerlendirilerek ‘glikoz varlığında dahi inülinazın aktivitesini yerine getirebildiği’ şeklinde açıklanmıştır (Lertwattanasakul ve ark., 2011). Yine aynı çalışmada rafinoz ve inülin karbon kaynaklarında inülinaz aktivitesi 30 °C sıcaklıkta azalırken yüksek sıcaklıkta (45 °C) glikozun inülinaz aktivitesini tamamen baskıladığı tespit edilmiştir. Sukroz karbon kaynağında ise glikoz baskılamasının her iki sıcaklıkta da etkilenmediği görülmüştür.

*K. marxianus* maya suşunda (ATCC 16045) yapılan bir çalışmada farklı karbon kaynaklarının (glikoz, fruktoz ve sukroz) ve farklı azot konsantrasyonlarının inülinaz enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır (Santisteban ve ark., 2009). Enzim aktivitesinin zengin ortamda minimal ortamdaki daha yüksek olduğu, düşük azot konsantrasyonunda ise enzim aktivitesinin 4 kat azaldığı tespit edilmiştir.

*K. fragilis*, *K. lactis* ve *K. marxianus* maya türleri laktozu kullanabilen ve endüstriyel öneme sahip maya türleridir. *K. marxianus* maya türü  $\beta$ -galaktozidaz (EC 3.2.1.23) enzim aktivitesi ile laktozu hidrolize ederek galaktoz ve glikoz açığa çıkarır (Rajoka ve ark., 2003; Gonzalez-Siso, 1994). Daha düşük maliyetle daha yüksek miktarda  $\beta$ -galaktozidaz enzimi üretebilmeyi amaçlayan biyoteknolojik çalışmaların büyük kısmında *K. marxianus* maya suşları kullanılmaktadır.

$\beta$ -galaktozidaz enziminin pürifikasyonu ve regülasyonu ile ilgili çalışmalar 1980’lerde itibaren yoğunluk kazanmıştır (Gonçalves ve Castillo, 1982; Bacci Junior ve ark., 1996; Brady ve ark., 1995; Martins ve ark., 2002). Peynir altı suyunun farklı ürünlere dönüştürülmesinde GRAS grubunda bulunan *K. marxianus* ve *K. lactis* maya suşları kullanılmaktadır. *K. marxianus* maya türü kullanılarak peynir altı suyundan ve şeker kamışı melasından laktaz enzimi üretimi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Rech ve ark., 1999; Furlan ve ark., 2000).

Yürütülen bir araştırmada *K. marxianus* maya suşunda (CBS6556), galaktozun laktozdan daha fazla oranda  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesini artırdığı, ancak artan

galaktoz konsantrasyonunun  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesini kısa süreli bir indüksiyon sonrasında çok fazla oranda azalttığı gözlenmiştir (Bruneska ve ark., 2002).  $\beta$ -galaktozidaz enzimi *K. lactis* maya türünde *LAC4* geni tarafından kodlanmaktadır ve transkripsiyon seviyesinde glikoz baskılaması ile kontrol edilmektedir (Sheetz ve Dickson, 1981; Zachariae ve ark., 1993; Breunig, 1989; Breunig ve ark., 2000).

### **2.3. *K. marxianus* Maya Türünde Glikoz Baskılaması**

Glikoz mayalar tarafından öncelikli tercih edilen karbon kaynağı olup, glikoz varlığında alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli olan enzimlerin genleri baskılanır. Bu duruma karbon katabolit represyon veya mayalardaki genel kullanımı olarak glikoz baskılaması adı verilir (Trumbly, 1992; Carlson, 1999). *K. lactis* maya türünde GAL/LAC regulonu karbon kaynağına bağlı olarak düzenlenmektedir (Breunig, 1989; Breunig ve ark., 2000; Rubio-Teixeira, 2005). Benzer şekilde heksokinaz aktivitesi yine glikoz baskılamasından etkilenmektedir (Goffrini ve ark., 1995). *K. lactis* maya türünde *MIG1* (Multicopy Inhibitor of GAL Gene Expression) geni klonlanmıştır (Cassart ve ark., 1995). Glikoz, Mig1p aracılığıyla *KIGAL1* genini baskılayarak *KIGAL-LAC* genlerini düzenlemede görev almaktadır. Ancak *KIGAL/LAC* regulonunda bulunan *KIGAL4* geninin promotor bölgesinde KIMig1p için bir bağlanma bölgesi bulunmamaktadır (Dong ve Dickson, 1997). *K. lactis* maya suşları arasında laktaz geninin farklı oranlarda baskılanması *KIGAL4* geninin promotor bölgesinde gözlenen bu değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Dickson ve Markin, 1980; Witte ve Dickson, 1988; Breunig, 1989).

*S. cerevisiae* maya türünde invertaz için kodlu *SUC2* geni Mig1p ve Mig2p aracılığıyla glikoz varlığında baskılanmaktadır (Johnston ve Carlson, 1992; Entian ve Schuller, 1997; Nehlin ve Ronne, 1990; Lutfiyya ve Johnston, 1996). *K. lactis* maya türünde invertaz enziminin glikoz baskılamasına uğradığı tespit edilmiştir (Goffrini ve ark., 1995). Ancak *K. lactis* maya türünde invertaz enzimi için kodlu *KIINV1* geninin tek kopya olarak bulunduğu ve transkripsiyonel baskılanması sırasında KIMig1 proteininin görev almadığı gösterilmiştir (Georis ve ark., 1999). *K. marxianus* maya türünde ise *KmINV1* geninin baskılanması için KmMig1p gerekmektedir (Cassart ve ark., 1997). Bu nedenle *K. lactis* maya türünde *KIINV1* geni üzerinde gözlenen glikoz baskılama mekanizması *K. marxianus* maya türünde *KmINV1* geni üzerinde gözlenen glikoz baskılama mekanizmasından farklıdır.

Avrupa Kültür Koleksiyonundan (European Culture Collection, ECC) alınan 13 *K. marxianus* maya suşu kullanılarak yürütülen bir çalışmada farklı karbon kaynaklarının kullanımı ve glikoz baskılaması incelenmiştir. Çalışma sonucunda bazı suşlarda aynı karbon kaynağına karşı glikoz baskılaması gözlenirken bazı suşlarda gözlenmemiş veya farklı karbon kaynağında glikoz baskılaması gözlenmiştir. Bu durum *K. marxianus* maya suşlarında genetik veya metabolik bir özellik için, *S. cerevisiae* veya *K. lactis* maya türlerinde olduğu gibi, genelleme yapılamayacağını gözlenen özelliğin suş spesifik olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *K. marxianus* maya türü içinde farklı suşlarda farklı fizyolojik ve genetik cevaplar gözlenmektedir (Lane ve ark., 2011).

*K. marxianus* maya suşunda farklı karbon kaynaklarının kullanımında glikoz baskılamasının etkisini tespit etmek ve ısı stresinin glikoz baskılamasına etkisini belirleyebilmek için yürütülen başka bir çalışmada hekzoz olarak glikoz, galaktoz ve mannoz, pentoz olarak arabinoz ve ksiloz (xylose) karbon kaynakları kullanılmıştır. Galaktoz, arabinoz ve ksiloz karbon kaynaklarının kullanımı glikoz tarafından baskılanırken mannozun kullanımının glikoz tarafından baskılanmadığı görülmüştür. Glikoz baskılamasının yüksek sıcaklıkta (45 °C) ve 2-deoxyglucose içeren ortamlarda tamamen üremeyi durdurduğu belirlenmiştir. Mannozda ise sıcaklık artışında glikoz baskılaması görülmemiştir. Sukroz karbon kaynağında ise kullanılan tüm sıcaklıklarda glikoz baskılaması görülmemiştir (Rodrussamee ve ark., 2011).

*S. cerevisiae* maya türünde *GALI* geni ve *K. lactis* maya türünde *KIGALI* geninin promoter bölgelerinde Mig1p için bir tane ve Gal4p için 4 tane bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Rubio-Teixeira, 2005). *K. marxianus* maya suşunda *KmGALI* geninin promoter bölgesinde, transkripsiyonun başlama bölgesinden yaklaşık +1Kb uzaklıkta, Gal4p bağlanabileceği 5 bağlanma bölgesi bulunmakta ancak KmMig1p için bağlanma bölgesi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmada *KmGALI* geninin özellikle yüksek sıcaklıkta glikoz tarafından baskılanmasının, *KmGALI* geninin bilinen Mig1 proteininin bağlanma dizisinden farklı bir diziye bağlanabileceğini ve bu şekilde transkripsiyonu baskılayabileceği düşünülmektedir (Rodrussamee ve ark., 2011). *KmXYLI* geni glikoz baskılanmasından etkilenmekte ancak promoter bölgesinde KmMig1p bağlanma bölgesi bulunmamaktadır. *KmXYLI* geninin, KmMig1p içermeyen farklı bir iz yolu üzerinden glikoz baskılaması yaptığı düşünülmektedir (Rodrussamee ve ark., 2011).

Mannoz ve glikoz karbonhidratları *K. marxianus* maya suşunda aynı düşük-afiniteli glikoz transporter üzerinden taşınmaktadır (Gasnier, 1987). Ksiloz ve arabinoz için *K.*

*marxianus* maya suşunda tanımlanmış transporter sistemi bulunmamaktadır. *S. cerevisiae* ve *Pichia stipitis* maya türlerinde tanımlanan glikoz baskılamasına duyarlı hekkoz transporterlarına benzer bir sistem tarafından ksiloz ve arabinozun taşınabileceği olasılığı önerilmiştir (Rodrussamee ve ark., 2011). Diğer maya türlerinde de ksiloz ve arabinoz metabolizmasında glikoz baskılaması ile ilgili genler ve düzenlenmelerine yönelik çalışma bulunmamaktadır.

*K. lactis* maya türünde *HGT1*, *RAG1*, *KHT1* ve *KHT2* olmak üzere 4 farklı hekkoz transporter tanımlanmış ve yapılan mutasyon çalışmalarında bu transporter proteinlerine ek olarak başka transporter proteinlerinin olabileceği öne sürülmüştür (Breunig ve ark., 2000). *RAG1* (Resistance to Antimycin A on Glucose) geninin düşük afiniteli hekkoz transporter (Low-affinity glucose transporter) için kodlu olduğu ve diğer *RAG* genlerinin (*RAG4*, *RAG5* ve *RAG8*) *RAG1* geninin regülasyonunda görev aldıkları gösterilmiştir (Goffrini ve ark., 1990; Chen ve ark., 1992; Wesolowski-Louvel ve ark., 1992; Prior ve ark., 1993). Bazı *K. lactis* maya suşlarında *RAG1* geninin yerine *KHT1* ve *KHT2* genlerinin aynı görevi üstlendiği görülmüştür (Weirich ve ark., 1997). Glikoz baskılamasına hassasiyet maya suşunun içerdiği transporter gene göre değişmektedir. *KHT1/KHT2* genlerini taşıyan *K. lactis* maya suşları glikoz baskılamasına *RAG1* genini taşıyan maya suşlarından daha duyarlıdır (Weirich ve ark., 1997). *RAG1* ve *KHT1/KHT2* genlerinin düzenlenmesi karbon kaynağına göre değişmektedir (Billard ve ark., 1996; Chen ve ark., 1992; Milkowski ve ark., 2001). Son olarak tanımlanan hekkoz transporter geni *KHT3* olup, bu genin yüksek ekspresyonunun *snf1* ve *lac12* mutant *K. lactis* maya hücrelerinin galaktozda üremesini sağlamıştır (Wiedemuth ve Breunig, 2005). *HGT1* (High-affinity Glucose Transporter 1) geninin yüksek afiniteli hekkoz transporter için kodlu olduğu ve sürekli ekspres edildiği gösterilmiştir (Billard ve ark., 1996). Galaktoz alım kinetiği ile yapılan çalışmalar sonrasında *K. lactis* maya suşunda *LAC12* (Lactose Permease 12) genine ilave olarak *HGT1* geninin de galaktozu transport edebildiği gösterilmiştir. Hgt1p yüksek afiniteli galaktoz transporter olarak Lac12p ise düşük afiniteli galaktoz transporter olarak belirlenmiştir. Ayrıca *HGT1* geninin ekspresyonu galaktoz tarafından indüklenirken glikoz baskılamasından etkilenmemektedir (Baruffini ve ark., 2006).

*KHT1/KHT2* (Kluyveromyces Hexose Transporter 1 ve 2) genlerini taşıyan maya suşunda laktoz permeaz için kodlu *LAC12* geninin ekspresyonunu glikoz varlığında Lac9 proteini acalığıyla baskılandığı, *RAG1/HGT1* genlerini taşıyan maya suşunda *LAC12* geninin bilinmeyen bir mekanizmayla baskılandığı ve *RAG1*/mutant *hgt1* genlerini taşıyan

maya suşunda ise *LAC12* geninde glikoz baskılamasının olmadığı gözlenmiştir (Suleau ve ark., 2006). Bu durum maya suşlarının glikoz varlığında laktozu farklı oranlarda kullanabildiğini ve farklı  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi gösterdiğini açıklamaktadır. *K. lactis* maya türünün fizyolojisini ve üremesini kontrol eden mekanizmaların genetik regülasyonunda glikozun hücre içine alınmasının en kritik ve en önemli basamak olduğu düşünülmektedir. Oldukça az transporter geninin biliniyor olması ve bilinen genlerin farklı suşlarda farklı oranlarda ekspres edilmesi oldukça ilginç ve henüz açıklanamayan bir durumdur (Suleau ve ark., 2006). Tüm bu çalışmalar *K. lactis* ve *K. marxianus* maya türlerinin glikoz baskılamasına *S. cerevisiae* maya türünden daha dirençli olduğunu göstermektedir.

### BÖLÜM 3

#### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Süt Örneklerinin Toplanması ve Maya İzolasyonu

Çalışmamızda kullanılan örnekler Çanakkale ilinin yerel pazarlarında satılan yöresel süt ve süt ürünlerinden 2011 yılının Haziran ve Temmuz aylarında toplandı. Ürün satıcıları Çanakkale merkezine yakın mahalle bazında üreticiler olup köy veya ilçeden gelen üreticiler değildir. Ürün satıcıları ve örnek alınan ürünler Çizelge 3.1’de verildi. Peynir örneklerinin iç kısmından steril koşullarda 1 gram örnek tartılarak alındı. Örnekler steril sodyum sitrat çözeltisi (% 2) içinde homojenize edildikten sonra uygun seyreltmeler yapılarak sodyum propiyonat içeren YGC (40 gr/l Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar, % 0.1 (w/v) Sodyum Propionat) petrilere yayma ekimi yapıldı. İşlenmemiş süt (çiğ süt), ayran ve yoğurttan 100 µl örnek alınarak YGC katı besi ortamlarına ekildi. Uygun sıcaklıkta (30°C) 2-3 gün inkübe edilen petrilere koloni sayıları belirlenip farklı morfoloji gösteren koloniler öncelikli olmak üzere rastgele maya kolonileri seçilerek glikoz içeren YP-D (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone, 20 gr/l (w/v) Agar, % 2 Dextrose) katı besi ortamlarına aktarıldı. İşlenmemiş süt, ayran ve yoğurt örneklerinde koloni oluşturabilen birim sayıları (Colony Forming Unit) CFU/ml olarak, peynir örneklerinde ise CFU/gr olarak hesaplandı. Maya örneklerine kod numaraları verilerek % 15 gliserol içerisinde -80 °C’de stokları yapıldı.

Çizelge 3.1. Çanakkale yerel pazarında bulunan ürün satıcıları ve alınan örnekler

Ürün Satıcısı (S)	Örneklenen Ürün
S1	Çiğ süt ve peynir
S2	Çiğ süt ve peynir
S3	Çiğ süt ve peynir
S4	Çiğ süt, yoğurt ve ayran
S5	Çiğ süt, yoğurt ve ayran
S6	Çiğ süt, yoğurt ve ayran
S7	Yoğurt ve ayran
S8	Peynir
S9	Yoğurt ve ayran

### **3.2. İzole Edilen Maya Örneklerinin Tür Tanımlamaları**

Çalışmamızda izolasyonları yapılan maya türleri öncelikli olarak koloni morfolojilerine (renk, şekil, büyüklük v.s.) göre gruplandırıldı. Daha sonra izole edilen maya örnekleri YP-Lac (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone, 20 gr/l (w/v) Agar, % 2 Laktoz) besi ortamlarına ekilerek pozitif sonuç veren maya türleri seçildi. Yüksek sıcaklığa dayanıklı olan maya türlerini belirlemek için laktoz pozitif maya suşları 40°C’ de 2-3 gün süreyle YP-D ve YP-Lac üreme ortamlarında inkübe edildi. Üreme gösteren maya suşlarının seçimi yapılarak laktoz pozitif ve sıcaklık pozitif maya suşları olası *K. marxianus* maya suşları olarak değerlendirildi.

Aynı zamanda maya türlerinin tanımlamalarını yapmak için hızlı bir maya tanımlama sistemi olan; API ID 32C (Analytical Profile Index) test sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanıldı. API ID 32C sistemi, bir tane negatif kontrol olmak üzere farklı karbon ve azot kaynaklarını içeren (D-Galaktoz, Sakkaroz (sukroz), *N*-Asetil-glukozamin, Laktik asit, L-Arabinoz, D-Sellibioz, D-Raffinoz, D-Maltoz, D-Trehaloz, Potasyum 2-Keto-glukonat, Metil- $\alpha$ -D-glukopiranosit, D-Mannitol, D-Laktoz, Inositol, D-Sorbitol, D-Ksiloz, D-Riboz, Gliserol, L-Rhamnoz, Palatinoz, Erithritol, D-Melibioz, Sodyum Glukuronat, D-Melezitoz, Potasyum Glukonat, Levulinik asit (Levulinate), D-Glikoz, L-Sorboz, Glikozamin, Sikloheksimit (Actidion) ve Eskulin Ferrik Sitrat) 32 kuyucuktan oluşan mikro ölçekli bir asimilasyon test sistemidir. Test sonucunda elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar APIWEB R1.2.1 programında analiz edilerek maya türleri belirlendi.

API ID 32C tanımlama kiti ile elde edilen sonuçlar klasik yöntemle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak analizi yapıldı. *K. marxianus* maya türlerinin çiğ süt, ayran, yoğurt ve peynir örneklerine göre dağılımı belirlendi.

### **3.3. *K. marxianus* Maya Suşlarının Asimilasyon ve Fermentasyon Testleri**

*K. marxianus* olarak tanımlanan maya suşlarının ve referans maya suşunun (DBVPG-6072/CBS4857 maya suşu; DBVPG maya koleksiyonu, Perugia Üniversitesi-İtalya) farklı karbon kaynaklarında fermentasyon testleri ile farklı karbon ve azot kaynaklarında asimilasyon testleri yapıldı. Asimilasyon testleri için API ID 32C kit sistemi kullanıldı. Fermentasyon sonucu oluşacak gaz (karbondioksit) çıkışını gözlemleyebilmek için Durham tüpleri kullanıldı. Üreme ortamının pH değişimini gözlemleyebilmek için bromtimol mavisi (0, 8 g/l (w/v)) fermentasyon ortamına ilave edildi.

Fermentasyon testleri % 2 Glikoz, % 2 Galaktoz, % 2 Laktoz, % 2 Sukroz, % 2

Maltoz ve % 2 Gliserol karbon kaynaklarını içeren zengin (YP) üreme ortamlarında yapıldı. Durham tüpleri yerleştirilmiş uygun karbon kaynaklarını ve pH indikatörünü içeren 4,5 ml sıvı besi ortamlarına (YP-D, YP-Gal, YP-Lac, YP-Suc, YP-Mal ve YP-G) 0,5 ml bir gecelik kültürlerden ilave edilerek 28 °C’de 7 gün süre ile inkübe edildi. Maya hücresi ilave edilmemiş, indikatörsüz ve karbon kaynağı içermeyen tüpler kontrol olarak kullanıldı. Tüpler içindeki gaz çıkışı ve renk değişimleri kontrollerle beraber günlük olarak takip edildi ve değişimler kaydedildi (Winn ve ark., 2006; Leboffe ve Pierce, 2006)

### **3.4. Genomik DNA İzolasyonu**

Genomik DNA izolasyonu için *K. marxianus* olarak tanımlanan maya suşları ve referans maya suşu (DBVPG-6072/CBS4857) kullanıldı. Genomik DNA izolasyonları Sherman ve arkadaşlarının genomik DNA izolasyon yöntemi kullanılarak yapıldı (Sherman ve ark., 1986). Steril tüplerde toplanan maya hücreleri steril distile su ile yıkandıktan sonra, maya hücreleri üzerine 500 µl 1M sorbitol ve 100 µl 0,5 M EDTA ilave edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu üzerine 30 µl Lyticase (0,391µg/µl) eklenerek 37°C’ de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler çöktürülerek sıvı kısım atıldı ve pellet üzerine 500 µl 50mM Tris, 20 mM EDTA (pH 7,5) eklenerek süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 50 µl %10 SDS eklenerek 65°C’ de 30 dakika inkübe edildi. Bu aşamadan sonra karışıma 300 µl 5M (pH 5,5) potasyum asetat eklenerek 60 dakika buz içerisinde bekletildi. Çöktürme işlemi sonrası supernatant kısmı yeni tüpe transfer edilerek üzerine 1:1 hacim izopropanol eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 20 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım atılarak üzerine 1ml %70’lik etanol ilave edildi ve çöktürüldü. Sıvı kısım atılarak oda sıcaklığında kurutulan tüplere 100 µl TE (pH 7,5) ilave edildi. İki kez fenol-kloroform ekstraksiyonu (1:1 hacim) yapıldı. Steril tüplere geçirilen sıvı faza 30 µl 3M K, 5M asetat (pH 5,8) eklendikten sonra 200 µl absolute etanol ilave edilerek buz içerisinde 5 dakika bekletildi ve çöktürülerek sıvı kısım atıldı. Tüplere 1 ml %70 etanol eklenip çöktürüldü ve sıvı kısım atılarak oda sıcaklığında kurutuldu. Tüpte bulunan genomik DNA 100 µl TE (pH 8 ) içinde çözülerek -20 °C’de depolandı. Genomik DNA’nın saflığı ve miktarı spektrofotometre (260/280nm) kullanılarak belirlendi. Ayrıca 5µl genomik DNA % 0, 8’lik (w/v) agaroz jelde görüntüldü.

### **3.5. ITS1- 5,8S- ITS2 Bölgelerinin Amplifikasyonu**

İzole edilen maya türlerine ait genomik DNA kullanılarak ITS1-5,8 rDNA-ITS2



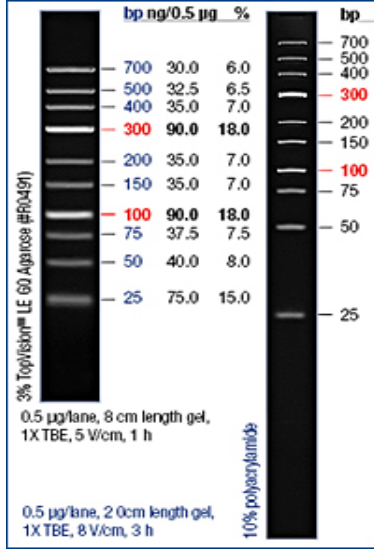
bölgeleri, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak daha önceden belirlenen PCR şartlarında gerçekleştirildi (White ve ark., 1990). PCR bileşenleri ve konsantrasyonları Çizelge 3.2'de verildi. PCR reaksiyonları Çizelge 3.3'te belirtilen sıcaklık ve sürelerde BİO-RAD marka Thermal cycler cihazında yapıldı. PCR ürünleri ve Marker 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak %1'lik (w/v) agaroz jelde 80 dakika (120 voltta) yürütüldü. Kullanılan marker haritası Şekil 3.1'de verildi. PCR ürünlerinin resimleri ultraviolet transilluminatör (UV) tablasında Olympus C- 5060 marka fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı.

Çizelge 3.2. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar (µl)</b>	<b>Final konsantrasyon</b>
Master mix (Fermentas, K0171)	12,5	-
10 pmol/µl forward primer	1	10 pmol/µl
10 pmol/µl reverse primer	1	10 pmol/µl
Genomik DNA	0,5	100 ng
Nuclease free-water	10	-
Toplam hacim	25	

Çizelge 3.3. PCR reaksiyon şartları

<b>Reaksiyon aşamaları</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (Dak.)</b>	<b>Döngü sayısı</b>
İlk denatürasyon	95	1,5	1
Denatürasyon	94	2	-
Primerlerin bağlanması	60	1	30
Uzama	72	2,5	-
Sonlanma	72	5	1



Şekil 3. 1. Çalışmada kullanılan marker haritası.

### 3.6. Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi

PCR reaksiyon ürünleri, PCR pürifikasyon kiti (Fermentas K0702) kullanılarak saflaştırıldıktan sonra farklı restriksiyon enzimleri (Fermentas; *HinfI*, *HaeIII*, *HhaI*, *AluI* ve *HpaII*) kullanılarak üretici firmanın önerdiği koşullarda restriksiyon kesimleri gerçekleştirildi (Çizelge 3.4). Restriksiyon ürünleri ve marker DNA % 2, 5 (w/v) agaroz jelde 1XTAE tamponu içinde 120 dakika (120 voltta) yürütüldü. Restriksiyon ürünlerinin görüntüleri ultra violet transilluminatör (UV) tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı. Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunda elde edilen bantların büyüklüğü Gel-Pro Analyzer Version 4.0 programı kullanılarak belirlendi.

Çizelge 3.4. Restriksiyon enzimlerinin kesim işlemi için reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar (µl)
Restriksiyon enzimi	0,5
10X Green buffer	1
Kalıp DNA	5
Nuclease free-water	8,5
Toplam hacim	15

### **3.7. Restriksiyon Veri Analizi**

Her bir restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bant profilleri bir harf ile kodlandı. Bant profillerine göre Bileşik Haplotip (Composite Haplotype) veri dosyası oluşturuldu. Her bir populasyon için haplotip çeşitliliği (Haplotype Diversity) ve haplotip frekansı (Haplotype Frequency) hesaplandı (Nei, 1987). Her bir populasyon için nükleotid çeşitliliği (Nucleotide Diversity) haplotipler arasındaki kesim bölgesine göre hesaplandı. Populasyonlar arasındaki farklılaşma (Divergency) REAP (Restriction Enzyme Analysis Programme) programı kullanılarak belirlendi (McElroy ve ark., 1991). Haplotipler kullanılarak köksüz DOLLO parsimoni ağaçları PHYLIP ver. 3.5c programı kullanılarak elde edildi (Felsenstein, 1993). Moleküler varyansın dağılımı (AMOVA) farklı düzeylerde ARLEQUIN 3.1 programı kullanılarak analiz edildi: populasyon içi, populasyonlar arası ve oluşturulan gruplar arası (Schneider ve ark., 1996). Moleküler varyans dağılımı ve FST değerleri 1000'lik permütasyon ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Bu filogenetik analizlerin yorumlanmasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serap MUTUN yardımcı oldu.

### **3.8. *K. marxianus* Maya Suşlarının Hücre Dışı Proteaz, Lipaz ve Üreaz Enzim Aktivitelerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi**

#### **3.8.1. Hücre dışı proteaz aktivitesi**

*K. marxianus* maya suşlarının ve referans maya suşunun hücre dışı proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi için PCA-SM (5,0 g/l (w/v) Peptone from casein, 2,5 g/l (w/v) Yeast extract, 1,0 g/l (w/v) Glikoz, 15 g/l (w/v) Agar ve % 50 Skim milk) ve YP-D-SM (10 g/l (w/v) Yeast extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone, 10 g/l (w/v) Glikoz, 15 g/l (w/v) Agar ve % 50 Skim milk) katı besi ortamları kullanıldı (Koburger, 1972; Nelson ve Young, 1986). Glikoz içeren zengin besi ortamında üretilen taze maya kültürlerinden hazırlanmış olan katı besi ortamlarına 5µl damlatılarak 30°C'de 15 gün inkübe edildi. Maya kolonileri etrafında oluşan transparent bölgenin çapı günlük ölçülerek kaydedildi. İlk 7 gün sonunda zon oluşturan maya suşlarında yüksek proteolitik aktivite olarak değerlendirilerek pozitif sonuç kabul edildi. Daha sonraki günlerde zon oluşumu gözlenen maya suşları zayıf proteolitik aktivite gösteren suşlar olarak değerlendirildi. Zon oluşumu göstermeyen maya suşlarında ise proteolitik aktivite bulunmadığından negatif olarak değerlendirildi.

**3.8.2. Hücre dışı lipaz aktivitesi**

*K. marxianus* maya suşlarının ve standart maya suşunun hücre dışı lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi için PCA-SM (5,0 g/l (w/v) Peptone from casein, 2,5 g/l (w/v) Yeast extract, 1,0 g/l (w/v) Glikoz, 15 g/l (w/v) Agar, 0.01% Kalsiyum klorid ve 0.5 % Tween 40) katı besi ortamı kullanıldı (Koburger, 1972). Glikoz içeren zengin besi ortamında üretilen taze maya kültürlerinden hazırlanmış olan katı besi ortamlarına 5µl damlatılarak 28-30°C’de 15 gün inkübe edildi. Lipolitik aktiviteye sahip maya kolonileri etrafında kalsiyum palmitatın çökmesi sonucu oluşan zon pozitif sonuç, 15 gün sonunda hala zon oluşumu göstermeyen maya suşlarında ise negatif sonuç olarak değerlendirildi.

**3.8.3. Hücre dışı üreaz aktivitesi**

*K. marxianus* maya suşlarının ve standart maya suşunun hücre dışı üreaz aktivitelerinin belirlenmesi için Christensen urea medium (1,0 g/l (w/v) peptone, 1,0 g/l (w/v) Glikoz, 5 g/l (w/v) Sodyum klorid, 2 g/l (w/v) Potasyum dihidrojen fosfat, 0,012 g/l (w/v) fenol red, 20 g/l (w/v) Agar ve 20 g/l (w/v) Üre) besi ortamı hazırlandı. Filtre sterilizasyonu yapılan üre daha sonra besiyerine ilave edilerek besi yerinin pH değeri 6,8’ e ayarlandı. (Seeliger, 1956; Difco, 1998; Winn, 2006). Glikoz içeren zengin katı üreme ortamında bulunan taze maya hücrelerinin besi yerlerine ekimleri yapılarak 30°C’de 5 gün inkübe edildi. Üreme ortamını koyu pembe-kırmızı renge dönüştüren maya suşları üreaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilirken renk dönüşümü göstermeyen (sarı-turuncu) besi ortamlarındaki maya suşlarında negatif sonuç olarak değerlendirildi.

**3.9. *K. marxianus* Maya Suşlarının İnvvertaz ve β-galaktozidaz Enzim Aktivitelerinin Kantitatif Olarak Repres–Derepres Şartlarda Belirlenmesi**

*K. marxianus* maya suşlarının invvertaz ve β-galaktozidaz enzim aktivitelerini belirleyebilmek için maya hücreleri YP-D (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone ve % 2 Glikoz) içeren sıvı kültürlerde durağan faza kadar 28-30°C ve 120 rpm’de 16-18 saat çalkalamayla üretildi. Daha sonra durağan faz maya kültürlerinden repres şartlar için YP-D ve derepres şartlar için YP-G (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone ve % 2 Gliserol) besi ortamlarında taze kültürler başlatılarak logaritmik aşamaya (OD<sub>600</sub>=1,0) kadar üretildi. Sıvı kültürde üretilen maya hücreleri santrifüj edilerek toplandı ve 5 ml steril soğuk distile su ile yıkandı.

Maya hücrelerinin invvertaz enzim aktivitesini belirlemek için çöktürülerek toplanan

hücreler 50 mM NaOAc pH 5 tampon çözeltisi ile yıkandı. Tekrar çöktürülen hücreler 200 µl'lik 50mM NaOAc pH 5,2, 2mM PMSF tampon çözeltisinde çözüldü. Bu hücre çözeltisinden 50 µl alınıp 200 µl'lik 200mM sukroz çözeltisiyle karıştırılarak 37 °C'de 15 dakika bekletildi. Reaksiyon periyodu sonunda enzim aktivitesi 50 µl, 1M Tris-HCl pH 8,8 çözeltisi eklenerek durduruldu. Reaksiyon sonucu açığa çıkan glikoz miktarı glikoz oksidaz-peroksidaz reaksiyonu (GOD-POD) ile belirlendi. (Rothe ve Lehle, 1998). Tekrarlanan deneylerden elde edilen sonuçların ortalamaları enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan µM glikoz/ dakika/ 100mg kuru ağırlık olarak hesaplandı. Mayaların kuru ağırlığı (OD<sub>600</sub>=1) 0.5 mg olarak alındı (Coons ve ark, 1995).

