

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

**BOZCAADA (ÇANAKKALE, TÜRKİYE) ÜZÜMLERİ**  
**YÜZEYİNDEN İZOLE EDİLEN NON-**  
**SACCHAROMYCES MAYA TÜRLERİNİN**  
**TANIMLANMASI VE MOLEKÜLER ANALİZİ**

**İlknur Nezahat ÇILDIR**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

Tezin sunulduğu tarih: **09.01.2012**

**Tez Danışmanı:**

**Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**İLKNUR NEZAHAT ÇILDIR**, tarafından **YRD. DOÇ. DR. TÜLAY TURGUT GENÇ** yönetiminde hazırlanan **“BOZCAADA (ÇANAKKALE, TÜRKİYE) ÜZÜMLERİ YÜZEYİNDEN İZOLE EDİLEN NON-SACCHAROMYCES MAYA TÜRLERİNİN TANIMLANMASI VE MOLEKÜLER ANALİZİ”** 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

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 09.01.2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans BAP tarafından 2010/196 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.**

**İlknur Nezahat ÇILDIR**

## 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.

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, tüm araştırmalarımda beraber çalıştığım, her türlü desteğini benden esirgemeyen çalışma ortağım ve çok değerli arkadaşım **Tuğba ÇELİK'**e teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca çalışmalarımın yürütülmesi esnasında manevi desteğinin yanı sıra çalışmalarımı 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 **Seriye ÇILDIR**, babam **Kadir ÇILDIR'**a ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

İlknur Nezahat ÇILDIR

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\mu$ l	Mikrolitre
bp	Baz çifti
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DNA	DeoksiriboNükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
g	Gram
M	Molar
ml	Mililitre
°C	Santigrat derece
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	RiboNükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Rotationperminute (Devir/dakika)
YGC	YeastExtractGlucoseChloramphenicolAgar
YPDA	YeastExtractPeptoneDextroseAgar
TAE	TrisEDTAAsetat

U.V.            ultra violet

Pmol           pikomol

## ÖZET

# BOZCAADA (ÇANAKKALE, TÜRKİYE) ÜZÜMLERİ YÜZEYİNDEN İZOLE EDİLENNON-SACCHAROMYCES MAYA TÜRLERİNİN TANIMLANMASI VE MOLEKÜLER ANALİZİ

İlknur Nezahat ÇILDIR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd.Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ

09.01.2012, 116 sayfa

Üzümler mayalar için oldukça uygun bir yaşam alanı olup üzüm yüzeyinde bulunan maya florası şarap kalitesini etkilemektedir. Fermentasyon florası yoğun olarak çalışılarak belirlenmesine rağmen üzüm yüzey florası oldukça az çalışılmıştır. Araştırmamızda Bozcaada bölgesinden toplanan üzümlerin yüzey maya florası belirlenmeye çalışılmıştır. *Metschnikowiapulcherrima* maya türü üzümlerden yoğun olarak izole edilen hücre dışına salgıladığı pulcherrimin pigmenti ile karakteristik bir maya türüdür. *M. pulcherrima* maya suşları arasında fenotipik, genetik ve biyokontrol özellikleri bakımından farklılıklar bulunmaktadır.

Bozcaada bölgesinde yetiştirilen Karasakız, Efes Karası, Çavuş, Atasarısı, Alphonse, Cinsaut, Kınalı Yapıncak, Cardinal, Karalahana, Pembe Gemre, Kokulu Kabak ve Cabernet araştırmamızda kullanılan üzüm çeşitleridir. Çalışmamızda 5 cinse ait 16 farklı maya türü belirlenmiştir. *Cryptococcuslaurentii*, *Cr. neoformans*, *Cr. albidus*, *Cr. humicola*, *Candidafamata*, *C. holmii*, *C. zeylanoides*, *C. sake*, *C. magnoliae*, *C. membranifaciens*, *Metschnikowiapulcherrima*, *Saccharomycescerevisiae*, *Kloeckeraapis*, *K. apiculata*, *Rhodotorulamucilaginosave R. glutinis* belirlenen maya türleridir. *M. pulcherrima* maya türü inulinaz enzim aktivitesi ile sukrozu hidrolize etmektedir. Farklı bakteri ve küf türlerine karşı *M. pulcherrima* maya türü farklı üreme ve pigment sentezi göstermektedir. Ayrıca farklı stres koşulları da üremeyi ve pigment sentezini etkilemektedir. Pulcherrimin pigment sentezinin amino asit biyosentezizyolu içinde gerçekleşme ihtimali yüksektir.

*M. pulcherrima* maya türlerinin 4 farklı haplotipe sahip olup, en fazla haplotip ve nukleotid çeşitliliğinin Kınalı Yapıncak *M. pulcherrima* maya populasyonlarında bulunduğu belirlendi. Her üzüm çeşidin yüzeyinde barındırdığı maya populasyonunun içindeki genetik varyansın yüksek olduğu, aynı bağda yetişen üzüm çeşitleri arasındaki varyansın ise düşük olduğu tespit edildi.

**Anahtar sözcükler:** Üzüm, maya, ITS, Bozcaada, Çanakkale, Türkiye, non-saccharomyces.



**ABSTRACT**  
**IDENTIFICATION AND MOLECULAR ANALYSIS OF NON-  
SACCAHROMYCES YEAST SPECIES ISOLATED FROM GRAPE SURFACE  
FROM BOZCAADA (ÇANAKKALE, TURKEY)**

İlknur Nezahat ÇILDIR

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

January 9 2012, 116 pages

Grape is mostly preferred habitat for the yeasts and the natural yeast flora on the grape berries affect the wine production. Even though, many study conducted on the identification of yeast species isolated from fermentation process, yeast flora on grape-berry surface is surprisingly poorly documented. In our research, we described yeast flora and diversity on grape berries collected from Bozcaada, Turkey. *Metschnikowia pulcherrima* yeast species are widely distributed on mature grapes and have extracellular pulcherrimin pigment synthesis. There is a variation in phenotypic, genetic and biocontrol characteristics among the strains of *M. pulcherrima*.

Grape varieties grown in Bozcaada, Karasakız, Efes Karası, Çavuş, Atasarısı, Alphonse, Cinsaut, KınalıYapıncak, Cardinal, Karalahana, PembeGemre, KokuluKabak, and Cabernet were used in our research. Sixteen different yeast species were identified as *Cryptococcus laurentii*, *Cr. neoformans*, *Cr. albidus*, *Cr. humicola*, *Candida. famata*, *C. holmii*, *C. zeylanoides*, *C. sake*, *C. magnoliae*, *C. membranifaciens*, *M. pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckeraapis*, *K. apiculata*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *R. glutinis*. Grape sucrose was hydrolysed by inulinase enzyme of *M. pulcherrima* yeast species. Antagonistic activity of *M. pulcherrima* yeast species to microorganisms became variable. Different stress conditions effect the growth and pulcherrimin synthesis. Pigment synthesis might be associated with the amino acid biosynthesis pathway.

*M. pulcherrima* yeast strains showed four haplotype patterns. Kınalı Yapıncak yeast population showed the highest nucleotide and haplotype diversity. Genetic variation within the grape yeast population was greater than the genetic variation between the yeast populations of grape varieties growing in the same vineyard.

**Keywords:** Grape, Yeast, ITS, Bozcaada, Çanakkale, Turkey, non-saccharomyces.

# İÇERİK

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
<b>BÖLÜM 1 – GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>10</b>
<b>BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Üzüm Örneklerinin Toplanması ve Maya İzolasyonu.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. İzole Edilen Maya Örneklerinin Tür Tanımlamaları.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Farklı Karbon Kaynaklarında Pulcherrimin Pigment Sentezinin</b>	
<b>Belirlenmesi.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Farklı Azot Kaynaklarında Pulcherrimin Pigment Sentezinin</b>	
<b>Belirlenmesi.....</b>	<b>16</b>
<b>3.5. Ozmotik Stres ve Isı Stresinde Pulcherrimin Pigment Sentezinin</b>	
<b>Belirlenmesi .....</b>	<b>17</b>
<b>3.6. Maya Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>18</b>
<b>3.7. Hücre Dışı Enzim Profillerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>19</b>
<b>3.8. Maya Türlerinin İnvertaz ve İnulinaz Aktivitelerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>19</b>
<b>3.9. Genomik DNA İzolasyonu.....</b>	<b>20</b>
<b>3.10. ITS1-5,8S-ITS2 Bölgelerinin Amplifikasyonu.....</b>	<b>21</b>
<b>3.11. Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi.....</b>	<b>23</b>

3.12. Restriksiyon Veri Analizi .....	23
3.13. DNA Dizi Analizi .....	24
<b>BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>25</b>
4.1. Maya Yoğunluğunun Üzüm Çeşitlerine Göre Dağılımı .....	25
4.2. Tanımlanan Maya Türleri ve Dağılımı .....	25
4.3. İzole Edilen <i>M. pulcherrima</i> Maya Türlerinin Üzüm Çeşitlerine Göre Dağılımı .....	31
4.4. Karbon Kaynağının Pulcherrimin Pigment Sentezine Etkisi .....	32
4.5. Azotun Pulcherrimin Pigment Sentezine Etkisi .....	37
4.6. Ozmotik Stresin ve Isı Stresinin <i>M. pulcherrima</i> Maya Türünün Üremesine ve Pulcherrimin Pigment Sentezine Etkisi .....	39
4.7. <i>M. pulcherrima</i> Maya Suşlarının Antifungal ve Antimikrobiyal Aktivitesi .....	42
4.8. <i>M. pulcherrima</i> Maya Türünün Hidrolitik Enzim Profilinin Belirlenmesi .....	45
4.9. <i>M. pulcherrima</i> Maya Türünde İnvertaz ve İnülinaz Enzim Aktiviteleri .....	49
4.10. <i>M. pulcherrima</i> Maya Türünden Genomik DNA İzolasyonu ve Amplifikasyonu .....	49
4.11. Restriksiyon Kesim Profilleri .....	51
4.12. Restriksiyon Kesim Bant Profilleri ve Veri Analizleri .....	72
4.13. Filogenetik Analiz Sonuçları .....	78
4.14. DNA Dizi Analizleri .....	81
<b>BÖLÜM 5- SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>89</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>99</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ .....</b>	<b>I</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ .....</b>	<b>III</b>

<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>VII</b>
-----------------------	------------

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

Mayalar değişik metabolik özellikleri nedeniyle doğada geniş dağılım alanına sahip fungi alemi içerisinde sınıflandırılan mikroorganizmalardır. Değişken çevre koşulları altında farklı besin kaynaklarını kullanarak çoğalabilirler (Tornai-Lehoczki ve ark., 2003). Bitkilerde, hayvanlarda ve bunlardan elde edilen ürünlerde özellikle gıdalarda, toprakta, sularda ve ekstrem koşullarda bulunabilirler. Özellikle pH değeri yüksek olan yoğun şeker veya tuz konsantrasyonuna sahip şartlarda üreyebilme yeteneğine sahiptirler. (Evans ve ark., 2004; Paraphailong ve Fleet, 1997).

Tek hücreli en basit ökaryotik organizmalar olan mayalar, laboratuvar koşullarında kolaylıkla çoğaltılabilmeleri, genetik düzeyde manipulasyonların yapılabilmesi ve genellikle patojenik olmamaları gibi nedenlerden dolayı moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılmaktadır (Arda, 1990). Ayrıca metillotrofik mayalar, heterolog gen ekspresyonu ve protein üretiminde kullanılırlar (Cregg ve Cereghino, 2000; Gellissen, 2000). Fermentasyon yeteneklerinin çok yüksek olması nedeniyle alkol, şarap, bira ve pasta endüstrisinde çok geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Lee, 1996). Ancak gerek bu ürünler gerekse meyve suları, süt ürünleri, sebzeler ve meyveler maya mikrobiotası tarafından kontamine olduğunda bozulmalara neden olabilirler. Bozulmaya yol açan maya suşu ve fizyolojik özellikleri gıda çeşidine göre değişiklik göstermektedir (Deak ve Beuchat, 1996; Baleiras-Couto ve ark., 1996). Sorbat ve benzoat gibi koruyucu madde içeren yiyeceklerde ise küflenmelere neden olurlar (Evans ve ark., 2004; Paraphailong ve Fleet, 1997).

Mayalar morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre teleomorfik ve anamorfik askomiset mayalar, telomorfik ve anamorfik basidiomiset mayalar olmak üzere iki farklı filogenetik grupta sınıflandırılırlar (Kurtzman ve Fell, 1998; Barnett ve ark., 1990; Krejer-van Rij, 1984). Tür düzeyinde bir mayanın tanımlanabilmesi için yaklaşık 1-3 hafta süren ve yaklaşık 60-100 morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test değerlendirmesi içeren oldukça uzun ve kompleks bir test sistem gereklidir (Deak 1995; Deak ve Beuchat, 1996; Barnett ve ark., 1990; Krejer-van Rij 1984; Lin ve Fung, 1987). Ayrıca toplam hücre proteininin analizi ve uzun zincirli yağ asitlerinin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi ile tür tanımlamaları da yapılmaktadır (Guillamon ve ark., 1993; van Vuuren ve van Der Meer, 1987; Vacanneyt ve ark., 1991; Augustyn ve ark., 1991; Cottrell ve ark., 1986;

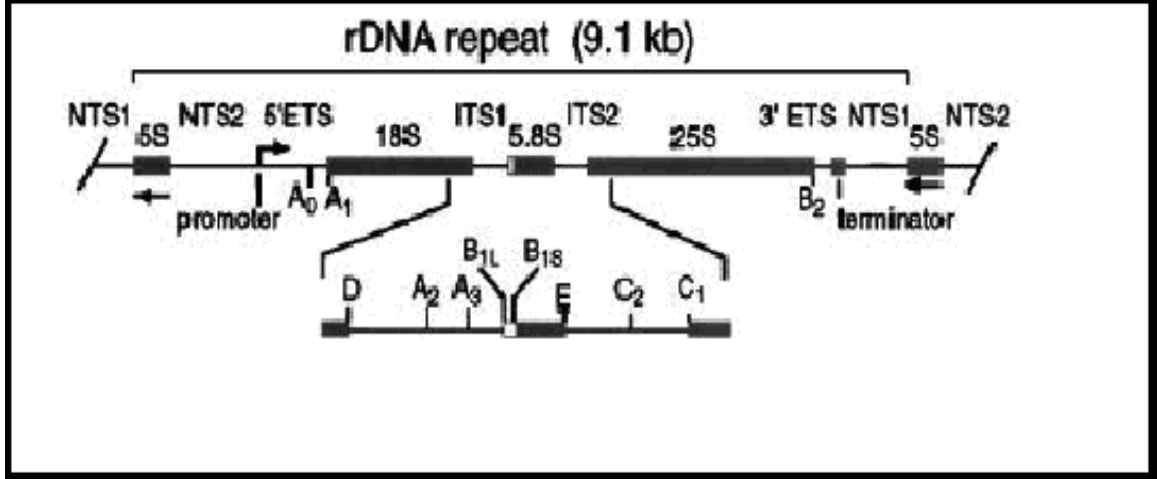
Moreira da Silva ve ark., 1994; Tredoux ve ark., 1987). Ancak bu metodlar hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak değiştiğinden tekrar edilebilirlikleri oldukça kısıtlıdır (Golden ve ark., 1994).

Klasik yöntemlerle yapılan tanımlamalarda oluşan hatalar ve bazı belirsizlikler aynı taksona farklı isimlerin verilmesine veya farklı gruplarda sınıflandırılmalarına neden olmaktadır. Literatürde geleneksel yöntemlere dayalı sınıflandırmalarda oldukça fazla yanlış araştırma mevcuttur (Reynolds ve Taylor, 1992). Maya türlerinin hızlı bir şekilde tanımlanmasına yönelik asimilasyon test kit sistemleri geliştirilmiştir, ancak bunların güvenilirlik oranı yine düşüktür. Bu tür kit sistemleri klinik çalışmalar için uygun olmakla beraber %100 güvenilir değildir. (Spencer ve ark., 2011).

Son yıllarda moleküler biyolojide gerçekleşen gelişmeler mayaların identifikasyonu için yeni yöntemler ortaya çıkarmıştır. DNA-DNA hibridizasyonu, mikrosatellit analizleri, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) 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; Baleiras Couto ve ark., 1994; Lopandic ve ark., 1996; Quesada ve Cenis, 1995; Versavaud ve Hallet, 1995; Belloch ve ark., 1997; Guillamon ve ark., 1994, 1997; Ibeas ve ark., 1997; Nadal ve ark., 1996; Pirez ve ark., 1995; Querol ve ark., 1992, Romano ve ark., 1996; Sabate ve ark., 2002). Ancak bu teknikler hızlı ve klasik yöntemlere göre daha güvenilir olmasına rağmen bazı türlerin tanımlanabilmesi için yeterli değildir (Esteve-Zarzoso ve ark., 1999; Taylor ve ark., 2000). Maya türlerinin hızlı şekilde identifikasyonu için ribosomal DNA bölgelerinin dizi analizleri son yıllarda çok sıklıkla kullanılmaktadır.

Ribozomlar oldukça korunmuş büyük ribonükleoprotein (RNP) partikülleri olup protein sentezinden sorumludur. Diğer ökaryotik hücrelerde olduğu gibi mayalarda da ribozomlar büyük 60S alt ünite (Large subunit, LSU) ve küçük 40S alt ünite (Small subunit, SSU) olmak üzere iki alt üniteden oluşmuştur. 25S, 5,8S, 5S ribozomal RNA molekülleri ile 42 protein büyük alt üniteyi (60S) oluştururken, 18S ribozomal RNA molekülü ve 32 protein küçük alt üniteyi (40S) oluşturmaktadır (Venema ve Tollervey, 1999; Verschoor ve ark., 1998). Ribozom oluşumu hücrenin değişik bölümlerinde gerçekleşen oldukça kompleks bir işlemdir. Ribozomal protein genleri nükleusta transkribe edildikten sonra translasyon için stoplazmaya geçerler. Translasyon sonunda sentezlenen r-proteinleri tekrar nükleusa oradan da nükleolusa geçerek polisistronik olarak sentezlenen

35S pre-rRNA molekülünü 18S, 5,8S ve 25S rRNA moleküllerine ayırır. Ayrılmış olan ribosomal alt üniteler (18S, 5,8S ve 25S rRNA) sitoplazmaya geçerek burada olgun ribozom molekülünü oluşturur (Şekil 1.1) (Venema ve Tollervey, 1999).

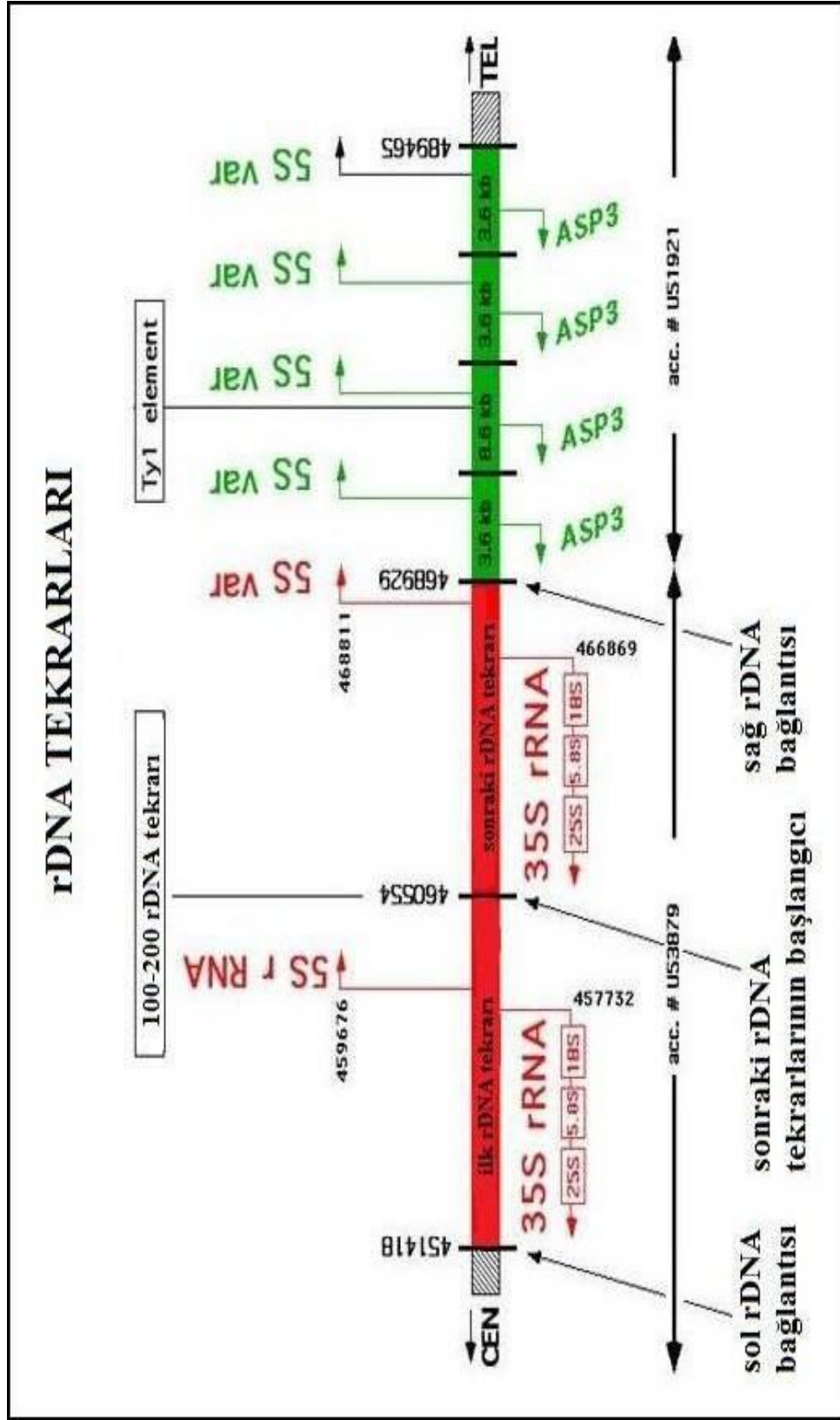


Şekil 1.1. *Saccharomyces cerevisiae* maya türünde ribozomal DNA tekrarının yapısı (35S pre-RNA operon yapısı) (Venema ve Tollervey, 1999).

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 nüklear ve mitokondriyal DNA'sında rRNA gen dizileri ardışık tekrar eden diziler olarak bulunur (Salazar ve ark., 2000; White ve ark., 1990) Bu diziler oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana gelmektedir. Nüklear 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 genidir. (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 mitokondriyal DNA içinde bulunmaz. Tekrar eden diziler sonunda yer alan 5S rDNA maya türüne bağlı olarak tekrar eden diziler içinde veya gen



kümesinin sonunda bulunur (Şekil 1.2) (Venema ve Tollervey, 1999; Johnston ve ark., 1997).



Şekil 1.2. *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 durum bu bölgelerin cins içindeki türler arasında (interspesifik) veya tür içindeki populasyonlar arasındaki (intraspesifik) çalışmalarda kullanılmaktadır. Kompleks ITS bölgeleri ve korunmuş 5,8S rRNA kodlu gen bölgesi türü (intraspesifik) akrabalıkların belirlenmesinde kullanılırken, 18S ve 25S rRNA gen bölgeleri daha uzak türler arası (interspesifik) akrabalıkların belirlenmesinde kullanışlıdır (Cai ve ark., 1996; James ve ark., 1996; Kurtzman, 1992, 1993). Ribozomal bölgelerin hep birlikte evrimleşmesinden (concerted evolution) dolayı ITS bölgeleri düşük intraspesifik polimorfizm ve yüksek interspesifik varyasyon gösterirler (Li, 1997). Bu yöntem *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve şaraptaki bazı maya türlerinin sınıflandırılmasında oldukça kullanışlıdır (Huffman ve ark., 1992; Molina ve ark., 1992; Valente ve ark., 1996; Wyder ve Puhan, 1997; Belloch ve ark., 1998; Guillaumon ve ark., 1998).

Kodlanmayan iki değişken bölgeden oluşan ITS bölgesi, korunmuş 18S ile 5.8S arasında (ITS1) ve 5.8S ile 25S arasında (ITS2) yer almaktadır. ITS bölgesi (ITS1 ve ITS2) yaklaşık 400 ile 800 bp büyüklükte olup universal tek bir primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılabilir. Ribozomal DNA bölgelerinin çok fazla tekrarlı olması nedeniyle degrade olan DNA örneklerinden dahi kolaylıkla çoğaltılabilir. ITS bölgeleri korunmamış değişken bölgeler olduğu için filogenetik analizler için rahatlıkla kullanılabilir. Türler özgül ITS problemleri kütüphane oluşturmadan rahatlıkla üretilebilir. Tüm bu nedenlerden dolayı ITS bölgeleri fungus türlerinin moleküler karakterizasyonlarında ve özellikle filogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır (White ve ark., 1990, Bruns ve ark., 1991, Lee ve Taylor, 1992). Son yıllarda şarap maya türlerinin 5,8S ve ITS içeren ribozomal DNA bölgelerinin PCR-RFLP ve dizi analizi yöntemleri kullanılarak hızlı bir şekilde identifikasyonu yapılmaktadır (Clemente-Jimenez ve ark., 2004; Combina ve ark., 2005; Nisiotou ve Nychas, 2007; Zott ve ark., 2008). Örneğin 25 farklı cinse ait 132 maya türünü belirlemek için 5.8S rRNA, ITS1 ve ITS2 bölgeleri kullanılarak RFLP analizi yapılmıştır (Esteve-Zarzoso ve ark., 1999).