Maya hücrelerinin β-galaktozidaz enzim aktivitesini belirlemek için çöktürülerek toplanan hücreler 1 ml steril soğuk distile su ile yıkandıktan sonra tekrar çöktürülerek toplandı. Toplanan hücreler 200µl'lik permeabilizasyon tampon çözeltisi (20µl saf kloroform ve 20 µl 0.1%'lik SDS) içinde süspansiyon edildi (Guarente, 1983). Hücre süspansiyonundan 20- 40 µl Z tampon çözeltisi (16,1 g/l (w/v) disodyum hidrojen fosfat-7 hidrat, 5,5 g/l (w/v) Sodyum fosfat mono bazik-7 hidrat, 0,75 g/l (w/v) potasyum klörür, 0,246 g/l magnezyum sülfat-7 hidrat ve 2,7 ml (v/v) β-merkaptotanol) içeren tüp içine transfer edildi. Süspansiyon 28°C'de 10 dakika inkübe edilerek üzerine 200 µl ONPG ilave edilerek zaman kaydedildi. Süspansiyon rengi sarıya döndüğünde reaksiyon 500 µl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilerek durduruldu ve tekrar zaman kaydedildi. Süspansiyonun absorbansı 420 nm'de belirlendi. Hücre süspansiyonlarındaki protein konsantrasyonları Lowry metoduyla belirlendi (Lowry ve ark. 1951). β -galaktozidaz aktiviteleri parçalanmış milimol ONPG/dakika/mg protein olarak verildi.

Enzim deneyleri her *K. marxianus* maya suşu için ikili set olarak üç kez tekrar edildi ve ortalamaları alınarak standart sapmaları belirlendi.

### **3.10. *K. marxianus* Maya Suşlarının İvertaz ve İnülinaz Enzim Aktivitelerinin Repres–Derepres Şartlarında Belirlenmesi**

Enzimatik aktivitelerine göre seçilen maya suşları ve referans maya suşunun invertaz ve inülinaz enzim aktivitelerini belirleyebilmek için maya hücreleri YP-D (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone ve % 2 Glikoz) içeren sıvı kültürlerde durağan faza kadar 28-30°C ve 120 rpm'de 16-18 saat çalkalamayla üretildi. Daha sonra durağan faz maya kültürlerinden repres şartlar için YP-D (%2 glikoz ve %4 glikoz) ve derepres şartlar için YP-G (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone ve % 2

Gliserol) besi ortamlarında taze kültürler başlatılarak logaritmik aşamaya ( $OD_{600}=1,0$ ) kadar üretildi. Sıvı kültürde üretilen maya hücreleri santrifüj edilerek toplandı. Çöktürülen hücreler steril soğuk distile su ile yıkandıktan sonra invertaz ve inülinaz enzim aktiviteleri belirlendi. İvertaz aktiviteleri Bölüm 3'te 9 numaralı konu başlığında verildiği gibi yapıldı.

Maya hücrelerinin inülinaz enzim aktivitelerini belirlemek için Suzuki ve arkadaşlarının önerdiği metod bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı (Suzuki ve ark., 1988). Çöktürülerek toplanan maya hücreleri önce steril soğuk distile su ile, daha sonra 50mM NaOAc pH 5 tampon çözeltisi ile yıkandı ve 200 $\mu$ l'lik 50mM NaOAc, 2mM PMSF pH 5,2 tampon çözeltisinde homojenize edildi. Bu hücre çözeltisinden 50  $\mu$ l alınıp 200 $\mu$ l'lik 200mM sukroz çözeltisiyle karıştırılarak 55 °C'de 15 dakika ve 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon periyodu sonunda enzim aktivitesi 50  $\mu$ l 1M Tris-HCl pH 8,8 çözeltisi eklenerek durduruldu. Reaksiyon sonucu açığa çıkan glikoz miktarı glikoz oksidaz-peroksidaz reaksiyonu (GOD-POD) ile belirlendi. (Rothe ve Lehle, 1998). Tekrarlanan deneylerden elde edilen sonuçların ortalamaları enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan  $\mu$ M glikoz/dakika/100mg kuru ağırlık olarak hesaplandı. Mayaların kuru ağırlığı ( $OD_{600}=1$ ) 0.5 mg olarak alındı (Coons ve ark., 1995).

Enzim deneyleri her *K. marxianus* maya suşu için ikili set olarak üç kez tekrar edildi ve ortalamaları alınarak standart sapmaları belirlendi.

### **3.11. *K. marxianus* Maya Suşlarının Hidrolitik Enzim Profillerinin Belirlenmesi**

*K. marxianus* maya türlerinin enzim profillerinin saptanabilmesi için kantitatif bir yöntem olan; API-ZYM test sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanıldı. API-ZYM kit sistemi bir tane negatif kontrol olmak üzere içerisinde enzim substratı bulunan 20 kuyucuktan oluşmaktadır. API-ZYM test sistemi ile 19 farklı enzimin (Alkalin fosfataz, Esteraz (C 4), Esteraz Lipaz (C 8), Lipaz (C 14), Lösin arilamidaz, Valin arilamidaz, Sistin arilamidaz, Tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin, Asit fosfataz, Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz,  $\alpha$ -galaktozidaz,  $\beta$ -galaktozidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\alpha$ -glukozidaz,  $\beta$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz,  $\alpha$ -mannosidaz,  $\alpha$ -fukosidaz) varlığı hızlı bir şekilde test edilmektedir. API-ZYM test sistemi oldukça pahalı bir kit sistemi olduğu için enzimatik aktivitelerine göre seçilen Km5, Km38, Km63 ve referans *K. marxianus* maya suşları test sisteminde kullanıldı.

Maya hücrelerinin hücre dışı enzim profilleri zengin (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone) ve minimal (1.6 g/l (w/v) Yeast Nitrogen Base, 5.0 g/l (w/v)

Ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) üreme ortamında iki farklı karbon kaynağında (% 2 glikoz ve % 2 gliserol) belirlendi. Karbon kaynağı ilave edilmiş uygun besi ortamında (YP-D, YP-G, YNB-D ve YNB-G) üretilen sıvı kültürlerden maya hücreleri çöktürülerek toplandı ve suspension medium ile tekrar suspense edildi. Bu şekilde elde edilen sabit hücre derişimindeki kültür süspansiyonlarından kitteki her bir hücreye 65 µl olacak şekilde transfer edilerek 28-30°C’ de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa ZYM A ve ZYM B çözeltileri eklenerek, 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kuyucuklarda oluşan renk, test kitleri ile birlikte verilen renk değerlendirme çizelgesine göre yorumlanarak, referans maya suşunun ve diğer seçilen *K. marxianus* maya suşlarının enzim profilleri belirlendi.

**BÖLÜM 4****ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Maya Yoğunlukları**

Çalışmamızda Çanakkale ilinin yerel pazarlarında kendi ürettikleri süt ve süt ürünlerini satan 9 farklı yöre halkından çiğ süt, peynir, yoğurt ve ayran örnekleri alınarak laboratuara getirildi. Sodyum propiyonat içeren YGC besi ortamlarına gerekli miktarlarda ve uygun seyreltmeler yapılarak ekimleri yapıldı. Üreme ortamında sayılabilir yoğunlukta bulunan maya kolonilerinin sayımları yapılarak süt ve süt ürünleri üzerindeki mayaların koloni oluşturabilen birim değerleri süt, ayran ve yoğurt için CFU/ml, peynir örnekleri için CFU/mg olarak hesaplandı. Tüm üreticilere ve örneklenen ürünlere göre maya yoğunlukları Çizelge 4.1’de verildi. Çiğ süt, yoğurt, ayran ve peynir örneklerinde bulunan ortalama maya yoğunluğu ise Çizelge 4.2’de verildi.

İncelenen çiğ süt, yoğurt ve ayran örneklerinde en fazla maya yoğunluğuna S5 numaralı üreticinin çiğ süt örneğinde ( $1,5 \times 10^4$  CFU/ml) rastlanırken en düşük maya yoğunluğuna S5 ve S6 numaralı üreticilerin yoğurt örneklerinde ( $10^2$  CFU/ml) rastlandı. S4, S7 ve S9 numaralı üreticilerin yoğurt örneklerinde ve S-5 numaralı üreticinin ayran örneğinde maya üremesi gözlenmedi. Peynir ürünlerinde ise en düşük maya yoğunluğu ( $10^3$  CFU/gr) S1 numaralı üreticinin örneğinde gözlemlendi.

Ortalama maya yoğunluğu 1 mililitre işlenmemiş çiğ süt ve ayranda  $10^2$  - $10^4$  CFU arasında değişirken 1 gram peynirde  $10$  - $10^2$  CFU ( $10^4$  - $10^5$  CFU/mg) olarak bulundu. Yoğurt örneklerinde ise ortalama maya yoğunluğunun  $10^2$  - $10^3$  CFU/ml arasında değiştiği görüldü.

Genel olarak peynir (87 CFU/mg) örneklerinde maya yoğunluğunun oldukça düşük olduğu çiğ süt (3500 CFU/ml) örneklerinde ise yüksek olduğu tespit edildi. Ayran (860 CFU/ml) ve yoğurt (700 CFU/ml) örneklerinde ise maya yoğunluklarının birbirine yakın olduğu gözlemlendi.



Çizelge 4.1. Süt ve süt ürünlerinde belirlenen maya yoğunlukları

Ürün Kaynağı	Örnek	CFU/ml	CFU/gr
S1	Çiğ süt	$2,3 \times 10^3$	-
	Peynir	-	$10^3$
S2	Çiğ süt	$3 \times 10^2$	-
	Peynir	-	$4 \times 10^4$
S3	Çiğ süt	$4 \times 10^2$	-
	Yoğurt	$1,8 \times 10^3$	-
S4	Çiğ süt	$2 \times 10^3$	-
	Yoğurt	0	-
	Ayran	$1,6 \times 10^3$	-
S5	Çiğ süt	$1,5 \times 10^4$	-
	Yoğurt	$10^2$	-
	Ayran	0	-
S6	Çiğ süt	$5 \times 10^2$	-
	Yoğurt	$10^2$	-
	Ayran	$7,1 \times 10^2$	-
S7	Yoğurt	0	-
	Ayran	$6,6 \times 10^2$	-
S8	Peynir	-	$2,2 \times 10^5$
S9	Yoğurt	0	-
	Ayran	$5 \times 10^2$	-

Çizelge 4.2. Toplanan örneklerdeki ortalama maya yoğunluğu (Mean CFU)

Örnek	CFU/ml	CFU/gr
Çiğ süt	$3,5 \times 10^3$	-
Yoğurt	$7 \times 10^2$	-
Ayran	$8,6 \times 10^2$	-
Peynir	-	$8,7 \times 10^4$

**4.2. Tanımlanan Maya Türlerinin Süt ve Süt Ürünlerine Göre Dağılımı**

Örnekleme yapılan 6 farklı çiğ süt örneğinden 110 maya suşu, 3 farklı yoğurt örneğinden 30 maya suşu, 4 farklı ayran örneğinden 111 maya suşu ve 3 farklı peynir örneğinden 53 maya suşu olmak üzere toplam 304 maya suşu izole edildi. İzole edilen maya suşlarının YPD ve YP-Lac üreme ortamlarında 30°C’de ve 40°C’de üreme sonuçları Çizelge 4.3’te verildi. Çiğ süt örneklerinde glikoz içeren ortamda 40°C sıcaklıkta 49 maya suşu üreme gösterirken 17 maya suşu 30°C’de laktoz içeren ortamda üreme gösterdi. Bu maya suşlarından yalnızca 16 tanesinin 40°C sıcaklıkta üreyebildiği belirlendi. Yoğurt örneklerinden izole edilen 111 maya suşundan 53 tanesi laktoz içeren ortamda üreme gösterirken bunlardan yalnızca 38 tanesi laktoz içeren ortamda 40°C sıcaklıkta üreme göstermedi. Yoğurt örneklerinden izole edilen suşlardan 14 tanesinin peynir örneklerinde ise 23 maya suşunun hem laktozda hemde 40°C sıcaklıkta ürediği tespit edildi. Laktoz içeren ortamda üreme gösterebilen 117 maya suşu ve bunlardan 91 tane izolat 40°C’de üreme gösterebildiği için olası *K. marxianus* maya suşları olarak değerlendirildi.

Çizelge 4.3. İzole edilen maya suşlarının glikoz ve laktoz içeren besi ortamlarında farklı sıcaklıklarda üreme testleri

Üreme Koşulları	Çiğ süt	Yoğurt	Ayran	Peynir	Toplam
YP-Glikoz-30°C	110	30	111	53	304
YP-Laktoz-30°C	17	14	53	24	108
YP-Glikoz-40°C	49	18	67	33	167
YP-Laktoz-40°C	16	14	38	23	91

İzole edilen maya örneklerinin tümü API ID 32C kit sistemi ile tanımlandı. Çiğ süt, yoğurt, ayran ve peynir örneklerinde *Candida inconspicua*, *Candida norvegensis*, *Candida lambica*, *Candia tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Candida lipolytica*, *Candida utilis*, *Candida parapsilosis*, *Candida famata*, *Candida colliculosa*, *Candida pelliculosa*, *Candida lusitaniae*, *Candida sake*, *Candida melibiosica*, *Candida intermedia*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum capitatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* ve *K. marxianus* olmak üzere toplam 22 farklı maya türü tanımlandı. Çiğ süttten, yoğurttan, ayrandan ve peynirden izole edilerek tanımlanan maya türleri, her türe ait izolat sayısı ve 40°C’de laktoz içeren ortamda üreme

gösterebilen maya türleri Çizelge 4.4'te verildi.

İşlenmemiş süt örneklerinden 11 farklı maya türü, yoğurt örneklerinde 5 farklı maya türü, ayran örneklerinde 14 farklı maya türü ve peynir örneklerinde 6 farklı maya türü tanımlandı. *K. marxianus* maya türü tüm süt ve süt ürünlerinde yüksek oranda dağılım gösterirken *C. zeylanoides* ve *C. utilis* maya türlerinin yalnızca çiğ süt örneklerinde, *C. colliculosa*, *C. lusitaniae*, *C. sake*, *C. melibiosica*, *R. glutinis* ve *G. capitatum* maya türlerinin yalnızca ayran örneklerinde, *C. pelliculosa*, *C. intermedia* ve *C. guilliermondii* maya türlerinin yalnızca peynir örneklerinde dağılım gösterdiği görüldü.

Çiğ süt örneklerinde *C. lipolytica*, *C. norvegensis* ve *K. marxianus* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu görüldü. Tanımlanan *C. tropicalis*, *C. utilis*, *R. mucilaginosa*, *K. lactis* ve *K. marxianus* maya suşlarının 30°C sıcaklıkta laktozu kullanarak üreyebildikleri, *C. tropicalis*, *C. utilis* ve *K. marxianus* maya suşlarının laktoz içeren ortamda 40°C'de üreyebildikleri belirlendi. Yoğurt örneklerinde *C. parapsilosis* ve *K. marxianus* maya türlerinin 30°C sıcaklıkta laktozu hidrolize edebilirken yalnızca *K. marxianus* maya suşlarının 40°C'de laktozu kullanabildiği tespit edildi. Ayran örneklerinde *C. parapsilosis* ve *K. marxianus* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu, *C. famata*, *C. colliculosa*, *G. capitatum*, *K. lactis* ve *K. marxianus* maya suşlarının laktozu kullanarak 30°C'de üreme gösterirken, 40°C'de yalnızca *C. famata*, *G. capitatum* ve *K. marxianus* maya suşlarının laktozu karbon kaynağı olarak kullanabildiği belirlendi. Peynir örneklerinde *C. pelliculosa* maya türünün yoğun olarak bulunurken *C. famata* ve *K. marxianus* maya suşlarının 40°C'de karbon kaynağı olarak laktozu kullanarak üreyebildikleri görüldü.

İzole edilerek tanımlanan *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lusitaniae*, *C. sake*, *C. melibiosica*, *G. capitatum* ve *K. marxianus* maya türleri glikoz içeren ortamda 40°C'de üreme gösterirken *C. lambica*, *C. zeylanoides*, *C. lipolytica*, *C. colliculosa*, *C. pelliculosa*, *C. intermedia*, *C. guilliermondii*, *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *S. cerevisiae* ve *K. lactis* maya türleri üreme göstermedi. Laktozu kullanarak 40°C'de üreme gösterebilen 91 maya suşunun *C. famata*, *G. capitatum*, *K. marxianus* ve *C. utilis* maya türlerine ait olduğu tespit edildi. Bu türler API ID 32C analizi öncesi olası *K. marxianus* maya türleri olarak tespit edilmişti. Analiz sonrasında çiğ süttten 15, yoğurttan 14, ayrandan 28 ve peynirden 13 olmak üzere toplam 70 maya suşu *K. marxianus* olarak tanımlandı.

Çizelge 4.4. Tanımlanan maya türlerinin süt ve süt ürünlerine göre dağılımı ve izolat sayıları

\*Laktoz içeren besi ortamında 40°C’de üreme gösterebilen maya türleri

Maya Türü	Maya Sayısı			
	Çiğ Süt	Yoğurt	Ayran	Peynir
<i>Candida inconspicua</i>	4	1	-	-
<i>Candida norvegensis</i>	25	-	-	-
<i>Candida lambica</i>	12	12	4	-
<i>Candia tropicalis</i>	4	1	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	1	-	-	-
<i>Candida lipolytica</i>	33	-	10	-
<i>Candida utilis</i> *	1	-	-	-
<i>Candida sake</i>	-	-	1	-
<i>Candida famata</i> *	-	-	1	10
<i>Candida parapsilosis</i>	-	2	18	10
<i>Candida colliculosa</i>	-	-	4	-
<i>Candida lusitaniae</i>	-	-	8	-
<i>Candida melibiosica</i>	-	-	2	-
<i>Candida pelliculosa</i>	-	-	-	18
<i>Candida intermedia</i>	-	-	-	1
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	1
<i>Geotrichum capitatum</i> *	-	-	9	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	-	6	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	7	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	-	12	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	-	1	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> *	15	14	28	13
Toplam	110	30	111	53

Genel olarak ayran örneklerinde maya çeşitliliğinin çiğ süt örneklerine göre daha fazla olduğu belirlendi. Çiğ süttteki maya yoğunluğu ayranda belirlenen maya yoğunluğundan yaklaşık 5 kat daha yüksek olmasına rağmen maya çeşitliliğinin ayranda

çiğ süttten daha fazla olduğu görüldü.

Çiğ süt, ayran, yoğurt ve peynir örneklerinden izole edilerek tanımlanan *K. marxianus* maya suşlarının örneklere göre dağılımı ve araştırmanın buradan sonraki kısımlarında kullanılacak olan işlem kodları Çizelge 4.5'te verildi.

Çizelge 4.5. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının örneklere göre dağılımı ve kodları

<b>İzole Edildiği Örnek (Toplam İzolat Sayısı)</b>	<b><i>K. marxianus</i> Maya Suşu Kodu</b>
Çiğ süt (15)	Km1, Km2, Km3, Km4, Km7, Km8, Km21, Km22, Km33, Km34, Km35, Km38, Km39, Km40, Km41
Yoğurt (14)	Km9, Km10, Km11, Km12, Km13, Km69, Km28, Km29, Km30, Km31, Km32, Km70, Km37, Km51
Ayran (28)	Km14, Km15, Km16, Km17, Km18, Km19, Km20, Km23, Km24, Km25, Km26, Km27, Km36, Km42, Km43, Km44, Km45, Km46, Km47, Km48, Km49, Km50, Km52, Km53, Km54, Km55, Km67, Km68
Peynir (13)	Km5, Km6, Km56, Km57, Km58, Km59, Km60, Km61, Km62, Km63, Km64, Km65, Km66

#### **4.3. *K. marxianus* Maya Suşlarının Asimilasyon ve Fermentasyon Testleri**

*K. marxianus* olarak tanımlanan maya suşlarının ve referans maya suşunun (Kontrol, K) % 2 Glikoz, % 2 Galaktoz, % 2 Laktoz, % 2 Sukroz, % 2 Maltoz ve % 2 Gliserol karbon kaynaklarını içeren zengin (YP) besi ortamında fermentasyon testleri yapıldı. Glikoz, galaktoz ve sukroz sonuçları Çizelge 4.6'da, laktoz ve gliserol sonuçları Çizelge 4.7'de verildi. Fermentasyon sırasında oluşan organik asitler ve karbondioksit üreme ortamının pH değerini değiştirmektedir. Karbondioksit çıkışını tespit edebilmek için kullanılan Durham tüplerine ilave olarak pH indikatörü olan Bromtimol mavisi de üreme ortamına ilave edildi. Bromtimol mavisi ortamın pH değeri asidik olduğunda sarı bazik olduğunda ise koyu mavi renge dönüştürmektedir.

Çalışmamızda üreme ortamının sarı renge dönüşümü ve Durham tüpleri içindeki gaz birikimi fermentasyon pozitif, ortamın maviye dönmesi ve gaz birikimi gözlenmemesi fermentasyon negatif olarak değerlendirildi. Fermentasyon hızı yüksek olan maya

suşlarında daha kısa sürede renk değişimi ve gaz birikimi gözlemlendi. Çizelgelerde maya suşlarının fermentasyon süreleri, 24 saat içinde sonuç verenler ‘++++’, 2-3 gün sonunda sonuç verenler ‘+++’, 4-5 gün içinde sonuç verenler ‘++’, 6-7 gün sonunda sonuç verenler ‘+’ ve fermentasyon yapamayanlar ise ‘-’ olarak tanımlandı.

Çizelge 4.6. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının glikoz, galaktoz ve sukroz içeren zengin üreme ortamında fermentasyon testleri

Karbon Kaynağı	<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Fermentasyon Süresi
<b>Glikoz</b>	Tüm <i>K. marxianus</i> maya suşları (Km1-Km70)	++++
<b>Galaktoz</b>	Km1, Km5, Km6, Km7, Km9, Km10, Km11, Km13, Km14, Km16, Km17, Km18, Km19, Km20, Km21, Km22, Km23, Km24, Km25, Km26, Km27, Km28, Km29, Km30, Km31, Km32, Km33, Km34, Km35, Km36, Km37, Km38, Km39, Km40, Km41, Km42, Km43, Km44, Km45, Km46, Km47, Km48, Km49, Km50, Km51, Km52, Km53, Km54, Km62, Km65, Km66, Km70	++++
	Km8, Km15, Km55, Km56, Km57, Km58, Km59, Km61, Km63, Km67	+++
	Km3, Km4, Km64	++
	Km68	+
	Km2, Km12, Km60, Km69,	-
<b>Sukroz</b>	Km1, Km2, Km5, Km6, Km7, Km8, Km9, Km10, Km11, Km13, Km14, Km15, Km16, Km17, Km18, Km19, Km20, Km21, Km22, Km23, Km24, Km25, Km26, Km27, Km28, Km29, Km30, Km31, Km32, Km33, Km34, Km35, Km36, Km37, Km38, Km39, Km40, Km41, Km42, Km43, Km44, Km45, Km47, Km48, Km49, Km50, Km51, Km52, Km53, Km54, Km55, Km56, Km57, Km58, Km59, Km61, Km64, Km66, Km67	++++
	Km3, Km4, Km12, Km46, Km60, Km62, Km63, Km65, Km69	+++
	Km70	++
	Km68	-

Çizelge 4.7. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının laktoz ve gliserol içeren zengin üreme ortamında fermentasyon testleri

Karbon Kaynağı	<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Fermentasyon Süresi
Laktoz	Km1, Km2, Km3, Km4, Km9, Km10, Km11, Km13, Km14, Km15, Km16, Km17, Km18, Km21, Km22, Km23, Km24, Km25, Km26, Km27, Km28, Km29, Km30, Km31, Km32, Km33, Km34, Km35, Km36, Km37, Km38, Km39, Km40, Km41, Km42, Km43, Km44, Km45, Km47, Km48, Km49, Km50, Km51, Km52, Km53, Km54, Km55, Km56, Km57, Km58, Km59, Km60, Km61, Km62, Km63, Km65, Km66	++++
	Km5, Km6, Km7, Km20, Km64	+++
	Km8, Km46, Km67	++
	Km12, Km19, Km68, Km69, Km70	-
	Km12, Km17, Km43, Km69	++++
Gliserol	Km11, Km67	+++
	Km1, Km2, Km4, Km5, Km6, Km7, Km8, Km13, Km15, Km16, Km19, Km21, Km22, Km23, Km24, Km42, Km44, Km45, Km46, Km55, Km56, Km58, Km59, Km60, Km63, Km64, Km65, Km68	++
	Km3, Km9, Km18, Km20, Km25, Km38, Km48	+
	Km10, Km14, Km26, Km27, Km28, Km29, Km30, Km31, Km32, Km33, Km34, Km35, Km36, Km37, Km39, Km40, Km41, Km47, Km49, Km50, Km51, Km52, Km53, Km54, Km57, Km61, Km62, Km66, Km70	-

Asimilasyon testleri API ID 32C kit sistemi kullanılarak belirlendi ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’da verildi. Kullanılan kit sistemi ile D-Galaktoz, D-Sakkaroz, *N*-Asetil-glukozamin, Laktik asit, L-Arabinoz, D-Sellibioz, D-Raffinoz, D-Maltoz, D-Trehaloz, Potasyum 2-Keto-glukonat, Metil- $\alpha$ -D-glukopiranosit, D-Mannitol, D-Laktoz, Inositol, D-Sorbitol, D-Ksiloz, D-Riboz, Gliserol, L-Rhamnoz, Palatinoz, D-Melibioz, Sodyum Glukuronat, D-Melezitose, Potasyum Glukonat, Levülinik asit (Levülinat), D-Glukoz, L-Sorboz, Glukozamin, Sikloheksin (Aktidion) ve Eskulin ferrik

sitrat olmak üzere farklı karbonhidrat ve azot kaynaklarının kullanımını belirlemektedir.

Çizelge 4.8. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının farklı karbon ve azot kaynaklarında asimilasyon testleri-1

<b>Karbon ve Azot Kaynağı</b>	<b><i>K. marxianus</i> Maya Suşu</b>	<b>Asimilasyon Sonucu</b>
D-Glukoz	Tüm <i>K. marxianus</i> maya suşları	+
D-Galaktoz		
D-Sakkaroz		
D-Laktoz		
D-Raffinoz		
D-Maltoz	Tüm <i>K. marxianus</i> maya suşları	-
D-Trehaloz		
D-Sellibioz		
2-Keto-glukonat		
Metil- $\alpha$ -D-glukopiranosit		
Inositol		
L-Rhamnoz,		
Palatinoz		
Eritritol		
D-Melibioz		
Glukuronat		
D-Melezitoz		
Glukonat		
Levülinat		
L-Sorboz		



Çizelge 4.9. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının farklı karbon ve azot kaynaklarında asimilasyon testleri-2

Karbon ve Azot Kaynağı	<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Asimilasyon Sonucu
N-Asetil-glikozamin	Km9, Km12, Km59, Km68, Km69	+
	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	-
Laktik asit	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	+
	Km56, Km57, Km58	-
L-Arabinoz	Km1, Km2, Km33,	+
	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	-
D-Mannitol	Km1, Km3, Km4, Km10, Km12, Km13, Km17, Km18, Km33, Km34, Km29, Km35, Km39, Km59, Km60, Km61, Km62, Km63, Km64, Km65, Km66, Km67	+
	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	-
D-Sorbitol	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	+
	Km9, Km34, Km68	-
D-Ksiloz	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	+
	Km3, Km4, Km17, Km34,	-
D-Riboz	Km13, Km22, Km14, Km38, Km36	+
	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	-
Gliserol	Km2, Km3, Km4, Km5, Km6, Km7, Km8, Km12, Km13, Km17, Km22, Km37, Km38	+
	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	-
Glikozamin	Km2, Km9, Km68, Km69	+
	Diğer <i>K. marxianus</i> suşları	-

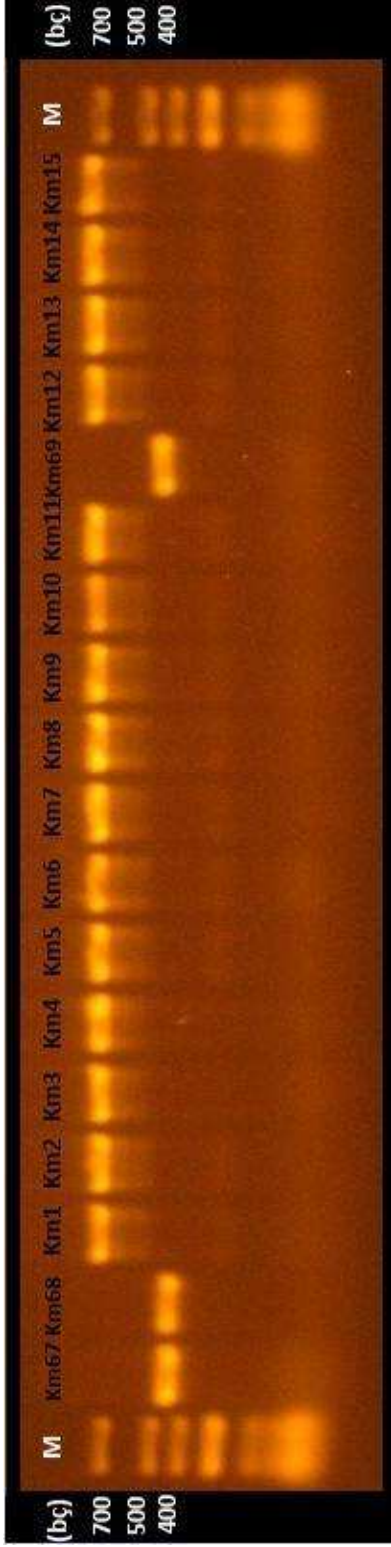
Tüm *K. marxianus* maya suşlarının D-Glikozu, D-Galaktozu, D-Sukrozu, D-Laktozu ve D-Rafinozu kullanarak üreyebilirken D-Maltozu, D-Trehalozu, D-Sellibiozu, 2-Keto-glukonatı, Metil- $\alpha$ -D-glikozidi, İnositolü, Ramnozu, Palatinozu, Eritritolü, D-Melibiozu, Glukuronatı, D-Melezitozu, Potasyum Glukonatı, Levülinatı ve L-Sorbozu

asimile edemediği görüldü. *K. marxianus* maya suşlarının %95'inin *N*-Asetil-glikozamini, D-Ribozu ve L-Arabinozu, %58'inin Gliserolü ve %69'unun D-Mannitolü asimile edemediği belirlendi. Maya suşlarının %95'inin ise Laktik asiti, D-Sorbitolü ve D-Ksilozu asimile ettiği tespit edildi. Tüm *K. marxianus* maya suşlarının glikozu hem asimile hem de fermente edebildiği belirlendi.

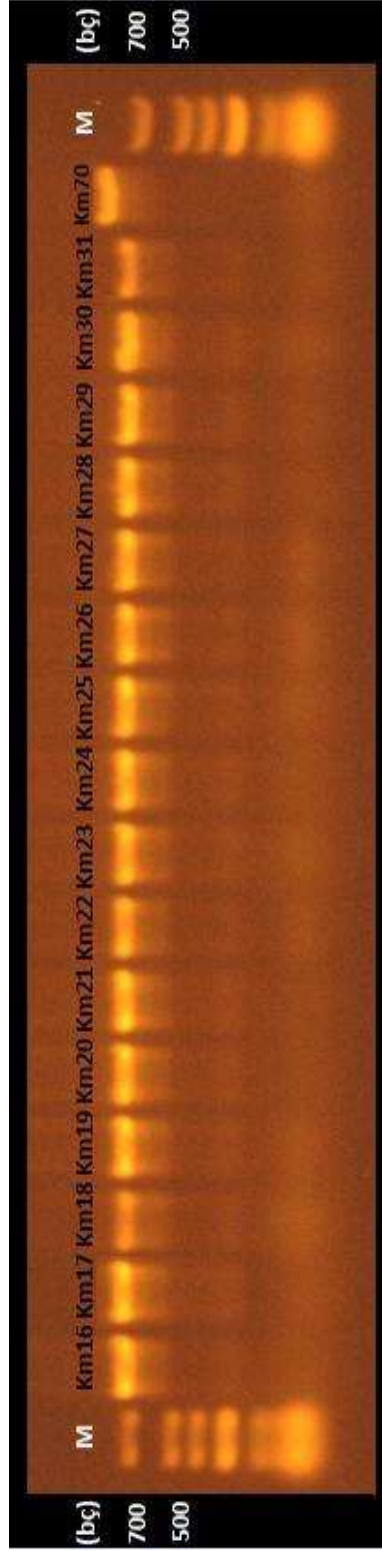
#### **4.4. *K. marxianus* Maya Türünden Genomik DNA İzolasyonu ve Amplifikasyonu**

*K. marxianus* maya hücrelerinden genomik DNA izolasyonu yapılarak DNA'nın saflığı ve miktarı spektrofotometrik (A260/A280) yöntemle tespit edildi. ITS bölgesinin (ITS1-5,8rDNA-ITS2) amplifikasyonu için ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanıldı. *K. marxianus* referans maya suşuna ve diğer izole edilen maya suşlarına ait PCR sonuçları ise Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verildi. Km67, Km68, Km69 ve Km70 maya suşları hariç diğer tüm izole edilen maya suşlarında ve referans maya suşunda yaklaşık 700 baz çifti uzunluğunda DNA bölgesinin amplifike olduğu belirlendi. Km67, Km68 ve Km69 maya suşlarında yaklaşık 450 baz çifti, Km70 maya suşunda ise yaklaşık 850 baz çifti uzunluğunda DNA bölgesinin amplifike olduğu belirlendi.