Bazı maya türleri fermentasyon hızına, şarap aromasına ve şarap kalitesine olan etkileri nedeniyle şarap üretiminde kullanılmaktadır. (Fleet, 2003; Loureiro ve Malfeito-Ferreira, 2003). Şarap, üzüm suyunun non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* maya türlerinin birbirini izleyen aktiviteleri sonucu oluşan alkollü bir içecektir. Şarap

fermentasyonu için yaygın olarak kullanılan *S. cerevisiae* maya türüdür. *Saccharomyces* dışındaki maya türleri şarabın kalitesini belirleyen ve aromasına katkıda bulunan bazı ikincil fermentasyon ürünleri yapabilmeleri nedeniyle oldukça önemlidir. Üzüm yüzeyinde bulunan *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora*, *Kluyveromyces* ve *Zygosaccharomyces* gibi bazı non-*Saccharomyces* maya türleri şarabın başlangıç mikroflorasını oluşturur. Fermentasyon sırasında alkol oranının artmaya (% 5 - % 7) başlamasıyla beraber güçlü fermentasyon yeteneği olan ve etanol toleransına sahip *Saccharomyces* maya türleri floraya hâkim olur (Fleet ve Heard, 1993; Zambonelli, 1998). Fermentasyon sırası içerisindeki non-*Saccharomyces* mayaların başlangıçtaki aktivitesi şarabın aroması için önemlidir. Bu maya türleri glikosidaz, esteraz, proteaz gibi değişik hücre dışı enzim aktivitelerine sahip olup farklı enzimatik reaksiyonlarla uçucu olan ve olmayan yan ürünlerin oluşumundan sorumludur (Romano ve ark., 2003; Ciani ve ark., 2006; Domizio ve ark., 2007).

Üzüm, şarap üretiminde en çok kullanılan meyve olmakla birlikte elma, şeftali ve erik gibi farklı meyvelerde şarap üretiminde kullanılmaktadır. Üzüm yüzey maya florasının şarap üretiminde yararlı katkıları olduğu gibi bozulmalara yol açabilecek zararlı etkileri de olabilir. Bu nedenle özellikle şarap üreticilerinin yüksek kalitede şarap üretebilmeleri için üzümlerin yüzeyinde bulunan maya toplulukları hakkında daha fazla bilgiye sahip olması gerekmektedir. Dünyada şarap üretiminde ve bağ alanlarına sahip ülkeler arasında ilk sıralarda yer alan Fransa, İspanya ve İtalya gibi ülkelerde üzüm yüzey maya florası ve fermentasyondan sorumlu mayaların belirlenmesine yönelik araştırmalar yoğunluktadır (Gonzalez ve ark., 2007; Querol ve ark., 2000; Valles ve ark., 2007; Capece ve ark. 2003; Ercolini ve ark.2007; Romancino ve ark., 2008; Diguta ve ark., 2011). Benzer şekilde Macaristan, Sloveky, Polonya, Portekiz, Çin , Yeni Zelanda, Hindistan, Arjantin ve Yunanistan gibi farklı şarap üretim bölgelerinde de bu tür çalışmalar bulunmaktadır (Peter ve ark., 2005; Raspor ve ark. 2006; Satora ve Tuszynski, 2005; Valero ve ark. 2007; Li ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2010; Ghormade ve Ark. 2009; Chavan ve ark., 2009; Combina ve ark. 2007; Nisiotou ve Nychas, 2007).

Dünyada saptanan 18500 üzüm çeşidinin yaklaşık olarak 1500 tanesi ülkemizde bulunmaktadır. Türkiye dünyada bağ alanlarına sahip ülkeler arasında 4. sırada, üzüm üretiminde ise 6. sırada yer almasına rağmen şarap üretiminde beklenen sıralamada yer almamaktadır. Ülkemizde üretilen meyveler içinde ise üzüm birinci sıradadır ve üretilen üzümlerin yarısından fazlası sofralık olarak tüketilmekte geri kalanı ise şıralık, şaraplık ve

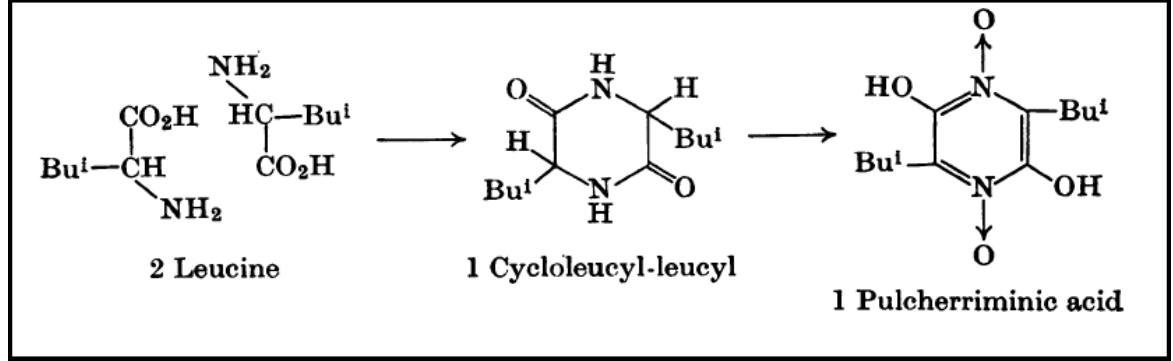
kuru üzüm olarak değerlendirilmektedir. Üzüm yüzey maya florasını belirlemeye yönelik çalışmalar ise oldukça sınırlı sayıda ve şaraplık üzüm çeşitlerine yöneliktir. Üzüm yüzeyinden izole edilen maya türlerine ait moleküler filogenetik çalışmalar ise mevcut değildir.

Üzümün olgunluğu, çeşidi, bağın coğrafik konumu ve yaşı, iklim şartları, fungusit uygulaması ve değişik bağcılık uygulamaları gibi faktörler üzüm meyveleri üzerindeki maya popülasyonunun çeşitliliğini ve yoğunluğunu etkilemektedir (Cordero-Buesco ve ark., 2011; Fleet, 2008; Combina ve ark., 2007; Raspor ve ark., 2006; Chavan ve ark., 2009). Bu nedenle araştırmamızda ayrıca maya türlerinin üretilen bağlara ve üzüm çeşitlerine göre dağılımları belirlenmiştir.

Üzüm yüzeyinde genel olarak bulunan non-*Saccharomyces* maya türlerinden birisi olan *Metschnikowia pulcherrima* maya türünün de doğal habitatı özellikle olgunlaşmış üzümler olup diğer meyve türlerinde de bulunabilir (Mills ve ark., 2002). Ascomycetous maya cinsi bir maya olan *Metschnikowia spp.* vejetatif hücrelerin çok taraflı tomurcuklanmasıyla ve bir veya iki tane uzatılmış iğne şekilli askospor üretimi ile tanımlanır (Miller ve Phaff, 1998). *M. pulcherrima* hücre içinde ve üreme ortamında maya kolonileri etrafında biriktirilen pulcherrimin pigmenti üretir (Kluyver ve ark., 1953; Kurtzman ve Droby, 2011).

Pulcherrimin pigment üretimi *M. pulcherrima* maya türü için karakteristik olup üreme ortamının içeriğine göre pigment üretimi değişkendir (Gimenez ve ark., 1995; Kluyver ve ark., 1953). Pulcherrimin pigmenti ferrik iyonlarından ve pulcherriminic asitten oluşan kompleks bir moleküldür (Cook ve Slater, 1956; MacDonald, 1965). Sıvı kültürlerde demir ( $FeCl_3$ ) konsantrasyonu arttırıldığında pulcherrimin pigment üretimi de artmaktadır (Sipiczki, 2006). Demir içermeyen ortamda üretilen durağan safhadaki *M. pulcherrima* maya hücrelerine 0,1mg/ml  $FeCl_3$  ilave edildiğinde hücrelerin kırmızıya döndüğü görülmüştür. Bu durum renkli suda çözünemeyen ve difüze olamayan pulcherrimin pigmentinin, renksiz suda çözünebilir ve üreme ortamı içerisinde difüz olabilen bir başlangıç molekülünden in situ olarak sentezlendiğini göstermektedir (Sipiczki, 2006). Lösün amino asiti cyclo-L-leucine-L-leucine ara molekülüne dönüşerek dibasic asit olan pulcherriminic asiti oluşturmaktadır (MacDonald, 1965) (Şekil 1.3). Lösün amino asitinin salgılanan başlangıç molekülü olup olmadığını test etmek için yapılan çalışmada, lösün bağımlı *Schizosaccharomyces pombe leu1* mutant maya hücreleri ile *M. pulcherrima* maya hücreleri SMA petrilere ekilmiş ancak iki maya türü arasında bir

çapraz beslenme (cross-feeding) gözlenmemiştir. Bu durum lösün amino asitinin hücre dışına salgılanmadığını ve lösünün bir başlangıç molekülü olmadığını göstermektedir (Sipiczki, 2006).



Şekil 1.3. Pulcherriminic asit biyosentezi. (MacDonald, 1965).

*M. pulcherrima* maya türünün bazı suşları elma, şeftali ve üzümde hasat sonrası patojenlerin ve özellikle *Botrytis cinerea* gibi mikroorganizmaların zararlarına karşı koruyucu etkiye sahiptir (De Curtis ve ark., 1996; Deighton ve ark., 1997; Prakitchaiwattana ve ark., 2002) *M. pulcherrima* maya türünün antagonistik etkisi bazı bakteri, maya ve fungal türler üzerinde çalışılmış pulcherrimin pigmentinin farklı mikroorganizmalar için farklı etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir (Türkel ve Ener, 2009).

Mayalar invertaz enzim aktivitesiyle sukrozu glikoz ve fruktoza, inulinaz enzim aktivitesiyle inülini glikoz, fruktoz ve inulo-oligosakkaritlere parçalayarak karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar (Walker, 2000; Gao, 2007). İvertaz enzimi β-D-fructofuranoside-fructohydrolase (E.C.3.2.1.26) enzimi olup *S. cerevisiae* maya türünde *SUC2* geni tarafından kodlanır ve hücre dışı sukrozun ve rafinozun hidrolizinden sorumludur (Goldstein ve Lampen, 1975). *SUC2* geni glikoz baskılamasına uğrayan ve transkripsiyonu glikoz varlığıyla düzenlenen bir gen dir (Carlson, 1998). Maya hücresinin üreme ortamında yeterli glikoz varsa, diğer karbon kaynaklarının (örneğin sukroz) kullanımı için gerekli olan genlerin ve glikoneogenez enzimleri için kodlu genlerin transkripsiyonunu baskılar (glucose repression) (Ronne, 1995; Gancedo, 1992). Üreme ortamında glikoz tükendiğinde veya maya hücreleri fermente edilemeyen karbon kaynağına geçirildiğinde glikoz tarafından baskılanan genler aktive edilerek transkripsiyona başlar (glucose derepression). *S. cerevisiae* maya hücresinde *SUC2* gen işeyişi ve invertaz enzim sentezi oldukça fazla araştırılmıştır (Herrero ve ark., 1998; DeVit

ve ark., 1997; Edmonson ve ark., 1996; Lutfiyya ve Johnston, 1996; Treitel ve ark., 1998; Vyas ve ark., 2001; Taussing ve Carlson, 1983). Non-*Saccharomyces* maya türlerinde ise benzer çalışmalar bulunmakla beraber sayı olarak oldukça azdır (Perez ve ark., 1996; Klein ve ark., 1989).

İnulin,  $\beta$ -2,1-D-fruktofuranoz zincirinden ve bu zincir sonunda bir glikoz molekülünden oluşur. İnulinaz enzimi inülini glikoz, fruktoz ve inulo-oligosakkaritlere parçalar. İnulinaz enzimi inülinin indirgenmemiş ucundaki terminal fruktozu kesen ekzo-inülinaz ve inülin içindeki bağları kesen endo-inülinaz olmak üzere iki çeşittir. Ekzo-inülinazın aynı zamanda invertaz aktivitesine sahip olup sukrozu da hidrolize edebilirken endo-inülinaz invertaz aktivitesine sahip değildir (Chi ve ark., 2009; Chi ve ark., 2011; Ertan ve ark., 2003). *Kluyveromyces*, *Pichia* ve *Candida* cinslerine ait bazı maya türlerinin inülinaz aktivitesi oldukça yüksektir (Gao ve ark., 2007; Kalil ve ark., 2010; Santisteban ve ark., 2009). *Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus aureus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolitica* ve *Debaryomyces hansenii* maya türleri 40 U/mL üzerinde hücre dışı inülinaz aktivitesine sahiptir (Yu ve ark., 2009; Gao ve ark., 2007, Chi ve ark., 2009, Gong ve ark., 2008, Gong ve ark., 2007, Sheng ve ark., 2008; Liu ve ark., 2010; Golunski ve ark., 2011; Kushi ve ark., 2000).

**BÖLÜM 2****ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Yüksek sukroz içeriği nedeniyle üzümler mayalar için oldukça uygun bir yaşam alanına sahiptirler. Üzüm yüzeyinden maya izole edilen ve tür tanımı yapılan birçok araştırma bulunmaktadır. Daha önceleri bu tanımlamalar mayaların biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri, üreme şekilleri, koloni morfolojileri gibi özellikleri kullanılarak klasik yöntemlerle yapılırken, son 15 yıldır moleküler teknikler bu tanımlamalarda kullanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) ve 5.8S ITS bölgesini içeren ribozomal DNA (rDNA) sekans analizi gibi teknikler son yıllarda şaraplık maya türlerinin hızlı bir şekilde tanımlanmasında kullanılmaktadır (Clemente-Jimenez ve ark.,2004; Combina ve ark.,2005; Nisiotou ve Nychas, 2007; Zott ve ark.,2008). Kullanılan moleküler yöntemler daha sonra intra-spesifik ve inter-spesifik türlerin tanımlamasında kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle klinik izolatların tanımlamasında kullanımı yaygınlaşmıştır (Meyer ve ark. 1997, Chang ve ark. 2006).

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; Esteve-Zarzoso ve ark., 1999; La Guerche ve ark., 2004; Lee ve Taylor, 1992).

Yapılan çalışmaların çoğunluğu şarap yapımında kullanılan üzümlere ve fermentasyon süresine katkıda bulunan mayalara yöneliktir. İtalyada yapılan bir çalışmada şaraplardan izole edilen 32 maya türü 18S rDNA ve NTS bölgeleri kullanılarak moleküler identifikasyonu yapılmıştır (Capece ve ark., 2003). Diğer bir çalışmada ise 8 farklı üzüm çeşidinin üzüm yüzeyinde bulunan maya türlerinin yoğunluğu rakamsal olarak belirlenerek üzüm çeşitlerine göre dağılımı tespit edilmiştir (Martini ve ark., 1996). *S. cerevisiae* maya türü üzüm yüzeyinden direkt olarak izole edilemezken *M. pulcherrima* ve *Kloeckera apiculata* maya türlerinin üzüm çeşitleri üzerinde yoğun olarak bulunduğu gözlenmiştir.

Catalanesca beyaz üzüm çeşidinin spontan fermentasyonu sırasında izole edilen mayaların 26S rDNA bölgesi kullanılarak tanımlaması sonrasında *Hanseniaspora spp.*, *Issatchenkia spp.* ve *Candida spp.* maya türlerinin fermentasyon başlangıcında maya florasında yoğun olarak bulunurken fermentasyon sonlarında *S. cerevisiae* maya türünün

dominant olduğu gösterilmiştir (Di Maro ve ark., 2007). Sicilya bölgesinde üzüm şirasındaki maya türleri 5,8S ve 26S rDNA bölgeleri kullanılarak tanımlanmıştır (Romancino, 2008)

Fransa'nın şaraplık üzümleri ile meşhur Burgundy bölgesinde bulunan 7 farklı bağdan toplanan tek bir üzüm çeşidi (Pinot noir üzüm çeşidi) üzerindeki filamentli fungal türlerin belirlenmesi için yapılan çalışmada PCR-RFLP tekniği kullanılarak 5,8S-ITS bölgesi çoğaltılmıştır. Farklı restriksiyon enzimleri ile kesilerek restriksiyon profillerine göre tür tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlanan türlerin bağ alanlarına göre dağılımı ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir (Diguta ve ark., 2011).

Benzer çalışmalar İspanya (Gonzalez ve ark., 2007; Querol ve ark. 2000, Querol ve ark., 1998; Briones ve ark., 2000; Valles ve ark., 2007), İtalya (Ercolini ve ark.2007, Romancino ve ark. 2008, Capece ve ark. 2003), Portekiz (Valero ve ark. 2007), Slovekyaya (Raspor ve ark. 2006), Polonya (Satora ve Tuszynski 2005), Macaristan (Peter ve ark., 2005), Çin (Li ve ark., 2010), Yeni Zelanda ( Zhang ve ark., 2010), Hindistan (Ghormade ve ark. 2009; Chavan ve ark., 2009) ve Güney Afrika (Pretorius ve ark., 1999) gibi farklı ülkelerde bulunan bağ alanları ve şaraplık üzüm çeşitleri üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmalarda izole edilen non-*Saccharomyces* maya türlerinin, 5,8S rDNA-ITS bölgeleri ve 26S rDNA D1/D2 domain bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılıp restriksiyon profillerine göre moleküler karakterizasyonları belirlenmiştir.

Arjantin'de yapılan çalışmada ise birbirini takip eden iki sezon üzümlerden maya türleri izole edilerek şarap florasına bu maya türlerinin fermentatif katkıları araştırılmıştır (Combina ve ark., 2007). Maya populasyonlarının kompozisyonlarının üzüm çeşidine göre yıldan yıla farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu durum şarap yapımında kullanılan üzümlerin başlangıç fermentasyon florasını etkilemekte ve şarap aromasını değiştirmektedir. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada birbirini izleyen iki yıl Santorini ve Amyndeon'dan elde edilen şıralarda *Hanseniaspora uvarum*, *M. pulcherrima*, *Candida stellata* ve *Torulaspota delbrueckii* baskın türler olarak belirlenmiştir (Pramateftaki ve ark.2000).

Şaraplık üzümlerde ve şarap üretim alanlarında *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota*, *Dekkera*, *Schizosaccharomyces* ve *Saccharomyces* cinslerine ait maya türleri yaygın olarak bulunmaktadır (Ribereau-Gayon ve ark., 2000; Fleet ve ark., 2002; Fleet, 2003; Fleet,



2008; Prakitchaiwattana ve ark., 2004; Jolly ve ark., 2006). Ancak üzüm maya florası bölgeden bölgeye ve sezondan sezona değişim göstermektedir (Frezier ve Dubourdiou, 1992; Vezinhet ve ark., 1992; Schütz ve Gafner, 1994).

*S. cerevisiae* maya türünün üzüm yüzeyinden direk izole edilebilmesi oldukça zordur. 1000 adet üzüm meyvesinde bir tane *S. cerevisiae* maya türü bulunur (Mortimer ve Polsinelli, 1999). Ancak yapılan bir çalışmada üzümlerden izole edilen mayalar arasında *S. cerevisiae* maya türünün oranı yüksektir (%15,6) (Clavijo ve ark., 2010). Benzer şekilde İspanya'da yürütülen bir çalışmada üç farklı üzüm şırası içindeki maya popülasyonu belirlenmiş ilk sezon en baskın türler *H. uvarum* ve *C. stellata* olarak belirlenirken sonraki sezon *S. cerevisiae* maya türünün baskın tür olduğu gözlemlenmiştir (Beltran ve ark., 2002). Fakat bu durumun üzüm yüzeyinin düşük maya popülasyonundan veya *Saccharomyces* kontaminasyonundan kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (Martini 1993; Vaughan-Martini ve Martini 1995).

Üzümler kullanılarak yapılan çalışmaların benzerleri, erik ve elma şarabı yapımında kullanılan meyvelerin, siyah zeytinin, portakal meyvesinin ve suyunun, kambucha çayının ve üzüm suyunun fermentasyon süreçlerinden izole edilen maya türlerinde de yapılmıştır (Satora ve Tuszyński 2005, Bedrinana ve ark. 2007, Coton ve ark. 2006, Cox ve ark. 2004, Bisson ve Dizy 2000, Heras-Vazquez ve ark., 2003; Valles ve ark., 2007; Leng Teoh ve ark., 2004).

Yunanistanda yapılan bir çalışmada *Botrytis* ile enfekte olmuş üzümlerden izole edilen maya türlerinin tanımlamalar RFLP yöntemi ile yapılarak *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Issatchenkia terricola*, *Issatchenkia occidentalis*, *M. pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans* ve *C. stellata* maya türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Nisiotou ve Nychas, 2007). Benzer şekilde bazı hastalıklı üzümlerden izole edilen mayaların tür tanımları yapılarak antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir (Nychas ve Nisiotou 2007, Barata ve ark. 2008, Spiczki 2006). Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise üzümlerden izole edilen, moleküler olarak türleri tanımlanan bazı *M. pulcherrima* türlerinin salgıladığı pigment ile antimikrobiyal aktiviteleri arasında farklılıklar bulunmuştur (Türkel ve Ener, 2009). Yapılan çalışmada *M. pulcherrima* türünün, insan patojenleri *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* ve *Trichosporon mucoides* türleri üzerinde güçlü antagonistik etkisinin bulunduğu gösterilmiştir.

İzole edilen maya türlerinde yapılan çalışmalar yalnızca non-*Saccharomyces* maya türlerinin tanımlamaları ile sınırlı değildir. Amerikalı bilim adamları İtalya ve Romanya'nın mahzenlerinden topladıkları bazı şaraplardan izole ettikleri 43 *S. cerevisiae* maya türünde yaptıkları çalışmalar sonucunda, doğal şarap suşlarının çoklu heterozigotluktan tam homozigot diploid sporlar oluşturduklarını, bunlardan bazılarının ise orijinal heterozigot diploid forma döndüklerini göstermişlerdir. Bu dönüşüm prosesini ise 'Genomic Renewal' olarak adlandırmışlardır (Mortimer ve Ark. 1994).

Yapılan araştırmalar sonucunda yeni türler de kaydedilmiştir. Örneğin, üzümlerden izole edilen *Metchnikowia viticola* maya türünün fenotipik özelliklerinin ve bazı moleküler özelliklerinin *Candida kofuensis* ile benzerlik göstermesine rağmen, moleküler karakterizasyonunda ortaya çıkan farklılıklardan dolayı yeni tür olduğu gösterilmiştir (Peter ve ark. 2005).

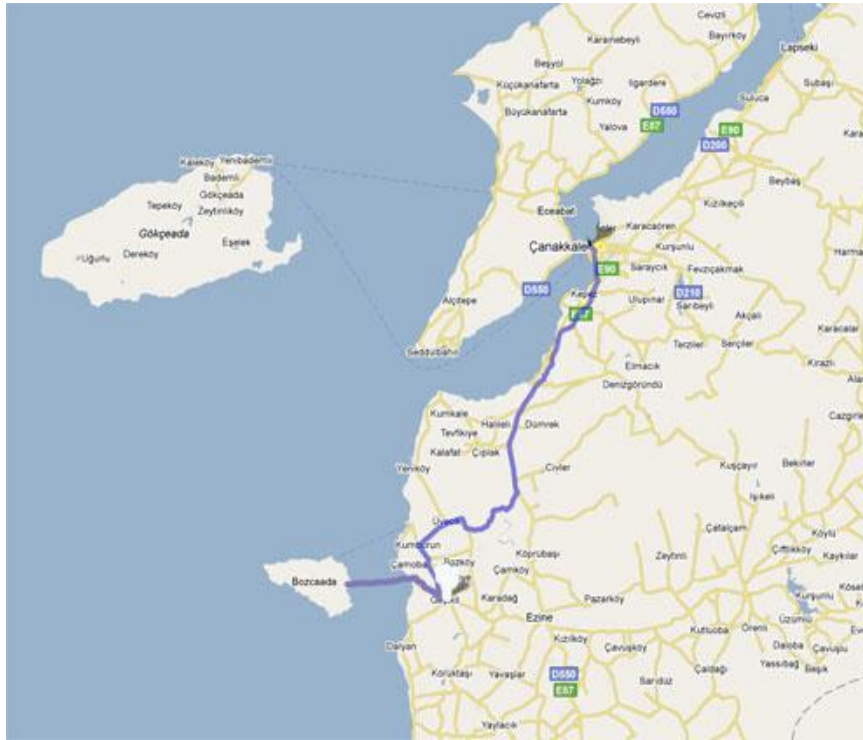
Ayrıca üzümlerin fermentasyonu süresince izole edilen mayalarda  $\beta$ -glukozidaz, poligalakturanaz, amilaz, lipaz ve proteaz gibi bazı enzimatik özellikleri farklı araştırmalarda incelenmiştir (Briones ve ark. 2000, Fleet ve ark. 2008). Üzümlerden izole edilen *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora (Kloeckera)*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces* and *Torulaspora* maya cinslerine ait 26 maya suşu izole edilerek pektinaz, amilaz, lipaz, proteaz ve  $\beta$ -glikozidaz gibi hücre dışı enzim aktiviteleri belirlenmiştir. İzole edilen *Pichia anomala (Candida pelliculosa)* ve *H. uvarum (Kloeckera apiculata)* maya suşlarının yüksek  $\beta$ -glikozidaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Charoenchai ve ark., 1997). Ayrıca üzüm suyu fermentasyonundan izole edilen bazı *Candida* türlerinin, *Hanseniaspora* ve *Kloeckera* cinslerine ait türlerin yüksek hücre dışı proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Charoenchai ve ark., 1997; Bisson ve Dizy 2000). *M. pulcherrima* ve *C. guillermondii* maya türlerinde yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi tespit edilmiştir. Ancak *C. guillermondii* maya türünde enzimatik aktivite hücre içi ve periatel iken *M. pulcherrima* maya türünde tamamen hücre içi enzimatik aktivite tespit edilmiştir (Rodriguez ve ark., 2004).

## BÖLÜM 3

## MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1. Üzüm Örneklerinin Toplanması ve Maya İzolasyonu

Marmara Bölgesi içinde yer alan Bozcaada, Ege Denizi'nin kuzeyinde, Çanakkale Boğazı'nın hemen girişinde yer alır (Şekil 3.1). Coğrafik konum olarak 39° 50' 6" kuzey enlemi 26° 4' 11" doğu boylamındadır. Gökçeada'dan sonraki ikinci büyük ada olup tarihte üzüm bağları ve şarapları ile meşhurdur. Araştırmamızda öncelikle Bozcaada'da bulunan bağlar ve bu bağlarda yetiştirilen üzüm çeşitleri tespit edildi (Çizelge 3.1). Üzüm örnekleri üzümlerin olgunlaşma dönemlerine göre 2009 yılının Eylül ve Ekim aylarında olmak üzere iki farklı dönemde toplandı.