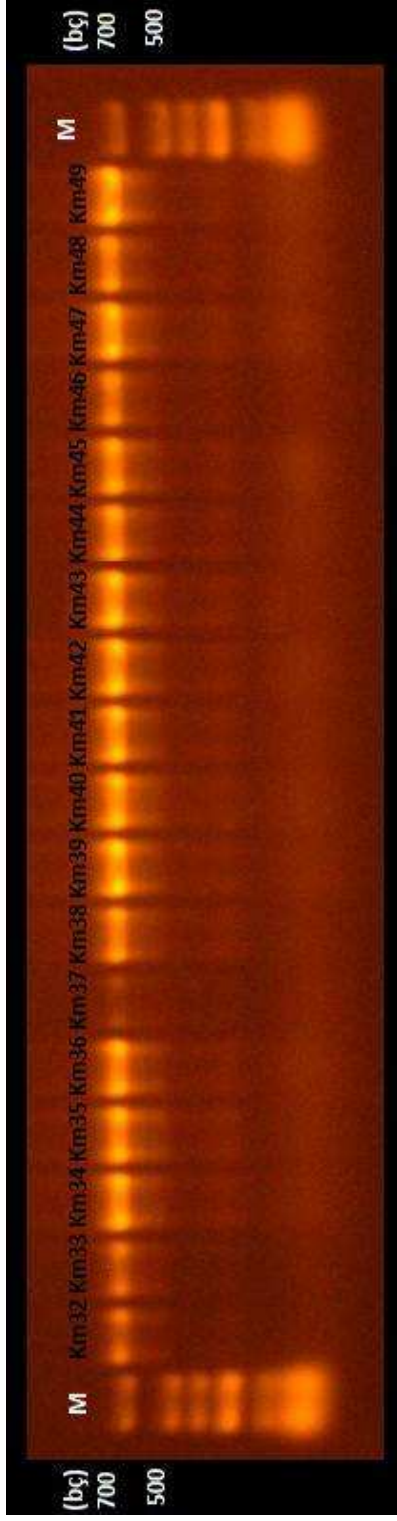
Km67, Km68, Km69 ve Km70 maya suşları kullanılan kit sistemi ile %98 *K. marxianus* olarak tanımlanmıştı. Fermentasyon testlerinde özellikle karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığında Km68, Km69 ve Km70 maya suşlarının negatif sonuç verdiği, Km67 maya suşunun ise oldukça uzun sürede fermentasyon (++) yapabildiği görülmüştü. Ayrıca Km68 maya suşunun sukrozu, Km69 maya suşunun galaktozu ve Km67 maya suşunun maltozu fermente edemediği belirlenmişti. Fermentasyon testleri ve son olarak PCR sonuçlarına göre bu dört maya suşunun *K. marxianus* maya türü olmadıklarına karar verilerek daha sonraki çalışmalarda bu maya suşları kullanılmadı.



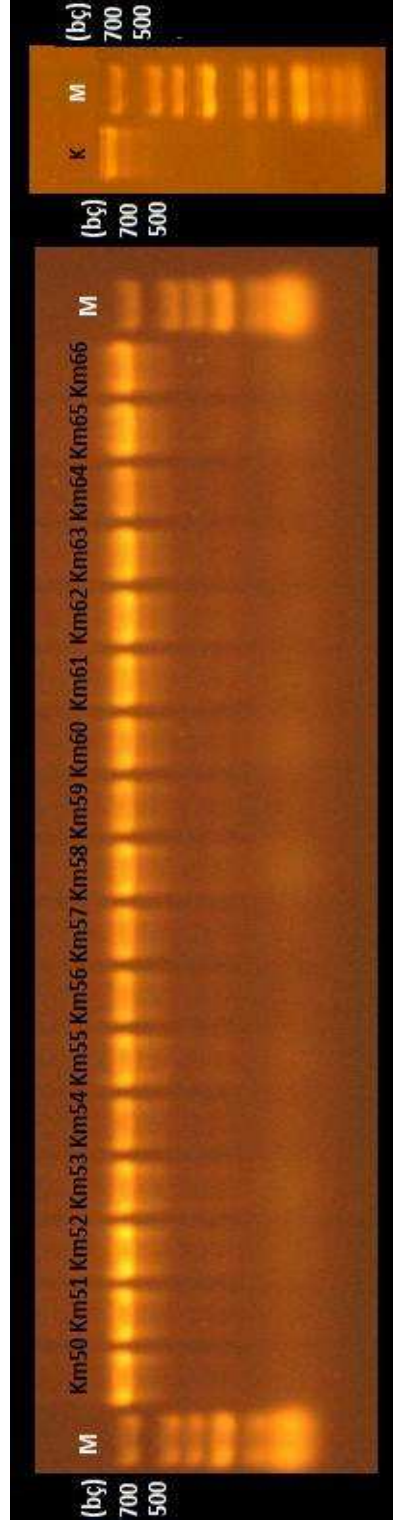
Şekil 4.1. *K. marxianus* maya suşlarında ITS bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Km1-Km15, Km67, Km68 ve Km69).



Şekil 4.2. *K. marxianus* maya suşlarında ITS bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Km16-Km31 ve Km70).



Şekil 4.3. *K. marxianus* maya suşlarında ITS bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Km32-Km49).



Şekil 4.4. *K. marxianus* maya suşlarında ITS bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Km50-Km66 ve Kontrol).

#### **4.5. Restriksiyon Kesim Profilleri**

Amplifikasyon sonrası 66 *K. marxianus* maya suşlarının ve referans maya suşunun ITS bölgesi PCR ürünleri *HaeIII*, *HhaI* (*CfoI*), *HinfI*, *HpaII* (*MspI*) ve *AluI* restriksiyon enzimleri ile kesildi.

*K. marxianus* maya suşlarının *HaeIII* enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.5 (Km1-Km4 arasındaki suşlar), Şekil 4.6 (Km5 ile Km22 arasındaki suşlar), Şekil 4.7 (Km23 ile Km40 arasındaki suşlar), Şekil 4.8 (Km41 ile Km58 arasındaki suşlar) ve Şekil 4.9’da (Km59 ile Km66 arasındaki suşlar) verildi.

*K. marxianus* maya suşlarının *HhaI* (*CfoI*) enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.10 (Km1-Km4 arasındaki suşlar), Şekil 4.11 (Km5-Km22 arasındaki suşlar), Şekil 4.12 (Km23-Km40 arasındaki suşlar), Şekil 4.13 (Km41-Km58 arasındaki suşlar) ve Şekil 4.14’de (Km59-Km66 arasındaki suşlar) verildi.

*K. marxianus* maya suşlarının *HinfI* enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.15 (Km1-Km4 arasındaki suşlar), Şekil 4.16 (Km5-Km12 arasındaki suşlar), Şekil 4.17 (Km13-Km30 arasındaki suşlar), Şekil 4.18 (Km31-Km48 arasındaki suşlar) ve Şekil 4.19’da (Km49-Km66 arasındaki suşlar) verildi.

*K. marxianus* maya suşlarının *HpaII* (*MspI*) enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.20 (Km1-Km4 arasındaki suşlar), Şekil 4.21 (Km5-Km12 arasındaki suşlar), Şekil 4.22 (Km13-Km30 arasındaki suşlar), Şekil 4.23 (Km31-Km48 arasındaki suşlar) ve Şekil 4.24’te (Km49-Km66 arasındaki suşlar) verildi.

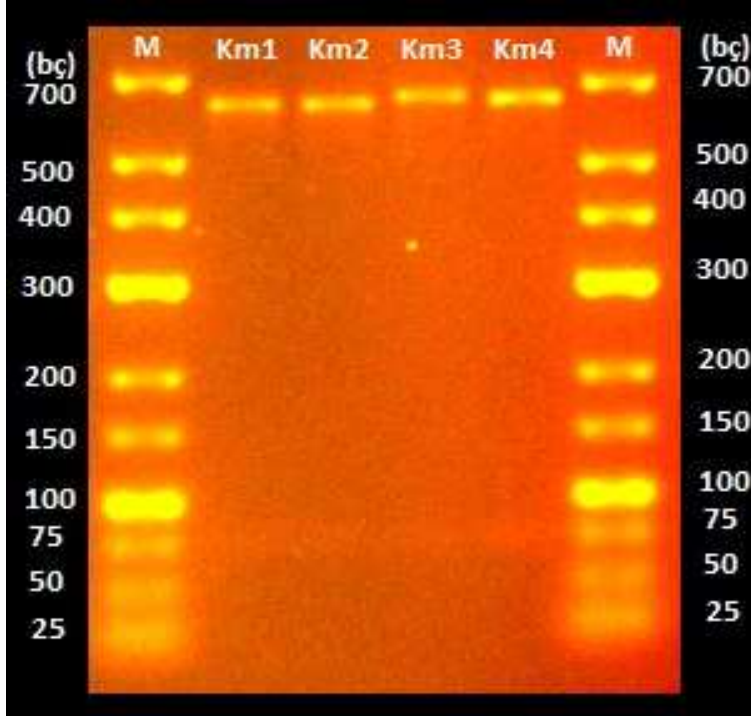
*K. marxianus* maya suşlarının *Alu I* enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.25 (Km1-Km18 arasındaki suşlar), Şekil 4.26 (Km19-Km36 arasındaki suşlar), Şekil 4.27 (Km37-Km54 arasındaki suşlar) ve Şekil 4.28’de (Km55-Km66 arasındaki suşlar) verildi. *K. marxianus* referans maya suşunun restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçları Şekil 4.29’da verildi.

*K. marxianus* maya suşlarının *HaeIII*, *HhaI* (*CfoI*), *HinfI*, *HpaII* (*MspI*) ve *AluI* restriksiyon kesimi sonucu elde edilen bantların büyüklüğü hesaplanarak Çizelge 4.10’da verildi.

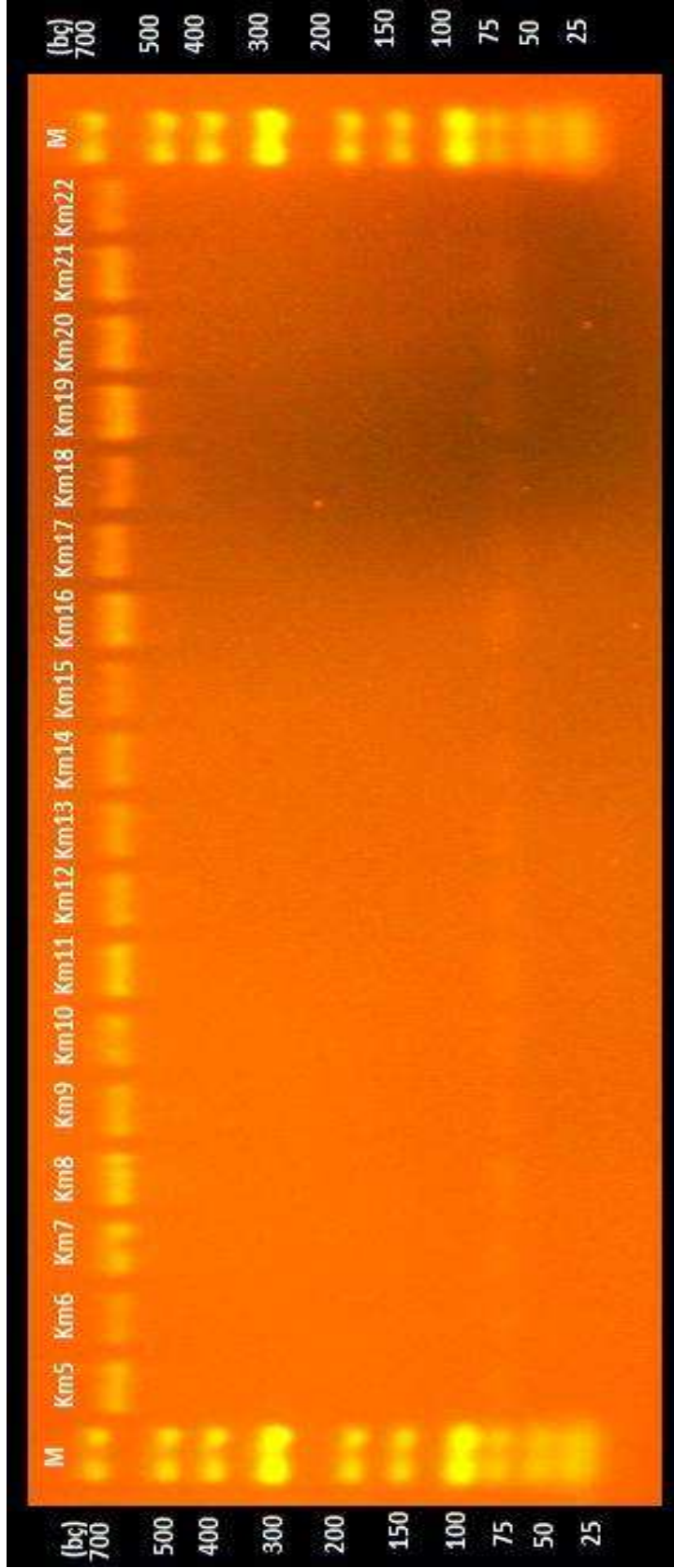
Tüm *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinde *HaeIII* ve *HhaI* enzimleri için tek kesim profili gösterdiğinden dolayı ve *HpaII* kesim bölgesi bulunmaması nedeniyle *HpaII*, *HaeIII* ve *HhaI* enzim kesimlerinde polimorfizm gözlenmedi. *HinfI* ve *AluI* kesimleri ise iyi bir diskriminasyon gösterdiğinden polimorfizm tespit edildi. Farklı

profilleri içeren restriksiyon kesim sonuçları toplu olarak Şekil 4.30’da verildi.

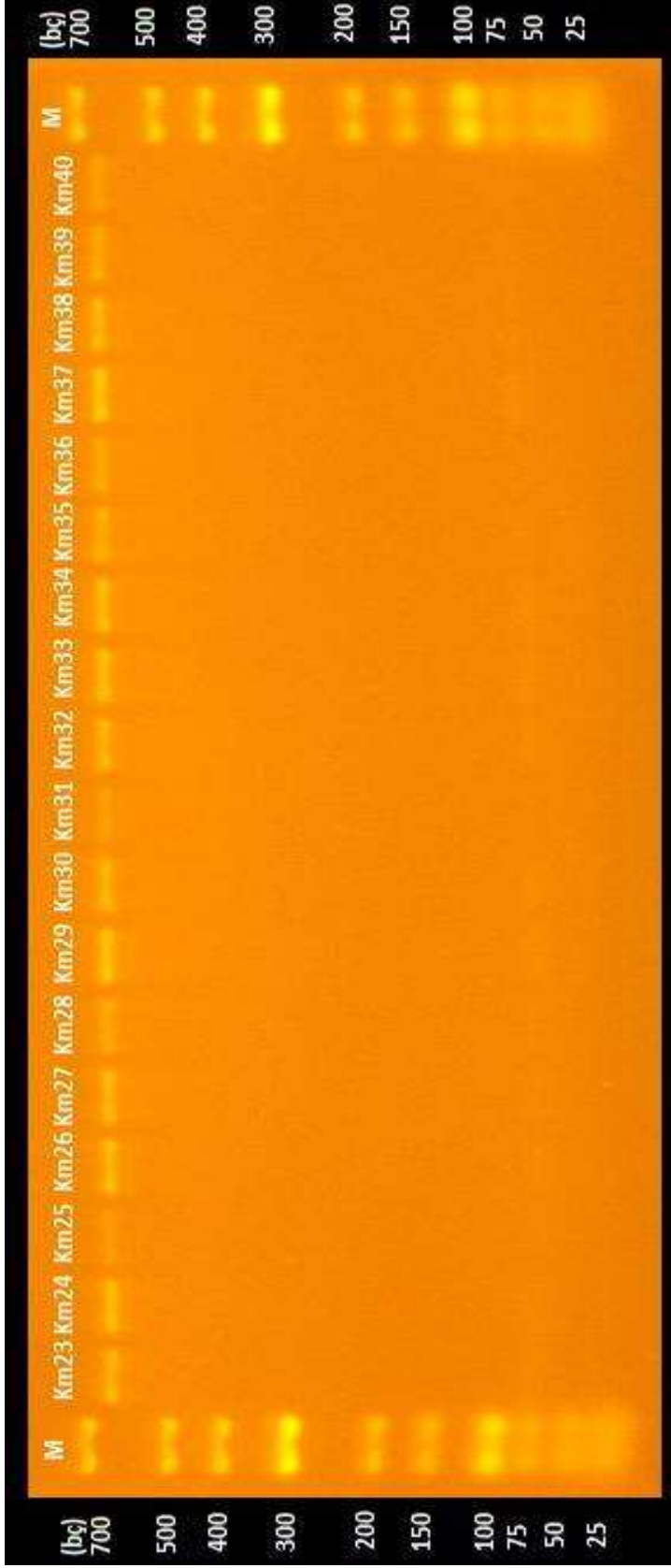
Referans maya suşu *AluI* kesimi sonrasında diğer izole edilen *K. marxianus* maya suşlarından farklı restriksiyon profili gösterdi. *AluI* kesimi sonrasında 400 bç-175 bç-120bç olmak üzere 3 DNA parçasına ilave olarak yaklaşık 500 bç uzunluğunda bir DNA parçası gözlenmiştir.



Şekil 4.5. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HaeIII* enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km4).

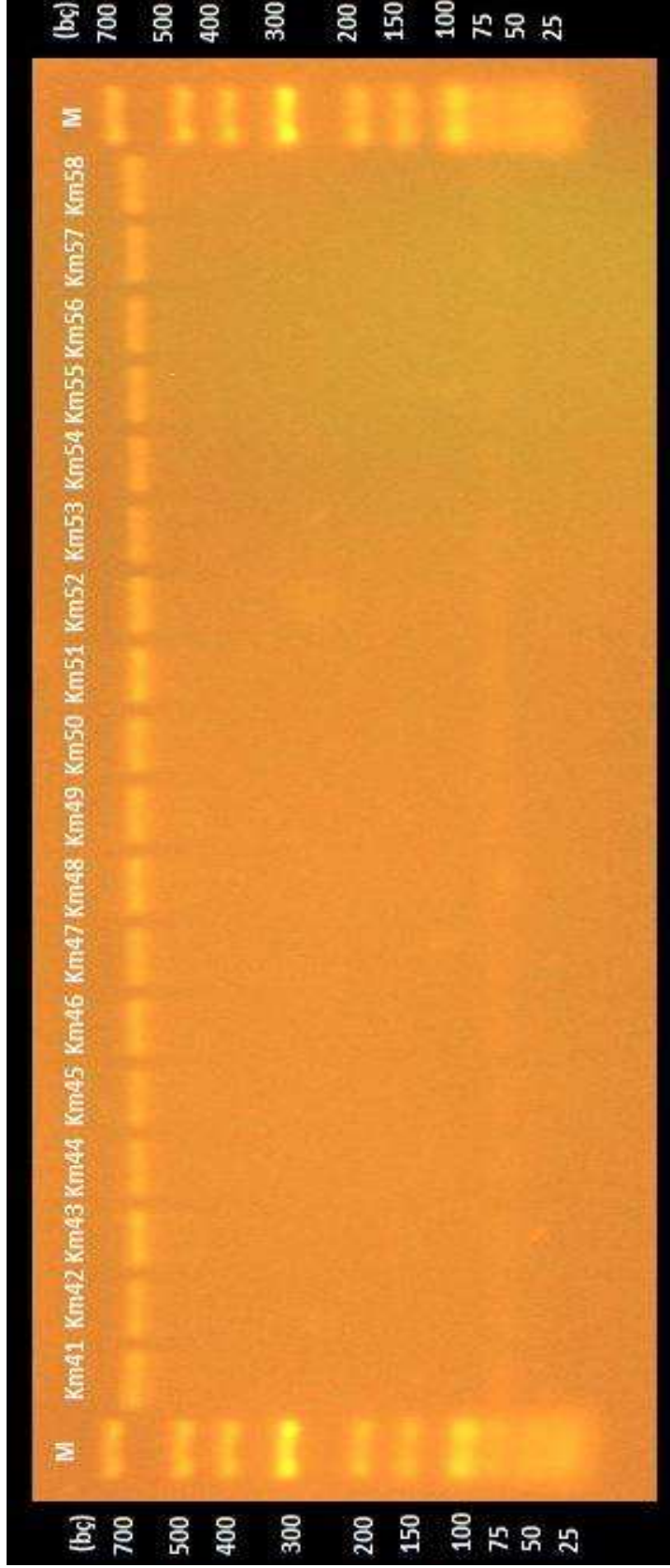


Şekil 4.6. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HaeIII* enzimi ile kesim sonuçları (Km5-Km22).



Şekil 4.7. *K. marxianus* maya susularının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HaeIII* enzimi ile kesim sonuçları (Km23-Km40).

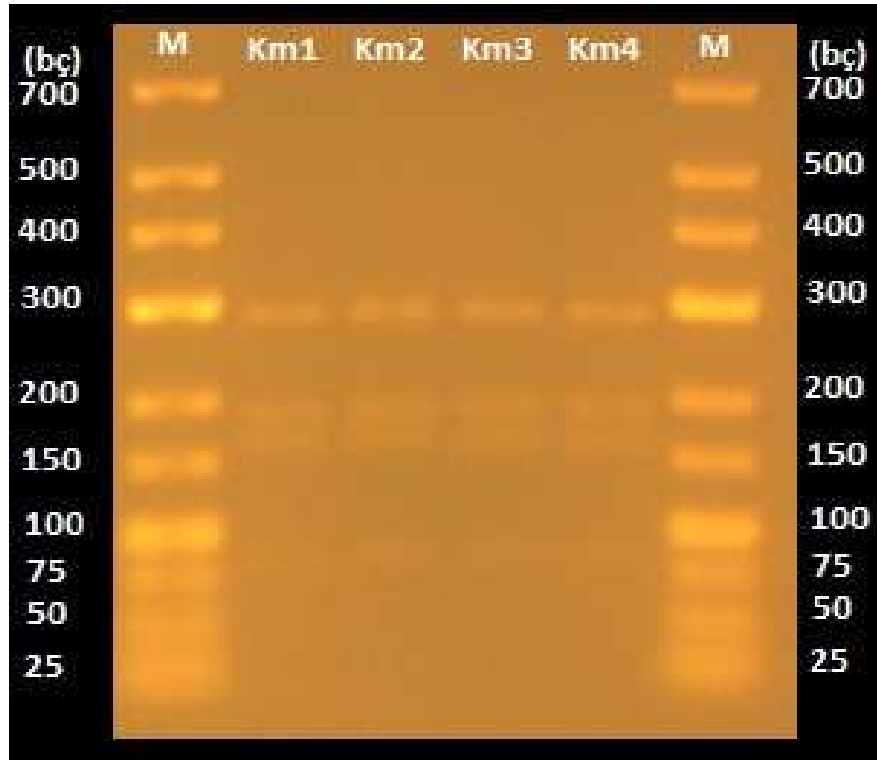




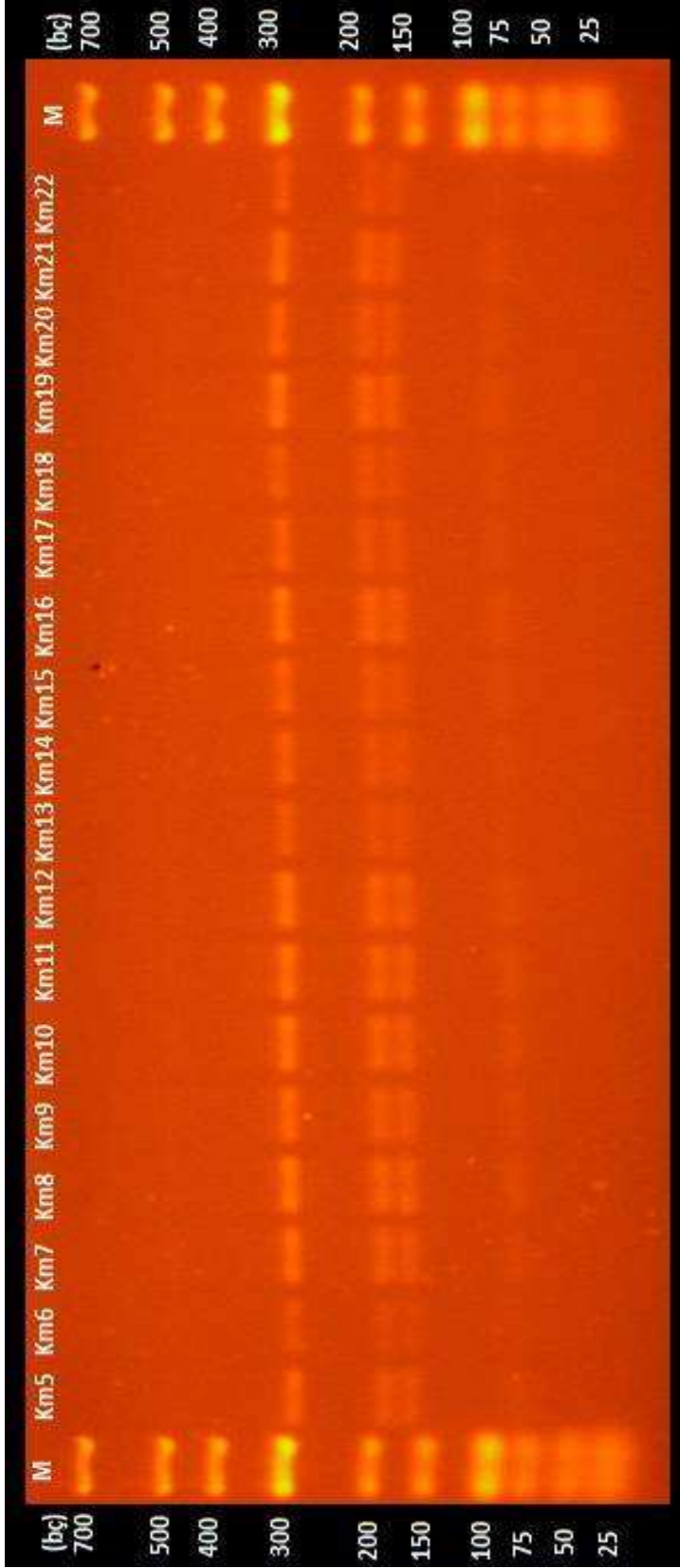
Şekil 4.8. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HaeIII* enzimi ile kesim sonuçları (Km41-Km58).



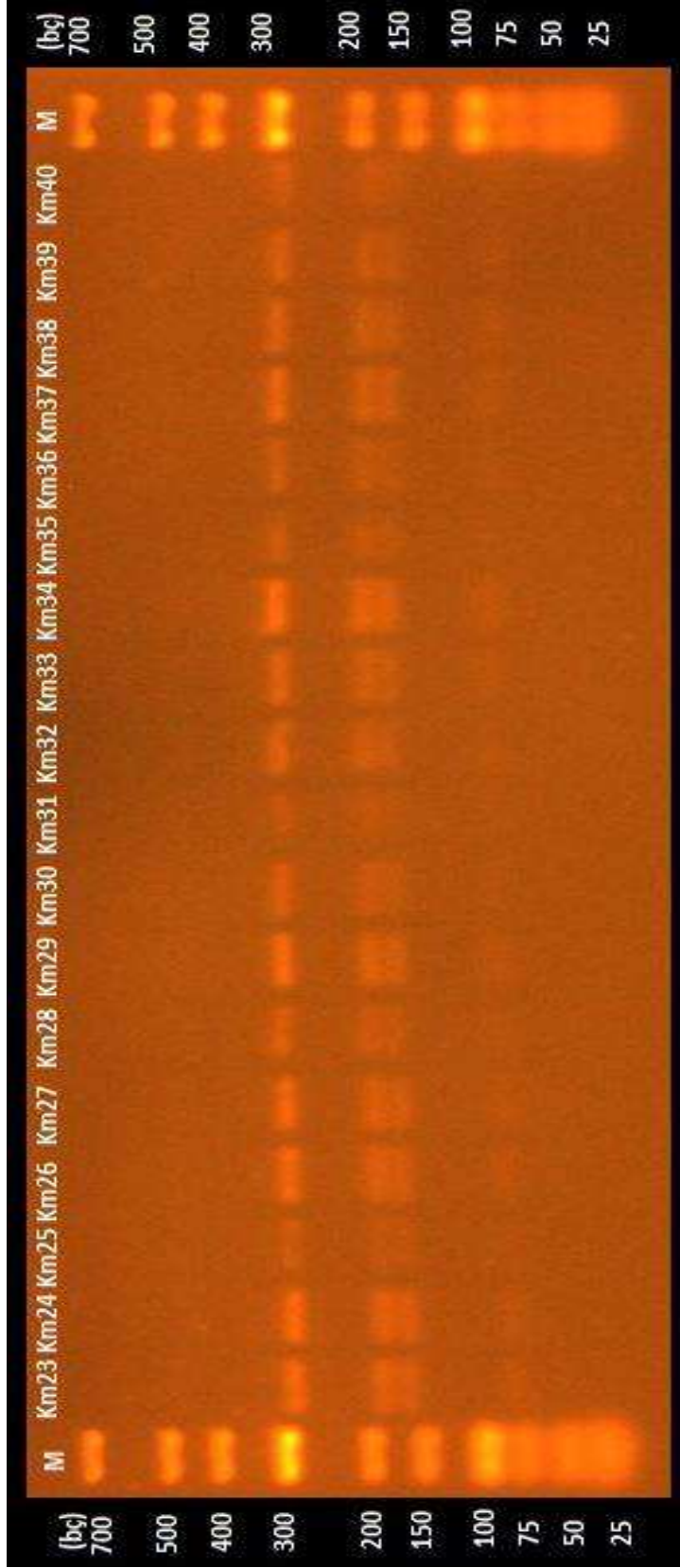
Şekil 4.9. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HaeIII* enzimi ile kesim sonuçları (Km59-Km66).



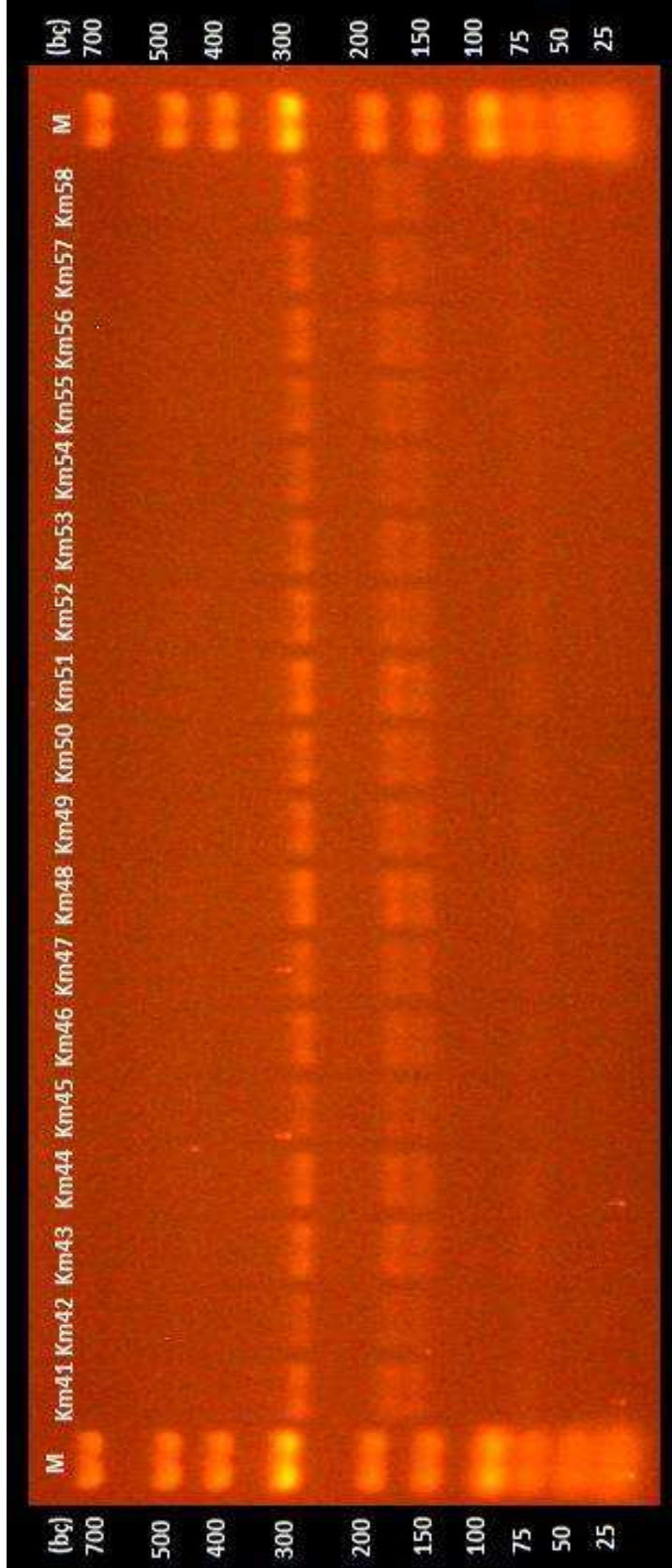
Şekil 4.10. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HhaI* (*CfoI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km1 Km4).