Şekil 3.1. Çanakkale ve Bozcaada haritası.

Daha önce belirlenen farklı bağlardan üzüm örnekleri aseptik koşullarda steril tüplere toplanarak laboratuvara getirildi. Tartımları yapılan üzümler 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

Sodyum Propiyonat) petrilere yayma ekim yöntemiyle ekildi. Uygun şartlarda 2-3 gün inkübe edilen petrilere koloni sayıları belirlenip farklı koloni morfolojisi gösteren türler olmak üzere rasgele maya kolonileri seçilerek glikoz içeren YPD (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone, 20 gr/l (w/v) Agar, % 2 Dextrose) besi ortamlarına aktarıldı. Koloni sayıları belirlenen üzüm örneklerindeki toplam maya sayısı CFU/ml olarak belirlendi. Toplanan üzüm türlerinin çeşitlerine göre elde edilen maya örneklerine farklı kod numaraları verilerek gliserol stokları olarak -70 °C’de muhafaza edilmektedir.

Çizelge 3.1. Üzüm örneklerinin toplandığı bağlar ve üzüm çeşitleri

<b>ÜZÜM BAĞLARI</b>	<b>ÜZÜM ÇEŞİTLERİ</b>
Panayır içi (Mustafa Yayım)	Karalahana Üzümü, Çavuş Üzümü
Panayır içi (Üsküplü Hasan)	Pembe Gemre Üzümü
Panayır içi	Alphonse Üzümü, Cabernet Üzümü
Kocamış Deresi (Sıtkı Bozkurt)	Kıvalı Yapıncak Üzümü, Karalahana Üzümü, Kokulu Kabak Üzümü, Karasakız (Kuntura) Üzümü
Çayır Mevkii (Alaettin Salman)	Çavuş Üzümü
Çayır Mevkii (Abdullah Tekin)	Atasarısı Üzümü
Çayır Mevkii	Vasilaki (Cardinal) Üzümü, Çavuş Üzümü
Pazar yeri	Efes Karası Üzümü, Cinsaut Üzümü

### 3.2. İzole Edilen Maya Örneklerinin Tür Tanımlamaları

Çalışmada izolasyonları yapılan maya türleri koloni morfolojilerine (renk, şekil, büyüklük, v.s.) göre öncelikli olarak gruplandırıldı. İzole edilen maya örneklerinin tür tanımlamalarını yapmak için hızlı bir maya tanımlama sistemi olan; API ID 32C (Analitical Profile Index) test sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanıldı. API ID 32C sistemi, bir tane negatif kontrol olmak üzere farklı karbon ve azot kaynaklarını içeren (Galactose, Actidion, Sucrose, N-Acetyl-glucosamine, DL-Lactate, LArabinose,

Cellobiose, Raffinose, Maltose, Trehalose, 2-Keto-gluconate, a-Methyl-D-glucoside, Mannitol, Lactose, Inositol, Sorbitol, DXYlose, Glycerol, Rhamnose, Palatinose, Erythritol, Melibiose, Glucuronate, Melezitose, Gluconate, Levulinate, Glucose, Sorbose, Glucosamine, Esculin) 32 kuyucuktan oluşan mikro ölçekli bir asimilasyon test sistemidir. Test sonucunda elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar APIWEB R1.2.1 programında analiz edilerek tür tanımlamaları yapıldı. Bağ alanlarına ve üzüm çeşitlerine göre tanımlanan maya türlerinin dağılımı belirlendi. *M. pulcherrima* olarak tanımlanan maya örnekleri daha sonraki işlemler için seçildi.

### **3.3. Farklı Karbon Kaynaklarında Pulcherrimin Pigment Sentezinin Belirlenmesi**

API ID 32C kit sistemi ile tanımlanan 78 *M. pulcherrima* maya örneği ve referans *M. pulcherrima* olarak temin edilen UMY12 (Uludağ Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, ST-Yeast Collection) maya suşunda pulcherrimin pigment sentezi kantitatif olarak belirlendi (Türkel ve Ener, 2008). Bunun için öncelikle Glikoz (% 2) içeren zengin besi ortamında (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone) bir gece sabit sıcaklık (28°C) ve çalkalama (100 rpm) ile üretilen sıvı kültürlerden % 2 Dextrose ve % 2 Sukroz içeren zengin katı besi ortamlarına (YPD ve YPS) 5 mikrolitre spot test yöntemi ile ekilerek 28°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Maya kolonileri etrafında oluşan pulcherrimin pigment zonu kaydedilerek petrilerin fotoğrafları çekildi.

### **3.4. Farklı Azot Kaynaklarında Pulcherrimin Pigment Sentezinin Belirlenmesi**

Azotun pulcherrimin pigment sentezine ve üremeye etkisini gözlemleyebilmek için pigment sentezi göstermeyen, hücre dışına pigment sentezi yapan ve hücre içine pigment sentezi yapan 3 *M. pulcherrima* maya suşu (MP-12, MP-23, MP-42) seçildi. Üreme ortamı olarak minimal besi ortamı olan YNB (1.6 g/l Yeast Nitrogen Base ve %2 agar) kullanıldı. Azot kaynağı olarak amonyum sülfat (5.0 g/l Ammonium sulfate (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)), prolin (Pyrrolidine-2-carboxylic acid, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>) ve lösün (60mg/l 2-Amino-4-methylpentanoic acid, C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>) üreme ortamına ilave edildi. Karbon kaynağı olarak sukroz kullanıldı. Seçilen maya suşları öncelikle Glikoz (% 2) içeren zengin besi ortamında (10 gr/l (w/v) Yeast Extract, 20 gr/l (w/v) Bacto-peptone) bir gece sabit sıcaklık (28°C) ve çalkalama (100 rpm) ile üretildi. Sıvı kültürlerden daha önce hazırlanan azot içermeyen (YNB), prolin içeren (YNB-Pro), amonyum sülfat içeren (YNB-AS), prolin ve lösün içeren (YNB-Pro-Leu), amonyum sülfat ve lösün içeren (YNB-AS-Leu) ve sadece lösün içeren (YNB-Leu)

minimal üreme ortamlarına 5 mikrolitre spot test yöntemi ile ekilerek 28°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Maya kolonileri etrafında oluşan pulcherrimin pigment zonu belirlenerek petrilerin fotoğrafları çekildi.

### **3.5. Ozmotik Stres ve Isı Stresinde Pulcherrimin Pigment Sentezinin Belirlenmesi**

Ozmotik stresin ve ısı stresinin pulcherrimin pigment sentezine ve üremeye etkisini gözlemleyebilmek için farklı pigment sentezine sahip 6 *M. pulcherrima* maya suşu (MP-20, MP-32, MP-34, MP-37, MP-45 ve MP-76) seçildi. *M.pulcherrima* maya türlerinin hiperozmotik strese dirençli olup olmadıklarını ve pigment sentezine etkisini belirleyebilmek için maya hücreleri %2 glikoz içeren ve uygun tuz konsantrasyonları konsantrasyonları (0.0M - 0.2M - 0.4M - 0.6M - 0.8M - 1.0M ve 1.2M NaCl) ilave edilmiş zengin (10 gr/l Yeast Extract, 20 gr/l Bacto-peptone ve 2% agar) ve minimal (1.6 g/l Yeast Nitrogen Base, 5.0 g/l Ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ve 2% agar) üreme ortamları hazırlandı. Glikoz (% 2) içeren zengin besi ortamında bir gece sabit sıcaklık ve çalkalama ile üretilen sıvı kültürlerden hazırlanan katı üreme ortamlarına (YPD, YPD-0,2M NaCl, YPD-0,4M NaCl, YPD-0,6M NaCl, YPD-0,8M NaCl, YPD-1,0M NaCl, YPD-1,2M NaCl, YPD-1,0M KCl, YNBD, YNBD-0,2M NaCl, YNBD -0,4M NaCl, YNBD -0,6M NaCl, YNBD -0,8M NaCl, YNBD -1,0M NaCl, YNBD -1,2M NaCl, YNBD -1,0M KCl) 5 mikrolitre damlalar şeklinde üçlü olarak ekim yapılarak 28°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Maya kolonilerinin üremeleri ve koloni etrafında oluşan pulcherrimin pigmentinin fotoğrafları çekilerek kaydedildi.

*M.pulcherrima* maya türlerinin ısı stresine dirençli olup olmadıklarını ve pigment sentezine etkisini belirleyebilmek için maya hücreleri %2 glikoz içeren zengin (10 gr/l Yeast Extract, 20 gr/l Bacto-peptone ve 2% agar) ve minimal (1.6 g/l Yeast Nitrogen Base, 5.0 g/l Ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ve 2% agar) üreme ortamları hazırlandı. Glikoz (% 2) içeren zengin besi ortamında bir gece sabit sıcaklık ve çalkalama ile üretilen sıvı kültürlerden hazırlanan petrilere (YPD ve YNBD) 5 mikrolitre damlalar şeklinde üçlü olarak ekim yapılarak 15 °C, 26 °C, 37 °C, ve 40 °C'de 3-4 gün inkübe edildi. Maya kolonilerinin üremeleri ve koloni etrafında oluşan pulcherrimin pigmentinin fotoğrafları çekilerek kaydedildi.

Mayaların hücre içi glikojen içeriklerindeki farklılıklar iyot boyama yöntemiyle kalitatif olarak kahverengi renk oluşumuyla belirlenmektedir (Chester 1968; Enjalbert ve ark. 2000). Stres şartlarında mayaların biriktirdiği glikojeni belirleyebilmek için taze

hazırlanan lugol çözeltisi (%1.67 İodin ve %0.67 Potasyum İodid) kullanıldı. Önce petrilerin içine yerleştirilen Whatman No:3 kâğıtlarına birkaç ml lugol eklenerek, kâğıtların lugol ile doygun hale gelmeleri sağlandı. Petrilerde üretilip koloni oluşturan hücreler iyot buharına maruz bırakıldı. Maya hücreleri tarafından biriktirilen glikojenin iyot ile boyanabilmesi için 15 dakika beklendi. Glikojen depo eden maya hücrelerinin oluşturduğu kolonilerin kahverengi, biriktirmeyenlerin sarı renkte boyandıkları gözlemlendi. Petrilerin fotoğrafları çekildi.

### **3.6. Maya Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi**

*M. pulcherrima* olarak tanımlanan mayalardan 6 maya suşu (MP-20, MP-32, MP-34, MP-37, MP-45 ve MP-76) antimikrobiyal aktivite testi için seçildi. Maya türlerinin 20 farklı patojen bakteri (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* (1), *Escherichia coli* (2), *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* (1), *Salmonella typhimurium* (2), *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus agalactia*, *Klebsiella pneumonia*, *Haemophilus parainfluenza* ve *Acinobacter baumannii*) ve 10 farklı maya (*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida intermedia*, *Candida pelliculosa*, *Candida famata*, *Candida lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Cryptococcus neoformans* ve *Debaryomyces hansenii*) türüne karşı antagonistik etkileri incelendi. Maya suşları süt ve süt ürünlerinden izole edilerek tür tanımlamaları laboratuvarımızda yapılan maya türleridir. Bakteri türleri ise Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (TMC) üyelerinden temin edilmiş ve farklı araştırmalarda kullanılmış klinik izolatlardır. Bakteri türleri Nutrient broth (3 g/l Beef Extract, 5 g/l Peptone) sıvı besi ortamında 37 °C’de ve maya hücreleri zengin sıvı besi ortamında (YPD) 28 °C’de bir gece süre ile inkübe edildikten sonra uygun katı besi ortamlarına uygun seyreltmeler yapılarak ekimleri yapıldı. Ekim işlemi sonrasında yüzey kuruduktan sonra, zengin besi ortamında bir gece boyunca üremiş olan *M. pulcherrima* maya türlerinden yine uygun seyreltmeler sonrası damlatılarak sabit sıcaklıkta üretildi. Üreme sonrası *M. pulcherrima* maya kolonileri etrafında pulcherrimin pigmenti sentezi ve inhibisyon zon oluşumu kaydedilerek fotoğrafları çekildi.

**3.7. Hücre Dışı Enzim Profillerinin Belirlenmesi**

*M. pulcherrima* 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 (Alkaline phosphatase, Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Lipase (C 14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, Trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -fucosidase) varlığı hızlı bir şekilde test edilmektedir.

Test sisteminde kullanılacak hücrelerin hazırlanışı her mikroorganizma için farklı olduğu için öncelikle hangi ortamda üretilen maya hücrelerinin pozitif sonuç vereceği belirlendi. Bunun için maya hücreleri iki farklı şekilde test için hazırlandı. Birinci yöntemde maya hücreleri % 2 glikoz içeren zengin katı besi ortamında üç gün sabit sıcaklıkta üretildi ve bu hücreler test sisteminde kullanıldı. İkinci yöntemde maya hücreleri bir gecelik %2 glikoz içeren zengin sıvı kültürlerden çöktürülerek alındı. Hücre dışı enzim aktivitesini belirlemek için sıvı kültürlerin enzim ekstraktı içeren supernatant kısmı ve hücreleri içeren pellet kısımları ayrı ayrı test sisteminde kullanıldı. Bu şekilde elde edilen sabit hücre derişimindeki kültür süspansiyonlarından kitteki her bir hücreye 65  $\mu$ L olacak şekilde transfer edildi. Transfer sonrası test sistemleri, 37°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 farklı pulcherrimin pigment sentez profiline sahip *M. pulcherrima* maya suşlarının enzim profilleri belirlendi.

**3.8. Maya Türlerinin İvertaz ve İnülinaz Aktivitelerinin Belirlenmesi**

*M. pulcherrima* maya türünün  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini belirleyebilmek için MP-23 maya suşu seçildi. Maya hücreleri YPS (%1 yeast extract, %2 peptone ve %2 sukroz) sıvı kültüründe durağan faza kadar 28 °C ve 120 rpm'de 16-18 saat karıştırma ile üretildi. Daha sonra durağan faz maya kültürlerinden taze kültür başlatılarak logaritmik aşamaya (OD<sub>600</sub>=1,0) kadar üretildi. Maya hücrelerinin hücre dışı invertaz/inülinaz



aktiviteleri için, sıvı besi yerinde üretilen hücreler santrifüj edilerek toplandı. Çöktürülen hücreler steril soğuk distile su ile, daha sonra 50 mM NaOAc pH:5 tampon yıkandı. Çöktürülen hücreler 200 µl'lik 50mM NaAOc pH=5.2, 2mM PMSF tampon çözeltisinde çözüldü. Bu hücre çözeltisinden 50 µl alınıp 200 µ'lik 200 mM sukroz çözeltisiyle karıştırıldı.

Maya hücrelerinin perietal invertaz/inulinaz aktiviteleri için, sıvı besi üretilen hücreler santrifüj edilerek toplandı. Çöktürülen hücreler steril soğuk distile su ile, daha sonra 50 mM NaOAc pH:5 tampon yıkandı. Hücreler 200 µl'lik 50mM NaAOc pH=5.2, 2mM PMSF tampon çözeltisi içinde 0,4 gr glass bead kullanılarak 2-3 dakika 4 C'de vortex edildi. Bu hücre çözeltisinden 50 µl alınıp 200 µ'lik 200 mM sukroz çözeltisiyle karıştırıldı.

Maya hücrelerinin hücre içi invertaz/inulinaz aktiviteleri için, sıvı besi üretilen hücreler santrifüj edilerek toplandı. Çöktürülen hücreler steril soğuk distile su ile yıkandı. 200 µl'lik ekstraksiyon çözeltisi (0,5M NaCl, 0,2 M Tris-HCl pH:7,5, 0,01M EDTA ve 1% SDS) içinde 0,4 gr glass bead kullanılarak 2-3 dakika 4 C'de vortex edildi. Bu hücre çözeltisinden 50 µl alınıp 200 µ'lik 200 mM sukroz çözeltisiyle karıştırıldı.

Hücre dışı, perietal ve hücre içi invertaz/inulinaz aktiviteleri için hazırlanan karışımlar 37 °C'de ve 55 °C 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; Spiro, 1966). 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).

### **3.9. Genomik DNA İzolasyonu**

*M. pulcherrima* maya suşlarından ve referans maya suşundan (UMY 12) genomik DNA izolasyonları Sherman ve arkadaşlarının genomik DNA izolasyon yöntemi kullanılarak yapıldı (Sherman ve ark., 1986). Bu amaçla seçilen maya örnekleri YPD besi ortamında 30°C 'de 3 gün inkübe edilerek üretildi. Steril tüplere 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 süspanse edildi. Hücre süspanسیونu 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. Sentrifugasyon sonrası supernatan kısmı yeni tübe transfer edilerek üzerine 1:1 hacim izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve 20 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldıktan sonra 1ml %70’lik etanol ilave edilerek 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 sıvı kısmı 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 -80 °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 görüntüledi.

### **3.10. 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 önce belirlenen PCR şartlarında gerçekleştirildi (Çizelge 3.2) (White ve ark., 1990). PCR reaksiyonları Çizelge 3.3’te belirtilen sıcaklık ve sürelerde BİO-RAD marka Thermal cycler cihazında yapıldı.

Çizelge 3.2. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

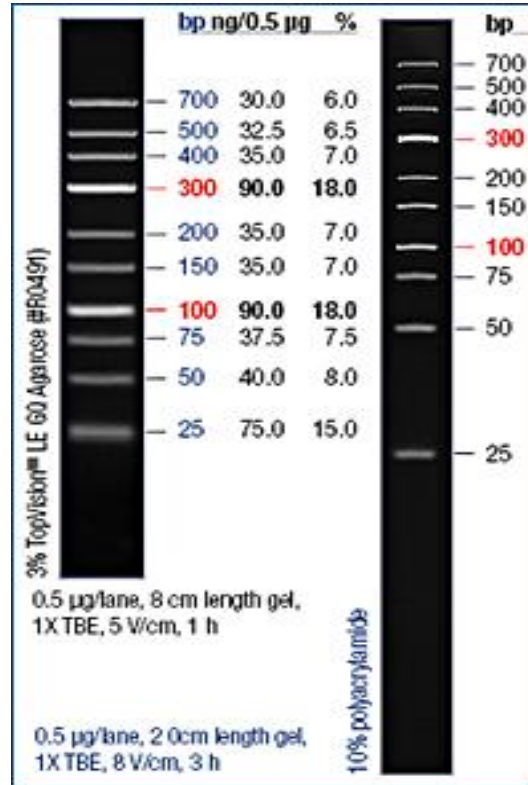
<b>Bileşen</b>	<b>Miktar (µl)</b>	<b>Final konsantrasyon</b>
Master mix (Fermentas, K0171)	12,5	-
10 pmol/µl forward primer	1	10 pmol/µl
10 pmol/µl reverse primer	1	10 pmol/µl
Genomik DNA	0,5	100 ng
Nuclease free-water	10	-

Toplam hacim	25
--------------	----

Çizelge 3.3. PCR reaksiyon şartları

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre (Dak.)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	15	1
Denatürasyon	94	2	-
Primerlerin bağlanması	60	1	30
Uzama	72	2,5	-
Sonlanma	72	5	1

PCR ürünleri ve Marker 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak % 0,8'lik (w/v) agaroz jelde 80 dakika (120 voltta) yürütüldü (Şekil 3.2). PCR ürünlerinin resimleri ultra violet transilluminatör (UV) tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı.



Şekil 3. 2. Çalışmada kullanılan marker haritası.

### 3.11. Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi

PCR reaksiyon ürünleri, PCR Purification kiti (Fermentas K0702) kullanılarak saflaştırıldıktan sonra farklı restriksiyon enzimleri (Fermentas *HinfI*, *HaeIII*, *MspI*, *AluI* ve *CfoI*) 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

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

### 3.12. 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 (üzüm çeşidi) 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) 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.

### **3.13. DNA Dizi Analizi**

Elde edilen sonuçlara göre, seçilen MP-57 ve MP-63 *M. pulcherrima* maya suşları DNA dizi analizi için seçildi. Maya suşlarına ait örneklerin dizilemeleri Ankara'da bulunan REFGEN firmasına yaptırıldı. DNA dizi benzerlik analizleri (DNA Sequence Similarity Analysis) NCBI servisinin sunduğu BLAST analiz programı kullanılarak yapıldı.

**BÖLÜM 4**  
**ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

**4.1. Maya Yoğunluğunun Üzüm Çeşitlerine Göre Dağılımı**

Çalışmamızda Bozcaada (Çanakkale, Türkiye) bölgesinden, üzüm çeşitlerinin olgunlaşma dönemleri göz önüne alınarak Eylül ve Ekim aylarında üzüm örnekleri toplanarak laboratuara getirildi ve uygun besi ortamlarına gerekli seyreltmeler yapılarak ekimleri yapıldı. Üreme ortamında sayılabilir yoğunlukta bulunan maya türlerinin sayımları yapılarak üzümler üzerindeki mayaların koloni oluşturabilen birim (CFU/ml) değerleri hesaplandı.

Örneklenen üzüm çeşitleri ve bağ alanları Bölüm 3'te Çizelge 3.1'de verildi. Toplanan üzüm çeşitlerine göre maya yoğunluğu Çizelge 4.1'de verildi. Daha önce belirlenen 8 farklı bağ bölgesinden 12 farklı üzüm çeşidine ait toplam 15 üzüm örneği toplandı. Üzüm örnekleri içerisinde en fazla maya yoğunluğuna Kınalı yapıncak ( $1.5 \times 10^7$ ) ve Karalahana ( $5 \times 10^6$ ) üzüm çeşitlerinde rastlanırken en düşük maya yoğunluğu Cabernet ( $3 \times 10^3$ ) ve Vasilaki ( $14 \times 10^3$ ) üzüm çeşitlerinde görüldü. Genel olarak üzüm çeşitleri üzerindeki maya yoğunluğu 1 mililitre üzüm suyunda  $10^3 - 10^7$  CFU olarak belirlendi.

**4.2. Tanımlanan Maya Türleri ve Dağılımı**

Örnekleme yapılan 15 üzüm çeşidinden toplam 435 maya örneği izole edildi. İzole edilen maya örneklerinden 37 maya türü küf kontaminasyonu nedeniyle iptal edilerek stoklardan çıkartıldı. Kalan 392 maya örneğinin 266 tanesi API ID 32C kit sistemi ile tanımlanırken 126 maya örneği tanımlanamadı. İzole edilen maya türlerinin bağ alanlarına ve örneklenen üzüm çeşitlerine göre dağılımı Çizelge 4.2'de verildi.

Panayır İçi bölgesinden Karalahana, Çavuş, Pembe Gemre, Alphonse ve Cabernet olmak üzere 5 farklı üzüm çeşidinden örnekleme yapıldı. Bu üzüm çeşitlerinden izole edilen 98 maya örneği tanımlanırken 40 maya örneği tanımlanamadı. Kocamış Deresi bölgesinden Kınalı Yapıncak, Karalahana, Kokulu Kabak ve Karasakız olmak üzere 4 farklı üzüm çeşidinden 78 maya örneği izole edildi. Bu üzüm çeşitlerinden izole edilen 62

maya örneğinin tanımlaması yapılırken 16 maya örneği tanımlanamadı. Çayır Mevkii bölgesinden Çavuş, Atasarısı ve Vasilaki (Cardinal) olmak üzere 3 farklı üzüm çeşidinden 127 maya örneği izole edilerek 84 tanesinin tanımlaması yapıldı. Kalan 43 maya örneği tanımlanamadı. Pazaryeri bölgesinden Efeskarası ve Cinsaut üzümlerinden izole edilerek örneklenen maya sayısı 69 olup bunların 39 tanesi tanımlanırken 30 tanesi tanımlanamadı. Örnekleme yapılan bağ alanları ve bölgelerinden en fazla Panayır içi ve Çayır mevkii bölgesinden maya izolasyonu yapıldığı belirlendi.

Çizelge 4.1. Üzüm çeşitlerindeki maya yoğunluğu

Üzüm Çeşidi (Kodu)	CFU / ml
Alphonse (Alfonos)	13X10 <sup>4</sup>
Cabernet	3X10 <sup>3</sup>
Kınalı Yapıncak	15X10 <sup>6</sup>
Çavuş	6X10 <sup>6</sup>
Atasarısı	6X10 <sup>4</sup>
Vasilaki (Cardinal)	14X10 <sup>3</sup>
Karalahana	5X10 <sup>6</sup>
Kokulu Kabak	7X10 <sup>4</sup>
Pembe Gemre	4X10 <sup>6</sup>
Kara Sakız (Kuntura)	3X10 <sup>3</sup>
Efes Karası	3X10 <sup>5</sup>
Cinsaut (Şensu)	3X10 <sup>6</sup>

Tanımlanan maya türlerinin üzüm çeşitlerine göre dağılımı Çizelge 4.3'te verildi. Alphonse (*Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Metchnikowia spp.*, *Rhodotorula spp.* ve *Saccharomyces spp.*), Kınalı yapıncak (*Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Metchnikowia spp.*, *Rhodotorula spp.* ve *Koleckera spp.*) ve Cinsaut (*Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Metchnikowia spp.*, *Rhodotorula spp.* ve *Koleckera spp.*), üzüm çeşitlerinin her birinde 5 farklı maya cinsine ait 7 farklı maya türü tanımlandı. Alphonse yalnızca Panayır içi bölgesinden, Kınalı Yapıncak sadece Kocamış Deresi bölgesinden ve Cinsaut üzümü

Çizelge 4.2. İzole edilen mayaların bağlara ve üzüm çeşitlerine göre dağılımı

Üzüm Bağları (Kodu)	Üzüm Çeşitleri (Kodu)	Tanımlanan Maya Sayısı	Tanımlanamayan Maya Sayısı
Panayır İçi	Karalahana	24	13
	Çavuş	30	8
Panayır İçi	Pembe Gemre	21	5
Panayır İçi	Alphonse	15	12
	Cabernet	5	3
Kocamış Deresi	Kımalı Yapıncak	41	12
	Karalahana	7	4
	Kokulu Kabak	4	-
	Karasakız	5	-
Çayır Mevkii	Çavuş	37	10
Çayır Mevkii	Atasarısı	14	12
Çayır Mevkii	Vasilaki	6	6
	Çavuş	19	11
Pazar yeri	Efes Karası	17	19
	Cinsaut	21	11

yalnızca Pazaryeri bölgesinden toplandı. Panayır içi ve Kocamış Deresi bağ bölgeleri üzüm çeşitliği en yüksek olan bağ bölgeleri olduğu için maya çeşitliliğinin de üzüm çeşitliliğine bağlı olarak artış gösterdiği düşünülmektedir. Benzer şekilde yalnızca Panayır içi bölgesinden toplanan Pembe Gemre üzüm çeşidinde 4 farklı maya (*Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Metchnikowia spp.*, ve *Koleckera spp.*) cinsine ait 7 farklı maya türü tanımlandı. Yalnızca Panayır içi bağ bölgesinden toplanan Alphonse ve Pembe Gemre üzüm çeşitlerinden izole edilen maya türlerinin *C. famata*, *Cr. laurentii* ve *M. pulcherrima* maya türleri ortak olup geriye kalan 4 maya türü farklıdır. Benzer şekilde gibi Pazaryeri bölgesinden toplanan Cinsaut ve Efes Karası üzüm çeşidinde *Cr. laurentii*, *M. pulcherrima*, *C. holmii* ve *Cr. neofarmans* maya türleri her iki üzüm çeşidinde dağılıma sahipken *K. apis/apiculata* ve *C. zeylanoides* yalnızca Cinsaut üzüm çeşidinde dağılım göstermektedir. Aynı bağ bölgesi içerisinde yetiştirilen farklı üzüm çeşitleri üzerinde bazı



Çizelge 4.3. Tanımlanan maya türlerinin üzüm çeşitlerine göre dağılımı

Üzüm Çeşidi (Kodu)	Maya Türü	İzolot Sayısı
Alphonse	<i>Candida famata</i>	1
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	3
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1
	<i>Candida holmii</i>	2
	<i>Rhodotorula spp.</i>	6
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
	<i>Cryptococcus humicola</i>	1
Cabernet	<i>Cryptococcus laurentii</i>	3
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	2
Kınalı Yapıncak	<i>Candida famata</i>	2
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	11
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	23
	<i>Candida holmii</i>	1
	<i>Rhodotorula spp.</i>	1
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
	<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	2
Çavuş	<i>Candida famata</i>	5
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	27
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	24
	<i>Candida holmii</i>	4
	<i>Rhodotorula spp.</i>	21
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3
	<i>Candida sake</i>	1
	<i>Cryptococcus humicola</i>	1
Atasarısı	<i>Cryptococcus laurentii</i>	7
	<i>Rhodotorula spp.</i>	7
Vasilaki	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	4
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
	<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	1

Çizelge 4.3. Tanımlanan maya türlerinin üzüm çeşitlerine göre dağılımı (Devam)

Üzüm Çeşidi (Kodu)	Maya Türü	İzolat Sayısı
Karalahana	<i>Candida famata</i>	1
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	12
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	7
	<i>Rhodotorula spp.</i>	10
	<i>Cryptococcus albidus</i>	1
Kokulu Kabak	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	3
	<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	1
Pembe Gemre	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	6
	<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	1
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	10
	<i>Candida magnoliae</i>	1
	<i>Candida famata</i>	1
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
	<i>Candida membranifaciens</i>	1
Karasakız	<i>Candida famata</i>	1
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	3
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1
Efes Karası	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	2
	<i>Rhodotorula spp.</i>	12
	<i>Candida holmii</i>	1
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
Cinsaut	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	5
	<i>Rhodotorula spp.</i>	8
	<i>Candida holmii</i>	1
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	3
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2
	<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	1
	<i>Candida zeylanoides</i>	1

maya türlerinin ortak olarak bulunduğu bazı maya türlerinin ise üzüm çeşidine göre değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.

İki farklı bağ alanından (Panayır içi ve Çayır mevki) toplanan çavuş üzümünün 4 farklı cins (*Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Metschnikowia spp.*, ve *Rhodotorula spp.*) ait 8 farklı maya türü barındırdığı belirlendi. Bu bağ bölgelerinde yetiştirilen diğer üzüm çeşitlerinin yüzeyinden de bu maya türleri izole edildi. Bu durum çavuş üzümünün diğer üzüm çeşitlerine nazaran daha fazla tercih edilen üzüm çeşidi olduğunu, maya türlerinin dağılımında hem bağ alanında bulunan üzüm çeşitliliğinin hem de mayaların tercih ettiği üzüm türlerinin önemli olduğunu göstermektedir. Bölgede yetiştirilen üzüm çeşidi ne kadar fazla ise üzüm yüzeyinden farklı maya türü izole etme olasılığı da fazlalaşmaktadır.

Tanımlanan maya türleri ve bunların toplam izole edilen maya türlerine göre dağılım frekansı Çizelge 4.4'te verildi. *S. cerevisiae*, *C. magnoliae*, *C. membranifaciens*, *Cr. albidus*, *C. zeylanoides* ve *C. sake* maya türleri en az sayıda izole edilen maya türleri olup toplam türler içindeki frekansı % 0,37 olarak bulundu. *Cr. humicola* (% 0,75) ve *K. apis/apiculata* (% 2,25) türleri ise dağılımda yine frekansı düşük diğer iki maya türü oldu. *Cr. neoformans* ve *C. holmii* maya türleri % 3,38 dağılım frekansı ile *C. famata* % 4,13 dağılım frekansı ile orta düzeyde üzüm yüzeyinde dağılım gösteren türler oldu. *Rhodotorula spp.* (% 24,43), *M. pulcherrima* (%29,32) ve *Cr. laurentii* (% 30,07) maya türleri ise üzüm maya yüzeyinde en fazla dağılım gösteren türler olarak tespit edildi.

Tanımlanan maya cinsleri ve bunların toplam izole edilen maya cinslerine göre dağılım frekansı Çizelge 4.5'te verildi. *Cryptococcus spp.* (% 34,59), *Metschnikowia spp.* (% 29,32) ve *Rhodotorula spp.* (% 24,44) maya cinsleri üzüm yüzeyinde en fazla dağılım gösteren maya cinsleri olarak bulundu. Beklendiği gibi en düşük yoğunlukta bulunan maya türü *Saccharomyces spp.* (% 0,37) olarak tespit edildi. *Candida spp.* (% 9,02) ve *Kloeckera spp.* (% 0,37) maya cinsleri ise üzüm yüzeyinde yoğun olmamakla birlikte dağılımda yer aldığı görüldü.

Çizelge 4.4. Toplam izole edilen maya türleri ve yüzdeler dağılımı

<b>Maya Türleri</b>	<b>Toplam İzolat Sayısı</b>	<b>% Frekansı</b>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	80	30,07
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	78	29,32
<i>Rhodotorula spp.</i>	65	24,43
<i>Candida famata</i>	11	4,13
<i>Cryptococcus neoformans</i>	9	3,38
<i>Candida holmii</i>	9	3,38
<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	6	2,25
<i>Cryptococcus humicola</i>	2	0,75
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,37
<i>Candida magnoliae</i>	1	0,37
<i>Candida membranifaciens</i>	1	0,37
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	0,37
<i>Candida zeylanoides</i>	1	0,37
<i>Candida sake</i>	1	0,37
<b>TOPLAM</b>	<b>266</b>	<b>100</b>

Çizelge 4.5. Toplam izole edilen maya cinsleri ve yüzdeler dağılımı

<b>Maya Cinsi</b>	<b>Toplam İzolat Sayısı</b>	<b>% Frekansı</b>
<i>Cryptococcus spp.</i>	92	34,59
<i>Metschnikowia spp.</i>	78	29,32
<i>Rhodotorula spp.</i>	65	24,44
<i>Candida spp.</i>	24	9,02
<i>Kloeckera spp.</i>	6	2,25
<i>Saccharomyces spp.</i>	1	0,37
<b>TOPLAM</b>	<b>266</b>	<b>100</b>

#### **4.3. İzole Edilen *M. pulcherrima* Maya Türlerinin Üzüm Çeşitlerine Göre Dağılımı**

Toplam izole edilen ve tür tanımlaması yapılan 266 maya türünden 78 tanesi *M. pulcherrima* olarak belirlendi. Bu maya türlerinin izole edildikleri üzüm çeşidi ve daha sonraki işlemlerde kullanılacak olan kodları Çizelge 4.6'da verildi. Araştırmanın geri kalan

kısımında yapılan çalışmalarda bu kod numaraları kullanıldı. En fazla *M. pulcherrima* maya türü Çavuş (24) ve Kınalı Yapıncak (23) üzüm çeşitlerinden izole edilirken Atasarısı üzüm çeşidinden *M. pulcherrima* maya türü izole edilmedi. Karasakız ve Alphonse üzüm çeşitlerinden yalnızca bir *M. pulcherrima* maya türü izole edildi. Cabernet ve Efes Karası üzüm çeşitlerinden 2, Kokulu Kabak ve Vasilaki üzüm çeşitlerinden 3, Karalahana üzüm çeşidinden 8 ve Pembe Gemre üzüm çeşidinden 6 *M. pulcherrima* maya türü izole edildi.

#### **4.4. Karbon Kaynağının Pulcherrimin Pigment Sentezine Etkisi**


























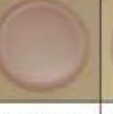




















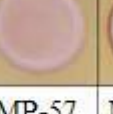
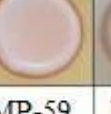





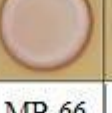
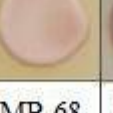
























Pulcherrimin pigment üretimi *M. pulcherrima* maya türü için karakteristik olup üreme ortamının içeriğine göre pigment üretiminin değişken olduğu gösterilmiştir (Gimenez ve ark., 1995; Kluyver ve ark., 1953). Bu nedenle araştırmada kullanılan referans *M. pulcherrima* maya suşunun (UMY12) ve tanımlanan 78 *M. pulcherrima* maya türünün farklı karbon kaynaklarında pulcherrimin pigment sentezleri belirlendi. Üreme ortamı olarak zengin besi ortamı kullanıldı. Karbon kaynağı olarak glikoz içeren ortamda üreyen ve pigment sentezleyen maya türlerinin fotoğrafları Şekil 4.1'de, sukroz içeren ortamda elde edilen görüntüler ise Şekil 4.2'de sunuldu. Genel olarak sukroz içeren zengin besi ortamında maya hücrelerinin daha fazla pulcherrimin pigmenti salgıladığı görüldü. Glikoz içeren üreme ortamında tüm maya suşlarında pigment sentezi gözlenirken sukroz içeren üreme ortamında MP-12, MP-13, MP-16, MP-17, MP-18, MP-19, MP-33 ve UMY12 maya suşlarında pigment sentezinin olmadığı belirlendi.

Maya hücrelerinin koloni etrafında oluşturduğu pigment çapı hesaplandı. Koloni çapı ( $R_{koloni}$ ) ve koloni çapı + koloni etrafında oluşan pigment çapı ( $R_{pigment}$ ) milimetrik olarak ölçüldü. Koloni etrafında oluşan pigment çapı ( $R_{pigment} - R_{koloni}$ ) olarak hesaplandı. Glikoz içeren ortamda pigmentin oluşturduğu halo (zon) çapı Çizelge 4.7'de sukroz içeren ortamda hesaplanan zon çapı ise Çizelge 4.8'de verildi. En fazla zon çapı 11 mm ile sukroz içeren ortamda kaydedildi.

**BÖLÜM-4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA İlknur Nezahat ÇILDIR**

Çizelge 4.6. İzole edilen *M. pulcherrima* maya türlerinin kod numaraları ve izole edildikleri üzüm çeşidi

<b>İzole Edilen Üzüm Çeşidi</b>	<b><i>M. pulcherrima</i> Maya Suşu Kodu</b>
Alphonse (Alfonos)	MP-55
Cabernet	MP-13, MP-19
Kımalı Yapıncak	MP-3, MP-7, MP-8, MP-9, MP-10, MP-14, MP-15, MP-24, MP-37, MP-39, MP-45, MP-48, MP-49, MP-50, MP-54, MP-64, MP-66, MP-69, MP-70, MP-72, MP-73, MP-77, MP-80
Çavuş	MP-1, MP-11, MP-12, MP-18, MP-21, MP-22, MP-23, MP-27, MP-30, MP-31, MP-32, MP-33, MP-34, MP-42, MP-43, MP-47, MP-56, MP-60, MP-61, MP-62, MP-65, MP-68, MP-71, MP-74
Atasarısı	-
Vasilaki (Cardinal)	MP-16, MP-17, MP-59
Karalahana	MP-2, MP-4, MP-5, MP-6, MP-35, MP-40, MP-46, MP-57,
Kokulu Kabak	MP-20, MP-25, MP-36,
Pembe Gemre	MP-26, MP-28, MP-75, MP-76, MP-78, MP-79
Kara Sakız (Kuntura)	MP-29,
Efes Karası	MP-38, MP-63
Cinsaut (Şensu)	MP-41, MP-44, MP-51, MP-52, MP-53,

YP-Glikoz (YPD)									
MP-1	MP-2	MP-3	MP-4	MP-5	MP-6	MP-7	MP-8	MP-9	MP-10
									
MP-11	MP-12	MP-13	MP-14	MP-15	MP-16	MP-17	MP-18	MP-19	M-20
									
MP-21	MP-22	MP-23	MP-24	MP-25	MP-26	MP-27	MP-28	MP-29	MP-30
									
MP-31	MP-32	MP-33	MP-34	MP-35	MP-36	MP-37	MP-38	MP-39	MP-40
									
MP-41	MP-42	MP-43	MP-44	MP-45	MP-46	MP-47	MP-48	MP-49	MP-50
									
MP-51	MP-52	MP-53	MP-54	MP-55	MP-56	MP-57	MP-59	MP-60	MP-61
									
MP-62	MP-63	MP-64	MP-65	MP-66	MP-68	MP-69	MP-70	MP-71	MP-72
									
MP-73	MP-74	MP-75	MP-76	MP-77	MP-78	MP-79	MP-80	C	
									

Şekil 4.1. Glikoz içeren ortamda *M. pulcherrima* türlerinin üremesi ve pigment sentezi.

YP-Sukroz (YPS)									
MP-1	MP-2	MP-3	MP-4	MP-5	MP-6	MP-7	MP-8	MP-9	MP-10
MP-11	MP-12	MP-13	MP-14	MP-15	MP-16	MP-17	MP-18	MP-19	M-20
MP-21	MP-22	MP-23	MP-24	MP-25	MP-26	MP-27	MP-28	MP-29	MP-30
MP-31	MP-32	MP-33	MP-34	MP-35	MP-36	MP-37	MP-38	MP-39	MP-40
MP-41	MP-42	MP-43	MP-44	MP-45	MP-46	MP-47	MP-48	MP-49	MP-50
MP-51	MP-52	MP-53	MP-54	MP-55	MP-56	MP-57	MP-59	MP-60	MP-61
MP-62	MP-63	MP-64	MP-65	MP-66	MP-68	MP-69	MP-70	MP-71	MP-72
MP-73	MP-74	MP-75	MP-76	MP-77	MP-78	MP-79	MP-80	C	

Şekil 4.2. Sukroz içeren ortamda *M. pulcherrima* türlerinin üremesi ve pigment sentezi.



Çizelge 4.7. Glikoz içeren ortamda maya hücrelerinin pigment zonu çapları

<i>M. pulcherrima</i> Kodu (MP)	Pigment Sentezi	Pigment Zonu ( $R_{\text{pigment}} - R_{\text{koloni}}$ ) (mm)
MP-5, MP-6, MP-7, MP-8, MP-9, MP-10, MP-11, MP-12, MP-14, MP-15, MP-16, MP-17, MP-18, MP-24, MP-25, MP-27, MP-33, MP-35, MP-36, MP-39, MP-41, MP-42, MP-47, MP-56, MP-60, MP-61, MP-62, MP-63, MP-69, MP-70, MP-71, MP-74, MP-76, Kontrol (UMY12)	+	0
MP-1, MP-3, MP-4, MP-13, MP-19, MP-21, MP-23, MP-26, MP-28, MP-29, MP-31, MP-32, MP-37, MP-40, MP-43, MP-44, MP-45, MP-46, MP-48, MP-50, MP-53, MP-54, MP-55, MP-77	+	0,5-1
MP-2, MP-20, MP-22, MP-30, MP-38, MP-49, MP-51, MP-52, MP-57, MP-59, MP-64, MP-65, MP-66, MP-68	+	1,5-2
MP-34, MP-75, MP-79, MP-80	+	3-4
MP-72, MP-73, MP-78	+	5-6

Glikoz içeren ortamda kontrol dahil 33 maya suşunda ve sukroz içeren ortamda kontrol dahil 12 maya suşunda pigment sentezi hücre içinde gerçekleştiği için zon çapı kaydedilmedi. Glikoz içeren ortamda 24 maya suşunda oldukça az (0,5-1 mm pigment çapı) hücre dışı pigment sentezi gerçekleşirken sukroz içeren ortamda 19 maya suşu 6-7 milimetrelik pigment difüzyonu gerçekleştirdi. MP-20, MP-57 ve MP-59 maya suşlarının sukroz içeren ortamda en geniş alana difüz edebilen pigment sentezi yaptığı gözlemlendi.

Çizelge 4.8. Sukroz içeren ortamda maya hücrelerinin pigment zonu çapları


















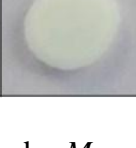
<i>M. pulcherrima</i> Kodu (MP)	Pigment Sentezi	Pigment Zonu ( $R_{\text{pigment}} - R_{\text{koloni}}$ ) (mm)
MP-12, MP-13, MP-16, MP-17, MP-18, MP-19, Kontrol (UMY12)	-	0
MP-6, MP-7, MP-9, MP-11, MP-15, MP-25, MP-33, MP-35, MP-36, MP-42, MP-47, MP-71	+	0
MP-1, MP-5, MP-21, MP-24, MP-29	+	1
MP-22, MP-26, MP-27, MP-28, MP-30, MP-31	+	2-2,5
MP-2, MP-4, MP-14, MP-32, MP-61, MP-68	+	3-3,5
MP-37, MP-39, MP-40, MP-49, MP-62,	+	4-4,5
MP-3, MP-34, MP-38, MP-46, MP-50, MP-51, MP-52, MP-74, MP-77, MP-78,	+	5-5,5
MP-10, MP-41, MP-43, MP-44, MP-45, MP-48, MP-53, MP-54, MP-55, MP-60, MP-63, MP-65, MP-56, MP-69, MP-70, MP-72, MP-73, MP-75, MP-76	+	6-7
MP-8, MP-23, MP-64, MP-66, MP-80	+	8
MP-79	+	9
MP-20, MP-57, MP-59	+	11

#### 4.5. Azotun Pulcherrimin Pigment Sentezine Etkisi

Hücre dışı lösin molekülünün veya azotun başlangıç molekülü olup olmadığını araştırmak için pigment sentezi göstermeyen (MP-12), hücre dışına pigment salgılayan (MP-23) ve hücre içine pigment sentezi yapan (MP-42) *M. pulcherrima* maya suşları seçildi. Güçlü azot kaynağı olarak amonyum sülfat, zayıf azot kaynağı olarak prolin ve pulcheriminic asitin yapısında bulunan lösin amino asiti üreme ortamlarında azot kaynağı olarak, sukroz ise karbon kaynağı olarak kullanıldı. Seçilen maya suşları azot içermeyen

## **BÖLÜM-4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA İlknur Nezahat ÇILDIR**

(YNB), zayıf azot kaynağı içeren (YNB-Pro), güçlü azot içeren (YNB-AS), zayıf azot ve lösin amino asiti içeren (YNB-Pro-Leu), güçlü azot ve lösin içeren (YNB-AS-Leu) ve sadece lösin amino asiti içeren (YNB-Leu) minimal üreme ortamlarına ekilerek uygun sıcaklıkta inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'te verildi.

ÜREME ORTAMI	PİGMENT SENTEZİ		
	MP-12	MP-23	MP-42
YNB			
YNB-As			
YNB-Pro			
YNB-Leu			
YNB-As-Leu			
YNB-Pro-Leu			

Şekil 4.3. Farklı azot içeren ortamlarda *M. pulcherrima* maya türünün üremesi ve pulcherrimin pigment sentezi.

Kullanılan tüm azot kaynaklarında ve azot kaynağı içermeyen ortamda maya suşlarının üremeleri arasında farklılık gözlenmedi. Yalnızca azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullanıldığında pigment sentezi gözlenirken diğer azot kaynakları kullanıldığında pigment sentezi gözlenmedi.

*M. pulcherrima* maya suşları azot içermeyen veya zayıf azot kaynağı (prolin) içeren ortamda azot kaynağı içeren ortamdaki (Amonyum sülfat) oranda üreme gösterdi. Ayrıca azot açlığının dolayısıyla amino asit açlığının üremeyi etkilemediği, azot açlığı ile



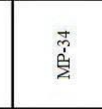

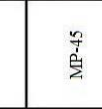

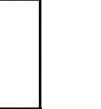
















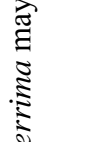
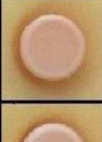






















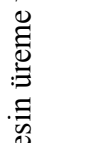









































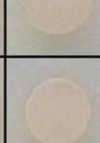
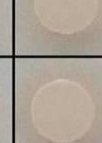





oluşturulan amino asit açlığı stresine karşılık maya hücrelerinin oldukça dirençli olduğu gözlemlendi.

#### **4.6. Ozmotik Stresin ve Isı Stresinin *M. pulcherrima* Maya Türünün Üremesine ve Pulcherrimin Pigment Sentezine Etkisi**

İzole edilen *M.pulcherrima* maya suşlarından MP-20, MP-32, MP-34, MP-37, MP-45 ve MP-76 numaralı maya suşları seçilerek stres testinde kullanıldı. Maya suşlarının hiperozmotik strese dirençli olup olmadıklarını belirleyebilmek için mayalar glikoz ve farklı tuz konsantrasyonları içeren zengin ve minimal üreme ortamlarında uygun koşullarda üretildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te verildi.

Üreme ve pigment salgısının, hem zengin hemde minimal üreme ortamında tuz konsantrasyonu 1,0M olana kadar etkilenmediği belirlendi. Tuz konsantrasyonu 1,0M üzerine çıktığında üremenin %50 azalma gösterdiği hücre dışı pigment sentezinin ise bazı suşlarda hücre içinde (MP-20, MP-32, MP-45 ve MP-76) olduğu gözlemlendi. Özellikle MP-32 maya suşunda pigment sentezinin 1,2M NaCl tuz konsantrasyonunda bloke olduğu tespit edildi. Ayrıca 1,0M NaCl ve 1,0M KCl tuzu içeren ortamlarda pigment sentezleri birbirinden farklı olurken, 1,0M KCl içeren ortamda maya suşları stres içermeyen ortamdakine benzer pigment sentezledi.

Isı stresi sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'te verildi. Sıcaklık 15°C olduğunda üreme %70 azalırken hücre dışı pigment salgısı gözlenmedi. 40°C sıcaklıkta üreme gözlenmediği için pigment sentezi ve salgısı da görülmedi. Maya suşlarının 37°C ve 26°C sıcaklıkta üremelerinde farklılık gözlenmezken, MP-34 maya suşunun üremesi 37°C'de bloke oldu. Zengin üreme ortamında MP-20 ve MP-32 maya suşlarında pigment

MAYA TÜRÜ	ZENGİN BESİ ORTAMI (YP-D)								MİNİMAL BESİ ORAMI (YNB-D)							
	0,0 M NaCl	0,2 M NaCl	0,4 M NaCl	0,6 M NaCl	0,8 M NaCl	1,0 M NaCl	1,2 M NaCl	1,0 M KCl	0,0 M NaCl	0,2 M NaCl	0,4 M NaCl	0,6 M NaCl	0,8 M NaCl	1,0 M NaCl	1,2 M NaCl	1,0 M KCl
MP-20																
MP-32																
MP-34																
MP-37																
MP-45																
MP-76																

Şekil 4.4. *M. pulcherrima* maya türünde ozmotik stresin üreme ve pigment sentezi üzerine etkisi.

MAYA TÜRÜ	ZENGİN BESİ ORTAMI (YP-D)				MİNİMAL BESİ ORTAMI (YNB-D)			
	15°C	26°C	37°C	40°C	15°C	26°C	37°C	40°C
MP-20								
MP-32								
MP-34								
MP-37								
MP-45								
MP-76								

Şekil 4.5. *M.pulcherrima* maya türünde ısı stresinin üreme ve pigment sentezine etkisi.





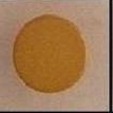
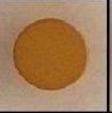

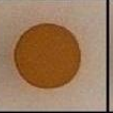





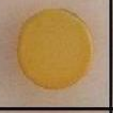




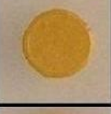

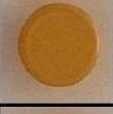


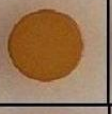

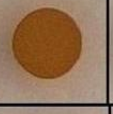
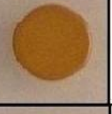


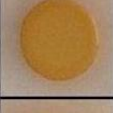
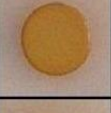
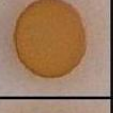




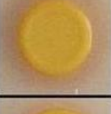
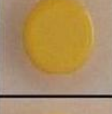

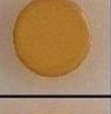



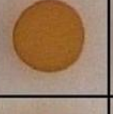










sentezinde 37°C’de farklılık tespit edilmezken, MP-37 ve MP-45 maya suşlarında pigment sentezinin hücre içine döndüğü belirlendi. MP-76 maya suşunda ise pigment üretimi gözlenmedi. Minimal üreme ortamında ise MP-45 maya suşu hariç diğer maya suşlarında pigment sentezinde azalma gözlendi.