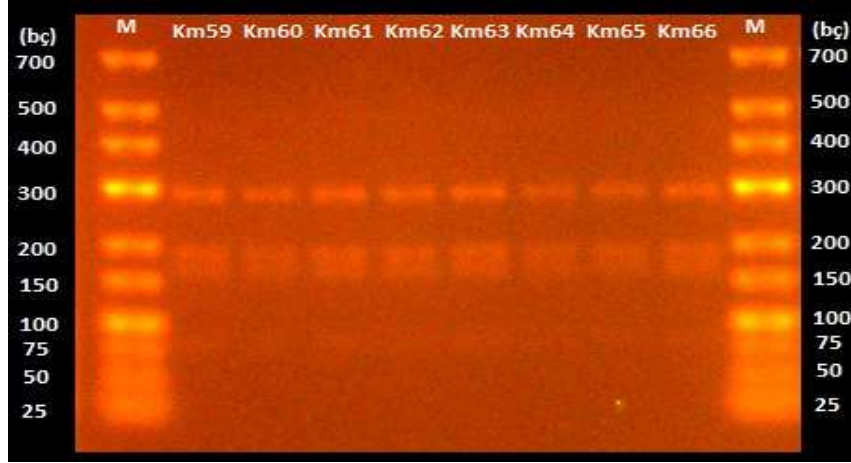
Şekil 4.11. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin *HhaI* (*CfoI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km5-Km22).



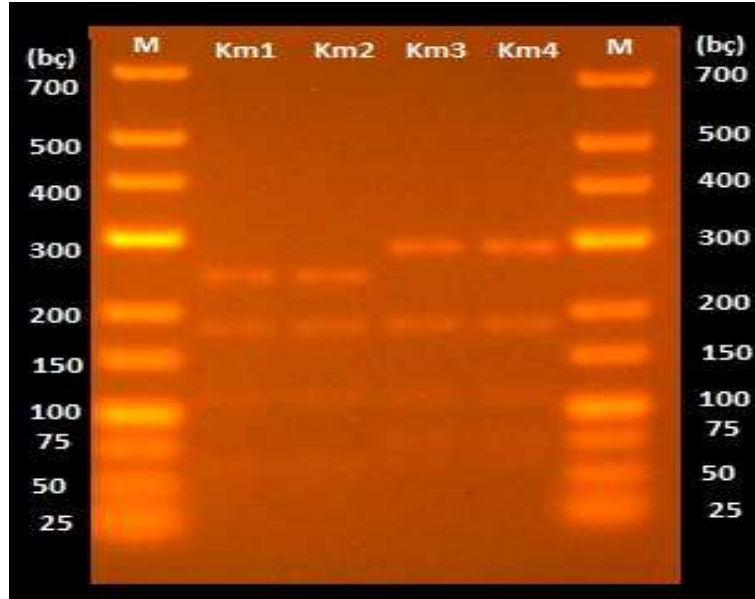
Şekil 4.12. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HhaI* (*CfoI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km23-Km40).



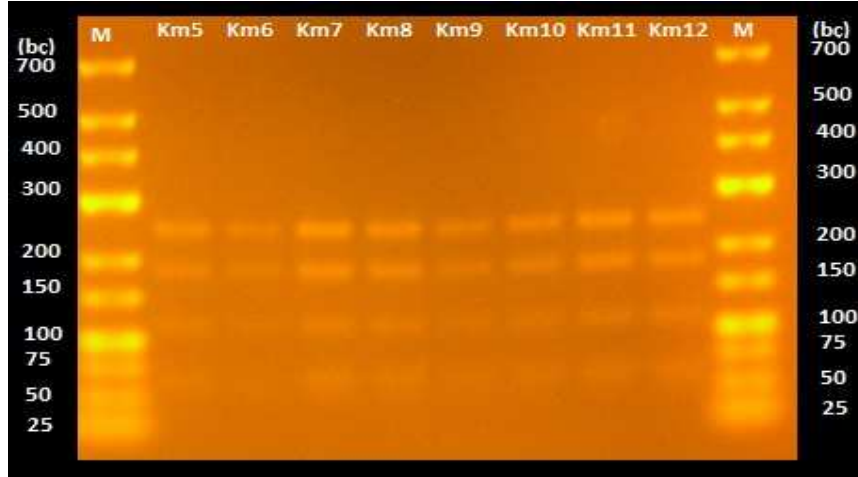
Şekil 4.13. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HhaI* (*CfoI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km41-Km58).



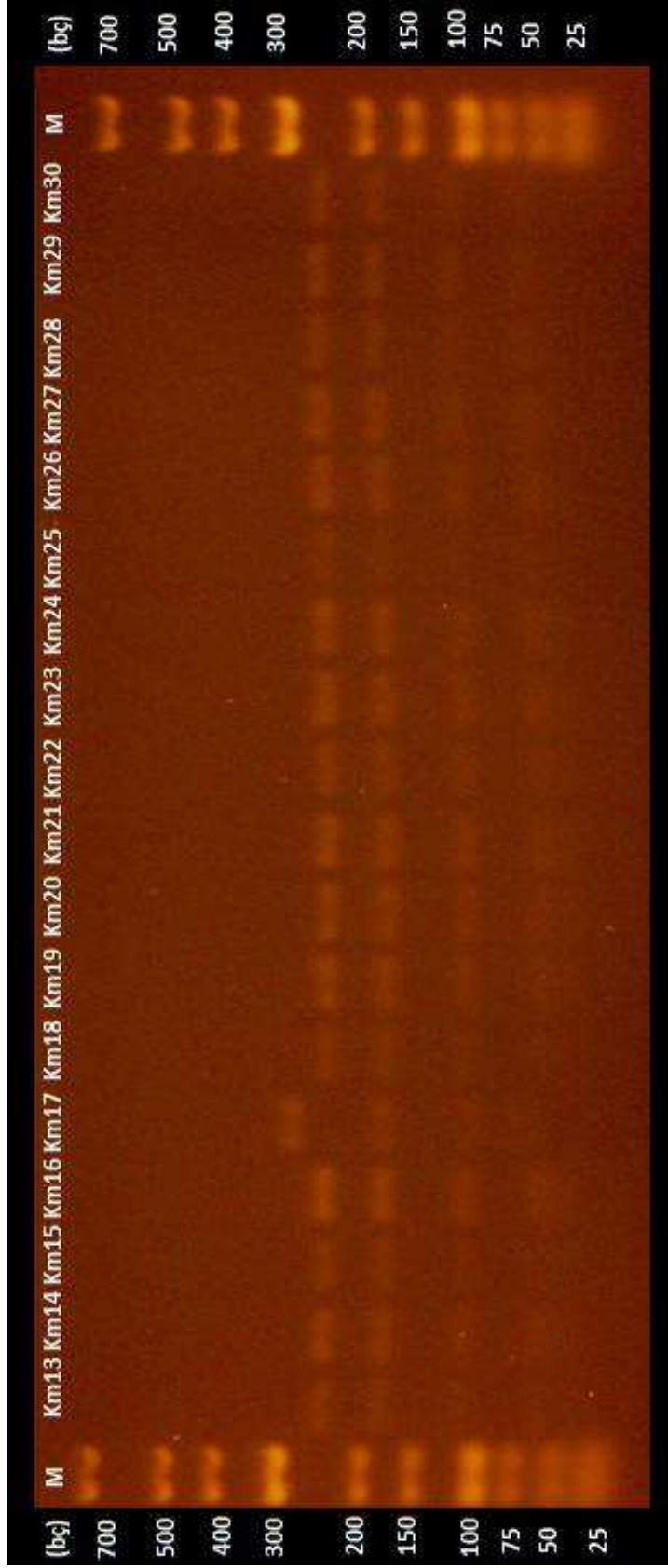
Şekil 4.14. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HhaI* (*CfoI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km59-Km66).



Şekil 4.15. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *Hinf I* enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km4).

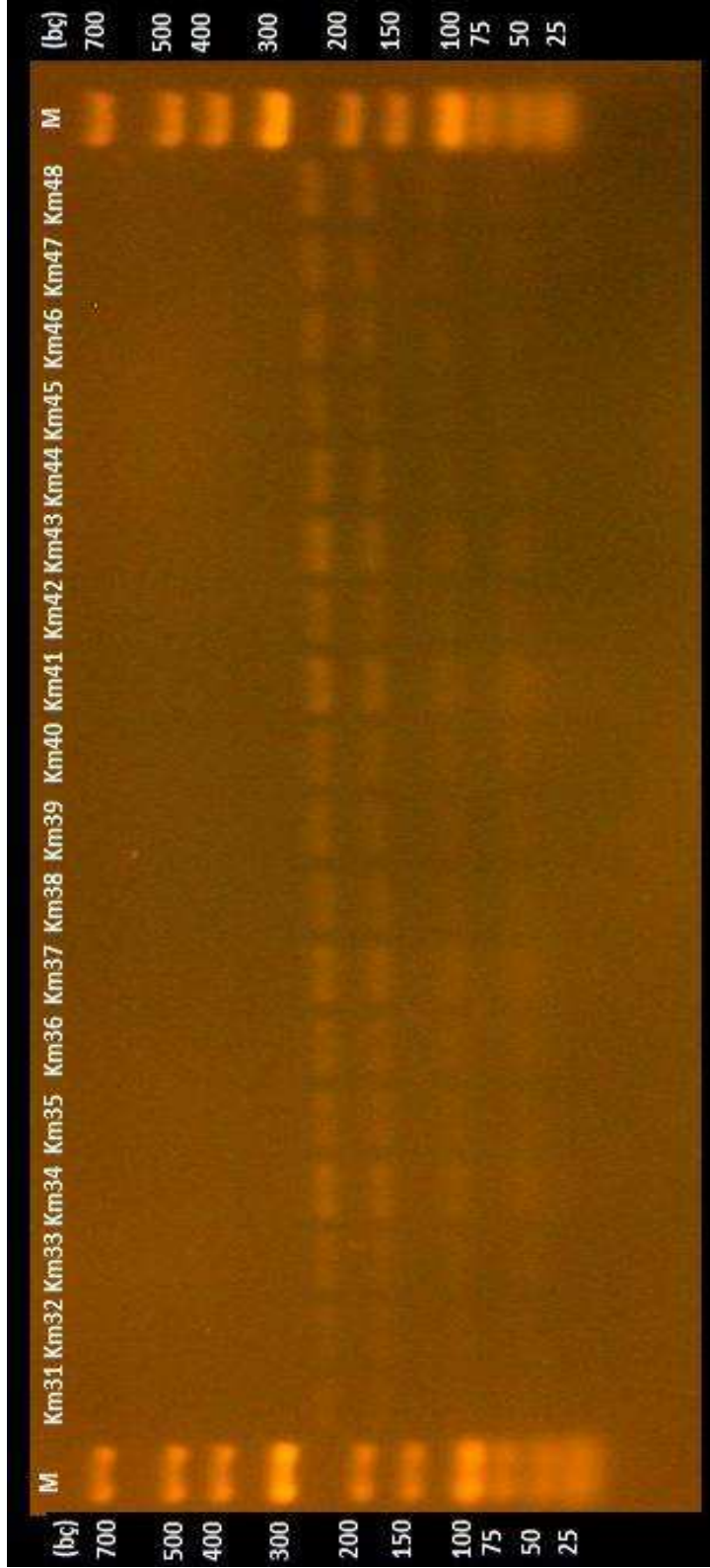


Şekil 4.16. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *Hinf I* enzimi ile kesim sonuçları (Km5-Km12).

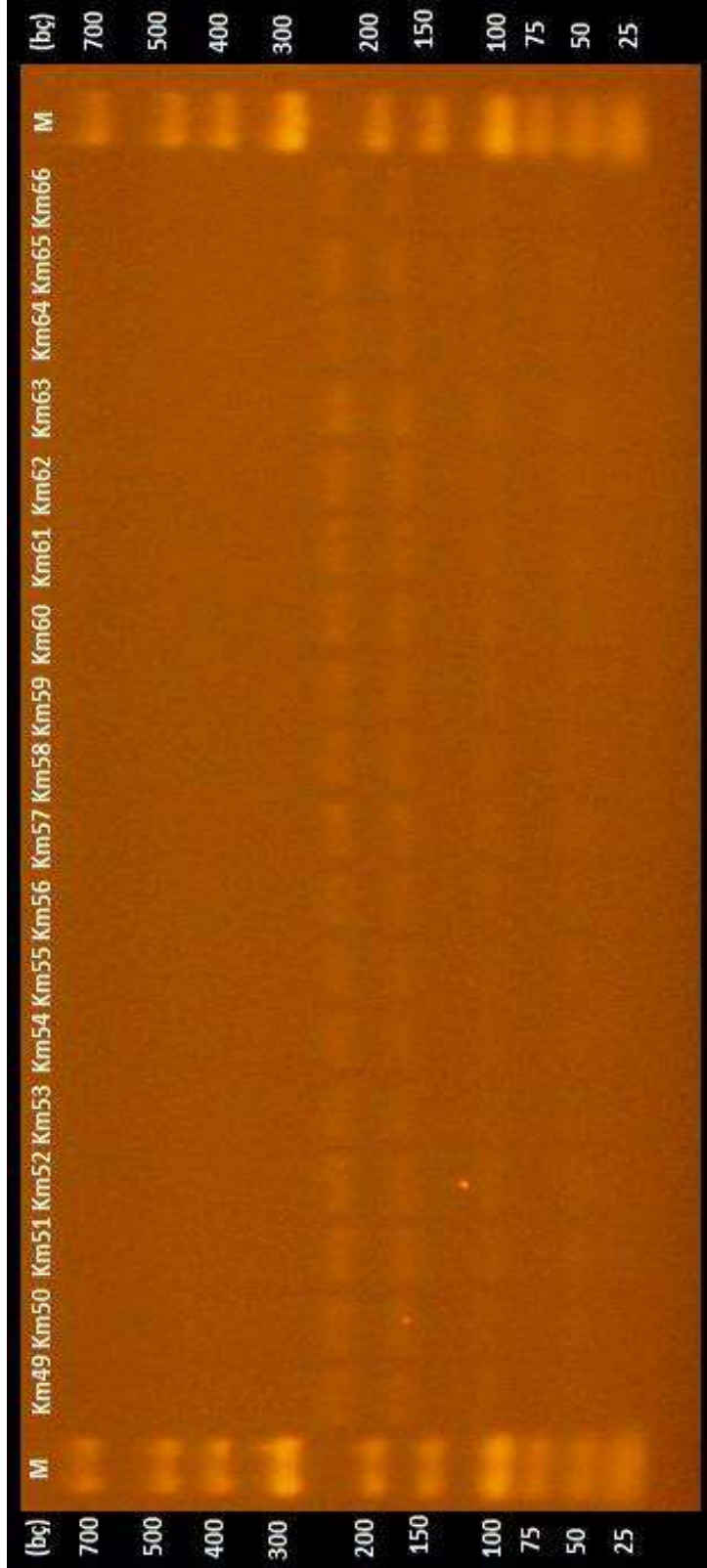


Şekil 4.17. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesinin *Hinf I* enzimi ile kesim sonuçları (Km13-Km30).

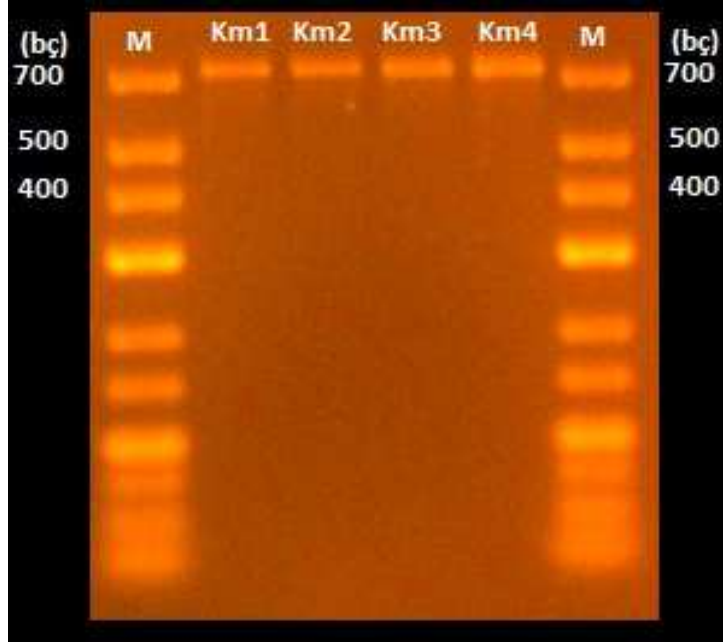




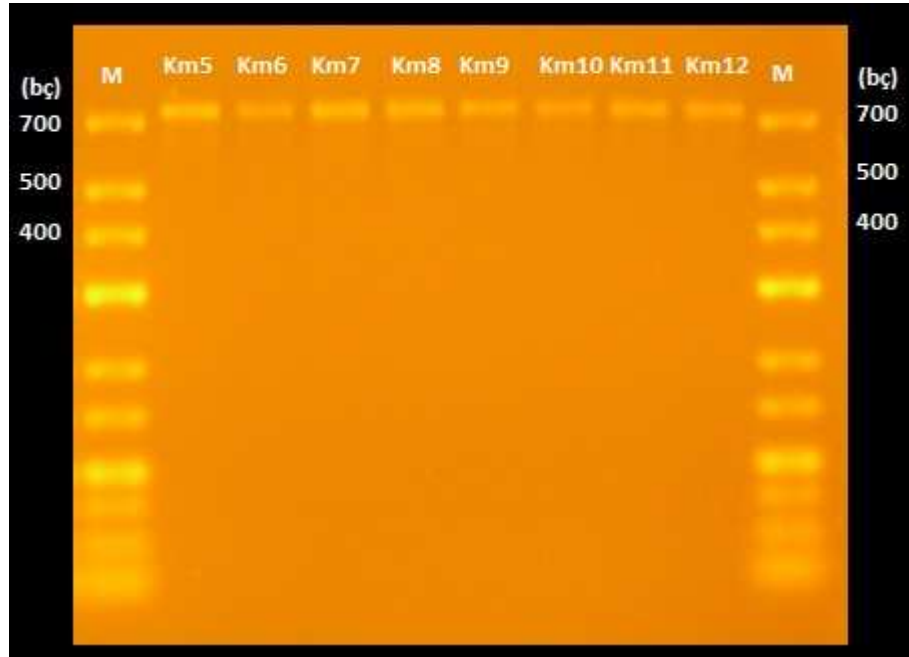
Şekil 4.18. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *Hinf I* enzimi ile kesim sonuçları (Km31-Km48).



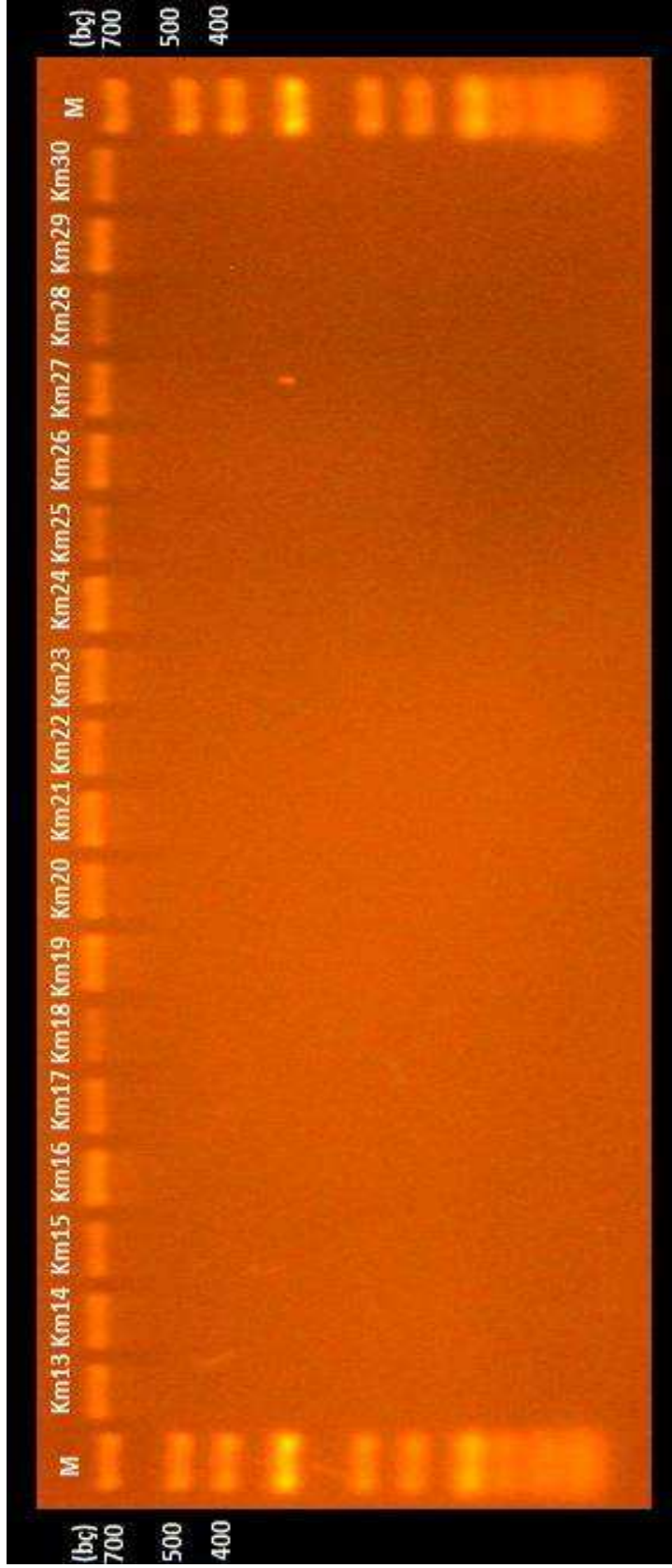
Şekil 4.19. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *Hinf I* enzimi ile kesim sonuçları (Km49-Km66).



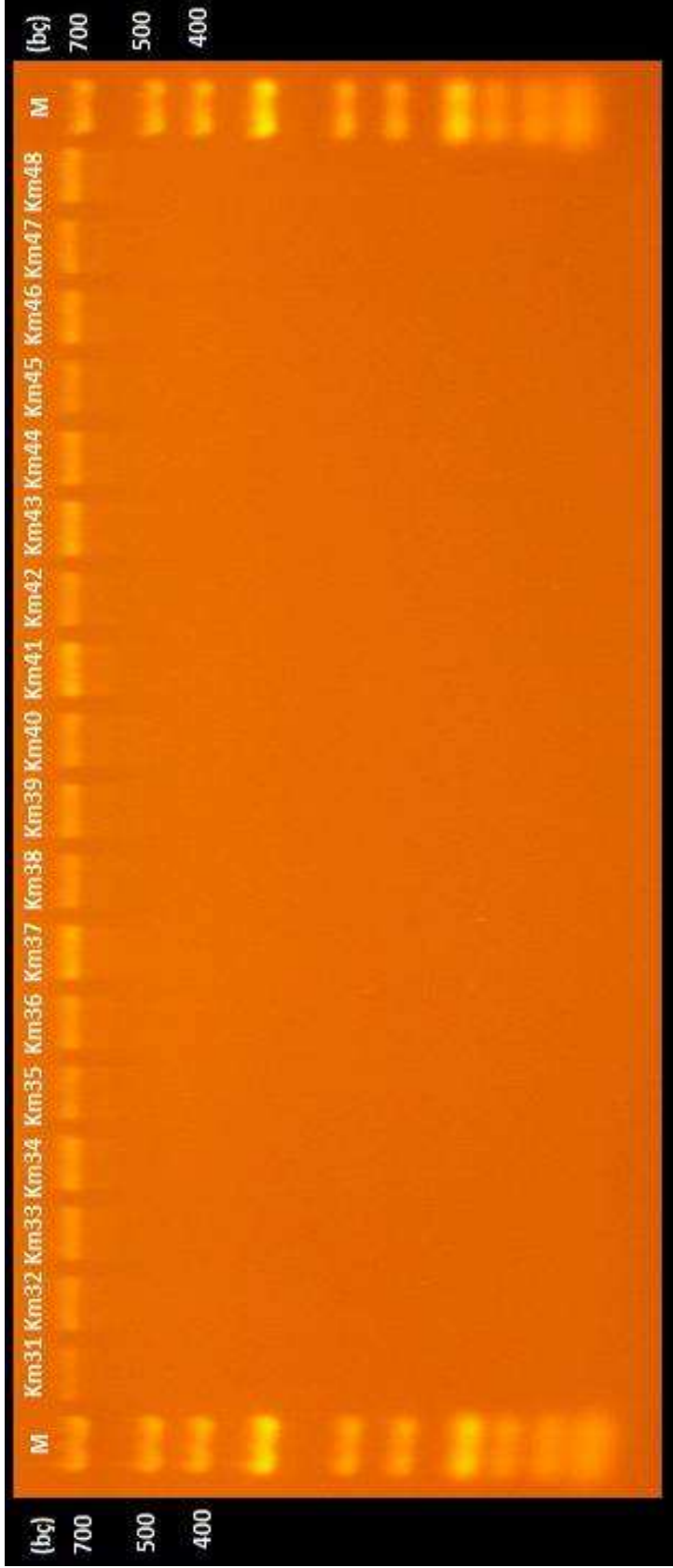
Şekil 4.20. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HpaII* (*MspI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km4).



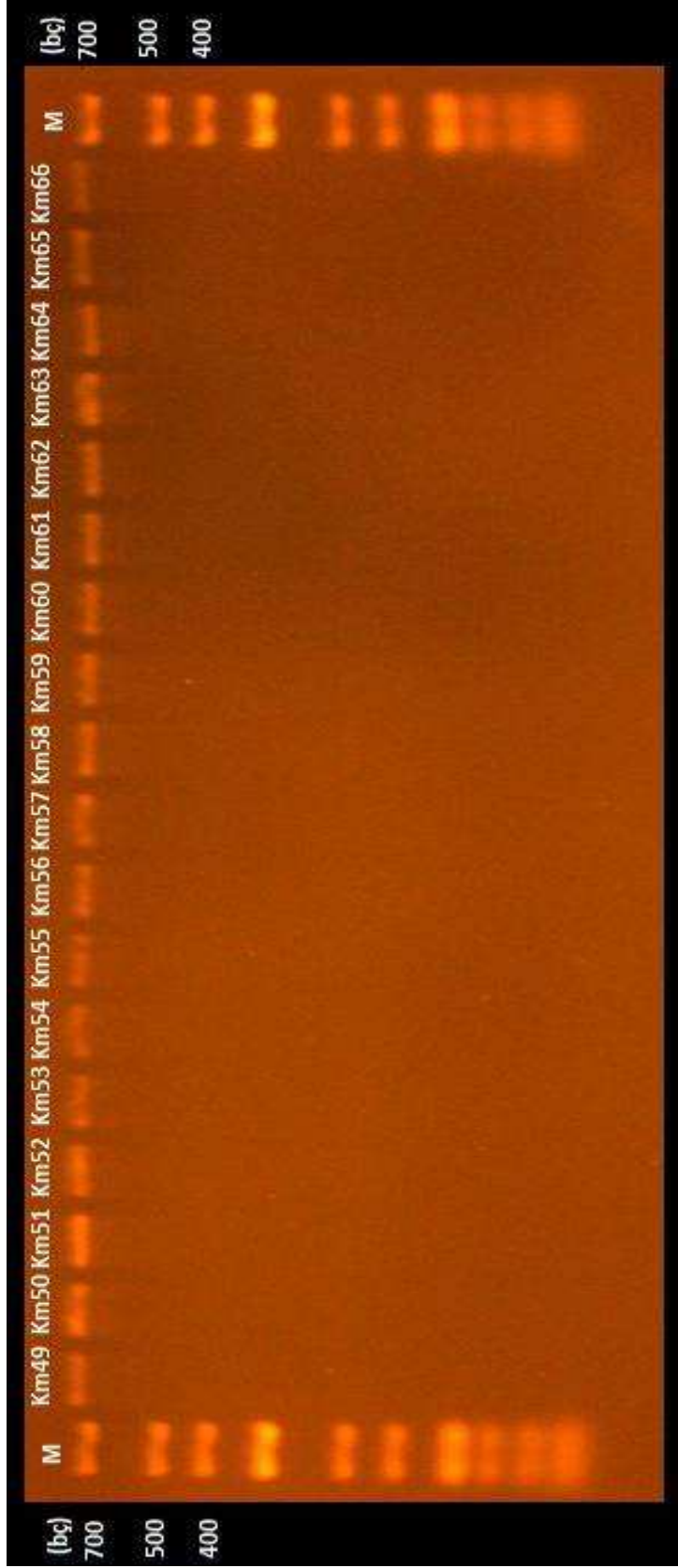
Şekil 4.21. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HpaII* (*MspI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km5-Km12).



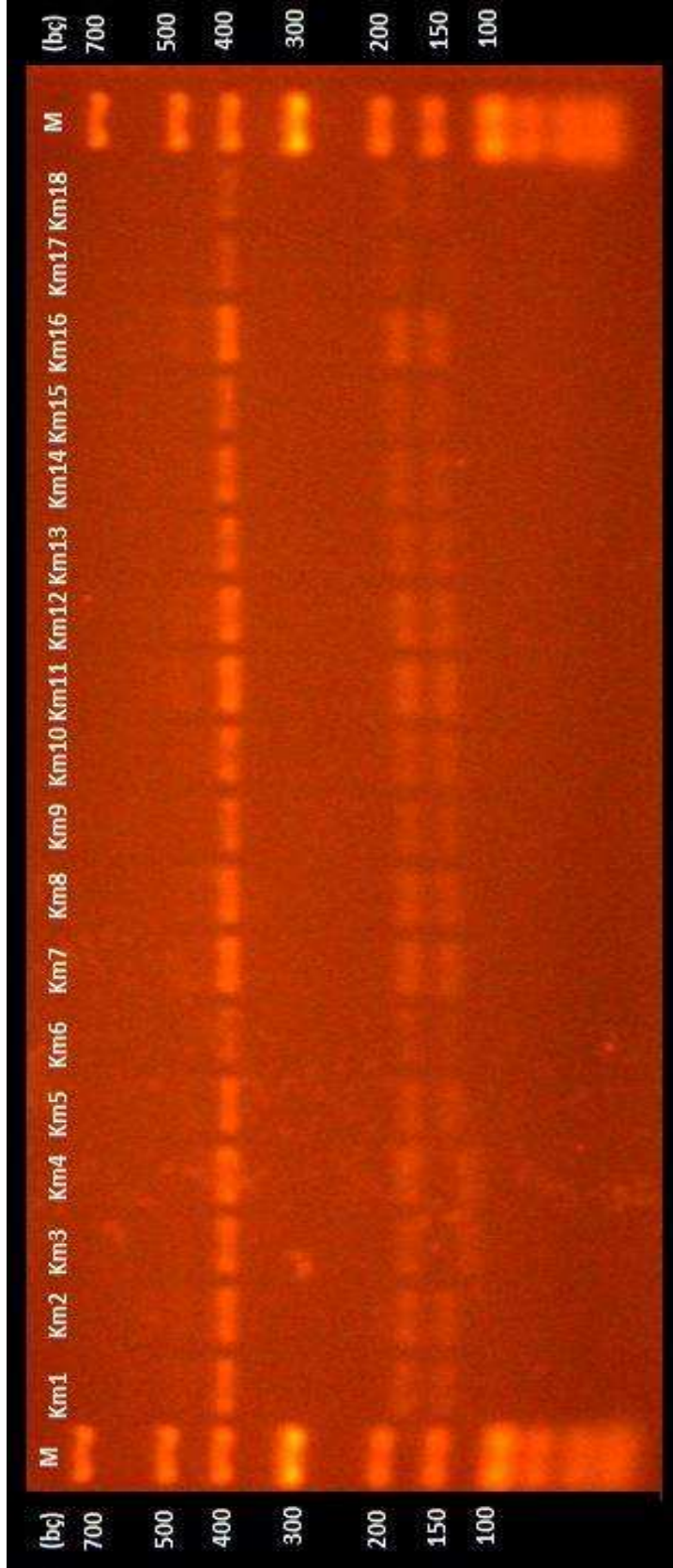
Şekil 4.22. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HpaII* (*MspI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km13-Km30).



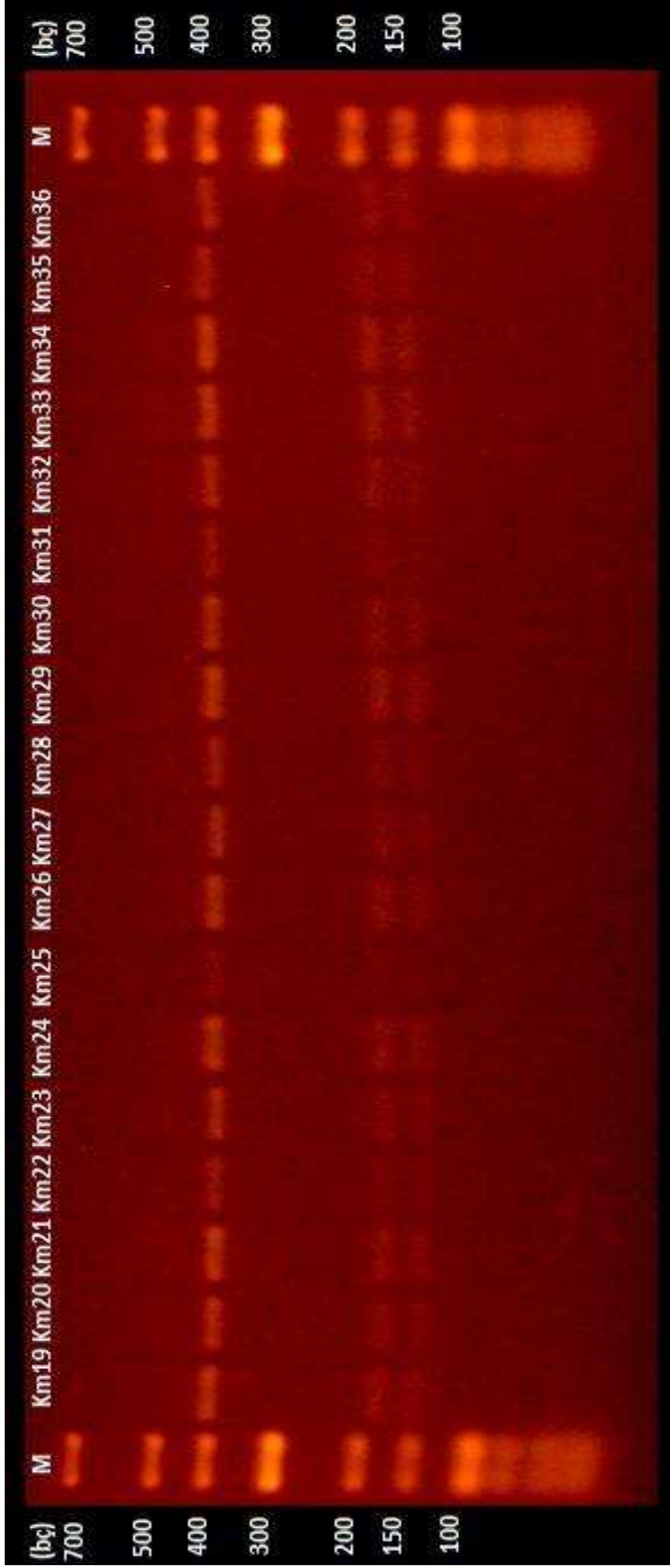
Şekil 4.23. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HpaII* (*MspI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km31-Km48).



Şekil 4.24. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *HpaII* (*MspI*) enzimi ile kesim sonuçları (Km49-Km66).

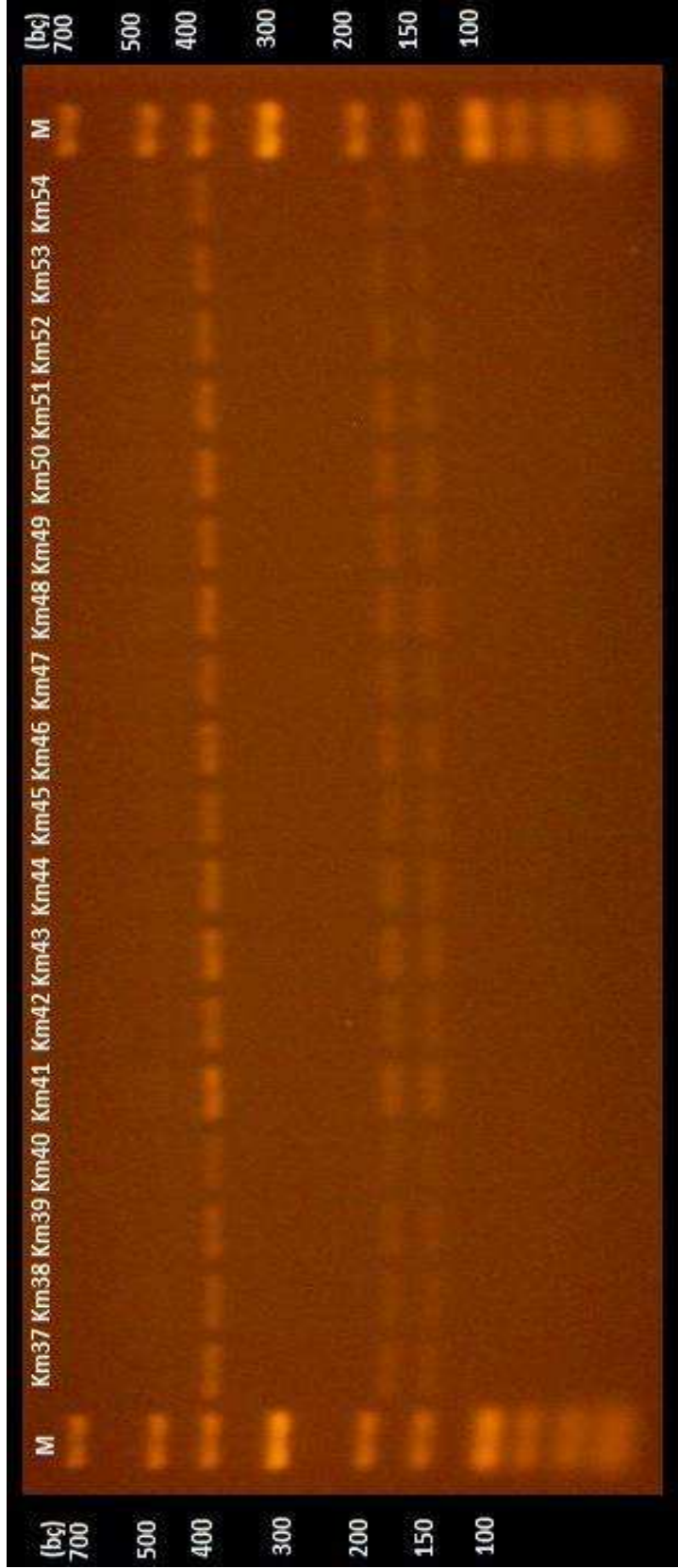


Şekil 4.25. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesinin *Alu I* enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km18).

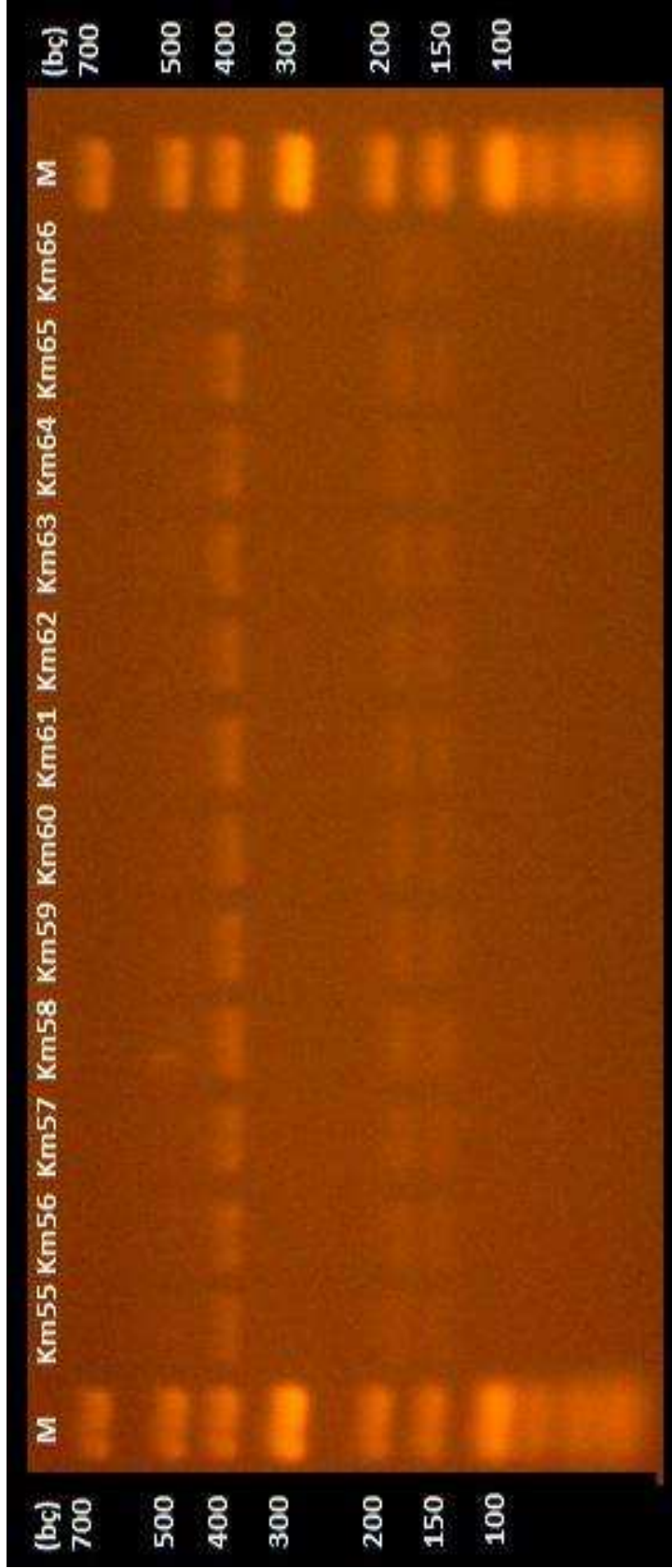


Şekil 4.26. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *Alu I* enzimi ile kesim sonuçları (Km19-Km36).

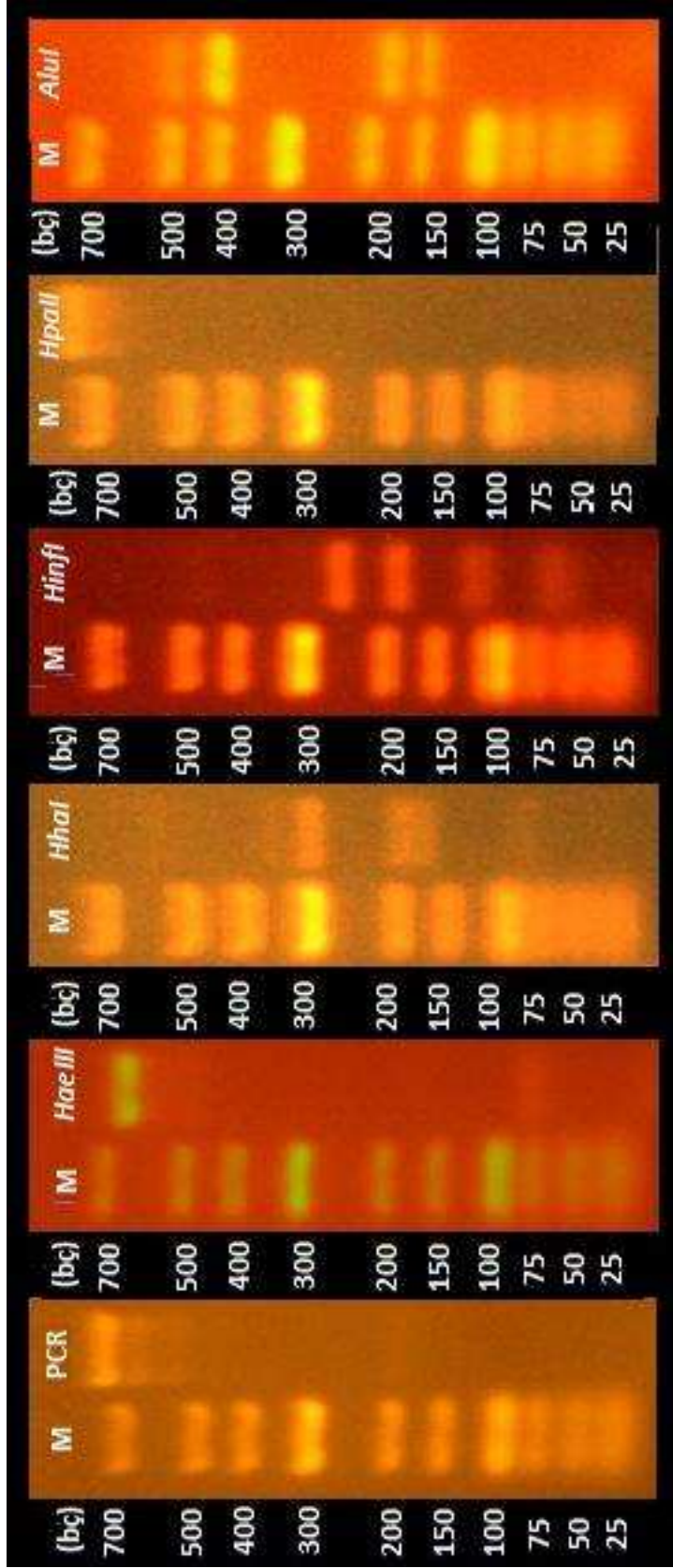




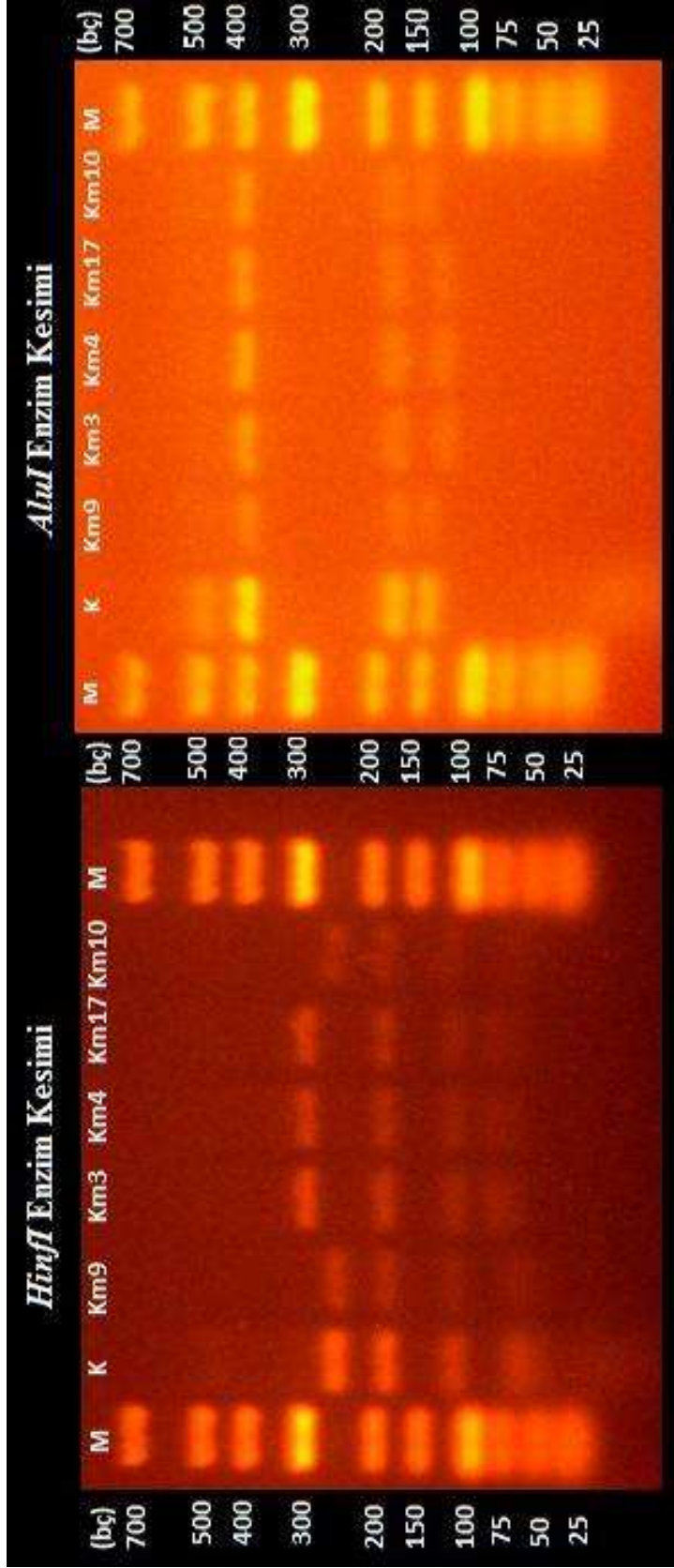
Şekil 4.27. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *Alu I* enzimi ile kesim sonuçları (Km37-Km54).



Şekil 4.28. *K. marxianus* maya suşlarının ITS bölgesi PCR ürünlerinin *Alu I* enzimi ile kesim sonuçları (Km55-Km66).



Şekil 4.29. *K. marxianus* referans maya suşunun ITS bölgesi PCR ürününün *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII* ve *AluI* restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçları.



Şekil 4.30. Farklı profilleri içeren maya suşlarının restriksiyon kesim sonuçları.

Çizelge 4.10. *K. marxianus* maya suşlarının *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII* ve *AluI* restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen bant büyüklükleri

Maya Türü	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>AluI</i>
Km1, Km2, Km5, Km6, Km7, Km8, Km9, Km10, Km11, Km12, Km13, Km14, Km15, Km16, Km18, Km19, Km20, Km21, Km22, Km23, Km24, Km25, Km26, Km27, Km28, Km29, Km30, Km31, Km32, Km33, Km34, Km35, Km36, Km37, Km38, Km39, Km40, Km41, Km42, Km43, Km44, Km45, Km46, Km47, Km48, Km49, Km50, Km51, Km52, Km53, Km54, Km55, Km56, Km57, Km58, Km59, Km60, Km61, Km62, Km63, Km64, Km65, Km66	~630/~70	~280/~180/~160/~80	~260/~180/~110/~65	~720	~400/~175/~140
Km3, Km4, Km17	~630/~70	~280/~180/~160/~80	~280/~180/~110/~75	~720	~400/~175/~120
Referans Maya Suşu (Kontrol, K)	~630/~70	~280/~180/~160/~80	~260/~180/~110/~65	~720	~500/~400/~175/~140

**4.6. Restriksiyon Bant Profilleri ve Veri Analizleri**

Her bir restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bant profillerinin her biri bir harf ile kodlanarak Çizelge 4.11’de verildi. Örneklenen süt ürünlerinden izole edilen maya türleri toplam iki farklı profil (Profil A ve Profil B) gösterirken kullanılan referans maya suşunun farklı bir profil (Profil C) oluşturduğu gözlemlendi. Bu nedenle daha sonraki analizlerde referans maya suşuda kullanıldı. Bileşik Haplotip (Composite haplotype) tablosu ve çalışılan her bir populasyonda (süt ve süt ürünü) bulunan haplotiplerin frekansı Çizelge 4.12’te verildi. En yaygın (frekansı en yüksek) olan haplotip Tip 1 (AAAA) olup tüm populasyonlarda (çiğ süt, yoğurt, ayran ve peynir) ve 63 bireyde bulundu. Frekansı en düşük (en az yaygın) haplotip Tip 2 (AABB) olup yalnızca 2 populasyonda (Çiğ süt ve ayran) ve 3 bireyde bulundu.

Çizelge 4.11. Restriksiyon kesimi sonrası oluşan bant profilleri

	<b>HaeIII</b>	<b>HhaI</b>	<b>Hinfi</b>	<b>AluI</b>
<b>PCR ürünü</b>	~ 720 bp	~ 720 bp	~ 720 bp	~ 720 bp
<b>Profil A</b>	<u>630bp</u> <u>70bp</u>	<u>280bp</u> <u>180bp</u> <u>160bp</u> <u>80bp</u>	<u>260bp</u> <u>180bp</u> <u>110bp</u> <u>65bp</u>	<u>400bp</u> <u>175bp</u> <u>140bp</u>
<b>Profil B</b>	-	-	<u>280bp</u> <u>180bp</u> <u>110bp</u> <u>75bp</u>	<u>400bp</u> <u>175bp</u> <u>120bp</u>
<b>Profil C</b>	-	-	-	<u>500bp</u> <u>400bp</u> <u>175bp</u> <u>140bp</u>

Çizelge 4.12. Bileşik Haplotipler ve *K. marxianus* maya populasyonunda bulunan haplotiplerin frekansı. (Bileşik haplotipler 4 restriksiyon enziminin kesimi sonucu oluşturulan profillere göre belirlenmiş olup restriksiyon enzimlerinin sırası *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI* ve *AluI* şeklindedir.)

Haplotip	Bileşik Haplotip	Çiğ süt	Yoğurt	Ayran	Peynir
Tip 1	AAAA	13	12	25	13
Tip 2	AABB	2	0	1	0
Tip 3 (Kontrol)	AAAC	1	0	0	0
Örnek Sayısı	-	16	12	26	13

Populasyon içi haplotip çeşitliliği ve nükleotid çeşitliliği Çizelge 4.13'te verildi. Haplotip çeşitliliği en fazla ( $0,3417 \pm 0,14031$ ) çiğ süt örneklerinin maya populasyonunda bulunurken en düşük ayran örneklerinde ( $0,0769 \pm 0,06975$ ) tespit edildi. Nükleotid çeşitliliği en fazla çiğ süt populasyonunda ( $0,017054$ ) en az ise ayran populasyonunda ( $0,005265$ ) görüldü. Yoğurt ve peynir örneklerinde haplotip ve nükleotid çeşitliliği saptanmadı. Süt ve süt ürünlerinde ortalama haplotip çeşitliliği (Average Haplotype Diversity, AHD)  $0,1046 \pm 0,00654$  olarak ve nükleotid çeşitliliği (Average Nucleotide Diversity, AND)  $0,005580 \pm 0,0000162$  olarak hesaplandı.

REAP (Restriction Enzyme Analysis Programme) programı kullanılarak her bir populasyon için hesaplanan populasyonlar arası nükleotid çeşitliliği ve genetik farklılaşma Çizelge 4.14'te verildi. Nükleotid çeşitliliği (Nucleotide diversity) en yüksek çiğ süt ve ayran populasyonları arasında ( $0,011079$ ) görüldü. Ayran ile yoğurt populasyonları ve ayran ile peynir populasyonları arasındaki nükleotid çeşitliliği aynı olup oldukça düşük ( $0,002632$ ) hesaplandı. En yüksek nükleotid farklılaşma değeri ( $0,000582$ ) çiğ süt ile yoğurt populasyonu ve çiğ süt ile peynir populasyonları arasında bulundu. En düşük farklılaşma ( $0,000080$ ) ise çiğ süt populasyonu ile ayran populasyonu arasında tespit edildi.

Bu nedenle genetik farklılaşma yalnızca yoğurt ve peynir maya populasyonları ile çiğ süt maya populasyonu arasında bulundu. Populasyonlar arası ortalama nükleotid çeşitliliği  $0,005760 \pm 0,0000034$  ve nükleotid farklılaşma değeri  $0,000181 \pm 0,0$  olarak tespit edildi.

Çizelge 4.13. Populasyon içi haplotip ve nükleotid çeşitliliğinin ortalaması ve standart hatası (Mean $\pm$ SE)

<b>Populasyon</b>	<b>Haplotip Çeşitliliği (Haplotype Diversity)</b>	<b>Nükleotid Çeşitliliği (Nucleotide Diversity)</b>
Çiğ Süt	0,3417 $\pm$ 0,14031	0,017054
Yoğurt	0,0000 $\pm$ 0,0000	0,00000
Ayran	0,0769 $\pm$ 0,06975	0,005265
Peynir	0,0000 $\pm$ 0,0000	0,00000
Ortalama	0,1046 $\pm$ 0,00657	0,005580 $\pm$ 0,0000162

Çizelge 4.14. *K. marxianus* maya populasyonları arasındaki nükleotid çeşitliliği (pair-wise nucleotide diversity) (üst diagonal) ve genetik farklılaşma (nucleotide divergence) (alt diagonal)

	<b>Çiğ Süt</b>	<b>Yoğurt</b>	<b>Ayran</b>	<b>Peynir</b>
<b>Çiğ Süt</b>		0,009108	0,011079	0,009108
<b>Yoğurt</b>	0,000582		0,002632	0,000000
<b>Ayran</b>	0,000080	0,000000		0,002632
<b>Peynir</b>	0,000582	0,000000	0,000000	
Ortalama Nükleotid Çeşitliliği			0,005760 $\pm$ 0,0000034	
Ortalama Nükleotid Farklılaşması			0,000181 $\pm$ 0,0000000	



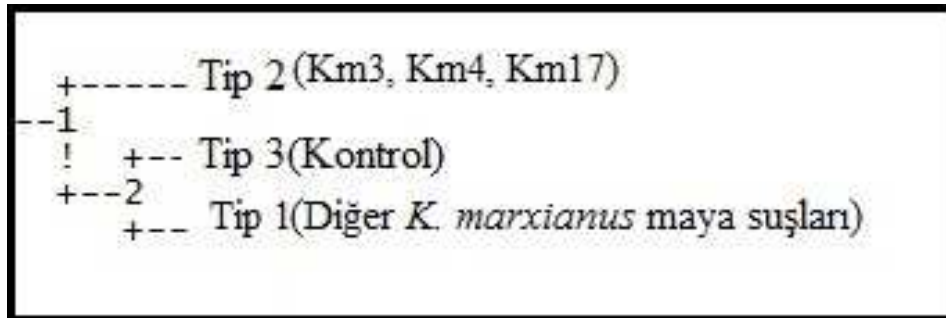
#### 4.7. Filogenetik Analiz Sonuçları

Restriksiyon kesimleri sonucu oluşturulan *K.marxianus* maya türüne ait haplotip veri dosyası PHYLIP ver.3.5c programında (Phylogenetic Inference Package, version 3.5c) DOLLO ağacı oluşturmak üzere kullanıldı. Elde edilen köksüz DOLLO ağacı Şekil 4.31’de verildi. Tip 2 (AABB) monofiletik bir ‘cluster’ oluşturan Tip 1 (AAAA) ve Tip 3’e (AAAC) göre daha ‘basal’ durumda bulundu.

Tip 2 haplotipi taşıyan bireyler ağırlıklı olarak süt ve ayran örneklerinden izole edildi. Tip 1 haplotipini taşıyan bireyler çiğ süt, yoğurt, ayran ve peynir örneklerinden izole edilirken, Tip 3 haplotipini oluşturan tek birey çalışmada referans maya suşu olarak kullanılan *K.marxianus* oldu. Elde edilen sonuçlara göre çiğ sütteki *K.marxianus* maya popülasyonlarının diğer örneklerle dağılımında en önemli kaynak oluşturduğu belirlendi.

Süt ve süt ürünlerinden izole edilen *K. marxianus* haplotipleri göz önüne alınarak Grup 1 (Çiğ süt maya popülasyonunun bireyleri), Grup 2 (yoğurt ve ayran maya popülasyonlarının bireyleri) ve Grup 3 (peynir popülasyonunun bireyleri) olmak üzere 3 grup oluşturuldu ve AMOVA (Analysis of Molecular Variance) analizleri yapıldı (Weir ve Cockerham, 1984; Excoffier ve ark., 1992; Weir, 1996). Referans maya suşu farklı profil (Tip 3) oluşturduğu için süt örnekleri içinde gruplandırıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15’te verildi.

Yapılan analizlerde genetik varyansın % 97’si popülasyon içinde ve istatistiksel olarak önemli ( $F_{ST}$ : 0,02435, significant,  $p<0.01$ ) bulundu. Gruplar arası arasında genetik varyansın ( $F_{CT}$ = %7;  $p<0.01$ ) yine istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu. Bununla birlikte popülasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli herhangi bir farklılaşma ( $F_{SC}$ = negatif değer;  $p>0.5$ ) gözlenmedi.



Şekil 4.31. *K.marxianus* haplotiplerinin köksüz Dollo parsimoni ağacı.

Çizelge 4.15. *K. marxianus* maya popülasyonlarının AMOVA analizi (\*1000 permütasyon sonrası  $P < 0.01$ ;  $V_a$ ,  $V_b$ , ve  $V_c$  birleşik kovaryans komponentleri (Associate Covariance Components))

Varyans Kaynağı	d.f	Kareleri Toplamı	Varyans Komponentleri	Yüzdelik Varyans	Fiksasyon İndeksleri
Gruplar arası	2	0.899	0.01901 $V_a$	6.79	$F_{CT}$ : 0.06791
Popülasyonlar arası	1	0.073	-0.01219 $V_b$	-4.36	$F_{SC}$ : -0.04674
Popülasyonlar içi	63	17.207	0.27312 $V_c$	97.56	$F_{ST}$ : 0.02435

**4.8. *K. marxianus* Maya Suşlarının Hücre Dışı Proteaz, Lipaz ve Üreaz Enzim Aktivitelerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi**

*K. marxianus* maya suşlarının ve standart maya suşunun hücre dışı proteolitik aktivitelerinin kalitatif olarak belirlenmesi için substrat olarak skim milk kullanıldı. Maya kolonileri etrafında oluşan transparent bölgenin çapı günlük ölçülerek kaydedildi. 7 gün sonunda zon oluşturan maya suşları yüksek proteolitik aktiviteye (++) ve daha sonraki günlerde zon oluşumu gözlenen maya suşları zayıf proteolitik aktiviteye (+) sahip maya suşları olarak değerlendirildi. 15 gün sonunda zon oluşumu göstermeyen maya suşlarının ise proteolitik aktiviteye sahip olmadığı (-) belirlenerek elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 16'da verildi. *K. marxianus* maya suşlarının % 3'ünde yüksek proteolitik aktivite, % 32'sinde düşük proteolitik aktivite gözlenirken % 65'inde aktivite gözlenmedi.

Maya suşlarının lipaz aktivitesini belirleyebilmek için substrat olarak Tween 40 (Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate) kullanıldı elde edilen sonuçlar Çizelge 16'da verildi. İzole edilen tüm *K. marxianus* maya suşlarında lipaz aktivitesine rastlanmadı.

Maya suşlarının üreaz aktivitesini belirleyebilmek için substrat olarak üre kullanıldı ve sonuçlar Çizelge 16'da verildi. Üreme ortamına ilave edilen pH indikatörü (fenol red) sayesinde, üreme ortamının orijinal sarı-turuncu rengini koyu pembe-kırmızıya dönüştüren maya suşlarında üreaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirildi. Renk dönüşümü bulunmayan besi ortamlarındaki maya suşlarında üreaz aktivitesi negatif sonuç olarak değerlendirildi. *K. marxianus* maya suşlarının % 6'sında üreaz aktivitesi gözlenirken, % 94'ünde üreaz aktivitesi gözlenmedi.

Referans maya suşunda proteaz ve lipaz aktivitesi gözlenmezken üreaz aktivitesi tespit edildi.

Çizelge 4. 16. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının ve referans maya suşunun proteaz, lipaz ve üreaz aktiviteleri

<b><i>K. marxianus</i> Maya Suşu</b>	<b>Proteaz Aktivitesi (% oranı)</b>	<b>Lipaz Aktivitesi (% oranı)</b>	<b>Üreaz Aktivitesi (% oranı)</b>
Km23, Km24	++ (% 3)	-	-
Km1, Km4, Km9, Km17, Km20, Km25, Km26, Km27, Km29, Km32, Km36, Km37, Km40, Km42, Km43, Km44, Km46, Km47, Km56, Km58, Km59	+ (% 32)	-	-
Km12, Km28, Km31, Km48, Kontrol	-	-	+ (% 6)
Km2, Km3, Km5, Km6, Km7, Km8, Km10, Km11, Km13, Km14, Km15, Km16, Km18, Km19, Km21, Km22, Km30, Km33, Km34, Km35, Km38, Km39, Km41, Km45, Km49, Km50, Km51, Km52, Km53, Km54, Km55, Km57, Km60, Km61, Km62, Km63, Km64, Km65, Km66	- (% 65)	-	- (% 94)

#### **4.9. Maya Türlerinin Repres ve Derepres Şartlarda İvertaz ve $\beta$ -galaktozidaz Enzim Aktiviteleri**

*K. marxianus* maya suşlarının invertaz ve  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitelerini belirleyebilmek için maya hücreleri YPD içeren sıvı kültürlerde bir gece üretilerek repres şartlar için %2 glikoz ve derepres şartlar için %2 gliserol içeren üreme ortamlarına aktarıldı. Logaritmik aşamaya kadar üretilen kültürlerden invertaz ve  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi belirlendi. İvertaz enzim aktivitesi açığa çıkan  $\mu$ M glikoz/dakika/100mg kuru ağırlık olarak hesaplandı. Mayaların kuru ağırlığı ( $OD_{600}=1$ ) 0.5 mg olarak alındı.  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri parçalanmış mM ONPG/dakika/mg protein olarak verildi. Hücre süspansiyonlarındaki protein konsantrasyonları Lowry metoduyla belirlendi (Lowry ve ark., 1951).