Maya suşlarının ozmotik stres ve ısı stresi sonrası biriktirdikleri glikojen miktarları kalitatif olarak iyot boyama yöntemi ile belirlendi. Minimal besi ortamında üreyen maya suşlarında ısı stresi ve ozmotik stres sonrası glikojen birikimi gözlenmedi. Zengin besi ortamında gözlenen glikojen birikimleri ise Şekil 4.6’da verildi. İyotla boyama sonucunda MP-20 ve MP-34 maya suşlarının özellikle 0,4M NaCl ve üzeri tuz konsantrasyonu içeren üreme ortamlarda koyu kahverengi boyandığı bu nedenle en fazla glikojen biriktiren suşlar olduğu gözlendi. MP-37, MP-45 ve MP-76 maya suşlarında tuz konsantrasyonu 0,6M üzeri olduğunda glikojen birikimi gözlenirken MP-32 maya suşunda tüm konsantrasyonlarda glikojen birikimi gözlenmedi.

## **BÖLÜM-4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA İlknur Nezahat ÇILDIR**

Potasyum klorür (KCl) içeren ortamda gerçekleşen glikojen birikimi MP-37 maya suşu hariç diğer maya suşlarında sodyum klorür içeren ortam ile benzer sonuçlar gösterdi. Bu durum maya suşlarında gözlenen glikojen birikimlerinin ozmotik stres kökenli olduğunu göstermektedir. Isı stresi sonrası MP-20 ve MP-34 maya suşlarında 37°C’de çok az glikojen birikimi gözlenirken diğer maya suşlarında glikojen birikimi gözlenmedi.

*M. pulcherrima* maya türlerinde hem üreme hemde pigment sentezi ozmotik stresten ve ısı stresinden etkilenmektedir. Ancak bu etki her maya suşunda değişik oranlarda gerçekleştiği gibi, stresin kaynağına ve yoğunluğuna bağlı olarak oluşturulan cevapta da farklılıklar meydana getirmektedir.

MAYA TÜRÜ	İYOT TESTİ (YP-D)								
	37 C	26 C	0,2 M NaCl	0,4 M NaCl	0,6 M NaCl	0,8 M NaCl	1,0 M NaCl	1,2 M NaCl	1,0 M KCl
MP-20									
MP-32									
MP-34									
MP-37									
MP-45									
MP-76									

Şekil 4.6. Minimal üreme ortamında ozmotik ve ısı stresinin *M. pulcherrima* maya suşlarının glikojen birikimine etkisi.

### **4.7. *M. pulcherrima* Maya Suşlarının Antifungal ve Antibakteriyel Aktivitesi**

Antimikrobiyal aktivite testi için MP-20, MP-32, MP-34, MP-37, MP-45 ve MP-76 olmak üzere 6 *M. pulcherrima* maya suşu seçildi. *M. pulcherrima* maya suşlarının, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida intermedia*, *Candida pelliculosa*, *Candida famata*, *Candida lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Cryptococcus*

*neoformans* ve *Debaryomyces hansenii* maya türlerine ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* (1), *Escherichia coli* (2), *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* (1), *Salmonella typhimurium* (2), *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus parainfluenza* ve *Acinobacter baumannii* patojen bakteri türlerine karşı antagonistik etkileri belirlendi. *M. pulcherrima* maya suşlarının 10 farklı maya türüne karşı oluşturduğu antagonistik etki sonuçları Çizelge 4.9'da ve bakteri türlerine karşı oluşturduğu antagonistik etki sonuçları Çizelge 4.10'da verildi.

Özellikle *C. glabrata* ve *C. tropicalis* maya türlerine karşı antimikrobiyal aktivitenin fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7). MP-45 maya suşunun çalışmamızda kullandığımız tüm mayalara karşı antagonistik etkisi olduğu ve pigment sentezinin oldukça fazla olduğu tespit edildi. *M. pulcherrima* maya suşlarının hücre dışı pulcherrimin pigment sentezi ile inhibisyon zonu oluşumu arasında paralellik gösterdiği belirlendi.

*M. pulcherrima* maya suşlarının *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *S. agalactia*, *K. pneumoniae*, *H. parainfluenza* ve *A. baumannii* bakteri türleri hariç diğer tüm bakteri türlerine karşı farklı oranlarda antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.10). Özellikle *E. faecalis* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı kuvvetli antagonistik etki gösterdiği saptandı (Şekil 4.7). MP-76 maya suşunun antibakteriyel etkisinin diğer maya suşlarına göre daha fazla oranda olduğu görüldü.

Maya türlerinin aksine kullanılan bakteri türlerinde pulcherrimin pigment sentezi ile inhibisyon zonu oluşumu arasında paralellik olmadığı tespit edildi. Ayrıca *M. pulcherrima* maya suşlarının, aynı bakteri türü olmalarına rağmen farklı suşlar olmalarından dolayı (*E. coli* (1) ile *E. coli* (2) ve *S. typhimurium* (1) ile *S. typhimurium* (2)) benzer antibakteriyel etkiye sahip olmadıkları belirlendi. *S. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. coli* (2) ve *E. faecalis* bakteri türlerinin, *M. pulcherrima* maya suşlarında pigment sentezini hücre içinde gerçekleştirerek kırmızı koloniler oluşturmasına neden olduğu gözlemlendi.
















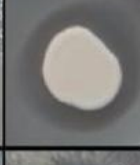

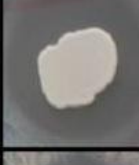





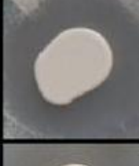








**BÖLÜM-4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA İlknur Nezahat ÇILDIR**Çizelge 4.9. *M. pulcherrima* maya türlerinin farklı maya türlerine karşı antifungal etkisi

Maya Türleri	İnhibisyon Zonu (mm)					
	MP-20	MP-	MP-	MP-	MP-45	MP-76
<i>Candida glabrata</i>	4	4	4	4	4	6
<i>Candida tropicalis</i>	4	5	5	4	4	5
<i>Candida albicans</i>	1	1	1	1	2	3
<i>Candida intermedia</i>	-	-	-	-	0,5	0,5
<i>Candida pelliculosa</i>	-	-	-	-	0,5	0,5
<i>Candida famata</i>	2	3	4	4	4	5
<i>Candida lipolytica</i>	0,3	1	-	2	2	2
<i>Kluyveromyces lactis</i>	-	-	-	0,5	0,5	-
<i>Cryptococcus</i>	1	3	2	2	2	3
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	1	2	3	4	4

Çizelge 4.10. *M. pulcherrima* maya türlerinin farklı bakteri türlerine karşı antibakteriyel etkisi

Bakteri Türleri	İnhibisyon Zonu (mm)					
	MP-	MP-32	MP-34	MP-37	MP-45	MP-76
<i>Pseudomonas</i>	3	3	3	4	4	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	3	4	4	4	4
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	0,5	2	2	1
<i>Proteus mirabilis</i>	0,5	-	-	1	2	1
<i>Escherichia coli (1)</i>	-	-	-	1	1	1
<i>Escherichia coli (2)</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Bacillus cereus</i>	0,5	1	1	0,5	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	0,5	2	2
<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1	1	1	3	3
<i>Serratia marcescens</i>	1	1	2	2	3	4
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	1	2	2	2	3
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	-	0,5	-	2	3
<i>Entorobacter aerogenes</i>	-	-	0,5	1	-	0,5
<i>Streptococcus</i>	0,5	2	0,5	0,5	-	-
<i>Streptococcus agalactia</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Haemophilus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Acinobacter baumannii</i>	-	-	-	-	-	-

MİKROORGANİZMA	MP-20	MP-32	MP-34	MP-37	MP-45	MP-76
<i>Candida glabrata</i>						
<i>Cryptococcus neoformans</i>						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
<i>Enterococcus faecalis</i>						
KONTROL						

Şekil 4.7. *M. pulcherrima* maya suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri.

#### 4.8. *M. pulcherrima* Maya Türünün Hidrolitik Enzim Profilinin Belirlenmesi

*M. pulcherrima* maya türünün hidrolitik enzim profili API-ZYM test sistemi ile belirlendi. Uygun hücre içeren ortam şartlarını belirleyebilmek için maya hücreleri % 2 glikoz içeren zengin katı ve sıvı üreme ortamında üretildi. Sıvı besi ortamında üretilen hücreler çötrülerek hem hücre içeren pellet kısmı hemde supernatant kısmı ayrı ayrı test sisteminde değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’de verildi.

Katı besi ortamından elde edilerek test sisteminde kullanılan maya hücrelerinde lösin arilamidaz aktivitesi pozitif reaksiyon verirken, asit fosfataz,  $\beta$ -glikozidaz, alkalın fosfataz, esteraz (C4) ve esteraz lipaz (C8) enzimleri düşük oranda pozitif reaksiyon gösterdi. Diğer enzimlerde ise aktivite gözlenmedi. Benzer şekilde sıvı kültür hücreleri çöktürülerek elde edilen supernatant kısmı test sisteminde kullanıldı ve bütün enzimlerde aktivite gözlenmedi. Sıvı besi ortamında üretilen hücreler test sisteminde kullanıldığında ise lösin arilamidaz, valin arilamidaz, asit fosfataz,  $\alpha$ -glikozidaz,  $\beta$ -glikozidaz, alkalın fosfataz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz ve lipaz(C14)













































































































































enzimlerinde farklı oranlarda pozitif reaksiyon gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda maya türlerinin enzim profilleri bir gecelik sıvı kültürlerden elde edilen hücreler kullanılarak belirlendi.

API-ZYM test sistemi oldukça pahalı bir kit sistemi olduğu için izole edilen tüm *M. pulcherrima* maya türleri bu test sisteminde analiz edilmedi. Bunun yerine pigment sentez profiline göre seçilen *M. pulcherrima* maya türleri test sisteminde kullanıldı. Pigment sentezi gözlenmeyen MP-12 ve MP-16 maya suşları, farklı oranlarda pigment sentezleyen MP-30, MP-51, MP-57 ve MP-61 suşları API-ZYM testi için seçildi. Ayrıca kontrol maya olan UMY12 yine test sisteminde kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da verildi.

Lösin arilamidaz ve valin arilamidaz enzimleri kullanılan tüm maya suşlarında oldukça yüksek aktivite gösterirken sistein arilamidaz aktivitesi değişken ve az oranda tespit edildi. Benzer olarak asit fosfataz,  $\alpha$ -glukozidaz ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitelerinin *M. pulcherrima* maya türlerinde değişik oranlarda bulunduğu görüldü. Alkalın fosfataz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8) ve Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz enzimlerinin ise düşük seviyede ve maya türleri arasında değişken seviyede bulunduğu tespit edildi. *M. pulcherrima* maya türlerinin tripsin,  $\alpha$ -chymotripsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase ve  $\alpha$ -fucosidase enzim aktivitelerine sahip olmadığı görüldü.

TEST EDİLEN ENZİM		SIVI KÜLTÜR				PETRİ	
		Süpernatant		Hücre		Hücre	
		MP-12	C	MP-12	C	MP-12	C
1	Kontrol						
2	Alkalın fosfataz						
3	Esteraz (C 4)						
4	Esteraz lipaz (C 8)						
5	Lipaz (C 14)						
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 4.8. Maya hücrelerinin katı ve sıvı besi ortamlarda hücre dışı enzim aktiviteleri.

TEST EDİLEN ENZİM		MP-12	MP-16	MP-30	MP-51	MP-57	MP-61	C
1	Kontrol							
2	Alkalın fosfataz							
3	Esteraz (C 4)							
4	Esteraz lipaz (C 8)							
5	Lipaz (C 14)							
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 4.9. *M.pulcherrima* maya hücrelerinin hücre dışı enzim aktiviteleri.

**4.9. *M. pulcherrima* Maya Türünde İvertaz ve İnulinaz Enzim Aktiviteleri**

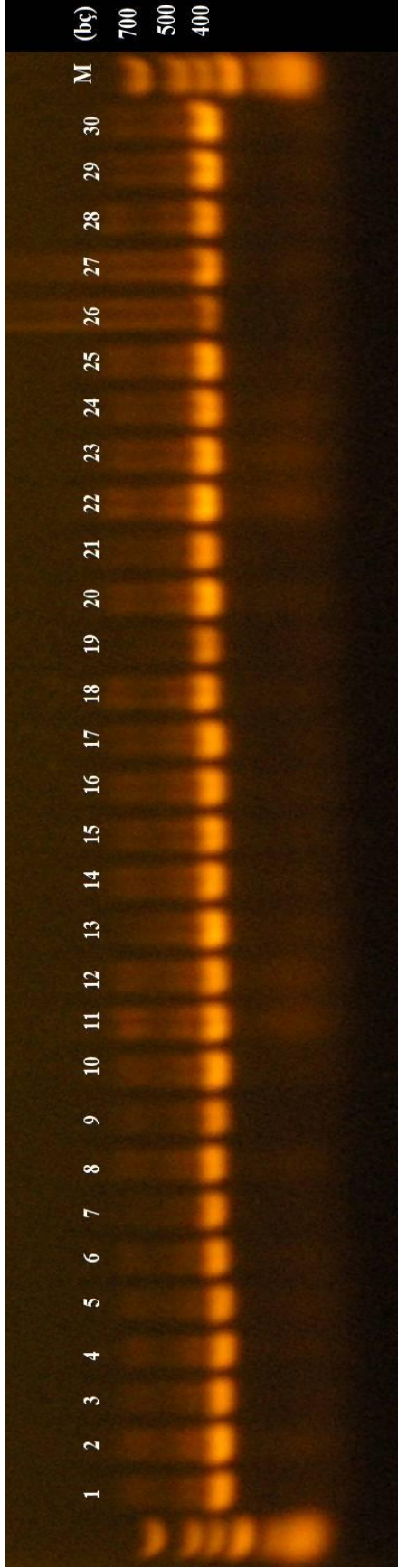
Maya hücrelerinin hücre dışı, parietal ve hücre içi invertaz ve inulinaz aktivitelerini belirlemek için bir tane *M. pulcherrima* maya suşu seçildi. Uygun koşullarda hazırlanan enzim çözeltileri % 0,2'lik sukroz içeren ortamda invertaz aktivitesini belirleyebilmek için 37°C'de ve inulinaz aktivitesini belirleyebilmek için 55°C'de inkübe edildi. Açığa çıkan glikoz  $\mu\text{mol}$  glikoz/dakika/100mg kuru maya ağırlığı olarak hesaplandı ve Çizelge 4.11'de verildi. *M. pulcherrima* maya türünde hücre dışı invertaz ve inulinaz aktivitesinin oldukça düşük olduğu parietal bölgede ise çok fazla enzim aktivitesi olmadığı kaydedildi. Maya türünde inulinaz aktivitesinin ise yüksek olduğu belirlendi.

Çizelge 4.11. *M. pulcherrima* maya türünde invertaz ve inulinaz aktivitesi (1 ünite (U) = 1  $\mu\text{mol}$  glikoz/dakika/100mg kuru ağırlık)

Enzimatik Aktivite	İvertaz (U)	İnulinaz (U)
Hücre Dışı	2,4 $\pm$ 0,13	4,7 $\pm$ 0,11
Parietal	7,1 $\pm$ 0,16	9,4 $\pm$ 0,14
Hücre İçi	18,0 $\pm$ 0,18	42,0 $\pm$ 0,16

**4.10. *M. pulcherrima* Maya Türünden Genomik DNA İzolasyonu ve Amplifikasyonu**

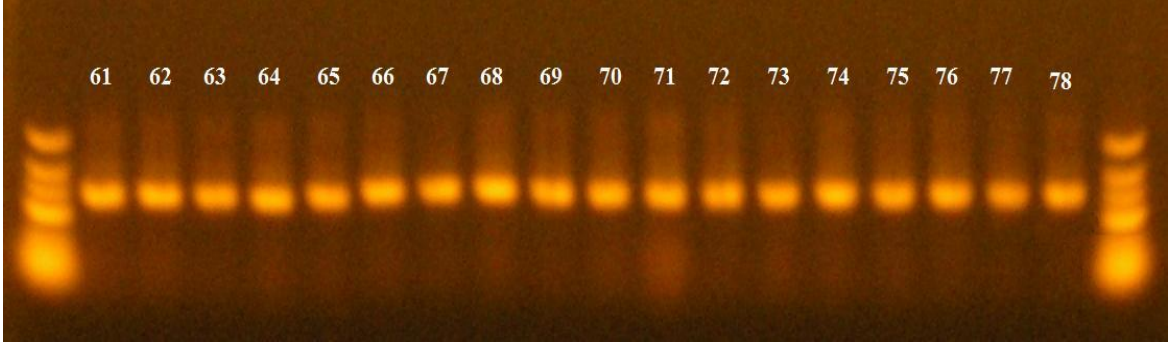
*M. pulcherrima* maya hücrelerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı (Sherman ve ark., 1986). Elde edilen DNA'nın saflığı ve miktarı spektrofotometrik (A260/A280) yöntemle tespit edildi. ITS1-5,8 rDNA-ITS2 bölgesinin amplifikasyonu için ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak ITS1-5,8 rDNA-ITS2 bölgesi çoğaltıldı (White ve ark.,1990). Çalışmamızda elde edilen PCR ürünleri Fermentas Gene JET PCR Purification Kit (Fermentas K0702) kullanılarak saflaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verildi. Tüm maya suşlarında yaklaşık 400 baz çifti uzunluğunda DNA bölgesinin amplifike olduğu belirlendi.



Şekil 4.10. *M. pulcherrima* maya suşlarının PCR ile amplifikasyonu (MP-1 – MP-30).



Şekil 4.11. *M. pulcherrima* maya suşlarının PCR ile amplifikasyonu (MP-1 – MP-30).



Şekil 4.12. *M. pulcherrima* maya suşlarının PCR ile amplifikasyonu (MP-61 – MP-78).

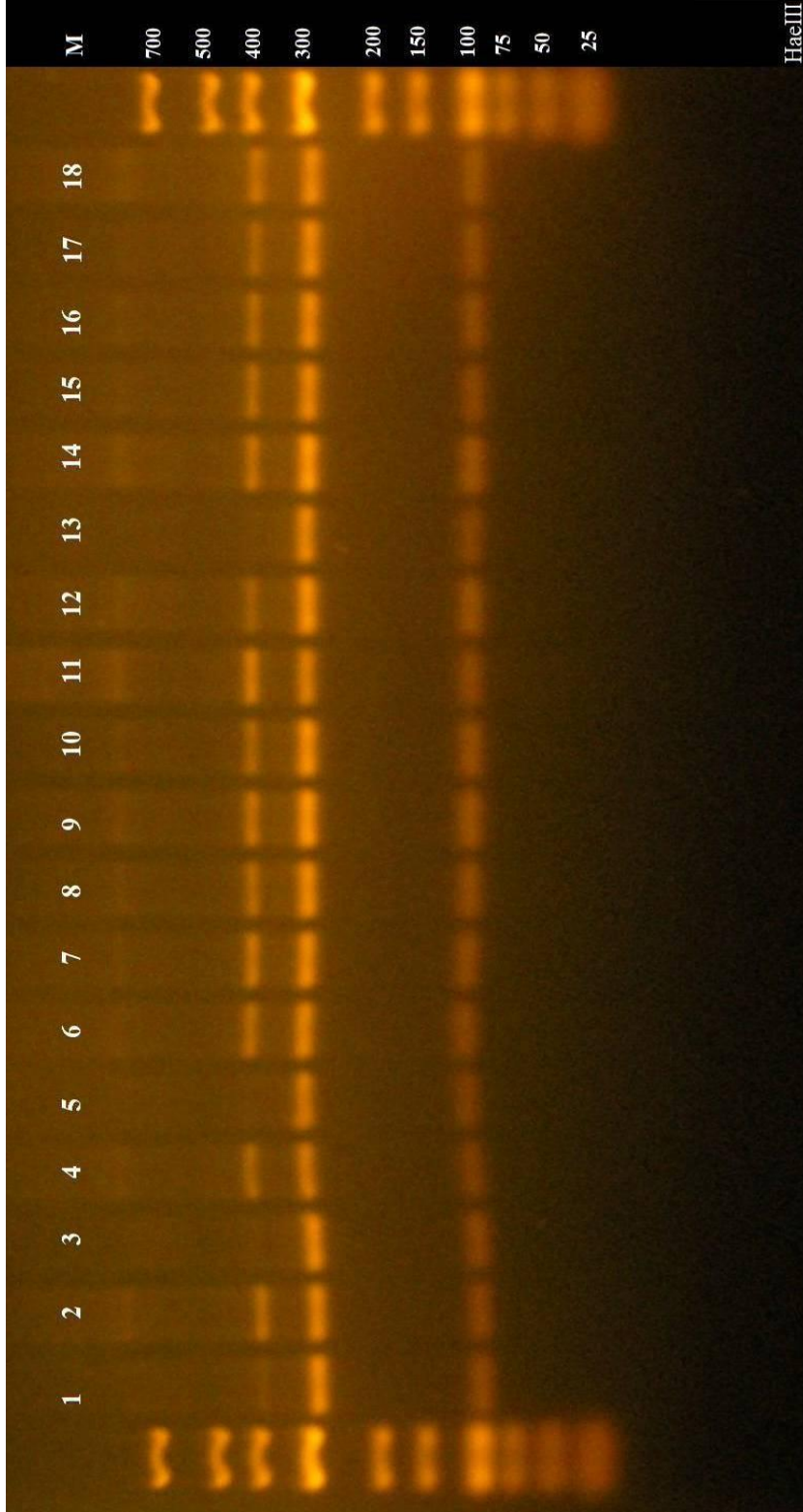
#### 4.11. Restriksiyon Kesim Profilleri

Pürifikasyon sonrası PCR ürünlerinin *HinfI*, *HaeIII*, *MspI*, *AluI* ve *CfoI* restriksiyon enzimleri kullanılarak üretici firmanın önerdiği koşullarda restriksiyon kesimleri gerçekleştirildi. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HaeIII* enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.13 (MP-1'den MP-18'e kadar), Şekil 4.14 (MP-19'dan MP-36'ya kadar), Şekil 4.15 (MP-37'den MP-54'e kadar), Şekil 4.16 (MP-55'den MP-66'ya kadar) ve Şekil 4.17'de (MP-68'den MP-80'e kadar) verildi. *M. pulcherrima* maya suşlarının *CfoI* (*HhaI*) enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.18 (MP-1'den MP-18'e kadar), Şekil 4.19 (MP-19'dan MP-36'ya kadar), Şekil 4.20 (MP-37'den MP-54'e kadar), Şekil 4.21 (MP-55'den MP-66'ya kadar) ve Şekil 4.22'de (MP-68'den MP-80'e kadar) verildi. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HinfI* enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.23 (MP-1'den MP-18'e kadar), Şekil 4.24 (MP-19'dan MP-36'ya kadar), Şekil 4.25 (MP-37'den MP-54'e kadar), Şekil 4.26 (MP-55'den MP-66'ya kadar) ve Şekil 4.27'de (MP-68'den MP-80'e kadar) verildi. *M. pulcherrima* maya suşlarının *MspI* (*HpaII*) enzimi ile kesim sonuçları Şekil 4.28 (MP-1'den MP-18'e kadar), Şekil 4.29 (MP-19'dan MP-36'ya kadar), Şekil 4.30 (MP-37'den MP-54'e kadar), Şekil 4.31 (MP-55'den MP-66'ya kadar) ve Şekil 4.32'de (MP-68'den MP-80'e kadar) verildi. *M. pulcherrima* maya suşlarının *AluI* enzimi ile kesimi sonrası PCR ürününde kesim gözlenmedi. Bu nedenle *AluI* enzim sonuçlarının fotoğrafları verilmedi ve daha sonraki işlemler için *AluI* enzim sonuçları kullanılmadı.

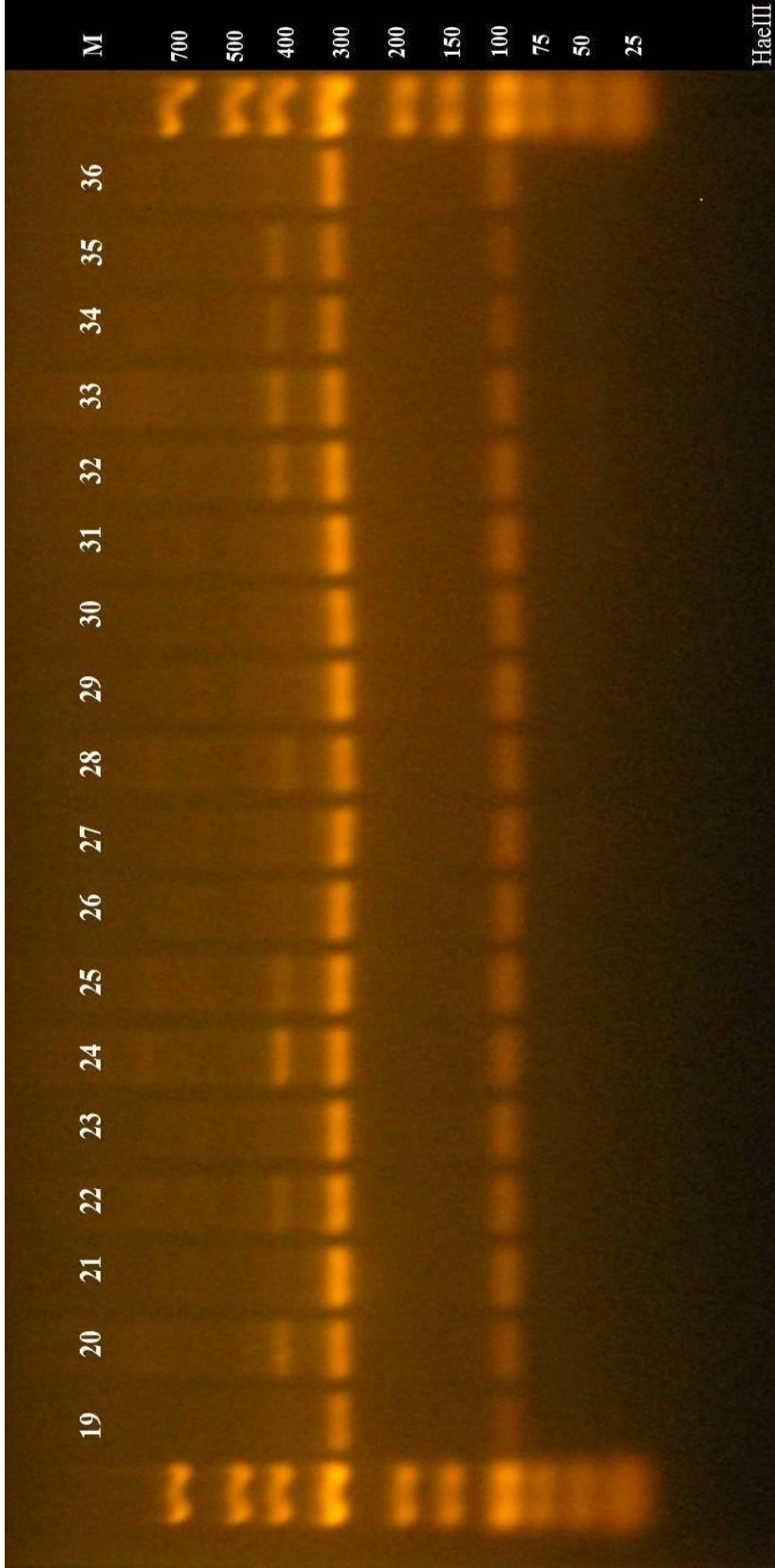
*HhaI* ve *Hinf I* enzimleri tüm izole edilen *M.pulcherrima* maya suşlarında tek kesim profili göstermiş olduğundan bu enzimlerin kesimlerinde polimorfizm gözlenmemiştir. Benzer olarak *AluI* kesim bölgesi bulunmadığından bu enzimde yine diğer iki enzim gibi polimorfizm göstermemektedir. *HaeIII* ve *HpaII* kesimleri ise iyi bir diskriminasyon gösterdiğinden polimorfizm göstermektedir.