Repres ve derepres şartlar için elde edilen invertaz enzim aktiviteleri Çizelge 4.17, Çizelge 4.18 ve Çizelge 4.19’da verildi. Genel olarak tüm izole edilen *K. marxianus* maya suşlarında invertaz enzim aktivitesinin yüksek olduğu gözlenirken 9 maya suşunda (Km17, Km23, Km24, Km25, Km26, Km29, Km36, Km37 ve Km42) repres ve derepres şartlarda belirlenen enzim aktivitelerinin (R: 16,9 U–48,7 U; DR: 44,7 U–75,6 U) diğer maya suşlarından daha düşük oranda olduğu bulundu. Km13, Km15, Km22, Km30, Km54, Km57, Km61, Km62 ve Km66 maya suşlarında repres ve derepres şartlarda çok yüksek invertaz aktivitesi (1000 U üzerinde) gözlenirken glikoz baskılamasının oldukça düşük olduğu belirlendi. Km2, Km3, Km4, Km6, Km7, Km8, Km13, Km15, Km17, Km18, Km21, Km22, Km23, Km28, Km29, Km31, Km32, Km36,, Km37, Km39, Km44, Km47, Km48, Km52, Km53, Km54, Km57, Km58, Km61, Km62, Km63, Km64, Km65 ve kontrol maya suşlarında 2 ile 10 kat arasında glikoz baskılaması gözlenirken Km24, Km25, Km26, Km30, Km42 ve Km66 maya suşlarında glikoz baskılamasının iki kattan daha az olduğu tespit edildi. Km1, Km5, Km9, Km10, Km11, Km12, Km14, Km16, Km19, Km20, Km38, Km45, Km46, Km49, Km50, Km51, Km55 ve Km56 maya suşlarında glikoz baskılamasının 20 kattan daha fazla olduğu gözlemlendi. Km27, Km33, Km34, Km35, Km40, Km41, Km43, Km59 ve Km60 maya suşlarında ise invertaz enzim aktivitesi bulunmasına rağmen glikoz baskılamasının olmadığı görüldü.

Maya suşları arasında invertaz enziminin dolayısıyla ilgili geninin glikoz tarafından baskılanması değişken olmakla beraber glikozun tek başına baskılamayı gerçekleştiremediği tespit edildi.

Çizelge 4. 17. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının (Km1-Km30) repres ve derepres şartlarda invertaz enzim aktiviteleri

\*Enzim Aktivitesi: Açığa çıkan  $\mu\text{M}$  glikoz/dakika/100mg kuru ağırlık olarak verilmiştir.

\*\* Tüm *K. marxianus* maya suşlarının invertaz enzim aktiviteleri için Standart hatası (SD)

%12'nin altında olduğu için çizelgede ayrıca belirtilmemiştir.

<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Enzim Aktivitesi* ( $\pm\text{SD}^{**}$ )	
	Repres (%2 Glikoz)	Derepres (%2 Gliserol)
Km1	78,6	4126,1
Km2	512,6	3897,5
Km3	625,3	1425,3
Km4	512,8	1785,4
Km5	227,3	5450,2
Km6	449,1	2560,6
Km7	468,8	3556,2
Km8	627,1	2495,6
Km9	81,4	2456,6
Km10	61,6	2517,0
Km11	20,2	3028,6
Km12	67,5	2296,6
Km13	1054,9	2461,6
Km14	88,9	5007,6
Km15	1447,4	3728,9
Km16	34,8	2598,2
Km17	18,6	50,4
Km18	972,3	3909,8
Km19	50,1	2879,1
Km20	65,1	3025,1
Km21	675,1	3525,8
Km22	1027,1	2537,3
Km23	41,1	75,6
Km24	30,6	47,5
Km25	48,7	75,3
Km26	44,4	68,1
Km27	3598,5	2685,9
Km28	734,3	1362,5
Km29	29,6	63,3
Km30	2290,8	3148,8

Çizelge 4. 18. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının (Km31-Km60) repres ve derepres şartlarda invertaz enzim aktiviteleri

\*Enzim Aktivitesi: Açığa çıkan  $\mu\text{M}$  glikoz/dakika/100mg kuru ağırlık olarak verilmiştir.

\*\* Tüm *K. marxianus* maya suşlarının invertaz enzim aktiviteleri için Standart hatası (SD)

%12'nin altında olduğu için çizelgede ayrıca belirtilmemiştir.

<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Enzim Aktivitesi* ( $\pm\text{SD}^{**}$ )	
	Repres (%2 Glikoz)	Derepres (%2 Gliserol)
Km31	196,9	649,9
Km32	202,46	1163,8
Km33	335,8	43,4
Km34	196,1	56,9
Km35	281,8	47,4
Km36	16,9	65,9
Km37	36,8	50,2
Km38	168,3	4971,4
Km39	479,1	2659,2
Km40	134,2	54,4
Km41	268,6	42,2
Km42	32,8	44,7
Km43	225,2	57,8
Km44	778,1	3877,2
Km45	120,2	4071,8
Km46	86,9	5539,9
Km47	394,3	2786,7
Km48	459,3	4262,6
Km49	154,3	5195,5
Km50	134,5	6082,6
Km51	161,3	4801,1
Km52	719,1	4032,0
Km53	574,6	2460,7
Km54	1221,5	4770,3
Km55	240,8	4102,8
Km56	192,2	4336,9
Km57	1590,4	3749,9
Km58	583,2	4489,8
Km59	3927,2	3957,5
Km60	4041,9	4002,9

Çizelge 4. 19. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının (Km61-Km66) ve referans maya suşunun repres ve derepres şartlarda invertaz enzim aktiviteleri

\*Enzim Aktivitesi: Açığa çıkan  $\mu\text{M}$  glikoz/dakika/100mg kuru ağırlık olarak verilmiştir.

\*\* Tüm *K. marxianus* maya suşlarının invertaz enzim aktiviteleri için Standart hatası (SD) %12'nin altında olduğu için çizelgede ayrıca belirtilmemiştir.

<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Enzim Aktivitesi*( $\pm$ SD**)	
	Repres (%2 Glikoz)	Derepres (%2 Gliserol)
Km61	4098,3	8088,0
Km62	4454,1	8121,7
Km63	806,2	3807,3
Km64	403,8	4075,9
Km65	860,1	4303,0
Km66	3980,9	4362,8
Kontrol	518,0	4137,2

İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının ve referans maya suşunun repres ve derepres şartlarda belirlenen  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri Çizelge 4.20, Çizelge 4.21 ve Çizelge 4.22'de verildi. *K. marxianus* maya suşlarının repres ve derepres şartlarda  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri, invertaz enzim aktivitelerine göre daha düşük olup Km1, Km3, Km4, Km23, Km33, Km35 ve Km63 maya suşlarında glikoz baskılaması görülmedi. Diğer maya suşlarında 2 ile 6 kat arasında glikoz baskılaması gözlenirken referans maya suşunda yaklaşık 40 kat glikoz baskılaması tespit edildi. Km39, Km44, Km46, Km48 ve Km65 maya suşlarında derepres şartlarda 1000 U üzeri enzim aktivitesine rastlandı.



Çizelge 4.20. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının (Km1-Km30) repres ve derepres şartlarda  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri

\*Enzim Aktivitesi: Parçalanmış mM ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.

\*\* Tüm *K. marxianus* maya suşlarının invertaz enzim aktiviteleri için Standart hatası (SD) %6,5'in altında olduğu için çizelgede ayrıca belirtilmemiştir.

<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Enzim Aktivitesi* (SD**)	
	Repres (%2 Glikoz)	Derepres (%2 Gliserol)
Km1	60,4	67,9
Km2	92,8	583,8
Km3	51,7	29,8
Km4	176,2	97,4
Km5	25,7	58,0
Km6	39,5	42,1
Km7	18,9	262,6
Km8	120,4	842,4
Km9	120,4	544,8
Km10	104,7	688,2
Km11	97,5	536,2
Km12	137,3	386,4
Km13	61,3	265,2
Km14	71,0	574,2
Km15	131,6	170,8
Km16	47,4	368,0
Km17	18,0	69,0
Km18	152,4	384,8
Km19	75,0	154,7
Km20	69,2	438,1
Km21	38,9	186,0
Km22	102,5	42,2
Km23	123,3	121,9
Km24	53,4	168,3
Km25	104,0	244,2
Km26	100,9	146,2
Km27	125,8	349,8
Km28	11,2	104,6
Km29	35,8	93,4
Km30	51,9	102,2

Çizelge 4.21. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının (Km31-Km60) repres ve derepres şartlarda  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri

\*Enzim Aktivitesi: Parçalanmış mM ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.

\*\* Tüm *K. marxianus* maya suşlarının invertaz enzim aktiviteleri için Standart hatası (SD) %6,5'in altında olduğu için çizelgede ayrıca belirtilmemiştir.

<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Enzim Aktivitesi* (SD**)	
	Repres (%2 Glikoz)	Derepres (%2 Gliserol)
Km31	11,3	36,5
Km32	21,3	75,8
Km33	57,4	61,5
Km34	19,4	338,4
Km35	131,5	62,8
Km36	71,4	197,4
Km37	84,1	199,8
Km38	99,6	184,5
Km39	199,0	1096,7
Km40	148,3	343,7
Km41	82,2	334,9
Km42	109,5	240,9
Km43	22,1	243,1
Km44	99,8	1033,1
Km45	110,1	599,1
Km46	56,6	1173,6
Km47	60,7	805,5
Km48	35,7	1237,0
Km49	62,5	898,7
Km50	44,5	194,3
Km51	78,8	904,4
Km52	49,2	434,4
Km53	119,6	180,3
Km54	57,4	561,3
Km55	115,5	992,1
Km56	40,1	970,9
Km57	70,3	764,2
Km58	79,5	747,2
Km59	94,2	505,2
Km60	100,6	991,2

Çizelge 4.22. İzole edilen *K. marxianus* maya suşlarının (Km61-Km66) ve referans maya suşunun repres ve derepres şartlarda  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri

\*Enzim Aktivitesi: Parçalanmış mM ONPG/dakika/mg protein olarak verilmiştir.

\*\* Tüm *K. marxianus* maya suşlarının invertaz enzim aktiviteleri için Standart hatası (SD) %6,5'in altında olduğu için çizelgede ayrıca belirtilmemiştir.

<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	Enzim Aktivitesi*( $\pm$ SD**)	
	Repres (%2 Glikoz)	Derepres (%2 Gliserol)
Km61	95,5	650,9
Km62	249,3	688,0
Km63	723,5	466,8
Km64	68,2	900,0
Km65	114,3	1223,9
Km66	95,9	430,7
Kontrol	4,0	167,3

#### 4.10. Maya Türlerinin Repres ve Derepres Şartlarda İvertaz ve İnülinaz Enzim Aktiviteleri

Elde edilen invertaz enzim aktivitesi sonuçlarına göre yüksek invertaz aktivitesine sahip ve farklı oranlarda glikoz baskılamasına uğrayan Km5 ve Km38 (25-30 kat glikoz baskılaması), Km44, Km63 ve Km65 (3-5 kat glikoz baskılaması) maya suşları ile referans maya suşu invertaz ve inülinaz enzim aktivitelerini belirlemek için seçildi. Seçilen *K. marxianus* maya suşlarının zengin üreme ortamında repres (% 2 glikoz) ve derepres (% 2 gliserol) şartlarda enzim aktiviteleri belirlenerek Çizelge 4.23'te verildi. İnülinaz aktivitesini belirlemek için 55 °C'de 15 dakika ve 30 dakika inkübasyon sonrası elde edilen değerler Çizelge 4.23'te verildi. Yüksek glikoz konsantrasyonunun invertaz enzim aktivitesine etkisini belirlemek için %4 glikoz konsantrasyonunda invertaz aktivitesi ve inülinaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.23'te verildi.

Çizelge 4.23. *K. marxianus* maya suşlarının repres (R-1: %2 glikoz ve R-2: %4 glikoz) ve derepres (DR: %2 gliserol) şartlarda invertaz ve inülinaz enzim aktiviteleri

\*İnvertaz ve İnülinaz Enzim Aktiviteleri açığa çıkan  $\mu\text{M}$  glikoz/dakika/100mg kuru ağırlık olarak verilmiştir.

\*\* Tüm *K. marxianus* maya suşlarının invertaz enzim aktiviteleri için Standart hatası (SD) %7,6'nın altında olduğu için çizelgede ayrıca belirtilmemiştir.

<i>K. marxianus</i> Maya Suşu	İnvertaz Aktivitesi* ( $\pm\text{SD}^{**}$ )				İnülinaz Aktivitesi* ( $\pm\text{SD}^{**}$ )			
	15 Dakika		30 Dakika		15 Dakika		30 Dakika	
	R-1	DR	R-2	DR	R-1	DR	R-2	DR
Km5	227	5450	404	4844	2382	4844	771	3093
Km38	168	4971	618	6539	718	6539	831	3503
Km44	778	3877	418	4087	4438	4087	969	2065
Km63	806	3807	473	3918	2980	3918	995	1749
Km65	860	4303	480	3959	4010	3959	1089	1975
Kontrol	518	4137	23	3871	924	3871	171	1655

İnvertaz enzim aktivitesinin tüm maya suşlarında 5 ile 30 kat arasında baskılandığı gözlemlendi. Glikoz konsantrasyonu iki katına çıkarıldığında Km5 maya suşunda glikoz baskılamasının yaklaşık iki kat azaldığı, Km44, Km63 ve Km65 maya suşlarında tersine yaklaşık iki kat arttığı, Km38 maya suşunda ise fazla değişikliğin olmadığı gözlemlendi. Referans maya suşunda ise artan glikoz konsantrasyonunda baskılamamanın yaklaşık 23 kat arttığı gözlemlendi.

Km44, Km63 ve Km65 maya suşlarının inülinaz enzim aktivitesinde glikoz baskılaması gözlenmezken diğer suşlarda 2 ile 9 kat arasında baskılama gözlemlendi. Ancak bu baskılamamanın oldukça az olduğu belirlendi. Glikoz konsantrasyonu iki katına çıkarıldığında Km38 suşu hariç tüm suşlarda baskılamada artış gözlemlendi. Km38 maya suşunda ise değişiklik gözlenmedi. İnülinaz aktivitesinde inkübasyon süresi arttığında (30 dakika) enzim aktivitesinin repres ve derepres şartlarda değişik oranlarda azaldığı belirlendi.

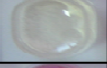
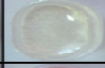
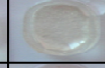

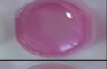
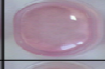
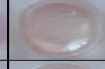



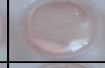





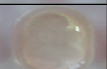
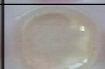
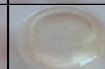
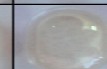


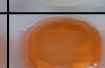
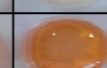
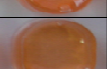


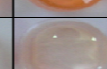









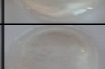


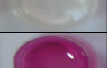
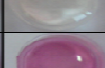

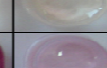
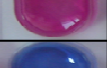
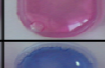
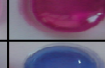
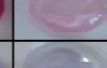
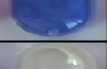

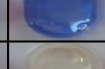

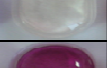

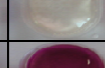




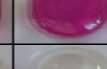




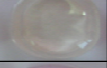
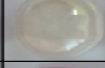
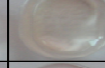
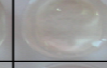








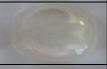



#### **4.11. *K. marxinaus* Maya Türünün Hidrolitik Enzim Profilinin Belirlenmesi**

API-ZYM test sistemi oldukça pahalı bir kit sistemi olduğu için izole edilen tüm *K. marxinaus* maya türleri bu test sisteminde analiz edilmedi. Repres ve derepres şartlarda Km44, Km63 ve Km65 maya suşlarının invertaz ve inülinaz enzim aktiviteleri benzer olduğundan Km65 maya suşu hidrolitik enzim aktivitesinin belirlenmesi için seçildi. Ayrıca Km5, Km38 ve referans maya suşları API-ZYM test sisteminde kullanıldı. Maya suşları %2 glikoz ve %2 Gliserol içeren zengin ve minimal besi ortamında üretilerek hidrolitik enzim aktiviteleri belirlendi. Km5 maya suşu için elde edilen sonuçlar Şekil 4.32’de, Km38 için elde edilen sonuçlar Şekil 4.33’de, Km63 için elde edilen sonuçlar Şekil 4.34’te ve referans maya suşu için elde edilen sonuçlar Şekil 4.35’te verildi. Kuyucuklarda oluşan renk, test kitleri ile birlikte verilen renk değerlendirme çizelgesine göre yorumlanarak maya suşlarına ait enzim profilleri Çizelge 4.24’te verildi.

Tüm maya suşlarında Lipaz (C 14), Tripsin,  $\alpha$ -galaktozidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\alpha$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz enzim aktiviteleri gözlenmedi. Esteraz (C 4), Esteraz Lipaz (C 8) ve Sistin arilamidaz enzim aktiviteleri ise oldukça düşük (1-2) bulundu. Lösin arilamidaz enzim aktivitesinin tüm besi ortamlarında ve maya suşlarında çok yüksek (5) olduğu görüldü.

	TEST EDİLEN ENZİM	Km5			
		YP-D	YP-G	YNB-D	YNB-G
1	Kontrol				
2	Alkalın fosfataz				
3	Esteraz (C 4)				
4	Esteraz lipaz (C 8)				
5	Lipaz (C14)				
6	Lösin arilamidaz				
7	Valin arilamidaz				
8	Sistin arilamidaz				
9	Tripsin				
10	$\alpha$ - Kimotripsin				
11	Asit fosfataz				
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz				
13	$\alpha$ - galaktosidaz				
14	$\beta$ - galaktosidaz				
15	$\beta$ - glukuronidaz				
16	$\alpha$ - glukosidaz				
17	$\beta$ - glukosidaz				
18	N-asetil- $\beta$ -glukosaminidaz				
19	$\alpha$ - mannosidaz				
20	$\alpha$ - fukosidaz				

Şekil 4.32. *K. marxianus* maya suşunun (Km5) repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında enzim aktiviteleri.

	TEST EDİLEN ENZİM	Km38			
		YP-D	YP-G	YNB-D	YNB-G
1	Kontrol				
2	Alkalın fosfataz				
3	Esteraz (C 4)				
4	Esteraz lipaz (C 8)				
5	Lipaz (C14)				
6	Lösin arilamidaz				
7	Valin arilamidaz				
8	Sistin arilamidaz				
9	Tripsin				
10	$\alpha$ - Kimotripsin				
11	Asit fosfataz				
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz				
13	$\alpha$ - galaktosidaz				
14	$\beta$ - galaktosidaz				
15	$\beta$ - glukuronidaz				
16	$\alpha$ - glukosidaz				
17	$\beta$ - glukosidaz				
18	N-asetil- $\beta$ -glukosaminidaz				
19	$\alpha$ - mannosidaz				
20	$\alpha$ - fukosidaz				

Şekil 4.33. *K. marxianus* maya suşunun (Km38) repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında enzim aktiviteleri.

	TEST EDİLEN ENZİM	Km63			
		YP-D	YP-G	YNB-D	YNB-G
1	Kontrol				
2	Alkalın fosfataz				
3	Esteraz (C 4)				
4	Esteraz lipaz (C 8)				
5	Lipaz (C14)				
6	Lösin arilamidaz				
7	Valin arilamidaz				
8	Sistin arilamidaz				
9	Tripsin				
10	$\alpha$ - Kimotripsin				
11	Asit fosfataz				
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz				
13	$\alpha$ - galaktosidaz				
14	$\beta$ - galaktosidaz				
15	$\beta$ - glukuronidaz				
16	$\alpha$ - glukosidaz				
17	$\beta$ - glukosidaz				
18	N-asetil- $\beta$ -glukosaminidaz				
19	$\alpha$ - mannosidaz				
20	$\alpha$ - fukosidaz				

Şekil 4.34. *K. marxianus* maya suşunun (Km63) repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında enzim aktiviteleri.



	TEST EDİLEN ENZİM	Kontrol			
		YP-D	YP-G	YNB-D	YNB-G
1	Kontrol				
2	Alkalın fosfataz				
3	Esteraz (C 4)				
4	Esteraz lipaz (C 8)				
5	Lipaz (C14)				
6	Lösin arilamidaz				
7	Valin arilamidaz				
8	Sistin arilamidaz				
9	Tripsin				
10	$\alpha$ - Kimotripsin				
11	Asit fosfataz				
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz				
13	$\alpha$ - galaktosidaz				
14	$\beta$ - galaktosidaz				
15	$\beta$ - glukuronidaz				
16	$\alpha$ - glukosidaz				
17	$\beta$ - glukosidaz				
18	N-asetil- $\beta$ -glukosaminidaz				
19	$\alpha$ - mannosidaz				
20	$\alpha$ - fukosidaz				

Şekil 4.35. Referans *K. marxianus* maya suşunun repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında enzim aktiviteleri.

Çizelge 4.21. *K. marxianus* maya suşlarının zengin ve minimal ortamda repres ve derepres şartlarda enzim aktiviteleri

Enzim	Km5				Km38				Km63				Kontrol			
	YP-D	YP-G	YNB-D	YNB-G	YP-D	YP-G	YNB-D	YNB-G	YP-D	YP-G	YNB-D	YNB-G	YP-D	YP-G	YNB-D	YNB-G
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	1	2	5	3	2	1	2	5	2	1	2	5	4	3	1
3	1	1	2	1	2	1	1	1	0	2	1	2	3	2	2	1
4	1	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
7	2	2	2	1	4	3	1	1	4	2	2	2	3	2	3	1
8	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	4	1	4	1	4	3	5	1	4	1	2	1	5	3	2	1
12	4	1	4	1	5	4	5	1	4	1	4	1	4	4	2	1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	4	5	0	4	5	5	5	4	5	5	4	5	5	5	5	5
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	2	2	1	1	1	0	0	3	3	0	3	4	5	4	5
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Valin arilamidaz aktivitesi tüm maya suşlarında ve besi ortamlarında görüldü. Enzim aktivitesinin glikoz içeren zengin üreme ortamında Km38 ve Km63 maya suşlarında yüksek (4) olurken minimal üreme ortamında enzim aktivitesinin oldukça azaldığı belirlendi. Km5 maya suşunda enzim aktivitesi minimal üreme ortamında (1) zengin üreme ortamından (2) daha düşük olduğu görüldü. Tüm maya suşlarında Naftol-AS-Bi-fosfohidrolaz enzim aktivitesi gözlenirken en yüksek enzim aktivitesi glikoz içeren üreme ortamlarında Km38 (5) maya suşunda gözlemlendi. Km5 (4) ve referans maya suşunda (4) glikoz içeren, Km38 (4) ve referans maya suşunda (4) gliserol içeren zengin üreme ortamlarında enzim aktivitesi tespit edildi. Genel olarak gliserol içeren minimal üreme ortamında enzim aktivitesinin oldukça düştüğü ve Km38 maya suşunda olmadığı tespit edildi.

Tüm maya suşlarının alkalın fosfataz ve asit fosfataz aktivitelerinde glikoz baskılaması görülmedi. En yüksek alkalın fosfataz aktivitesine Km63 (5) ve referans maya (5) suşlarında glikoz içeren zengin üreme ortamında, Km5 maya suşunda (5) ise gliserol içeren minimal üreme ortamında rastlandı. Genel olarak gliserol içeren üreme ortamlarında asit fosfataz aktivitesi azalırken en yüksek enzim aktiviteleri referans maya suşunda (5) YP-D üreme ortamında ve Km38 (5) maya suşunda YNB-D üreme ortamında belirlendi

Tüm maya suşlarının oldukça yüksek  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesine sahip oldukları tespit edildi. Referans maya suşunda repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi çok yüksek (5) tespit edilirken glikoz baskılamasının olmadığı gözlemlendi. Benzer şekilde Km38 ve Km63 maya suşlarında zengin üreme ortamında glikoz baskılaması görülmedi. Minimal üreme ortamında Km65 maya suşunun azda olsa enzim aktivitesi baskılanırken Km38 maya suşunda baskılanma gözlenmedi. Km5 maya suşunda her iki üreme ortamında da glikoz baskılaması gözlenirken özellikle minimal üreme ortamında  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesinin tamamen baskılandığı belirlendi.

Referans maya suşunun tüm üreme ortamlarında oldukça yüksek  $\beta$ -glikozidaz enzim aktivitesine sahip olduğu ve glikoz baskılamasına uğradığı belirlendi. Km5 maya suşunda zengin üreme ortamında glikoz baskılaması gözlenirken minimal üreme ortamında baskılama görülmedi. Tersine Km63 maya suşunda ise minimal üreme ortamında baskılama gözlenirken zengin üreme ortamında baskılamasının olmadığı belirlendi. Km5 maya suşunda zengin üreme ortamında glikoz baskılamasına uğramayan oldukça düşük

enzim aktivitesi belirlenirken minimal üreme ortamında enzim aktivitesi görülmedi.

API-ZYM enzim aktiviteleri izole edilen maya suşlarında ve kontrol maya suşunda tespit edilen enzim aktivitelerinin maya suşları arasında değişkenlik göstermekte olduğu, glikoz baskılamasının maya suşuna ve hücrenin fizyolojik şartlarına göre değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

## **BÖLÜM 5**

### **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Çalışmamızda Çanakkale ilinin yerel pazarlarında kendi ürettikleri süt ve süt ürünlerini satan 9 farklı üreticiden çiğ süt, yoğurt, ayran ve peynir örneklerinden maya izolasyonu yapılmıştır. Toplanan örnekler içerisinde en fazla maya yoğunluğuna çiğ süt örneklerinde rastlanırken en düşük maya yoğunluğuna peynir örneklerinde rastlanmıştır. Çiğ süt örneklerinin işlenmemiş örnekler olmasından dolayı maya yoğunluğunun yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur. Peynir örnekleri ise kaynatılarak steril edilen süttten yapıldığı için maya yoğunluğunun düşük çıkması doğaldır. Örnekleme yapılan ürünlerden 304 maya izole edilerek tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Ağırlıklı olarak *Candida sp.* cinsine ait *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. lambica*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. lipolytica*, *C. utilis*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. colliculosa*, *C. pelliculosa*, *C. lusitaniae*, *C. sake*, *C. melibiosica*, *C. intermedia* ve *C. guilliermondii* olmak üzere 16 maya türü, *R. mucilaginosus*, *R. glutinis*, *G. capitatum*, *S. cerevisiae*, *K. lactis* ve *K. marxianus* olmak üzere toplam 22 farklı maya türü tanımlanmıştır. *K. marxianus* maya türünün tüm süt ve süt ürünlerinde yüksek oranda dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

Çiğ sütteki maya yoğunluğunun ayıranda belirlenen maya yoğunluğundan daha yüksek olmasına rağmen maya çeşitliliğinin ayıranda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayranın işlenmiş süttten üretildiği ve laktoz şekeri içeriğinin süttten daha düşük olması göz önüne alındığında bu durum beklenen bir sonuç değildir. Yöre üreticileri çiğ sütü günlük olarak ayranı ise daha önce yapılan 1 veya 2 günlük yoğurttan hazırlayarak pazara getirmektedirler. Haziran ve temmuz aylarında hava sıcaklıklarının yüksekliği de göz önüne alındığında yaklaşık 48 saatlik zaman farklı maya türlerinin oluşması için yeterli bir süredir. Yoğurt örneklerinde tespit edilen *C. lambica*, *C. parapsilosis* ve *K. marxianus* maya türlerinin ayıranda da bulunması bu olasılığı desteklemektedir.

Laktozu kullanabilen ve 40°C’de üreme gösterebilen *C. famata*, *C. utilis* ve *G. capitatum* maya türleri API ID 32C analizi öncesi muhtemel *K. marxianus* maya türleri olarak tespit edilmesine rağmen analiz sonrası bu örneklerin *K. marxianus* maya türleri olmadığı tespit edilmişti. Bu durum klasik yöntemlerde yanlış tanımlama olasılığının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Analiz sonuçlarına göre en fazla ayrandan olmak üzere toplam 70 maya örneği *K. marxianus* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan tüm *K. marxianus* maya suşları glikozu hem asimile hem de fermente edebilmektedir. Ancak maya suşlarının tümü galaktozu, sukrozu ve laktozu kullanabilmesine rağmen bir kısmı

fermente edebilmektedir. Ayrıca maya suşlarının yaklaşık olarak yarısının gliserolu karbon kaynağı olarak kullanmadığı ve fermente edemediği, laktoz ve galaktoz fermentasyonlarının ise tüm *K. marxianus* suşlarında pozitif olmadığı belirlenmiştir. Bu durum *K. marxianus* olarak tanımlanan maya suşlarının metabolizmaları arasında farklılıklar olduğunu göstermektedir. *K. lactis* ve *K. marxianus* maya türleri *Kluyveromyces sp.* cinsinde bulunan diğer maya türlerinden ve diğer non-*Saccharomyces* maya türlerinden laktozu kullanabilme özellikleri ile ayırt edilirler. Özellikle *K. marxianus* maya türü yüksek sıcaklıklarda dahi respiro-fermentatif maya türü olarak bilinmektedir. Ancak izole edilen bazı suşların (Km12, Km19, Km68, Km69 ve Km70) laktozu fermente edemediği görülmüştür. Bu suşların *K. marxianus* olmama ihtimali yüksektir. Yapılan bir çalışmada *K. lactis* olarak tanımlanan çoğu maya suşunun yapılan moleküler tanımlama sonrasında *K. marxianus* maya suşları olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada *K. marxianus* maya suşlarının maltoz, melezitoz ve  $\alpha$ -metil-glikoziti asimile edemediği belirtilerek tür tanımlamalarında moleküler yöntemlerin kullanımının gerekliliği gösterilmiştir (Naumova ve ark., 2012). Araştırmamızda izole edilen ve *K. marxianus* olarak tanımlanan 70 maya suşunun maltoz, melezitoz ve  $\alpha$ -metil-glikoziti asimile edemediği tespit edilmiştir. Bu maya suşlarının ITS bölgeleri moleküler tanımlama için kullanılarak *K. marxianus* olarak tanımlanan tüm maya suşlarının moleküler tanımlaması yapılmıştır. ITS bölgesi PCR sonuçlarına göre Km68, Km69 ve Km70 maya suşlarının *K. marxianus* maya suşları olmadığı görülmüştür. Fermentasyon sonuçlarına göre Km68, Km69 ve Km70 maya suşlarının laktozu fermente edemediği tespit edilmiştir. Moleküler tanımlama sonrası bu suşların farklı maya türleri olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte fermentasyon sonuçlarında Km12 ve Km69 maya suşlarının laktozu fermente edemediği gözlenmesine rağmen bu suşların *K. marxianus* türler oldukları moleküler tanımlama sonrasında doğrulanmıştır. Km67 maya suşu ise tüm testlerde pozitif sonuç vermesine rağmen moleküler tanımlama sonrasında *K. marxianus* maya türü olmadığı görülmüştür. Moleküler tanımlama sonrasında Km67, Km68, Km69 ve Km70 maya suşlarının maltoz, melezitoz ve  $\alpha$ -metil-glikoziti asimile edememesine rağmen *K. marxianus* maya türleri olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu maya suşları *K. lactis* maya türüne de ait değildir. Tüm bu sonuçlar tanımlanan maya suşlarının kesinlikle moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekliliğini bir kez daha göstermektedir.

*K. marxianus* ve *K. lactis* maya türlerinin 5,8S –ITS rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen parça büyüklükleri (720 bp-740 bp) yaklaşık olarak aynıdır

(Kurtzman, 2003). Bu nedenle elde edilen *K. marxianus* türlerinin PCR sonuçlarına göre *K. lactis* olma ihtimali vardır. Fakat yapılan bir çalışmada 740 bp büyüklüğündeki PCR ürününün *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda *K. lactis* maya suşunda 290+180+120+80+65 bp olmak üzere 5 DNA parçası, *K. marxianus* maya suşunda 240+185+120+80+65+50 bp olmak üzere 6 DNA parçası verdiği bulunmuştur (Esteve-Zarzoso ve ark., 1999). Ancak başka bir çalışmada kullanılan *K. lactis* maya suşu ile *K. marxianus* maya suşlarının 240+185+120+80+65+50 bp olmak üzere aynı restriksiyon profiline sahip olduğu görülmüştür (Querol ve ark., 1998). Çalışmamızda izole ettiğimiz *K. marxianus* maya suşlarında, Km3, Km4 ve Km17 maya suşları hariç, 260+180+110+65 bp uzunluğunda 4 DNA parçası gözlenmiştir. PCR ürününün büyüklüğü yaklaşık 720 bp olup kesim sonrası DNA parçalarının toplamı 615 baz çiftidir ve toplamda 105 bp büyüklüğünde DNA parçası gözlenememiştir. Benzer durum referans *K. marxianus* maya suşunda da tespit edilmiştir. Eksik olan baz çiftlerinin 50 baz çiftinden daha küçük parçalara kesilerek agaroz jelde görüntülenememiş olabilir. Ayrıca 65 bp uzunluğunda gözlenen band bölgesi yaklaşık eşit uzunlukta ikinci bir band içeriyor olabilir, veya 110 bp uzunluğunda band bölgesi yine benzer şekilde ikinci bir DNA parçası içeriyor olabilir. Bu durumun netlik kazanabilmesi için farklı profil gösteren maya suşlarının Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ile tespit edilmesi gereklidir.

Yapılan başka bir çalışmada *K. marxianus* maya türü ile *K. lactis* maya türünün *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda oluşan bant profillerinin farklı olduğu bulunmuştur. *K. lactis* maya suşunda *RsaI* kesim bölgesi bulunmadığı için 740 bp uzunluğunda tek DNA parçası (PCR ürünü) gözlenirken *K. marxianus* maya suşunda 660+80 bp olmak üzere 2 DNA parçası belirlenmiştir (Querol ve ark., 1998). Diğer bir çalışmada ise *K. lactis* ve *K. marxianus* maya suşlarının moleküler karakterizasyonu *HindIII* restriksiyon enzim sonuçlarına göre belirlenmiştir. Seçilen referans *K. lactis* maya türünde *HindIII* restriksiyon kesim bölgesi bulunmazken seçilen referans *K. marxianus* maya türünde bir tane bulunmaktadır (Naumova ve ark., 2012). Bu nedenle ileride yapacağımız yayın çalışmaları için izole edilen *K. marxianus* maya suşlarının *RsaI* ve *HindIII* restriksiyon profillerinin belirlenmesi uygun olacaktır.

Referans maya suşunun ITS bölgesinin PCR ürününün *AluI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonrasında 500 bp uzunluğunda bir band daha gözlenmiştir. Kullanılan DNA'nın saf olmaması veya kullanılan enzimin saf olmaması enzimin yeterince çalışmayarak parsiyel kesim yapmasına neden olabilir. PCR sonrası yapılan pürifikasyon işlemi

nedeniyle amplifike edilen DNA saftır. *AluI* enziminin gerek üretici firmanın sunduğu güvence ile gerekse diğer suşlarda enzimin olumlu çalışması nedeniyle parsiyel kesime sebep olabileceği düşünülmemektedir. DNA bölgesinde gözlenen metilasyonlarında yine parsiyel kesime neden olması muhtemeldir. Metilasyon 400bç ile 120 bç arasındaki *AluI* kesim bölgesinde gerçekleşmişse bu bölgede parsiyel kesim gerçekleşerek yaklaşık 500 bç uzunluğunda kesilmemiş bir DNA parçası oluşturabilir. Ancak bu durumda 175 bç-120bç arasındaki kesim bölgesinde de gerçekleşecek parsiyel kesim sonrasında yaklaşık 275-330 bç uzunluğunda bir DNA parçasının daha açığa çıkması gerekirdi. Bu nedenle gözlenen 500 bç uzunluğundaki DNA parçasının mutasyon nedeniyle kesim bölgesinin tanınmasından dolayı bu DNA parçası gözlenmiş olabilir. ITS bölgesi çok tekrarlı dizilerden oluştuğundan ve korunmamış bölgeleri içerdiğinden kopyalardan bir kısmında bu durum gözlenirken bir kısmında gözlenmemiş ve iki farklı band gözlenmesine neden olabilir. Aynı maya suşunda dahi tekrarlar içerisindeki mutasyonların her tekrar içinde aynı oranda ve bölgede gerçekleşmediğini göstermektedir. Bu durum intraspesifik polimorfizm veya ITS heterogenity olarak tanımlanmış ve daha önce birkaç fungal tür için rapor edilmiştir (O'Donnell ve Cigelnik, 1997; Okabe ve ark., 2001; Wang ve Yao, 2005).

*Kluyveromyces* cinsi içinde bulunan türlerin değişik moleküler yöntemler kullanılarak yapılan tanımlama çalışmaları sonunda türler arasında çok fazla yakınlık olduğu gözlenmiştir (Naumov, 1988; Fuson ve ark., 1987; Sidenberg ve Lachance, 1983; Viljoen ve ark., 1989; Lehmann ve ark., 1992; Belloch ve ark. 1997; Molnar ve ar., 1996). Bu durum özellikle biyoteknolojik öneme sahip *K. lactis* ve *K. marxianus* maya türlerinin tanımlanmasında problemlere neden olmaktadır. *K.lactis* maya türünün genom dizisini belirleme çalışmaları tamamlanmıştır (Bolotin-Fukuhara ve ark., 2000; Dujon ve ark., 2004). *K. marxianus* maya türünün genom dizisini belirleme çalışmaları devam etmekte olup dizilemeler tamamlandığında yeni moleküler markerların belirlenmesiyle türlerin tanımlamaları sağlıklı olarak yapılacaktır (Llorente ve ark., 2000; Souciet ve ark., 2000).

Tanımlanan maya suşlarının dört farklı restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda 2 farklı restriksiyon profili ve 2 farklı haplotip bulunduğu belirlenmiştir. En yaygın haplotip (AAAA) tüm süt ve süt ürünlerindeki maya populasyonlarında bulunurken en az yaygın olan haplotip (AABB) çiğ süt ve ayran maya populasyonlarında bulunmuştur. Haplotip ve nükleotid çeşitliliği en fazla çiğ süt ve ayran maya populasyonlarında görülmüştür. Nükleotid farklılaşma (Nucleotide Divergency) değerlerine göre çiğ süt popülasyonu ile diğer ürünlerin maya populasyonları arasında genetik farklılaşma gözlenirken peynir,



yoğurt ve ayran populasyonları arasında genetik farklılaşma olmadığı tespit edilmiştir. Oluşturulan köksüz DOLLO ağacında Tip 2 (AAAA) ‘bazal’ haplotip olup tüm populasyonlarda (çiğ süt, yoğurt, ayran ve peynir) bulunmaktadır. Genetik farklılaşmaya neden olabilecek populasyonların ise çiğ süt ve ayranında bulunduğu görülmüştür. AMOVA analizleri sonucunda populasyon içi varyansın yüksek ve anlamlı olduğu, populasyonlar arası varyansın ise bulunmadığı belirlenmiştir. Gruplar arası varyansın anlamlı olmasına rağmen populasyon içi varyansın daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar çiğ süt maya populasyonunun diğer süt ürünlerindeki maya populasyonlarının hem tür bazında çeşitliliğinde hem de genetik çeşitliliğinde ana kaynak oluşturduğunu göstermektedir.

Moleküler yöntemlerle *K. marxianus* olarak tanımlanan maya suşlarının tümünde hücre dışı lipaz aktivitesine rastlanmazken birkaç maya suşunda yüksek proteaz aktivitesine ve üreaz aktivitesine rastlanmıştır. Bu durum yine *K. marxianus* maya suşlarının hücre dışı enzim aktiviteleri arasında da farklılıklar olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda benzer durum tespit edilmiş maya suşları arasında lipolitik ve proteolitik aktivite sonuçlarının farklı olduğu, bazı suşlarda proteolitik aktivite gözlenirken bazılarında bulunmadığı tespit edilmiştir (Devoyod, 1990; Viljoen ve Welthagen, 1998).

*K. marxianus* maya suşlarının repres ve derepres koşullarda belirlenen hücre dışı invertaz ve  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri arasında çok büyük farklılıklar bulunmaktadır. Maya suşlarının bir kısmında glikoz baskılamasına uğramayan çok yüksek seviyede invertaz aktivitesi gözlenirken bazı maya suşlarında glikoz baskılamasına maruz kalan invertaz aktivitesi gözlenmiştir. Benzer şekilde glikoz baskılamasına uğramayan ve glikoz tarafından baskılanan  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri yine maya suşları arasında değişiklik göstermektedir. Genel olarak maya suşlarında  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi invertaz enzim aktivitesinden daha düşük olarak bulunmuştur.

İnülinaz enzim aktivitesi seçilen maya suşlarında repres ve derepres şartlarda belirlenmiştir. İnülinaz aktivitesinin invertaz enzim aktivitesinden daha yüksek olduğu ve daha az glikoz baskılamasına maruz kaldığı tespit edilmiştir. Glikoz baskılaması için kullanılan %2 glikoz konsantrasyonu artırıldığında glikoz baskılamasının bazı suşlarda arttığı bazılarında ise azaldığı görülmüştür. İnülinaz enzim aktivitesini belirlerken 15 dakikalık ve 30 dakikalık inkübasyon süreleri kullanılmıştır. Uzun süre inkübasyona maruz

kalan maya suşlarının tümünde inülinaz enzim aktivitesinin repres ve derepres şartlarda azaldığı görülmüştür. Bu sonuca neden olabilecek üç sebep olabilir: Birincisi maya hücresi inülinaz aktivitesi ile sukrozu hidrolize ederek açığa çıkardığı glikozun bir kısmını tekrar geri kullanabilir ve bu nedenle ölçülen enzim aktivitesi düşük çıkabilir. İkincisi ortamda bulunan tüm sukrozun (0,2M) hidrolize edilerek tükenmesi ve daha fazla glikoz üretimi olmamasıdır. Dolayısıyla ortamda bulunan (açığa çıkan) glikozun hücre içine alınarak geri kullanılması sonucu düşük aktivite gözlenmiş olabilir. Bu olasılığı test etmek için artan substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesinin belirlenmesi uygun olacaktır. Üçüncüsü ise açığa çıkan glikozun, glikoz baskılaması oluşturması ve aktivitenin azalmasına neden olması ihtimalidir. Fakat kullanılan sukroz miktarı 0,2M olup, açığa çıkabilecek glikoz miktarı glikoz baskılaması oluşturacak konsantrasyonda (0,1% glikoz) değildir. Ayrıca % 4 glikoz konsantrasyonunda ölçülen inülinaz aktivitesi 30 dakika sonunda ölçülen inülinaz aktivitesinden daha düşüktür. Glikoz baskılaması olduğu takdirde ölçülen enzim aktivitesinin % 4 glikozda ölçülen enzim aktivitesine yakın olması gerekirdi.

Yapılan bir çalışmada inülinaz için kodlu *KmINU1* geninin transkript miktarının KmMig1p aracılığıyla sukroz, rafinoz ve inülin substratlarının varlığında azaldığı belirlenmiştir (Lertwattanasakul ve ark., 2011). Fakat inülinaz enzim aktivitesinin sadece rafinoz ve inülin varlığında ve yüksek sıcaklıkta baskılandığı, sukrozda ise glikoz baskılamasının gözlenmediği belirtilmiştir. Rafinoz ve inülinin hidrolizini SC-inülinaz, sukrozu ise CWA-inülinaz hidrolize etmektedir. Glikoz baskılamasına uğrayan enzimin SC-inülinaz olduğu muhtemeldir. Ancak yapılan çalışmada zamana bağlı enzim aktivitesi belirlenmemiştir.

Yürüttüğümüz çalışmada 30 dakika sonra enzim aktivitesinde azalma gözlenmesi hücre içinde baskılama gerçekleşmeden sentezlenen transkriplerin translasyona uğrayarak aktif enzimleri oluşturmasından kaynaklı olabilir. Bu nedenle % 4 ve % 2 glikoz içeren ortamlarda zamana bağımlı olarak enzim aktivitelerinin belirlenmesi gereklidir.

Çalışmamızda inülinaz aktivitesini belirlemek için substrat olarak sukroz kullanıldı. Açığa çıkan glikoz miktarı ölçülerek invertaz ve inülinaz aktiviteleri belirlendi. İvertaz ve inülinaz enzimlerinin sukroza karşı afinitesi yüksek olup, invertazın ise inüline karşı afinitesi düşüktür. İnülin yalnızca SC-inülinaz tarafından hidrolize edilmektedir (Nam ve ark., 1993; Phelps, 1965; Scherrer ve ark., 1974). Çalışmamızda SC-inülinaz aktivitesine bakılmadı ve substart olarak inülin kullanılmadı. Bu testlerin yapılması daha önce sunulan tez önerisinde de belirtilmedi. Tez kapsamında yapılan çalışmaların yayına dönüştürülmesi

için bu analizlerin yapılması özellikle inülinaz aktivitesinin doğru şekilde belirlenebilmesi ve yorumlanabilmesi için şarttır. S/I oranının az veya çok olmasına göre inülinaz aktivitesinin veya invertaz aktivitesinin varlığı tespit edilmektedir. (Snyder ve Phaff, 1960; Vandamme ve Derycke, 1983). *K. marxianus* maya türünde hem invertaz hem de inülinaz aktivitesi bulunduğu için S/I oranının hesaplanarak hangi enzim aktivitesinin hangi üreme ortamında bulunduğu belirlenmelidir. Tüm bu çalışmalar glikoz baskılaması koşullarında tekrar edilmelidir. Önerilen tüm bu analizlerin yapılmasına başlanmıştır.

Km5, Km38, Km63 ve referans maya suşları API ZYM test sisteminde kullanılarak hücrelerin hücre dışı hidrolitik enzim aktiviteleri API ZYM test sistemi kullanılarak tespit edildi. Maya suşlarının enzim profilleri fermente edilebilir karbon kaynağı glikoz ve fermente edilemeyen karbon kaynağı gliserol içeren zengin ve minimal besi ortamlarında belirlendi. Genel olarak tüm maya suşlarında Lipaz (C 14), Tripsin,  $\alpha$ -galaktozidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\alpha$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz enzim aktivitelerine sahip olmadığı görüldü. Diğer enzim aktivitelerinde ise farklı ortamlarda farklı şekillerde sentezlendikleri ve maya suşları arasında farklılıklar olduğu gözlemlendi.

Tüm maya suşlarının oldukça yüksek  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesine sahip oldukları tespit edildi. Km38, Km63 ve referans maya suşunda repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi gözlenirken glikoz baskılamasına uğramadığı belirlendi. Ancak Km5 maya suşunda her iki üreme ortamında da glikoz baskılaması gözlenirken özellikle minimal üreme ortamında  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesinin tamamen baskılandığı tespit edildi. Km5 maya suşunun  $\beta$ -glikozidaz enzim aktivitesi zengin üreme ortamında glikoz baskılamasına uğrarken minimal üreme ortamında baskılamaya uğramadığı bulundu. Km63 maya suşunda ise  $\beta$ -glikozidaz enzim aktivitesinin minimal üreme ortamında baskılanırken zengin üreme ortamında baskılanmadığı görüldü.

Maya suşlarının biyokimyasal yöntemle belirlenen  $\beta$ -glikozidaz (invertaz ve inülinaz) ve  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri ile API ZYM testi sonucu belirlenen enzim profilleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin; Km63 ve referans maya suşunda  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi API ZYM sonuçlarına göre tüm besi ortamlarında glikoz baskılamasına uğramazken biyokimyasal testlerde glikoz tarafından baskılanmaktadır. Bir diğer Km 38 maya suşunun API ZYM test sonuçlarına göre  $\beta$ -glikozidaz (invertaz ve

inülinaz) enzim aktivitesi zengin üreme ortamında baskılanmazken biyokimyasal test sonucuna göre baskılanmaktadır.

*K. lactis* maya türünde *KIKHT1/KIKHT2*, *KIKHT3*, *KIRAG1* ve *KIHGT1* genleri tarafından kodlanan transporter proteinleri tanımlanmıştır. *KIKHT1/KIKHT2* ve *KIRAG1* düşük afiniteli glikoz transporter *KIHGT1* ise yüksek afiniteli transporter proteinleridir. *KILAC/GAL* regulonunda görev alan *KILAC12* geni laktoz/galaktoz taşınmasında görev alan permeaz proteini için kodludur. *KILac12p* düşük afiniteli glikoz transporter olup yüksek galaktoz ve laktoz konsantrasyonunda çalışmaktadır. *KILAC12* geninin transkripsiyonu diğer transporter proteinleri ile glikoz varlığına göre kontrol edilmektedir. *Hgt1p* bulunmadığında *KILAC12* geninde glikoz baskılaması gözlenirken *Rag1p* ve *KIKht1p/KIKht2p* transporterlarının varlığında *KILAC12* geni baskılanmaktadır (Suleau ve ark., 2006). *KIHGT1* geninin transkripsiyonu glikoz baskılanmasından etkilenmemektedir ve sürekli ekspres edilmektedir. *KIRag4* proteini glikoz sensör proteini olup hücre içinde glikoz sinyali oluşturmaktadır. *KIRag4p*, *S. cerevisiae* maya türündeki *Snf3p/Rgt2p* glikoz sensör proteinlerine yapısal olarak benzemektedir (Betina ve ark., 2001). *KIRag4p* olmadığında *K. lactis* maya suşlarında *KIRAG1* gen transkripsiyonu gözlenmemektedir. *KIRAG1* geni *KIRgt1p* (*Sra1p*) tarafından baskılanmaktadır (Rolland ve ark., 2006). Yüksek glikoz konsantrasyonunda *KIRag4* proteini *KIRgt1* proteinini baskılayarak *KIRAG1* geni üzerindeki baskılamayı kaldırır. Düşük afiniteli glikoz transporter proteinleri olan *KIRag1p* ve *KILac12p* glikozu hücre içine alarak *LAC/GAL* regulonunda glikoz baskılaması oluşturur. Regulonda bulunan  $\beta$ -galaktozidaz enzimi için kodlu *KILAC4* geni baskılanır ve enzim aktivitesi gözlenmez. Düşük glikoz konsantrasyonunda, *KIRgt1p* *KIRAG1* genini baskılar ve *KILac12p* sentezi gözlenmez. Transport işlevi ise glikoz baskılanmasından etkilenmeyen *KIHgt1p* üzerinden gerçekleşir. *KIHgt1p* yüksek afiniteli glikoz transporter olup galaktoz tarafından indüklenir ve hücre içinde düşük glikoz sinyali oluşmasına neden olur. Düşük glikoz sinyali *LAC/GAL* regulonundaki genlerin derepres olarak yüksek  $\beta$ -galaktozidaz enzimi sentezlemesini sağlar.

*K. marxianus* maya türünde henüz tanımlanmış glikoz sensörü ve/veya transporter proteinleri bulunmamaktadır. Ancak her iki maya türünde *LAC/GAL* regulonunun benzer şekilde sensör ve transporter üzerinden kontrol edilme olasılığı yüksektir. Bu nedenle çalışmada *K. marxianus* maya suşları arasında gözlenen farklı  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri olası glikoz transporter sistemlerinin değişik düzenlenmelerinden kaynaklı

olabilir.

*K. lactis* maya türünde *KIRAG5* geni heksokinaz için kodlu tek kopya bulunan bir genidir. *KIRAG1* geni glikoz baskılanmasından etkilenmemekte ve sürekli ekspres edilmektedir.  $\Delta rag5$  *K. lactis* maya suşlarında *KIRAG1* geninin transkripsiyonu glikoz baskılanmasına uğramaktadır. KLRag4 proteini KIRgt1 proteinini (veya genini) KIRag5p aracılığıyla baskılıyarak *KIRAG1* genini derepres ediyor olabilir. Bu durumda *KIRAG1* geninin transkripsiyonu  $\Delta rag5$  mutantlarında baskılamaya uğrayabilir. Ayrıca bu durum  $\Delta Schx2$  maya suşunda ekspres edilen KIRag5 proteininin glikozu fosforlayabilirken glikoz baskılanması sinyali oluşturmamasını açıklamaktadır.

$\Delta rag5$  *K. lactis* maya suşlarında *KIINV1* geninin transkripsiyonu glikoz tarafından baskılanmaktadır. Bu durum *KIINV1* geninin KIRag5p tarafından dolaylı olarak baskılandığını göstermektedir. KmMig1p varlığında ve yokluğunda *KIINV1* geninde glikoz baskılanması görülmektedir. *K. marxianus* maya suşu rafinoz, sukroz veya inülide üretildiğinde *KmINU1* geninde glikoz baskılanması gözlenmekte olup bu baskılanmanın KmMig1p aracılığıyla olduğu bilinmektedir. *K. marxianus* maya suşunda tanımlanan *KmHXX2* geni glikoz baskılanmasından etkilenmektedir.

Tüm bu sonuçlar maya suşları arasında aynı enzim aktivitesinin dahi farklı şekillerde kontrol edildiğini, glikoz baskılanmasının maya suşunda bulunan transport sistemine ve hücrenin fizyolojik şartlarına göre değişken olduğunu göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda *K. marxianus* maya suşlarının çevresel faktörlere karşı oluşturdukları metabolik ve buna bağlı genetik cevaplar farklılıklar göstermektedir. Maya hücresinin bulunduğu ortam şartlarına göre fizyolojik cevapları aynı tür içinde tamamen değişiktir. *K. marxianus* maya türü respiro-fermentatif maya türlerinden olup oksijen varlığında fermentasyon yapabilmektedir. Bu nedenle hem fermentasyon için gerekli genlerin hemde respirasyon için gerekli genlerin regülasyonu *S. cerevisiae* maya türüne benzemekle beraber transkripsiyon ve translasyon basamaklarında farklılıklar göstermektedir. Glikoz baskılanmasının *K. marxianus* maya türünde *K. lactis* maya türüne benzer olmakla beraber tercih edilen karbon kaynağına göre farklılıklar göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Accensi F., Cano J., Figuera L., Abarca M.L. ve Cabanes F.J., 1999. New PCR Method to Differentiate Species in the *Aspergillus niger* Aggregate *FEMS Microbiology Letters*, 180: 191–196.
- Albertazzi E., Cardillo R., Servi S. ve Zucchi G., 1994. Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylacetate Important Aroma Components. *Biotechnology Letters* 16: 491-496.
- Bacci Júnior M., Siqueira C.G., Antoniazi S.A.ve Ueta J., 1996. Location of the  $\beta$ -galactosidase of the Yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 10022. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 357–361.
- Balerias Couto M.M., Ejisma B., Hofstra H., Huis in't Velt J.H. ve Vossen J.M.B.M., 1996. Evaluation of Molecular Typing Techniques to Assign Genetic Diversity Among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 41–46.
- Barnett J.A., Payne R.W. ve Yarrow D., 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, (3th ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Baruffini E., Goffrini P., Donnini C. ve Lodi T., 2006. Galactose Transport in *Kluyveromyces lactis*: Major Role of the Glucose Permease Hgt1. *FEMS Yeast Research*, 6(9): 1235-1242.
- Bayless M., Paige D.M. ve Ferry G.D., 1971. Lactose Intolerance and Milk Drinking Habits. *Gastroenterology*, 60: 605–608.
- Belem M.A.F. ve Lee B.H., 1998. Production of Bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* Grown on Whey: An Alternative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(7): 565-598.
- Belloch C., Barrio E., Dolores Garcia M. ve Querol A., 1998. Inter and Intraspecific Chromosome Pattern Variation in the Yeast Genus *Kluyveromyces*. *Yeast*, 14(15): 1341-1354.
- Belloch C., Barrio E., Uruburu F., García D.D. ve Querol A., 1997. Characterization of Four Species of the Genus *Kluyveromyces* by Mitochondrial Analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 20: 397-408.
- Betina S., Goffrini P., Ferrero I. ve Wesolowski-Louvel., 2001. Rag4 Gene Encodes a Glucose Sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics*, 158: 541-548.

- Billard P., Menart S., Blaisonneau J., Bolotin-Fukuhara M., Fukuhara H. ve Weselowski-Louvel M., 1996. Glucose Uptake in *Kluyveromyces lactis*: Role of the *HGT1* gene in Glucose Transport. *Journal of Bacteriology*, 178(20): 5860-5866.
- Bolotin-Fukuhara M., Toffano-Niochem C., Artiguenave F., Duchateau-Nguyen G., Lemaire M., Marmeisse R., Montrocher R., Marmeisse R., Montrocher R., Robert C., Termier M., Wincker P. ve Wesolowski-Louvel M., 2000. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Letters*, 487: 66-70.
- Brady D., Marchant R., McHale L. ve McHale A.P., 1995. Isolation and Partial Characterization of  $\beta$ -galactosidase Activity Produced by a Thermotolerant Strain of *Kluyveromyces marxianus* During Growth on Lactose-Containing Media. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 696–699.
- Breunig K.D., 1989. Glucose Repression of *LAC* Gene Expression in Yeast is Mediated by the Transcriptional Activator *LAC9*. *Biomedical and Life Sciences*.216(2-3): 422-427.
- Breunig K.D., Bolotin-Fukuhara M., Bianchi M.M., Bourgarel D., Falcone C., Ferrero I.I., Frontali L., Goffrini P., Krijger J.J., Mazzoni C., Milkowski C., Steensma H.Y., Wesolowski-Louvel M. ve Zeeman A.M., 2000. Regulation of Primary Carbon Metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme MicrobialTechnology*, 26: 771-780.
- Bruneska D.G.M., Souza C.G.de Jr., Simões D.A. ve Morais de Jr.M.A., 2002. The  $\beta$ -Galactosidase Activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 Decreases by High Concentrations of Galactose. *Current Microbiology*, 44(5): 379-382.
- Cai J., Roberts I.N. ve Collins D., 1996. Phylogenetic Relationships Among Members of the Ascomycetous Yeast Genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* Deduced by Small Subunit rRNA Gene Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 542-549.
- Carlson M., 1999. Glucose Repression in Yeast. *Current Opinnion in Microbiology*, 2:202-207.
- Cassart J.P., Georis I., Östling J., Ronne H.ve Vandenhoute J., 1995. The *MIG1* Repressor From *Kluyveromyces lactis*: Cloning, Squencing and Functional Analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 371: 191-194.

- Cassart J.P., Östling J., Ronne H. ve Vandenhoute J., 1997. Comparative Analysis in Three Fungi Reveals Structurally and Functionally Conserved Regions in the Mig1 Repressor. *Molecular and General Genetics*, 255: 9–18.
- Chen X.J., Wesolowski-Louvel M. ve Fukuhara H., 1992. Glucose Transport in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional Regulation of the Glucose Transporter Gene *RAG1*. *Molecular and General Genetics*. 233: 97-105.
- Coons D.M., Boulton R.B. ve Bisson L.F., 1995. Computer-assisted Non-linear Regression Analysis of the Multicomponent Glucose Uptake Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177: 3251- 3258.
- Çorbacı C., Uçar F.B. ve Yalçın H.T., 2011. Isolation and Characterization of Yeasts Associated with Turkish-style Homemade Dairy Products and Their Potential as Starter Cultures. *African Journal of Microbiology Research*, 6(3): 534-542.
- Cosentino S., Fadda M.E., Deplano M., Mulargia A.F. ve Palmas F., 2001. Yeasts Associated with Sardinian Ewe's Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 53–58.
- Cruz-Guerrero A., Garcia-Peña I., Barzana E., Garcia-Garibay M. ve Gomez-Ruiz L., 1995. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A Wild Inulinase Hyperproducing Strain. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80: 159–163.
- Deak T. ve Beuchat L.R., 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. Boca Raton, FL: CRC Press. USA.
- Devoyod J.J., 1990. Yeasts in Cheese-making. In: Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. (Eds.), *Yeasts Technology*. Springer, Heidelberg 229–240.
- Dickson R.C. ve Markin J.S., 1980. Physiological Studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 142: 777-785.
- Difco., 1998. *Difco Manual*, 11th ed. Difco Laboratories, Detroit, MI.
- Dong J. ve Dickson R.C., 1997. Glucose Represses the Lactose-Galactose Regulation in *Kluyveromyces lactis* through a *SNF1* and *MIG1*-dependent Pathway that Modulates Galactokinase (*GAL1*) Gene Expression. *Nucleic Acids Research*, 25: 3657-4664.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., De Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J.M., Beyne E., Bleykasten C., Boisramé A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., De



- Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J.M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard GF., Straub M.L., Suleau A., Swennen D., Tekaiia F., Wésolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P., Souciet JL., 2004. Genome Evolution in Yeasts. *Nature*, 430(6995): 35-44.
- Eliskases-Lechner F. ve Ginzinger W., 1995. The Yeast Flora of Surface Ripened Cheeses. *Milchwissenschaft*, 50: 458–561.
- Entian K.D. ve Schuller H.J., 1997. Glucose Repression (Carbon Catabolite Repression) in Yeast. In: Zimmermann F.K., Entian K.D(eds) *Yeast Sugar Metabolism :Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*. Technomic Press Basel.
- Esmon P.C., Esmon B.E., Schauer E., Taylor A. ve Schekman R., 1987. Structure, Assembly and Secretion of Octameric Invertase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262: 4387-4394.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F. ve Querol A., 1999. Identification of Yeasts by RFLP Analysis of the 5.8S rRNA Gene and the Two Ribosomal Internal Transcribed Spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329–337.
- Excoffier L., Smouse, P.E. ve Quattro, J.M., 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Fabre C.E., Blanc P.J. ve Goma G., 1997. Screening of Yeasts Producing 2-phenylethanol. *Biotechnology Techniques*, 11: 523–525.
- Fabre C.E., Blanc P.J. ve Goma G., 1998. Production of 2-phenylethyl Alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress*, 14: 270–274.
- Fadda M.E., Cosentino S., Deplanno M. ve Palmas F., 2001. Yeast Populations in Sardinia Feta Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 153-156.
- Fadda M.E., Mossa V., Pisano M.B., Delphano M., Cosentino S., 2004. Occurrence and Characterization of Yeast Isolated from Artisanal Fiore Sardo Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 51–59.