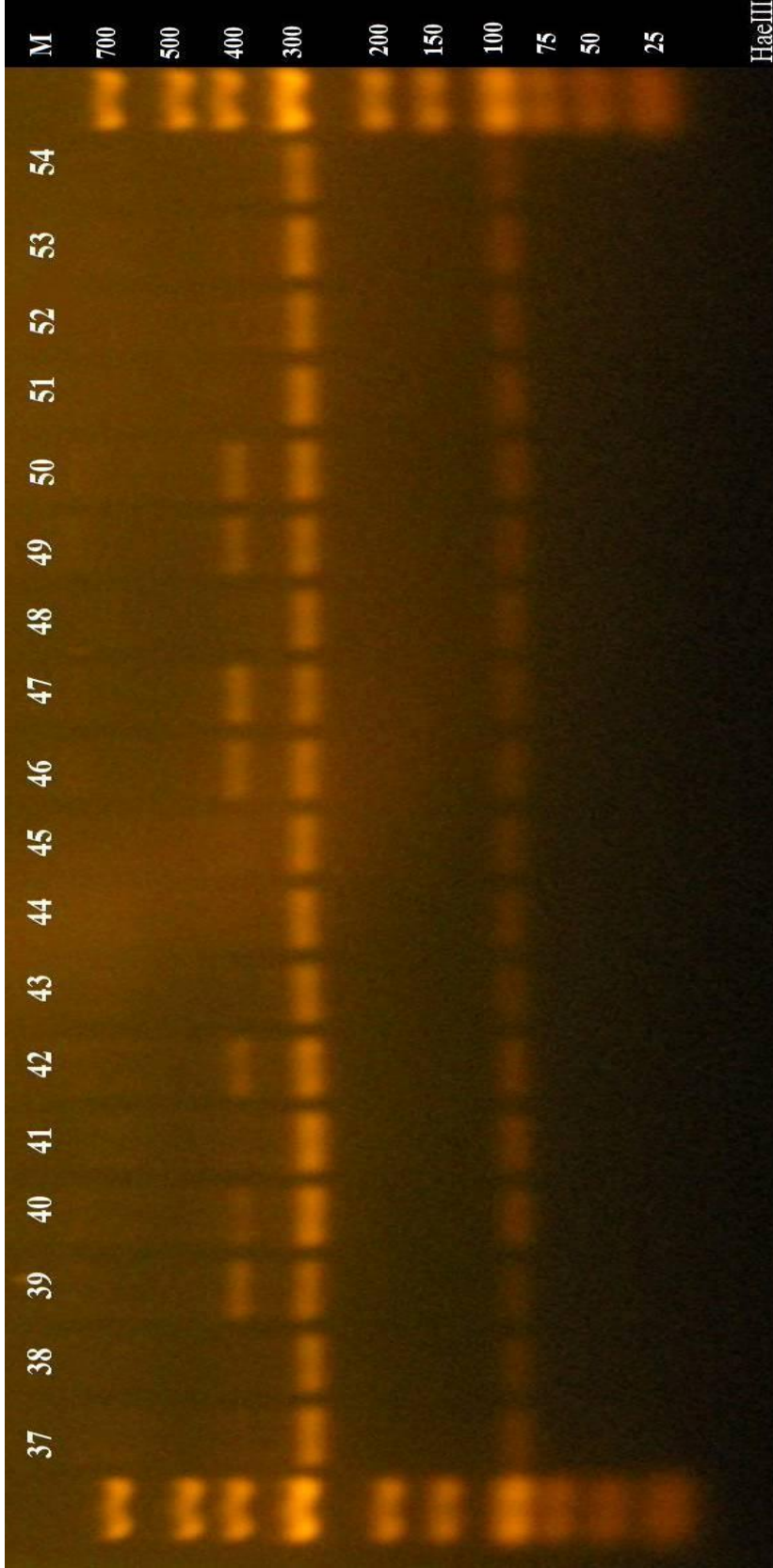
Maya suşlarının *HinfI*, *HaeIII*, *MspI* ve *CfoI* restriksiyon kesimi sonucu elde edilen bantların büyüklüğü hesaplanarak Çizelge 4.12’de verildi.



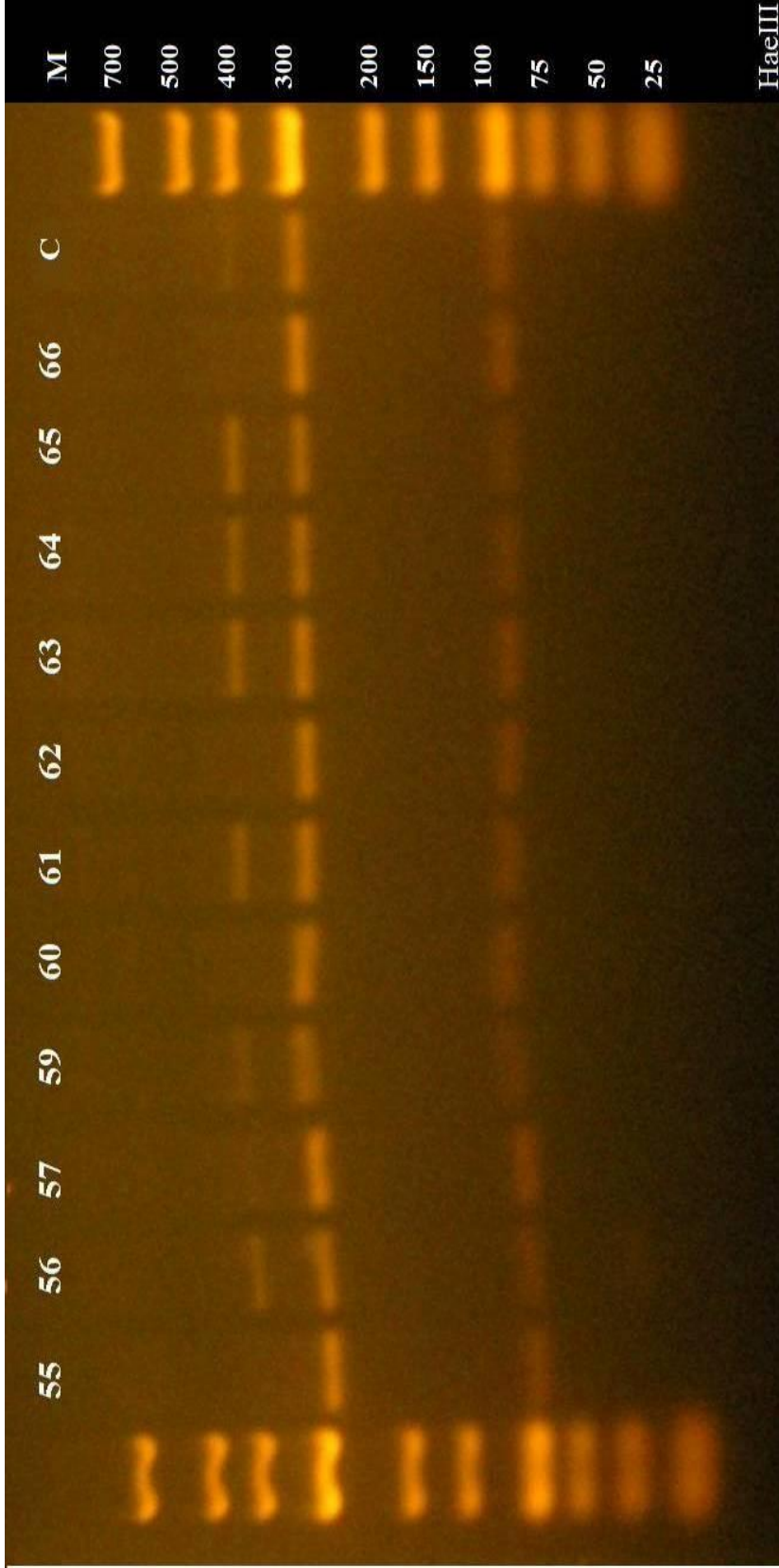
Şekil 4.13. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HaeIII* enzim kesim sonucu (MP-1 – MP-18).



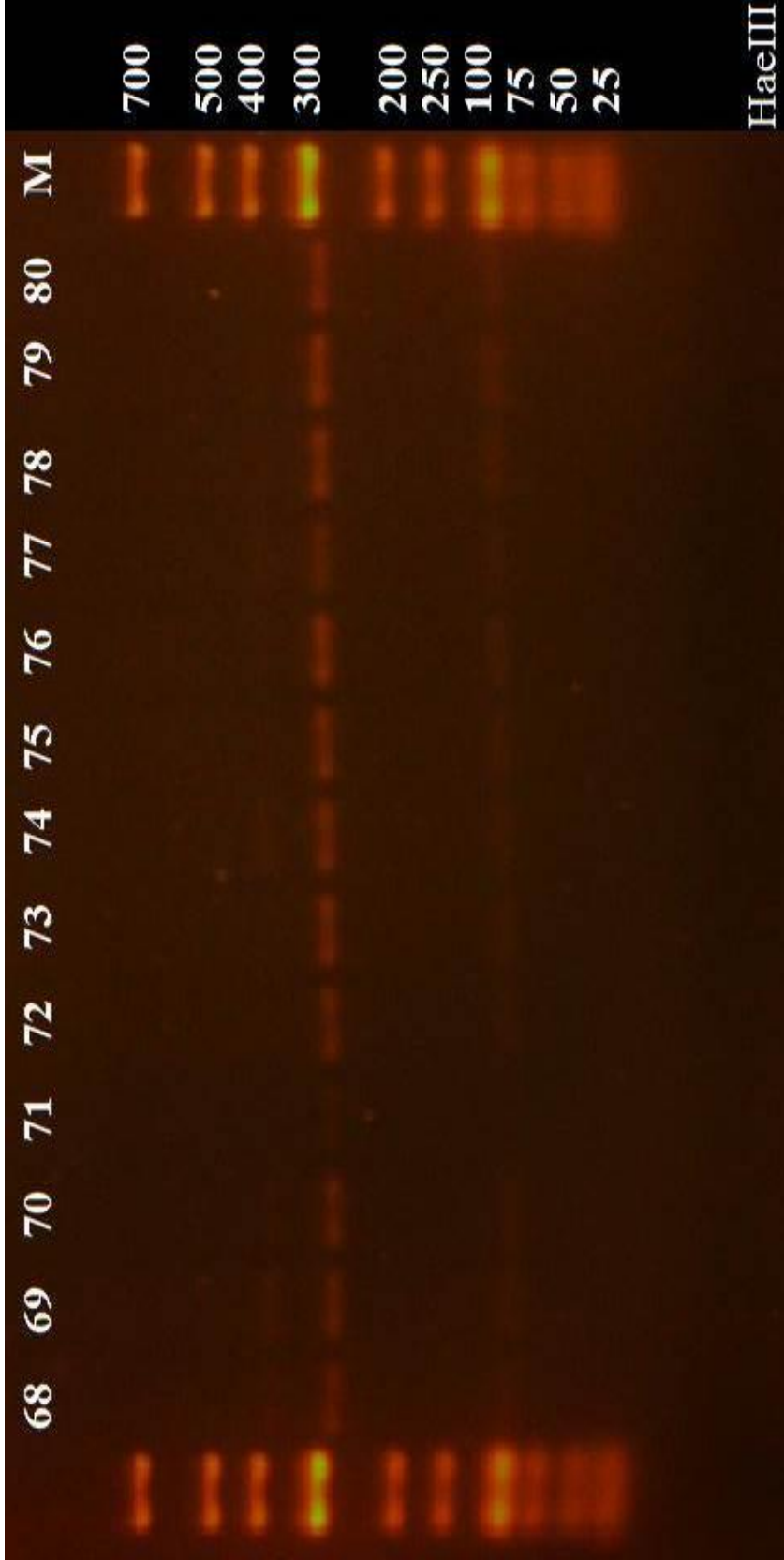
Şekil 4.14. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HaeIII* enzim kesim sonuçları (MP-19 – MP-36).



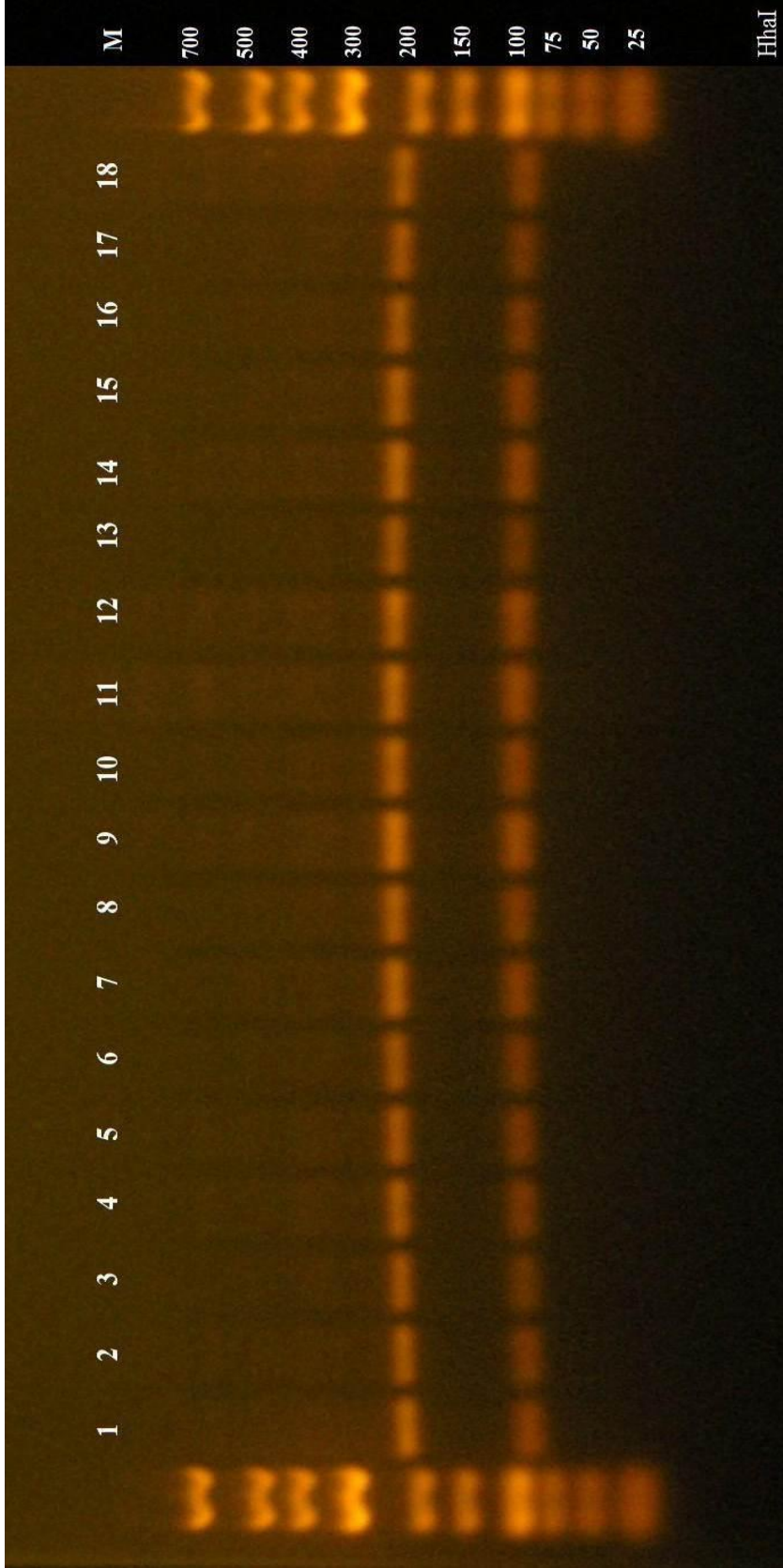
Şekil 4.15. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HaeIII* enzim kesim sonuçları (MP-37 – MP-54).



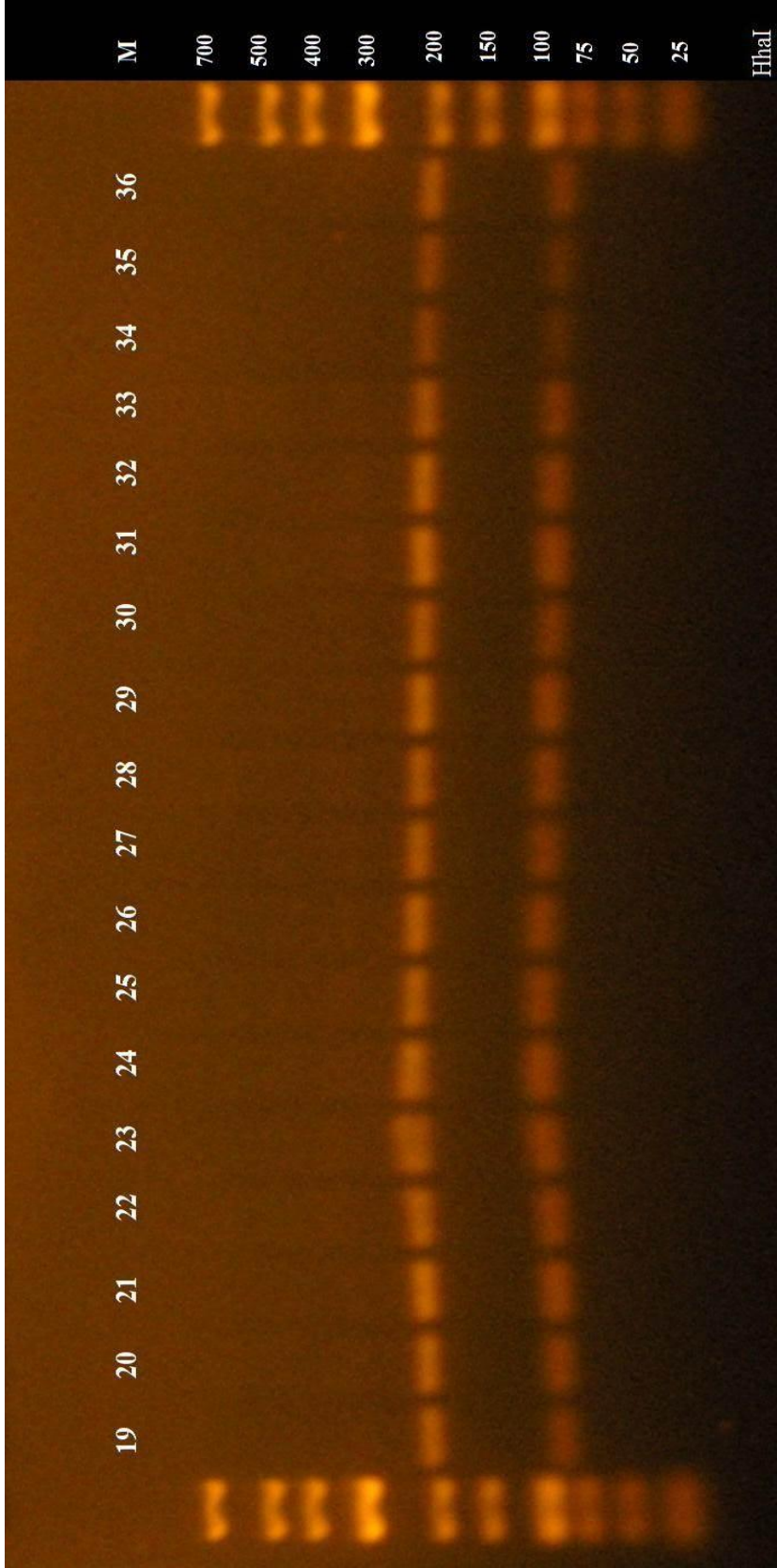
Şekil 4.16. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HaeIII* enzim kesim sonuçları (MP-55 – MP-66).



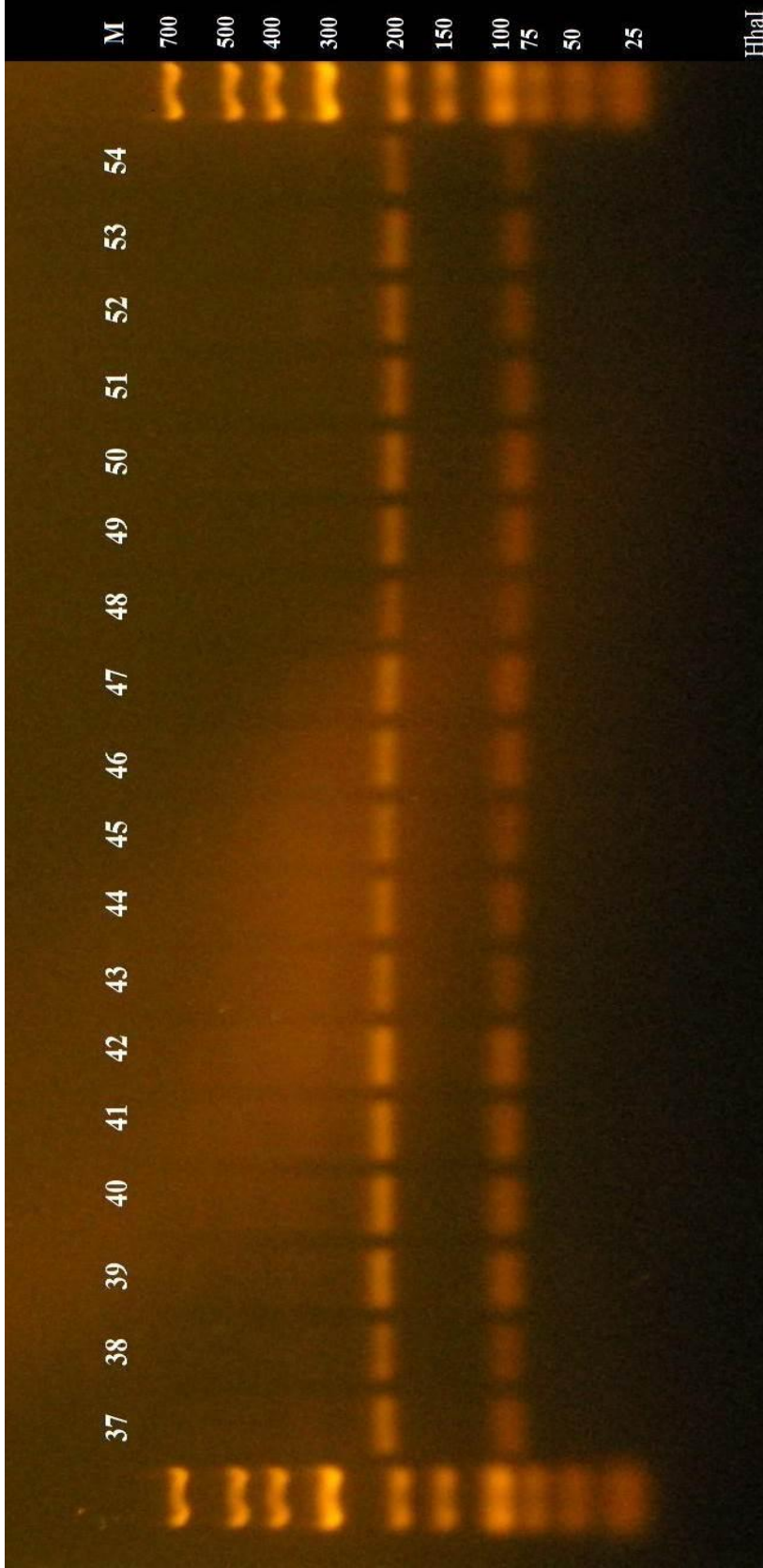
Şekil 4.17. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HaeIII* enzim kesim sonuçları (MP-68 – MP-80).



Şekil 4.18. *M. pulcherrima* maya suşlarının *CfoI* (*HhaI*) enzim kesim sonuçları (MP-1 – MP-18).