- Felsenstein J., 1993. *PHYLIP* (Phylogenetic Inference Package, version 3.5c). Department of Genetics, SK, University of Washington, Seattle, WA.
- Fernandes P.A., Sena-Esteves M. ve Moradas-Ferreira P., 1995. Characterization of the Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene Family from *Kluyveromyces marxianus* Polymerase Chain Reaction Single-strand Conformation Polymorphism as a Tool for The Study of Multigenic Families. *Yeast* 11: 725–733.
- Fleet G.H. ve Mian M.A., 1987. The Occurrence and Growth of Yeasts in Dairy Products, *International Journal of Food Microbiology*, 4: 145-155.
- Fleet G.H., 1990. Yeasts in Dairy Products: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 199–211.
- Fonseca G.G., Gombert A.K., Heinzle E. ve Wittmann C., 2007. Physiology of The Yeast *Kluyveromyces marxianus* During Batch and Chemostat Cultures with Glucose as The Sole Carbon Source. *FEMS Yeast Research*, 7: 422–435.
- Furlan S.A., Schneider A.L.S., Merkle R., Carvalho-Jonas M.de F. ve Jonas R., 2000. Formulation of a Lactose-free, Low-cost Culture Medium for the Production of  $\beta$ -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 22, 7, 589-593.
- Fuson G.B., Presley H.L. ve Phaff H.J., 1987. Deoxyribonucleic Acid Base Sequence Relatedness Among Members of the Yeast Genus *Kluyveromyces*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*. 37(4): 371-379.
- Gardini F., Tofalo R., Belletti N., Lucci L., Suzzi G., Torriani S., Guerzoni M.E. ve Lanciotti R., 2006. Characterization of Yeasts Involved in The Ripening of Pecorino Crotonese Cheese. *Food Microbiology*, 23: 641-648.
- Gasnier B., 1987. Characterization of Low- and High-affinity Glucose Transports in the Yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*. 903(3): 425–433.
- Gekas V. ve Lopez-Leiva M., 1985. Hydrolysis of Lactose: a Literature Review. *Process Biochemistry*, 20: 2–12.
- Georis I., Cassart J.P., Breunig K.D. ve Vandenhoute J., 1999. Glucose Repression of the *Kluyveromyces lactis* Invertase Gene *KLINV1* Does not Require Mig1p. *Molecular and General Genetics*, 261: 862-870.
- Goffrini P., Ficarelli A. ve Ferrero I., 1995. Hexokinase Activity is Affected in Mutants of

- Kluyveromyces lactis*. Resistant to Glucose Repression. *Microbiology*, 141: 441-447.
- Goffrini P., Wesolowski-Louvel M., Ferrero I. Ve Fukuhara H., 1990. *RAG1* Gene of the Yeast *Kluyveromyces lactis* Codes for a Sugar Transporter. *Nucleic Acids Research*, 18: 5294.
- Gonçalves J.A. ve Castillo F.J., 1982. Partial Purification and Characterization of  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Dairy Science*, 65: 2088–2094.
- Gonzalez-Siso M.I., 1994.  $\beta$ -galactosidase Production by *Kluyveromyces lactis* on Milk Whey: Batch Versus Fed-batch Cultures. *Process Biochemistry*, 29: 565-568.
- Guarente L., 1983. Yeast Promoters and LacZ Fusions Designed to Study Expression of Cloned Genes in Yeast. *Methods Enzymology*, 101: 181-191.
- Guillamon J.M., Barrio E., Huerta T. ve Querol A., 1994. Rapid Characterization of Four Species of the *Saccharomyces sensu stricto* Complex According to Mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 708-714.
- Guillamon J.M., Sanchez I. ve Huerta T., 1997. Rapid Characterization of Wild and Collection Strains of the Genus *Zygosaccharomyces* According to Mitochondrial DNA Patterns. *FEMS Microbiological Letters*, 147: 267-272.
- Gustavo G.F., Elmar H., Christoph W. ve Andreas K.G., 2008. The Yeast *Kluyveromyces marxianus* and Its Biotechnology Potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 339-354.
- Hall L., Wohlfel S., Roberts G.D., 2003. Experience with MicroSeq D2 Large-Subunit Ribosomal DNA Sequencing Kit for Identification of Commonly Encountered, Clinically Important Yeast Species. *Journal Clinical Microbiology*, 41, 5099–5102.
- Haridy M.S.A., 1992. Yeast Flora of Raw Milk in El-Minia City, Egypt, Cryptogamie. *Mycology*, 13 (4): 321-326.
- Holloway P. and Subden R.E., 1993. Isolation and Nucleotide Sequence of the Pyruvate Decarboxylase Gene From *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetics* 24, 3, 74-277.
- Huo K. ve Li Y., 1995. Cloning and Expression of *Kluyveromyces fragilis* *LAC4* Gene. *Science China B*, 38: 1332-1340.
- Jakobsen M. ve Narvhus J., 1996. Yeasts and Their Possible Beneficial and Negative

- Effects on the Quality of Dairy Products. *International Dairy Journal*, 6: 755-768.
- James S.A., Collins M.D. ve Roberts I.N., 1996. Use of an rRNA Internal Transcribed Spacer Region to Distinguish Phylogenetically Closely Related Species of the Genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 189-194.
- Jia J. ve Wheals A., 2000. Endopolygalacturonase and Enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetics*, 38: 264-270.
- Johnston M. ve Carlson M., 1992. *Regulation of Carbon and Phosphate Utilization in The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 193-281.
- Johnston M., Hillier L., Riles L., Albermann K., André B., Ansorge W., Benes V., Brückner M., Delius H., Dubois E., Düsterhöft A., Entian K.D., Floeth M., Goffeau A., Hebling U., Heumann K., Heuss-Neitzel D., Hilbert H., Hilger F., Kleine K., Kötter P., Louis E.J., Messenguy F., Mewes H.W. ve Hoheisel J.D., 1997. The Nucleotide Sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome XII. *Nature*, 387(29): 87–90.
- Jolivet P., Bergeron E., Benyair H. ve Meunier J.C., 2001. Characterization of Major Protein Phosphatases from Selected Species of *Kluyveromyces* Comparison with Protein Phosphatases From *Yarrowia lipolytica*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 861–870.
- Kalil S.J., Suzan R., Maugeri F., Rodrigues M.I., 2001. Optimization of Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus* Using Factorial Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 94, 257-264.
- Kaminarides S.E. ve Laskos N.S., 1992. Yeasts in Factory Brine of Feta Cheese. *Australian Journal Dairy Technology*, 47: 68-71.
- Kavas G., Kinik O., Uysal E., Kilic S., Çelikel N. ve Akbulut N., 2006. Characterisation of Yeasts Isolated from Artisanal Turkish Dairy Products. *International Journal of Dairy Science*, 1(1):44-50.
- Koburger J.A., 1972. Fungi in Foods: III. The Enumeration of Lipolytic and Proteolytic Organisms. *Journal of Milk and Food Technology*, 35: 117–118.
- Kurtzman C.P., 2003. Phylogenetic Circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and Other Members of the *Saccharomycetaceae*, and The Proposal of The New Genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and

- Zygorulaspota*. *FEMS Yeast Research*, 4: 233- 245.
- Kurtzman, C.P., 1992. rRNA Sequence Comparisons for Assessing Phylogenetic Relationships Among Yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 1-6.
- Kurtzman, C.P., 1993. Systematics of the Ascomycetous Yeasts Assessed from Ribosomal RNA Sequence Divergence. *Antonie Leeuwenhoek*, 63: 165-174.
- La Guerche S., Garcia C., Darriet P., Dobourdiou D. ve Labarere J., 2004. Characterization of *Penicillium* Species Isolated from Grape Berries by Their Internal Transcribed Spacer (ITS1) Sequences and by Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Geosmin Production. *Current Microbiology*, 48: 405-411.
- Lachance M.A., 2007. Current Status of *Kluyveromyces* Systematics. *FEMS Yeast Research*, 7: 642–645.
- Ladrière J.M., Delcour J. ve Vandenhoute J., 1993. Sequence of a Gene Coding for a Cytoplasmic Alcohol Dehydrogenase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 12424. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1173: 99–101.
- Ladrière J.M., Georis I., Guerineau M. ve Vandenhoute J., 2000. *Kluyveromyces marxianus* Exhibits an Ancestral *Saccharomyces cerevisiae* Genome Organization Downstream of ADH2. *Gene* 255: 83–91.
- Laloux O., Cassart J.P., Delcour J., van Beeumen J. ve Vandenhoute J., 1991. Cloning and Sequencing of the Inulinase Gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Letters*, 289: 64–68.
- Lane M.M., Burke N., Karreman R., Wolfe K.H., O’Byrne C. ve Morrissey J., 211. Physiological and Metabolic Diversity in the Yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100: 507-519.
- Leboffe M. ve Pierce B., 2006. *Microbiology Laboratory Theory and Application* (2nd ed.). Morton Publishing Company, Englewood, CO.
- Lee S.B. ve Taylor J.W., 1992. Phylogeny of Five Funguslike Protoctistan *Phytophthora* Species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 636-653.
- Lehmann P.F., Lin D. ve Lasker B.A., 1992. Genotypic Identification and Characterization of Species and Strains Within the Genus *Candida* by Using Random Amplified Polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(12):3249.

- Lenoir J., 1984. The Surface Flora and Its Role in the Ripening of Cheese. *International Dairy Federation*, 171: 3–20.
- Lertwattanasakul N., Rodrussamee N., Suprayogi., Limtong S., Thanonkeo P., Kosaka T. ve Yamada M., 2011. Utilization Capability of Sucrose, Raffinose and Inulin and Its Less-sensitiveness to Glucose Repression in Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3. *AMB Express*, 1:20.
- Llorente B., Malpertuy A., Blandin G., Artiguenave F., wincker P. ve Dujon B., 2000. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 12 *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Letters*, 487(1): 71-75.
- Lodder J., 1970. *The Yeasts: a Taxonomic Study* ( 2nd ed.). NHPC, Amsterdam
- Lodder J., Kreger-van Rij N.J.W., 1952. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. NHPC, Amsterdam
- Lopandic K., Zelger S., Bánszky L.K., Eliskases-Lechner F. ve Prillinger H., 2004. Identification of Yeasts Associated with Milk Products Using Traditional and Molecular Techniques. *Food Microbiology*, 23 (4): 315-410.
- Loureiro V. ve Querol A., 1999. The Prevalence and Control of Spoilage Yeasts in Foods and Beverages, *Trends in Food Science & Technology*, 10(11): 356-365.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. ve Randall R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Luftiyya L. ve Johnston M., 1996. Two Zinc-finger-Containing Repressors are Responsible for Glucose Repression of SUC2 Expression. *Molecular Cell Biology*. 16: 4790–4797.
- Madigan M.T., Martinko J.M. ve Parker J., 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, (10th ed.). Pirentice, Pearson Educatin International.
- Martins D.B:G., Souza C.G., Simoes D.A. ve Moraes M.A., 2002. The  $\beta$ -galactosidase Activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 Decreases by High Concentrations of Galactose. *Current Microbiology*, 44(5): 379-382.
- McElroy D., Moran P., Bermingham E. ve Kornfield I., 1991. *REAP–The Restriction Enzyme Analyses Package. Version 4.0*. Department of Zoology, Migratory Fish Research Institute and Center for Marine Studies, University of Maine, OR.
- Milkowski C., Krampe S., Weirich J., Hasse V., Boles E. ve Breunig K.D., 2001. Feedback Regulation of Glucose Transporter Gene Transcription in *Kluyveromyces lactis* by

- Glucose Uptake. *Journal of Bacteriology*, 183(18): 5223.
- Molnar O., Prillinger H., Lopandic K., Weigang F. Ve Staudache E., 1996. Analysis of Coenzyme Q Systems, Monosaccharide Patterns of Purified Cell Walls and RAPD-PCR Patterns in the Genus *Kluyveromyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 67–78.
- Nam S.W., Yoda K. ve Yamasaki M., 1993. Secretion and Localization of Invertase and Inulinase in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 15: 1049-1054.
- Naumov G.I., 1988. Species Identification of *Zygodospora Kudriavzev* Emend. *Mikrobiologiya*, 57(1): 114-118.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Nikitina T.N., Sadykova Zh., ve Kondratieva V.I., 2012. Molecular Genetic and Physiological Differentiation of *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*: Analysis of Strains from The All-Russian Collection of Microorganisms (VKM). *Microbiology*, 81: 216-223.
- Nehlin J.O. ve Ronne H., 1990. Yeast MIG1 Repressor is Related to the Mammalian Early Growth Response and Wilms' Tumour Finger Proteins. *EMBO Journal*, 9: 2891–2898.
- Nei M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nelson G. ve Young T.W., 1986. Yeast Extracellular Proteolytic Enzymes for Chill-proofing Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 92: 599-603.
- Not-so-distant Cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 1115–1128.
- O'Donnell K. ve Cigelnik E. 1997. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types Within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7:103–116.
- Okabe I., Arakawa M. ve Matsumoto N. 2001. ITS Polymorphism Within a Single Strain of *Sclerotium rolfsii*. *Mycoscience*, 42:107–113.
- Otha K., Suetsugu N. Ve Nakamura T., 2002. Purification and Properties of An Extracellular Inulinase From *Rhizopus* sp. Strain TN- 96. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 78-80.
- Öztürk T. ve Uçar F., 2001. Çesitli Kaynaklardan Ekstraselüler Lipaz Üreten Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu. *Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi*, 25 (3): 77-85.
- Pandey A., 2003. Solid State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84.

- Pandey A., Soccol CR. ve Mitchell D.A., 2000. New Development in Solid State Fermentation: I -Bioprocess and Bioproducts. *Process Biochemistry*, 35: 1153-1169.
- Pereira-Dias S., Potes M.E., Marinho A., Malfeito-Ferreira M. ve Loureiro V., 2000. Characterisation of Yeast Flora Isolated from an Artisanal Portuguese Ewe's Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 55–63.
- Perez L., Martinez P., Codon A. C. ve Benitez T., 1995. Physiological and Molecular Characterization of Flor Yeasts : Polymorphisms of Flor Yeast Populations. *Yeast*, 11: 1399-1411.
- Phelps C.F., 1965. The Physical Properties of Inulin Solutions. *Biochemical Journal*, 95: 41-47.
- Pitt J.I. ve Hocking A.D., 1999. *Fungi and Fungi Spoilage* (2nd ed.). Aspen Publishers, Gaithersburg, MD. Rippon. *Medical Mycology*.
- Prior C., Mamessier P., Fukuhara H., Chen X.J. ve Wesolowski-Louvel M., 1993. The Hexokinase Gene is Required for Transcriptional Regulation of the Glucose Transporter Gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(7): 3882-3889.
- Querol A., Guillamón J.M., Sabaté J., Barrio E. ve Cano J., 1998. Rapid Identification of Wine yeast Species Based on RFLP Analysis of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region. *Archives of Microbiology*, 169: 387–392.
- Rajoka M.I., Khan S. ve Shahid R., 2003. Kinetics and Regulation Studies of the Production of  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Grown on Different Substrates. *Food Technology and Biotechnology*, 41 (4): 315–320.
- Ramirez-Zavala B., Mercado-Flores Y., Hernandez-Rodriguez C. ve Villa-Tanaca L., 2004. Purification and Characterization of a Lysine Aminopeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Microbiology Letters*, 235: 369–375.
- Rao B.Y.K., Godbole S.S. ve D'Souza S.F., 1988. Preparation of Lactose Free Milk by Fermentation Using Immobilised *Saccharomyces fragilis*. *Biotechnology Letters*, 10: 427–430.
- Raynal A, ve Guerineau M., 1984. Cloning and Expression of the Structural Gene for  $\beta$ -glucosidase of *Kluyveromyces fragilis* in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, 195:108–115.
- Rech R., Cassini C.F., Secchi A. R. Ve Ayub M.A.Z., 1999. Utilization of



- Proteinhydrolyzed Cheese Whey for The Production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 91–96.
- Rodrussamee N., Lertwattanasakul N., Hirata K., Suprayogi., Limtong S., Kosaka T. ve Yamada M., 2011., Growth and Ethanol Fermentation Ability on Hexose and Pentose Sugars and Glucose Effect Under Various Conditions in Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1573–1586.
- Rolland S., Hnatova M., Lemaire M., Leal-Sanchez J. Ve wesolowski-Louvel M., 2006. Connection Between the Gag4 Glucose Sensor and the KIRgt1 Repressor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics*, 174:617-626.
- Romano A., Casaregola S., Torre P. ve Gaillardin C., 1996. Use of RAPD and Mitochondrial DNA RFLP for Typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* Yeast Strains Isolated from Cheese. *Systematic and Applied Microbiology*, 9: 255-264.
- Romano P., Ricciardi A., Salzano G. ve Suzzi G., 2001. Yeasts from Water Mozzarella, a Traditional Cheese of the Mediterranean Area. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 45–51.
- Roostita R. ve Fleet G.H., 1996. The Occurrence and Growth of Yeast in Camembert and Blue-veined Cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 393–404.
- Rothe C. ve Lehle L., 1998. Sorting of Invertase Signal Peptide Mutants in Yeast Dependent and Independent on the Signal Recognition Particle. *European Journal of Biochemistry*, 252: 16-24.
- Rouwenhorst R.J., Hensing M., Verbakel J., Scheffers W.A. ve van Dijken J.P., 1990a. Structure and Properties of The Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3337–3345.
- Rouwenhorst R.J., Ritmeester W.S., Scheffers W.A. ve van Dijken J.P., 1990b. Localization of Inulinase and Invertase in *Kluyveromyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3329–3336.
- Rubio-Teixeira M., 2005. A Comparative Analysis of the GAL Genetic Switch Between not-so-distant Cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 5:1115-1128.
- Salazar O., Julian M.C.ve Rubia V., 2000. Primers Based on Specific rDNA-ITS

- Sequences for PCR Detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 Subgroups and Ecological Types and Binucleate *Rhizoctonia*. *Mycological Research*, 104: 281-285.
- Santisteban S., Bernardo O., Converti A. ve Filho M.H., 2009. Effects of Carbon and Nitrogen Sources and Oxygenation on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152: 249–261.
- Savova I. ve Nikolova M., 2002. Isolation and Taxonomy Study of Yeast Strains from Bulgaria Dairy Products. *Journal of Culture Collections*, 3: 59-65.
- Scherrer R., Loudon L. ve Gerhardt P., 1974. Porosity of the Yeast Cell Wall and Membrane. *Journal of Bacteriology*, 118: 534-540.
- Schneider S., Roessli D. ve Excoffier L., 1996. Arlequin: a Software Package for Population Genetics. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47- 50.
- Schwan R.F., Cooper R.M., Rose A.H. ve Wheals A.E., 1996. Endopolygalacturonase of the Yeast *Kluyveromyces marxianus* is Constitutive, Highly Active on Native Pectin and is the Main Extracellular Protein. In: Visser J, Voragen AGJ (eds) *Progress in Biotechnology 14: Pectins and Pectinases*. Elsevier Press, Amsterdam. 861-868.
- Seeliger H.P.R., 1956. Use of a Urease Test for the Screening and Identification of Cryptococci. *Journal of Bacteriology*, 72: 127-131.
- Selvakumar P., Pandey A., Soccol C.R. ve Nigam P., 1999. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. *Science and Technology*, 77: 1.
- Sheetz R.M. ve Dickson R.C., 1981; *LAC4* is the Structural Gene for  $\beta$ -Galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 98: 719-745.
- Sherman F., ;Fink G.R. ve Hicks J.B., 1986. *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (USA)
- Sidberg D.G. ve Lachance M., 1983. Speciation, Species Delineation and Electrophoretic Isoenzyme Patterns of the Type Strains of *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. *International ;Journal of Systematic Bacteriology*, 822-828.
- Siekstele R., Bartkeviciute D. ve Sasnauskas K., 1999. Cloning , Targeted Disruption and Heterologous Expression of the *Kluyveromyces marxianus* Endopolygalacturonase Gene (*EPG1*). *Yeast*, 15: 311-322.

- Singh R.S., Sooch B.S. ve Puri M., 2007. Optimization of Medium and Process Parameters for the Production of Inulinase from a Newly Isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresource Technology*, 98: 2518–2525.
- Snyder H.E. ve Phaff H.J., 1960. Studies on a  $\beta$ -fructosidase (Inulinase) Produced by *Saccharomyces fragilis*. *Antonie van Leewenhoek Journal of Microbiology Serology*, 26: 443-452.
- Souciet J.L., Aigle M., Artiguenave F., Blandin G., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Brottier P., Casaregola S., Montigny J., Dujon B., Durrens P., Gaillardin C., Lepingle A., Llorente B., Malpertuy A., Neuveglise C., Ozier-Kalogeropoulos O., Potier S., Saurin W., Tekaia F., Toffano-Nioche C., Wincker P., Wesolowski-Louvel M. ve Weissenbach J., 2000. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 1. A Set of Yeast Species for Molecular Evolution Studies. *FEBS Letters* 487: 312.
- Spencer J., Rawling S., Stratford M., Steels H., Novodvorska M., Archer D.B. ve Chandra S., 2011. Yeast Identification: Reassessment of Assimilation Tests as Sole Universal Identifiers. *Letters in Applied Microbiology*, 53 (5): 503-508.
- Suleau A., Gourdon P., Reitz-Ausseur J. ve Casaregola S., 2006. Transcriptomic Analysis of Extensive Changes in Metabolic Regulation in *Kluyveromyces lactis* Strains. *Eukaryotic Cell*, 1360-1370.
- Suzuki Y., Nogi Y., Abe A. ve Fukasawa T., 1988. GAL11 Protein, An Auxiliary Transcription Activator for Genes Encoding Galactose-metabolizing Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 8(11): 4991.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S. ve Fisher M. C., 2000. Phylogenetic Species Recognition and Species Concept in Fungi. *Fungal Genetic and Biology*, 31: 21-32.
- Tempel T., 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(4): 263-270.
- Tornadijo E., Fresno J.M., Sarmiento R.M. ve Carbalho J., 1998. Study of the Yeasts During the Ripening Process of Armada Cheeses from Raw Goat's Milk. *Lait*, 78: 647–649.
- Torok T., Rockhold D. ve King A.D., 1993. Use of Electrophoretic Karyotyping and DNA-DNA Hybridization in Yeast Identification. *International Journal of Food Microbiology*, 9: 63-80.

- Trumbly R. J., 1992. Glucose Repression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 6:15-21.
- van der Walt J.P., 1956. *Kluyveromyces*- A New Yeast Genus of the Endomycetales. *Antonie van Leeuwenhoek*, 22: 265–272.
- Van Dijken J.P., Weusthuis R.A. ve Pronk J.T., 1993. Kinetics of Growth and Sugar Consumption in Yeasts. *Antonie Leewenhoek*, 63 (3-4): 343-352.
- Vandamme E.J.ve Derycke D.G., 1983. Microbial Inulinases: Fermentation Process, Properties and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 29: 139–176.
- Vaughan Martini A. ve Martini A., 1985. Deoxyribonucleic Acid Relatedness Among Species of the Genus *Saccharomyces sensu stricto*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35: 508-511.
- Vaughan Martini A. ve Martini A., 1987. Taxonomic Revision of the Yeast Genus *Kluyveromyces* by Nuclear Deoxyribonucleic Acid Reassociation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 381-385.
- Venema J. ve Tollervey D., 1999. Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Reviews of Genetics*, 33: 261-311.
- Versavaud A. ve Hallet I.N., 1995. Pulsed-field Gel Electrophoresis Combined with Rare-cutting Endonucleases for Strain Identification of *Candida famata*, *Kloeckera apiculata* and *Schizosaccharomyces pombe* with Chromosome Number and Size Estimation of the Two Former. *Systematic and Applied Microbiology*, 8: 303-309.
- Verschoor A., 1998. Three-dimensional Structure of the Yeast Ribosome. *Nucleic Acids Researches*, 26 (2): 655-661.
- Viljoen B.C. ve Greyling T., 1995. Yeasts Associated with Cheddar and Gouda Making. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 79–88.
- Viljoen B.C. ve Kock J.L.F., 1989. A Taxonomic Study of the Yeast Genus *Candida* Berkhout. *Systematic and Applied Microbiology*, 12 (1): 91-102.
- Viljoen B.C. ve Welthagen J.J., 1998. Yeast Profile in Gouda Cheese During Processing and Ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 41:185-194.
- Visser J. ve Voragen A.G.J., 1996. *Progress in Biotechnology 14:Pectins and pectinases*. Elsevier, Amsterdam .Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wang D. M. ve Yao Y. J., 2005. Intrastrain Internal Transcribed Spacer Heterogeneity in *Ganoderma* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 51:113–121.
- Weir B.S., 1996. *Genetic Data Analysis II*. Sunderland, MA.

- Weir, B.S., ve Cockerham C.C., 1984. Estimating *F*-statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Weirich J., Goffrini P., Kuger P., Ferrero I. ve Breunig K.D., 1997. Influence of Mutations in Hexose-transporter Genes on Glucose Repression in *Kluyveromyces lactis*. *European Journal of Biochemistry*, 249: 248-257.
- Welthagen J.J. ve Viljoen B.C., 1999. The Isolation and Identification of Yeasts Obtained During the Manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. *Food Microbiology*, 16: 63–73.
- Wesolowski-Louvel M., Breunig K.D. ve Fukuhara H., 1996. *Kluyveromyces lactis* In: K. Wolf Non-conventional Yeast in Biotechnology. *Heidelberg: Springer- Verlag*, 139- 201.
- Wesolowski-Louvel M., Goffrini P., Ferrero I. Ve Fukuhara H., 1992. Glucose Transport in the *Kluyveromyces lactis*. *Molecular General Genetic*. 33: 89-96.
- Westall S. ve Filtenborg O., 1998. Yeast Occurrence in Danish Feta Cheese. *Food Microbiology*, 15: 215–222.
- White T.J., Bruns T., Lee S. ve Taylor J., 1990. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* . Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., and White T. J., eds. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Wiedemuth C. ve Breunig K.D., 2005. Role of Snf1p in Regulation of Intracellular Sorting of the Lactose and Galactose Transporter Lac12p in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell*, 4(4):716.
- Witte M. M ve Dickson R. C., 1988. Cysteine Residues in the Zinc Finger and Amino Acids Adjacent to the Finger are Necessary for DNA Binding by the LAC9 Regulatory Protein of *Kluyveromyces lactis*. *Molecular and Cellular Biology*, 8: 3726-3733.
- Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P. ve Woods G., 2006. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* ( 6th ed.). Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Wojtatowicz M., Polomska X., Juszczak P., Cadez N., Raspor P. ve Robak M., 2007. Comparison of Physiological and PCR-RFLP rDNA Identification of Yeast Species Commonly Found in Cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57:221-226.

Zachariae W., Zenke F.T., Lunkes A. ve Breunig K.D., 1993. Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are Highly Conserved But Contribute Differently to Glucose Repression of The Galactose Regulon. *Molecular and Cellular Biology*, 13(12): 7566.

<b>ÇİZELGELER</b>	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 3.1. Çanakkale yerel pazarında bulunan ürün satıcıları ve alınan örnekler.....	16
Çizelge 3.2. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	19
Çizelge 3.3. PCR reaksiyon şartları .....	19
Çizelge 3.4. Restriksiyon enzimlerinin kesim işlemi için reaksiyon bileşenleri.	20
Çizelge 4.1. Süt ve süt ürünlerinde belirlenen maya yoğunlukları .....	27
Çizelge 4.2. Toplanan örneklerdeki ortalama maya yoğunluğu.....	27
Çizelge 4.3. İzole edilen maya suşlarının glikoz ve laktoz içeren besi ortamlarında farklı sıcaklıklarda üreme testleri.....	29
Çizelge 4.4. Tanımlanan maya türlerinin süt ve süt ürünlerine göre dağılımı ve izolat sayıları.....	30
Çizelge 4.5. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının örneklerle göre dağılımı ve kodları.....	31
Çizelge 4.6. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının glikoz, galaktoz ve sukroz içeren zengin üreme ortamında fermentasyon testleri.....	32
Çizelge 4.7. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının laktoz ve gliserol içeren zengin üreme ortamında fermentasyon testleri .....	33
Çizelge 4.8. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının farklı karbon ve azot kaynaklarında asimilasyon testleri-1.....	34
Çizelge 4.9. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının farklı karbon ve azot kaynaklarında asimilasyon testleri-2.....	35
Çizelge 4.10. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ve referans maya suşunun <i>HaeIII</i> , <i>HhaI</i> , <i>HinfI</i> , <i>HpaII</i> ve <i>AluI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen bant büyüklükleri.....	63
Çizelge 4.11. Restriksiyon kesimi sonrası oluşan bant profilleri.....	64
Çizelge 4.12. Bileşik Haplotipler ve <i>K. marxianus</i> maya popülasyonunda bulunan haplotiplerin frekansı.....	65

Çizelge 4.13. Populasyon içi haplotip ve nükleotid çeşitliliğinin ortalaması ve standart hatası (Mean±SE).....	66
Çizelge 4.14. <i>K. marxianus</i> maya populasyonları arasındaki nükleotid çeşitliliği (pair-wise nucleotide diversity) (üst diagonal) ve genetik farklılaşma (nucleotide divergence) (alt diagonal).....	66
Çizelge 4.15. <i>K. marxianus</i> maya populasyonlarının AMOVA analizi (*1000 permütasyon sonrası $P < 0.01$ ; Va, Vb, ve Vc birleşik kovaryans komponentleri (Associate Covariance Components)).....	67
Çizelge 4. 16. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ve referans maya suşunun proteaz, lipaz ve üreaz aktiviteleri	70
Çizelge 4. 17. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının (Km1-Km30) repres ve derepres şartlarda invertaz enzim aktiviteleri.....	72
Çizelge 4. 18. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının (Km31-Km60) repres ve derepres şartlarda invertaz enzim aktiviteleri.....	73
Çizelge 4. 19. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının (Km61-Km66) ve referans maya suşunun repres ve derepres şartlarda invertaz enzim aktiviteleri	74
Çizelge 4.20. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının (Km1-Km30) repres ve derepres şartlarda $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri.....	75
Çizelge 4.21. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının (Km31-Km60) repres ve derepres şartlarda $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri.....	76
Çizelge 4.22. İzole edilen <i>K. marxianus</i> maya suşlarının (Km61-Km66) ve referans maya suşunun repres ve derepres şartlarda $\beta$ -galaktozidaz enzim aktiviteleri.....	77
Çizelge 4.23. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının repres (R-1: %2 glikoz ve R-2: %4 glikoz) ve derepres (DR: %2 gliserol) şartlarda invertaz ve inülinaz enzim aktiviteleri.....	78
Çizelge 4.24. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının zengin ve minimal ortamda repres ve derepres şartlarda enzim aktiviteleri.....	84



## ŞEKİLLER

## Sayfa No

Şekil 1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya türünde ribozomal DNA tekrarları ve çevresindeki diziler.....	3
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan marker hariteası.....	20
Şekil 4.1. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Km1-Km15, Km67, Km68 ve Km69).....	37
Şekil 4.2. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Km16-Km31 ve Km70).....	37
Şekil 4.3. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Km32-Km49).....	38
Şekil 4.4. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Km50-Km66 ve Kontrol).....	38
Şekil 4.5. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km4).....	40
Şekil 4.6. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km5-Km22).....	41
Şekil 4.7. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km23-Km40).....	42
Şekil 4.8. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km41-Km58).....	43
Şekil 4.9. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km59-Km66).....	44
Şekil 4.10. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HhaI</i> ( <i>CfoI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km4).....	44

Şekil 4.11. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HhaI</i> ( <i>CfoI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km5-Km22).....	45
Şekil 4.12. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HhaI</i> ( <i>CfoI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km23-Km40).....	46
Şekil 4.13. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HhaI</i> ( <i>CfoI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km41-Km58).....	47
Şekil 4.14. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HhaI</i> ( <i>CfoI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km59-Km66).....	48
Şekil 4.15. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km4).....	48
Şekil 4.16. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km5-Km12).....	49
Şekil 4.17. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km13-Km30 ...)	50
Şekil 4.18. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km31-Km48).....	51
Şekil 4.19. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km49-Km66).....	52
Şekil 4.20. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HpaII</i> ( <i>MspI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km4).....	53
Şekil 4.21. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HpaII</i> ( <i>MspI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km5-Km12).....	53
Şekil 4.22. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HpaII</i> ( <i>MspI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km13-Km30).....	54
Şekil 4.23. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HpaII</i> ( <i>MspI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km31-Km48).....	55

Şekil 4.24. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HpaII</i> ( <i>MspI</i> ) enzimi ile kesim sonuçları (Km49-Km66).....	56
Şekil 4.25. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Alu I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km1-Km18).....	57
Şekil 4.26. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Alu I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km19-Km36).....	58
Şekil 4.27. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Alu I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km37-Km54).....	59
Şekil 4.28. <i>K. marxianus</i> maya suşlarının ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>Alu I</i> enzimi ile kesim sonuçları (Km55-Km66) sonuçları.....	60
Şekil 4.29 <i>K. marxianus</i> referans maya suşunun ITS bölgesinin PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> , <i>HhaI</i> , <i>HinfI</i> , <i>HpaII</i> ve <i>AluI</i> restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçları.....	61
Şekil 4.30. Farklı profilleri içeren maya suşlarının restriksiyon kesim sonucu ile kesim sonuçları.....	62
Şekil 4.31. <i>K.marxianus</i> haplotiplerinin köksüz Dollo parsimoni ağacı.....	67
Şekil 4.32. <i>K. marxianus</i> maya suşunun (Km5) repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında enzim aktiviteleri.....	80
Şekil 4.33. <i>K. marxianus</i> maya suşunun (Km38) repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında enzim aktiviteleri.....	81
Şekil 4.34. <i>K. marxianus</i> maya suşunun (Km63) repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında enzim aktiviteleri.....	82
Şekil 4.35. Referans <i>K. marxianus</i> maya suşunun repres ve derepres şartlarda zengin ve minimal üreme ortamında enzim aktiviteleri.....	83

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Tuğba ÇELİK

Doğum Yeri: BURSA

Doğum Tarihi: 19.11.1988

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi /Fen- Edebiyat Fakültesi / Biyoloji  
(Haziran- 2010)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi /Fen- Edebiyat Fakültesi /  
Biyoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI –Diğer

b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

- 1- Tülay Bican Süerdem, İlknur N.Çıldır, Tuğba Çelik, Candan Şahin, Hanife Akyalçın' 2011: Detecting the concentration of indoor microfungi, bacteria, yeast and pollen in child day care centers of Çanakkale (Turkey) IV. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu. İTÜ, İstanbul 27-Nisan 2011. (Poster Presentation).
- 2- T. Turgut Genç, İ. N. Çıldır, T.Çelik ve N. Demir, 2011. Characterization of yeast flora isolated from cheeses at central Anatolia, Turkey. XVI. Congress of European mycologists, Halkidiki 19-23September 2011. (Oral Presentation).
- 3- T. Turgut Genç, İ. N. Çıldır ve T.Çelik, 2011. Glycogen and trehalose accumulation in *Debaryomyces occidentalis* at different carbon sources. XVI. Congress of European mycologists ,Halkidiki 19-23 September 2011. (Oral Presentation)
- 4- Tülay Turgut Genç, İlknur N. Çıldır ve Tuğba Çelik, 2011: Extracellular Enzymatic Profiles of *Metschnikowia pulcherrima* Yeast Species Isolated From Grape Surface.7th. Balkan Microbiology Congress. Belgrad, Sırbistan. 25-28 October 2011 (Oral Presentation).
- 5- Tülay Turgut Genç, Tuğba Çelik ve İlknur N. Çıldır, 2011: Identification of Yeast

Species Isolated From Turkish Traditional Beverage, Ayran. 7th. Balkan Microbiology Congress. Belgrad, Sırbistan. 25-28 October 2011 (Poster Presentation).

6- Tuğba Çelik, Tülay Turgut Genç ve İlknur Nezahat Çıldır, 2012: *Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen Kluyveromyces marxianus* Maya Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi.3-7 Eylül 2012

7- Tuğba Çelik, ve Tülay Turgut Genç, 2012: *Kluyveromyces marxianus* Maya Türlerinin Bazı Hücre Dışı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi.3-7 Eylül 2012

8- Tülay Turgut Genç ve Tuğba Çelik, 2012: *Kluyveromyces marxianus* Maya Türlerinde Glikoz Baskılamasının  $\beta$ -Galaktozidaz Enzim Aktivitesine Etkileri. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi.3-7 Eylül 2012

9- Tülay Turgut Genç ve Tuğba Çelik, 2012: *Reserve Carbohydrate Accumulation in Pichia jadinii at Different Growth Conditions*. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi.3-7 Eylül 2012

10- Gizem Kaptan, Tülay Turgut Genç, İlknur Nezahat Çıldır, Tuğba Çelik, Berkay Öney ve Tülay Bican Süerdem. Çanakkale Şaraplık Üzümlerinden Yüksek İnvvertaz Enzim Aktivitesine Sahip Non-*Saccharomyces* Maya Türlerinin İzolasyonları ve İdentifikasyonları. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi.3-7 Eylül 2012

c) Katıldığı Projeler:

Proje Başlığı: ‘Süt ürünlerinden izole edilen *Kluyveromyces marxianus* maya türlerinin moleküler identifikasyonu ve hücre dışı bazı enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi’

Destekleyen Kuruluş: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu - Araştırma Projesi.

Proje no: 2012/007

Görevi: Proje Araştırmacısı

Başlangıç Tarihi: Ocak 2012. Bitiş Tarihi: Ocak 2014.

## İLETİŞİM

E-posta Adresi : [tugbacelik88@hotmail.com](mailto:tugbacelik88@hotmail.com)