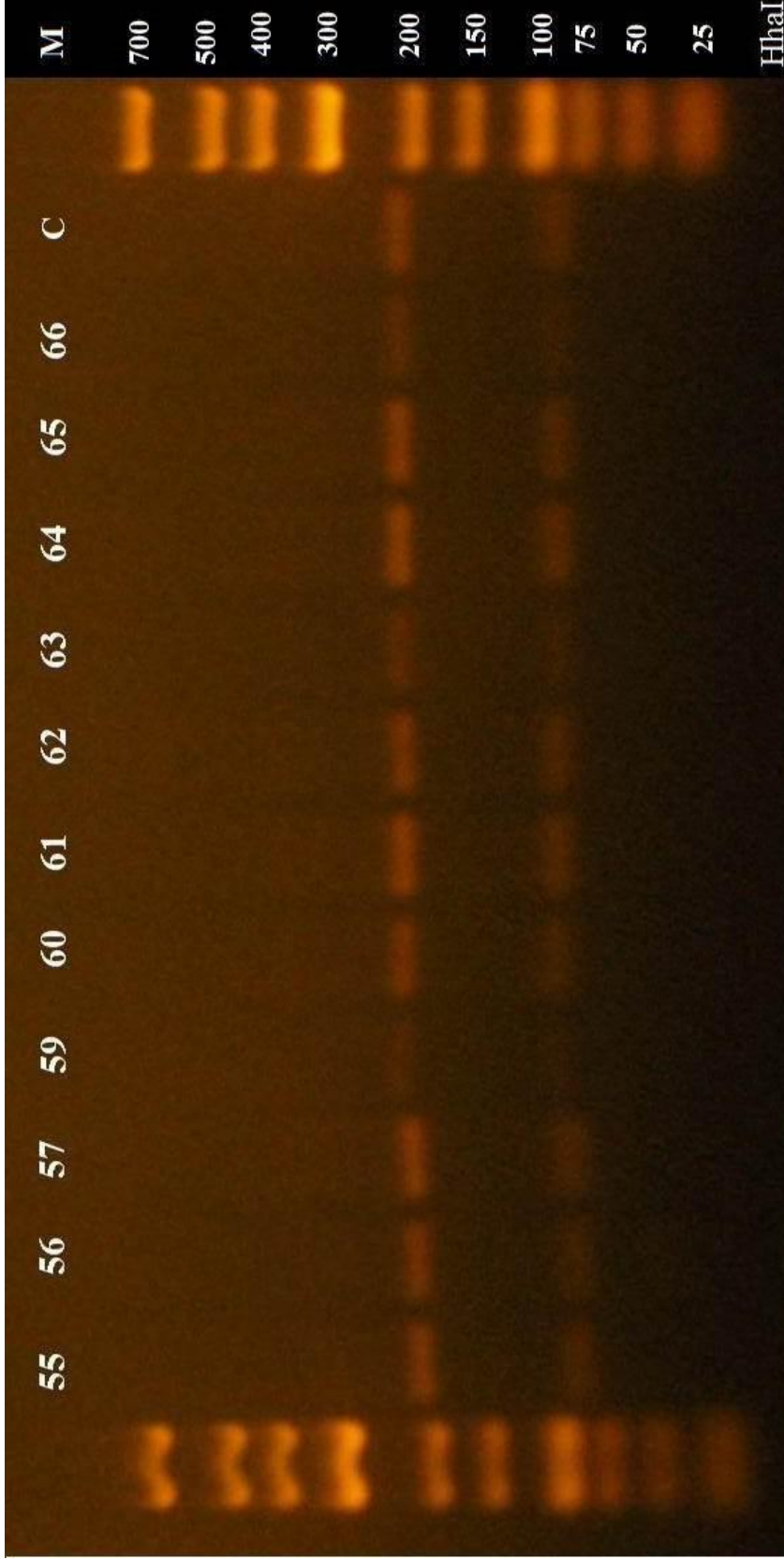


Şekil 4.19. *M. pulcherrima* maya suşlarının *CfoI* (*HhaI*) enzim kesim sonuçları (MP-19 – MP-36).

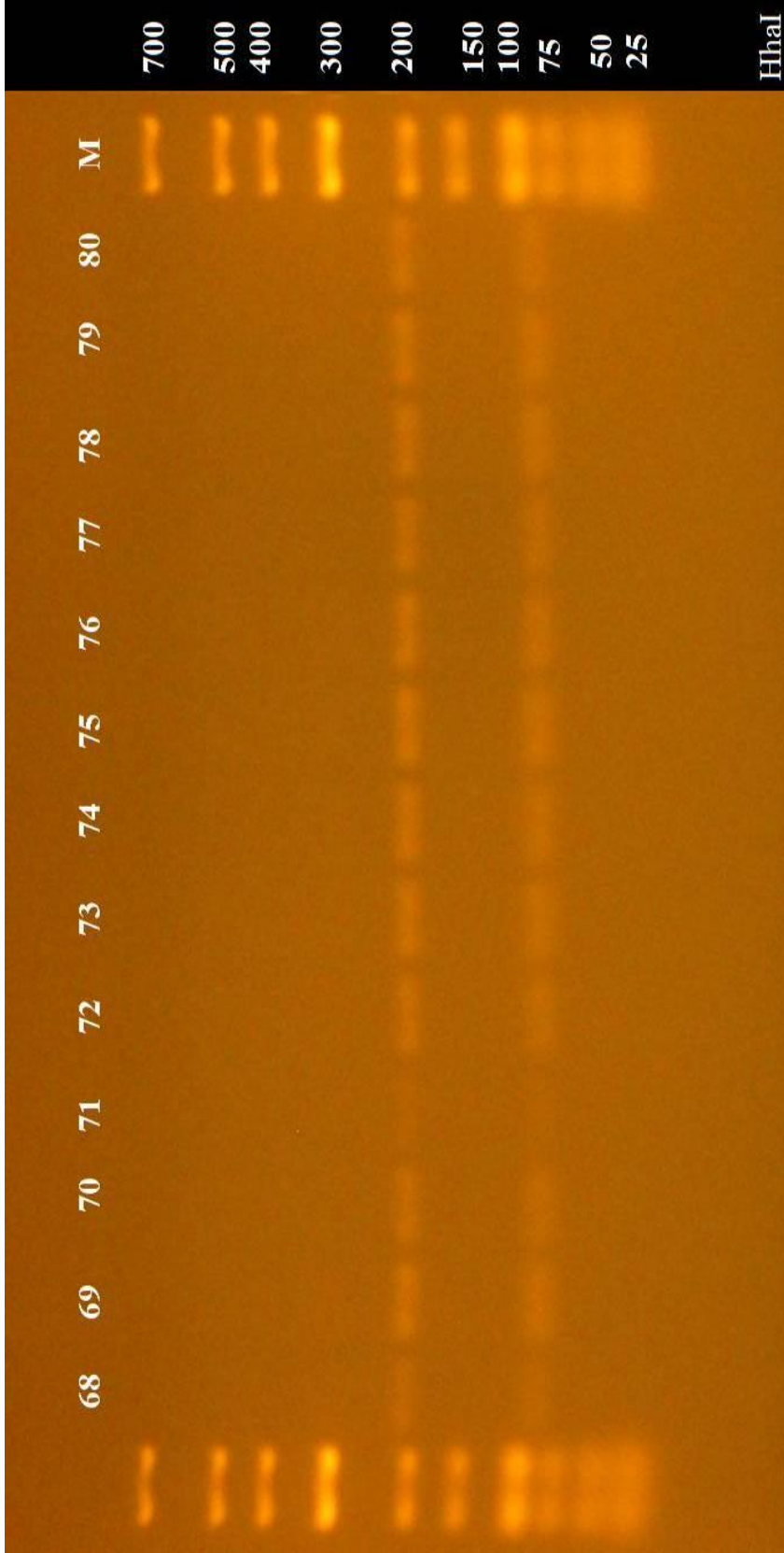


Şekil 4.20. *M. pulcherrima* maya suşlarının *CfoI* (*HhaI*) enzim kesim sonuçları (MP-37 – MP-54).

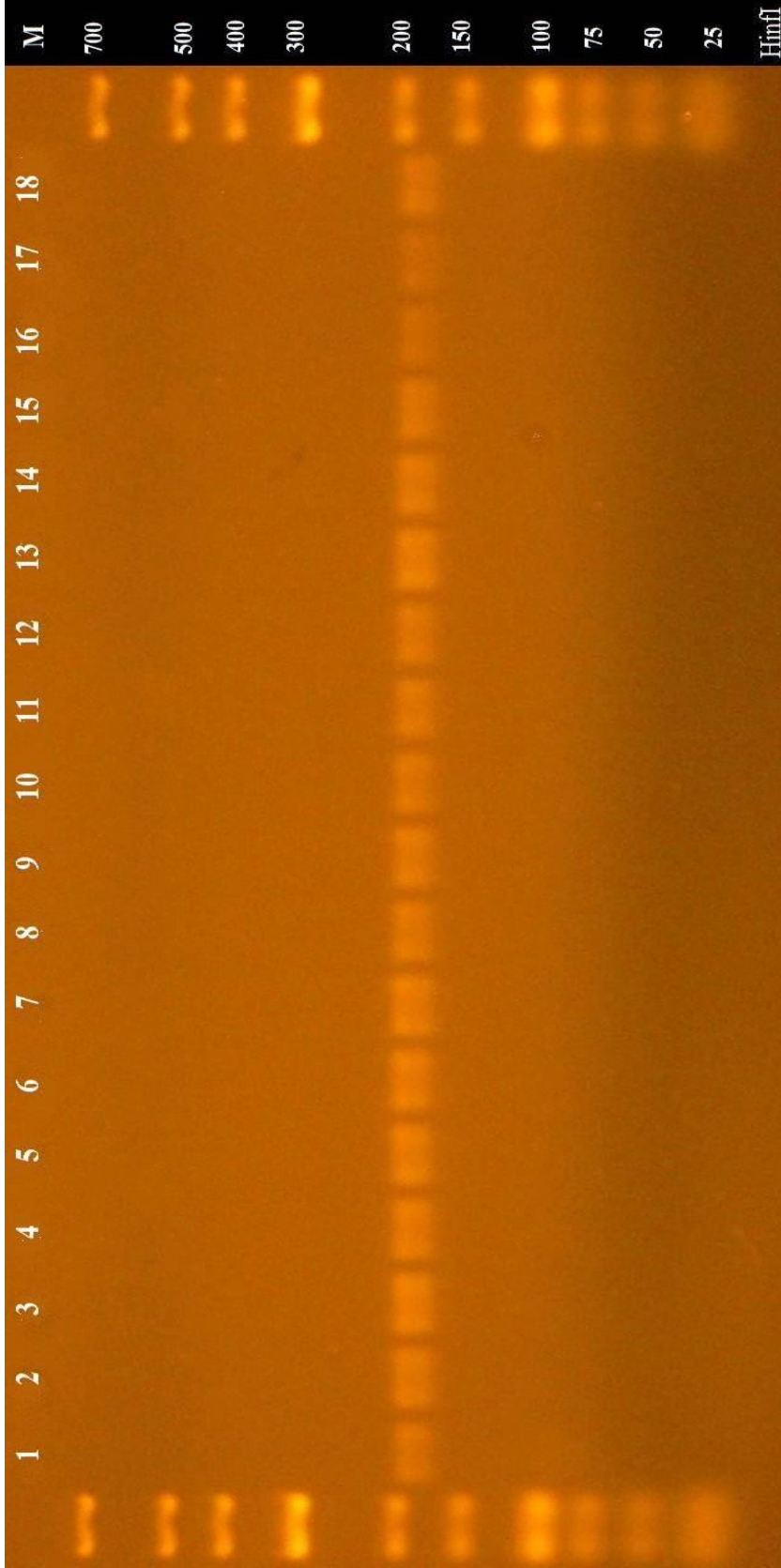




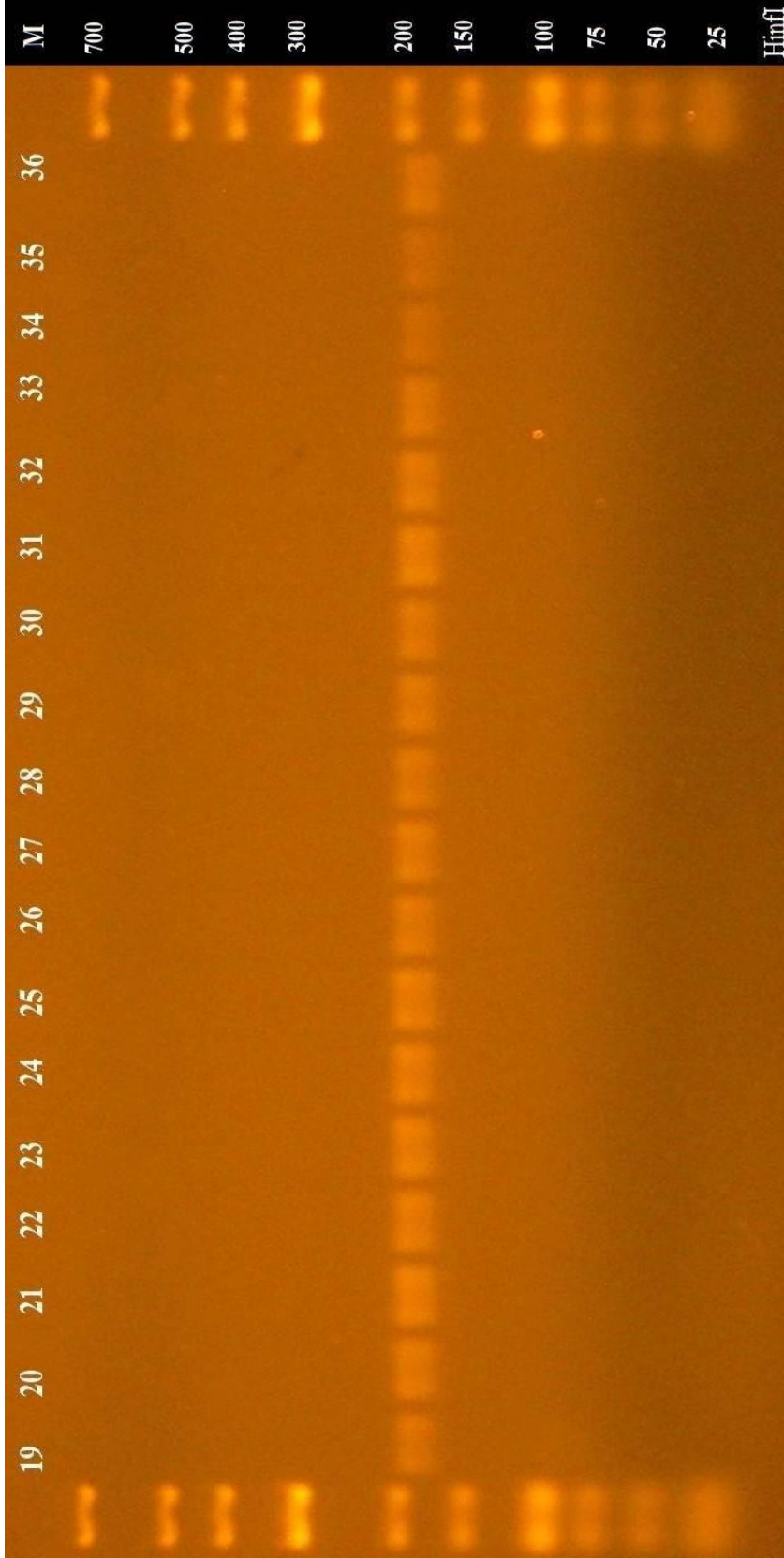
Şekil 4.21. *M. pulcherrima* maya suşlarının *CfoI* (*HhaI*) enzim kesim sonuçları (MP-55 – MP-66).



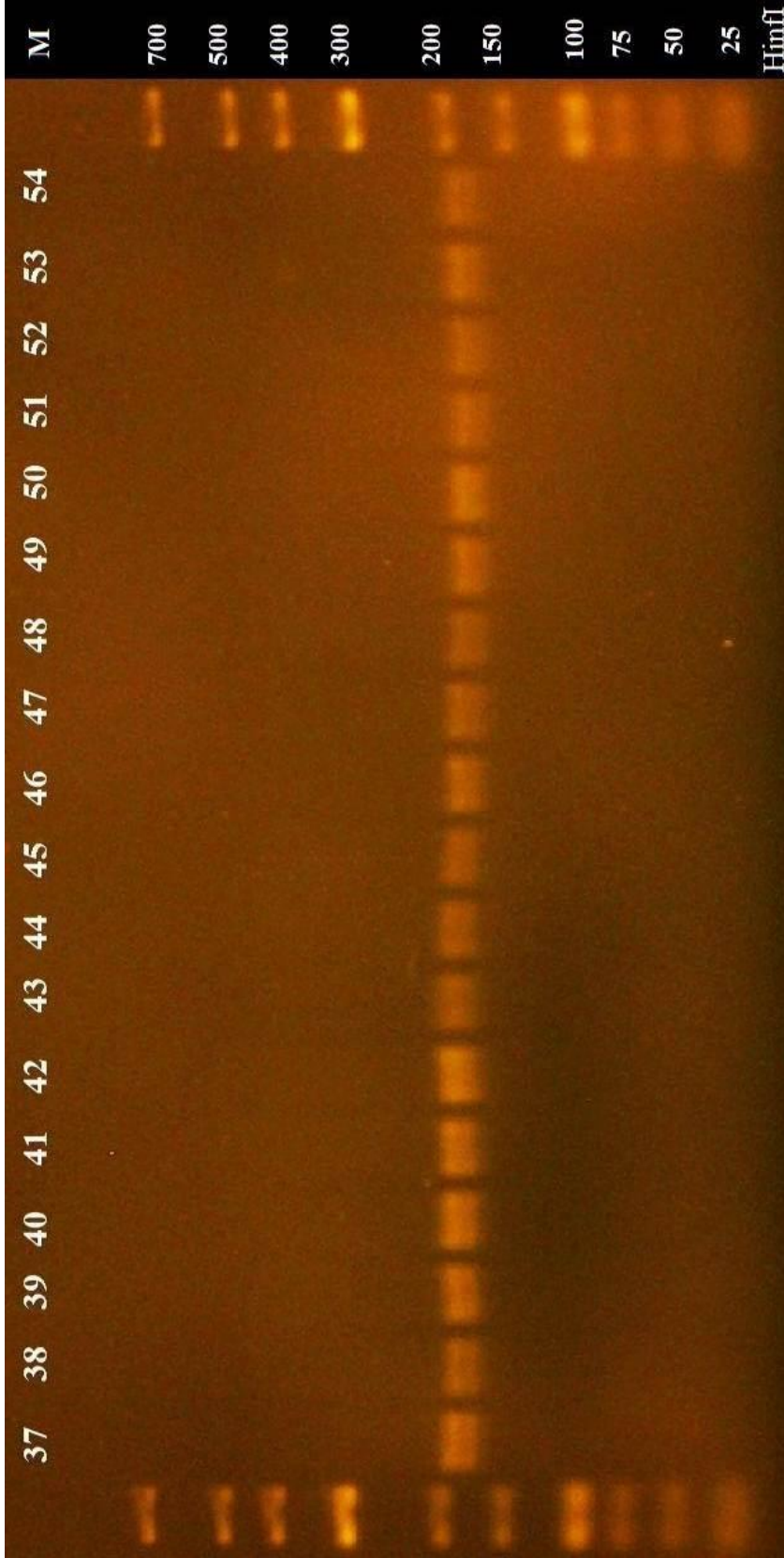
Şekil 4.22. *M. pulcherrima* maya suşlarının *CfoI* (*HhaI*) enzim kesim sonuçları (MP-68 – MP-80).



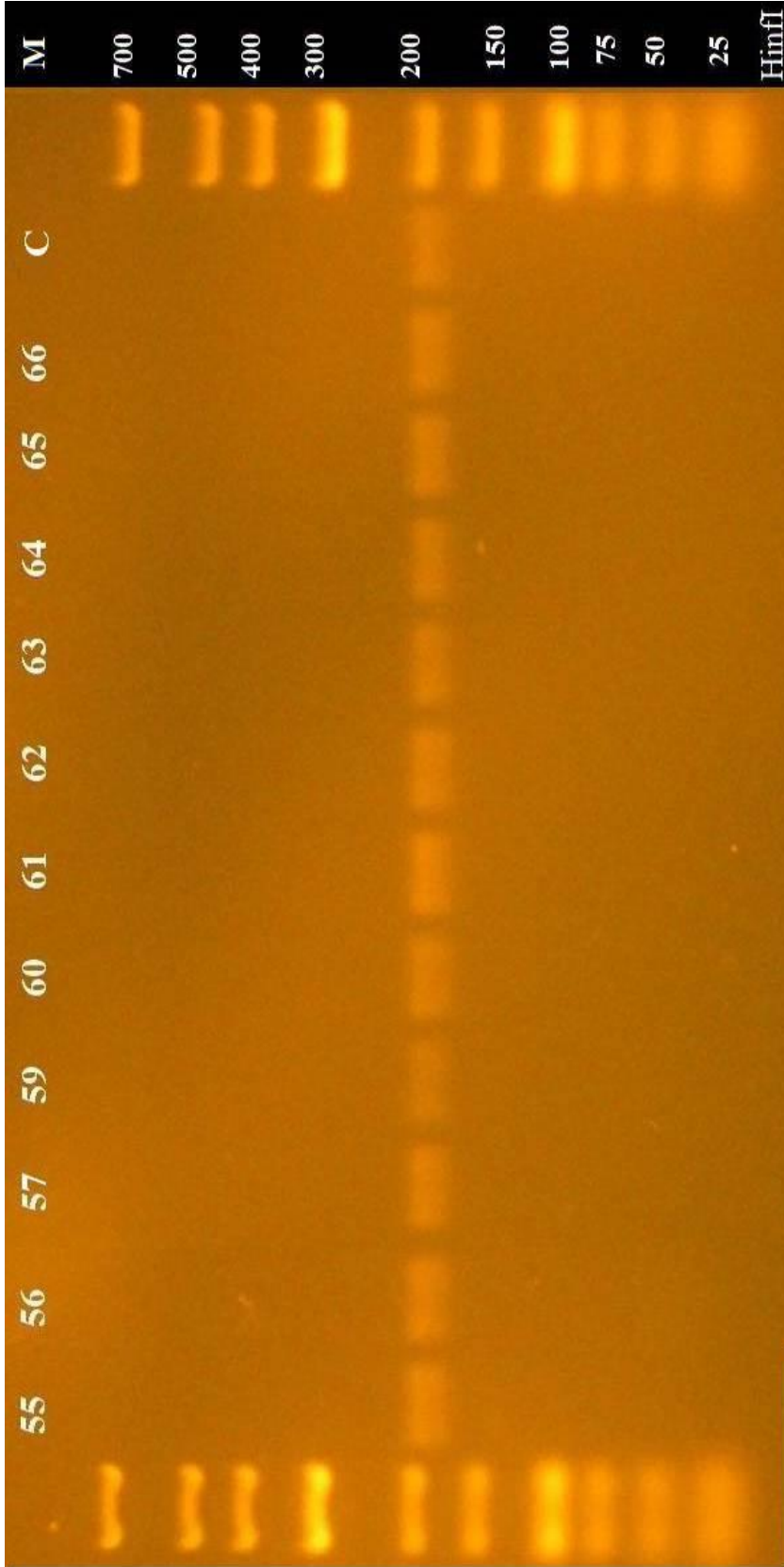
Şekil 4.23. *M. pulcherrima* maya suşlarının *Hinfi* enzim kesim sonuçları(MP-1 – MP-18).



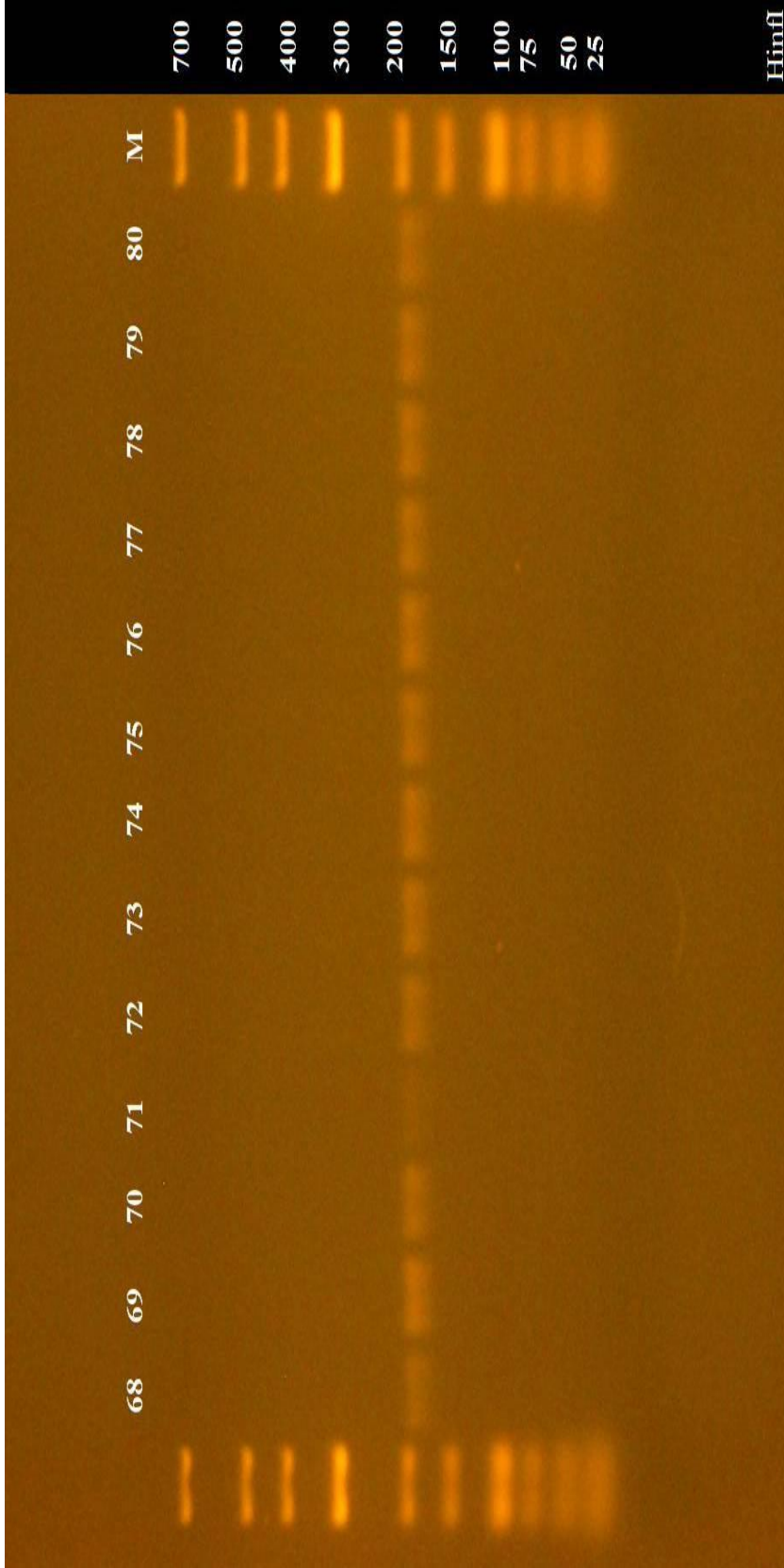
Şekil 4.24. *M. pulcherrima* maya suşlarının *Hinfi* enzim kesim sonuçları (MP-19 – MP-36).



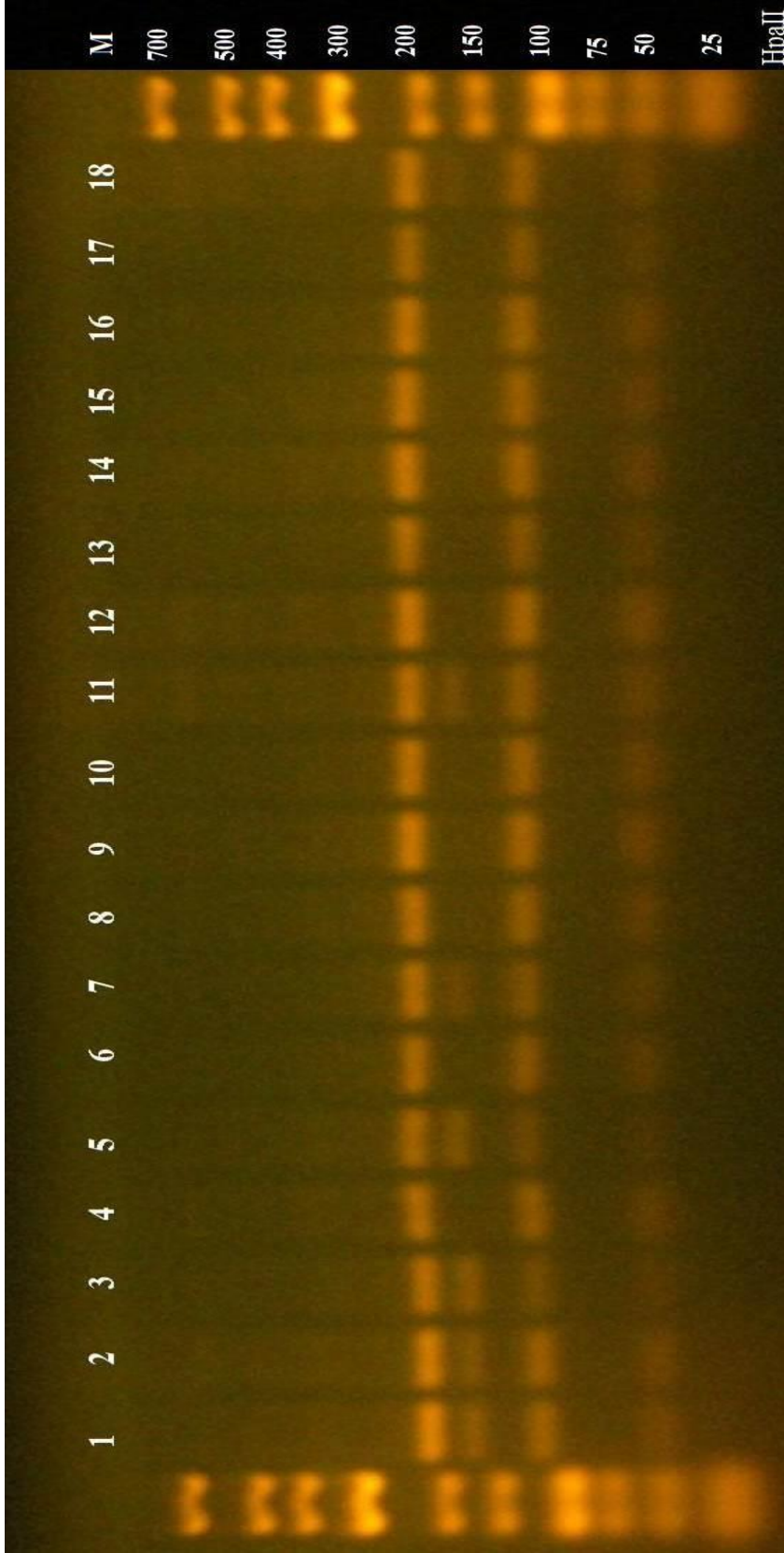
Şekil 4.25. *M. pulcherrima* maya suşlarının *Hinfl* enzim kesim sonuçları (MP-37 – MP-54).



Şekil 4.26. *M. pulcherrima* maya susularının *HinfI* enzim kesim sonuçları (MP-55 – MP-66).

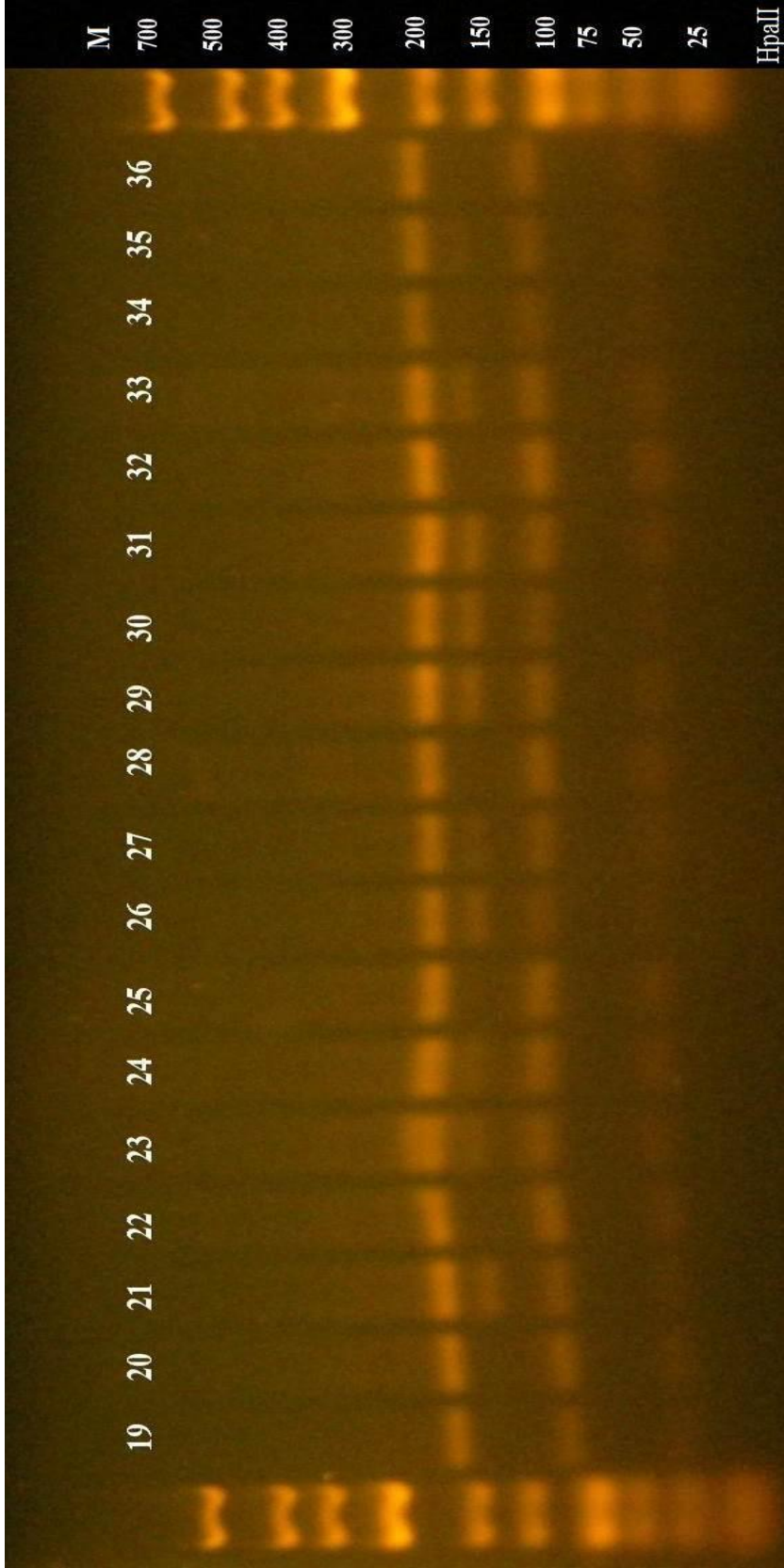


Şekil 4.27. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HinfI* enzim kesim sonuçları (MP-68 – MP-80).

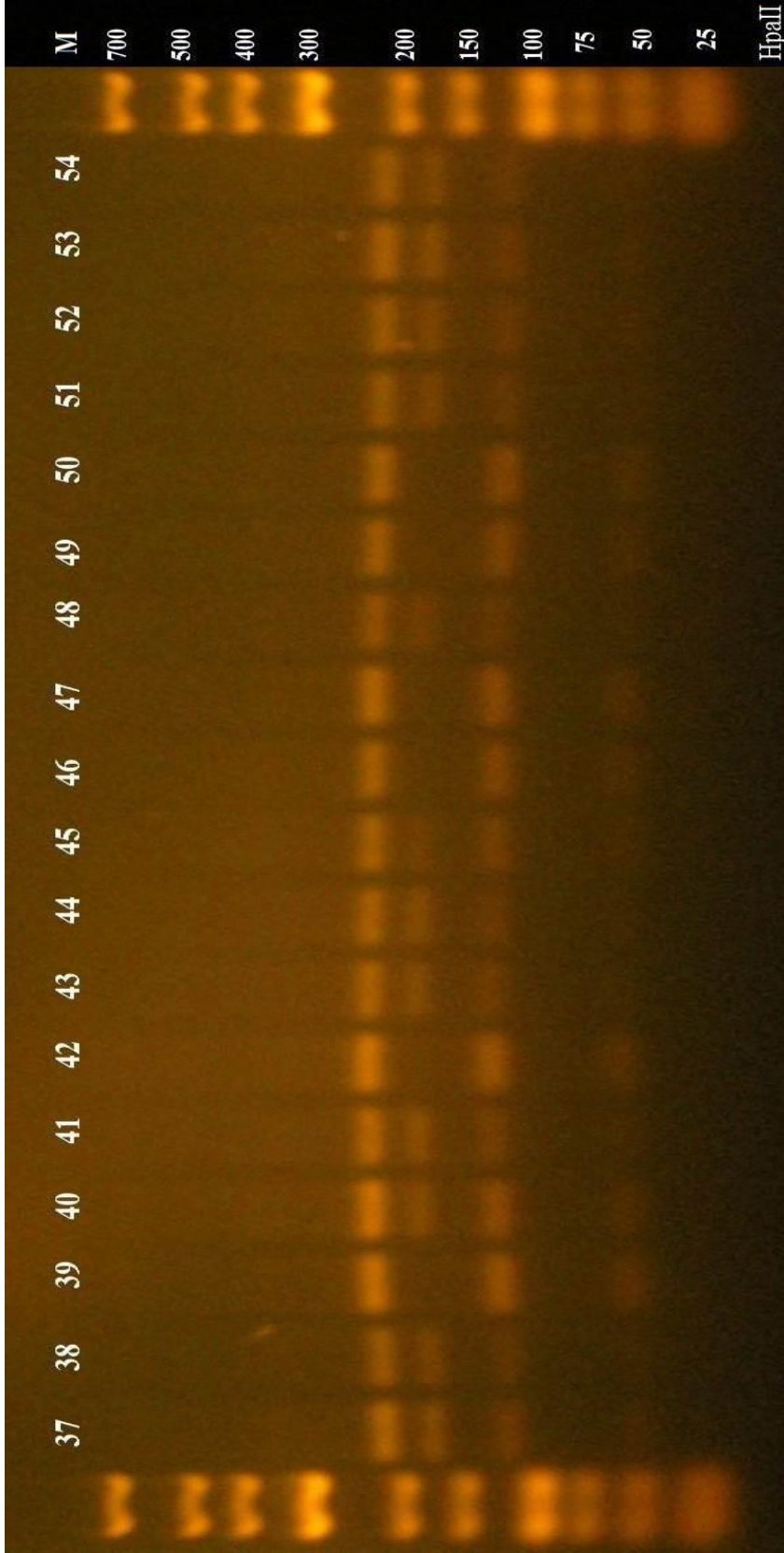


Şekil 4.28. *M. pulcherrima* maya suşlarının *MspI* (*HpaII*) enzim kesim sonuçları (MP-1 – MP-18).

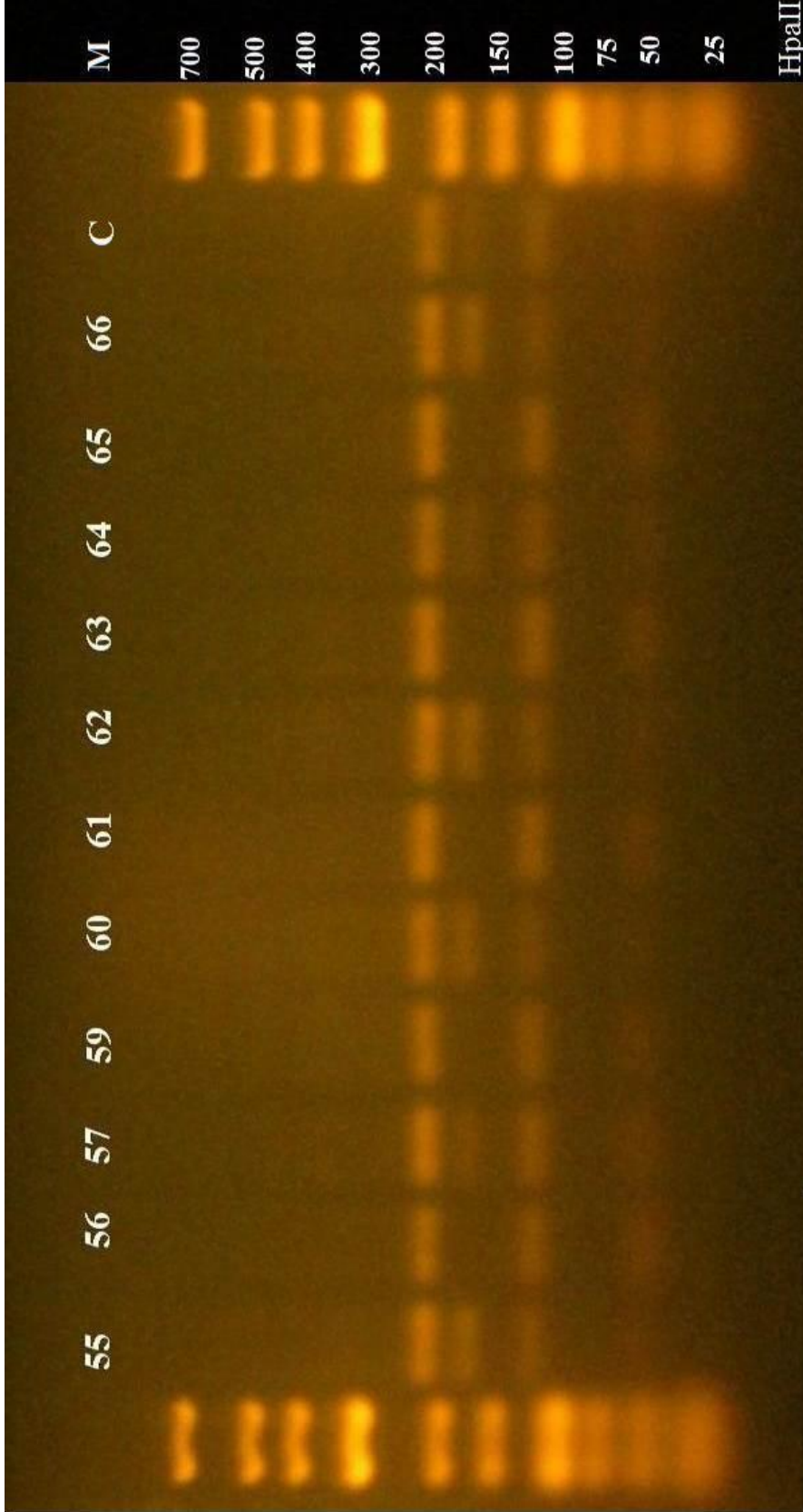




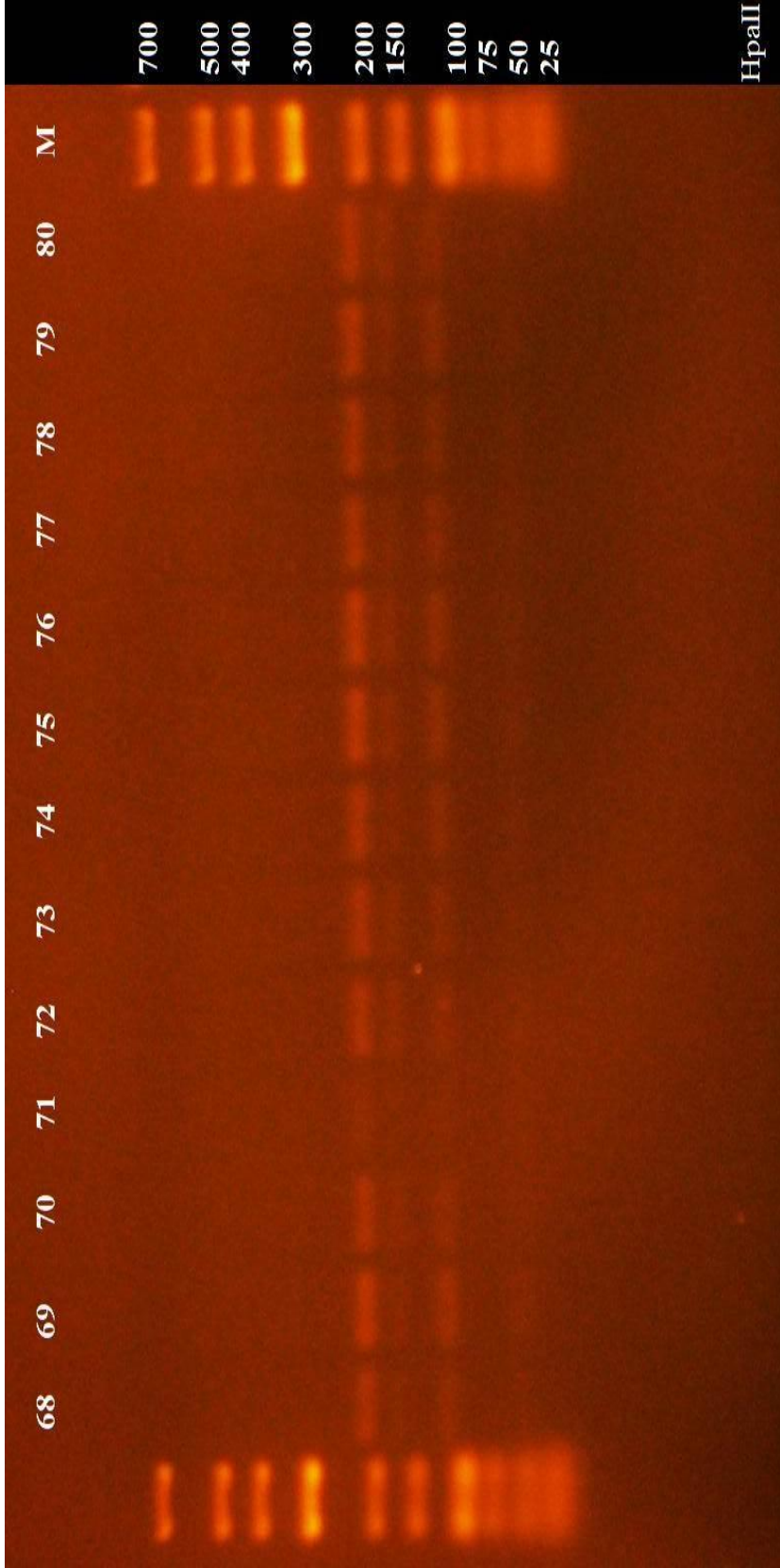
Şekil 4.29. *M. pulcherrima* maya suşlarının *MspI* (*HpaII*) enzim kesim sonuçları (MP-19 – MP-36).



Şekil 4.30. *M. pulcherrima* maya suşlarının *MspI* (*HpaII*) enzim kesim sonuçları (MP-37 – MP-54).



Şekil 4.31. *M. pulcherrima* maya suşlarının *MspI* (*HpaII*) enzim kesim sonuçları (MP-55 – MP-66).



Şekil 4.32. *M. pulcherrima* maya suşlarının *MspI* (*HpaII*) enzim kesim sonuçları (MP-68 – MP-80).

## **BÖLÜM-4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA İlknur Nezahat ÇILDIR**

Çizelge 4.12. *M. pulcherrima* maya suşlarının *HinfI*, *HaeIII*, *HpaII* (*MspI*) ve *HhaI* (*CfoI*) restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen bant büyüklüğü

Maya Suşu	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>
MP-1, MP-2, MP-7,MP-11, MP-18, MP-24, MP-33, MP-35, MP-40, MP-57, MP-64, MP-68, MP-69, C	393/289/100	221/92/92	193/185	216/174/118/52
MP-3, MP-5, MP-21,MP-23, MP-26, MP-27, MP-29, MP-30, MP-31, MP-37, MP-38, MP-41, MP-43, MP-44, MP-45, MP-48, MP-51, MP-52, MP-53, MP-54, MP-55, MP-60, MP-62, MP-66, MP-70, MP-71, MP-72, MP-73, MP-74, MP-75, MP-76, MP-77, MP-78, MP-79, MP-80	296/101	225/98/98	195/190	219/178/119/53
MP-4, MP-6,MP-8, MP-9, MP-10, MP-12, MP-14, MP-15, MP-16, MP-17, MP-20, MP-22, MP-25, MP-32, MP-34, MP-39, MP-42, MP-46, MP-47, MP-49, MP-50, MP-56, MP-59, MP-61, MP-63, MP-65	416/309/105	232/98/98	196/188	226/122/53
MP-13, MP-19, MP-28, MP-36,	302/104	233/99/99	195/189	223/121/53

### **4.12. Restriksiyon Bant Profilleri ve Veri Analizleri**

Her bir restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bant profilleri ve her bir bant profili bir harf ile kodlanarak Çizelge 4.13'te verildi. Bileşik Haplotip (Composite haplotype) tablosu ve çalışılan her bir populasyonda (üzüm çeşidinde bulunan maya populasyonu) bulunan haplotiplerin frekansı Çizelge 4.14'te verildi. En yaygın (frekansı en yüksek) olan haplotip Tip 4 (BAAB) olup 6 populasyonda (Kınalı yapıncak maya populasyonu, Çavuş üzümü maya populasyonu, Karalahana üzümü maya populasyonu,

## **BÖLÜM-4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA İlknur Nezahat ÇILDIR**

Pembe Gemre üzüm çeşidi maya populasyonu, Efes Karası üzüm çeşidi maya populasyonu ve Cinsaut üzüm çeşidi maya populasyonu) ve 33 bireyde bulundu. Frekansı en düşük (en az yaygın) haplotip Tip 3 (BAAA) olup 2 populasyonda (Cabernet üzüm çeşidi maya populasyonu ve Kokulu Kabak üzüm çeşidi maya populasyonu) ve 3 bireyde bulundu. Özel haplotip (Private haplotype; Singletones) bulunamadı.

Haplotip çeşitliliği ve nükleotid çeşitliliği Çizelge 4.15'te verildi. Haplotip çeşitliliği en fazla Efes Karası üzümü maya populasyonunda (1.0+/-0.5) bulundu. Karalahana üzümü maya populasyonu (0.7619+/-0.11476), Çavuş üzümü maya populasyonu (0.6848+/-0.03584) ve Kokulu Kabak üzümü maya populasyonu (0.6667+/-0.31427) diğer yüksek haplotip çeşitliliğine sahip populasyonlar olarak bulundu. En düşük haplotip çeşitliliği ise Pembe Gemre üzümü maya populasyonunda (0.3333+/-0.21517)

Çizelge 4.13. Restriksiyon kesimi sonrası oluşan bant profilleri

	<b>HaeIII</b>	<b>HhaI</b>	<b>HinfI</b>	<b>HpaII</b>
<b>PCR ürünü</b>	~ 400 bp	~ 400 bp	~ 400 bp	~ 400 bp
<b>Profil A</b>	<u>400bp</u> <u>296bp</u> <u>100bp</u>	<u>221bp</u> <u>92bpX2</u>	<u>200bp</u> <u>189bp</u>	<u>225bp</u> <u>126bp</u> <u>54bp</u>
<b>Profil B</b>	<u>296bp</u> <u>100bp</u>	-	-	<u>225bp X2</u> <u>182bp</u> <u>123bp</u> <u>52bp</u>

Çizelge 4.14. Bileşik Haplotipler ve *M. pulcherrima* popülasyonunda bulunan haplotiplerin frekansı. (Bileşik haplotipler 4 restriksiyon enziminin kesimi sonucu oluşturulan profillere göre belirlenmiş olup restriksiyon enzimlerinin sırası *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI* ve *HpaII* şeklindedir.)

Haplotüp	Bileşik Haplotüp	Cabernet Üzümü	Kınalı Yapıncak	Çavuş Üzümü	Kardinal Üzümü	Karalahana Üzümü	Kokulu Kabak	Pembe Gemre	Efes Karası	Şensu Üzümü	Toplam
Tip 1	AAAA	0	8	9	3	3	2	1	1	0	27
Tip 2	AAAB	0	4	6	1	2	0	0	0	0	13
Tip 3	BAAA	2	0	0	0	0	1	0	0	0	3
Tip 4	BAAB	0	11	9	0	2	0	5	1	5	33
Örnek sayısı		2	23	24	4	7	3	6	2	5	76

Çizelge 4.15. Populasyon içi haplotip ve nükleotid çeşitliliğinin ortalaması ve standart hatası (Mean +/- S.E.)

Population	Haplotype Diversity	Nucleotide Diversity
1. Cabernet	0.0000 +/- 0.00000	0.000000
2. Kınalı Yapıncak	0.6482 +/- 0.05462	0.175710
3. Çavuş Üzümü	0.6848 +/- 0.03584	0.182110
4. Kardinal	0.5000 +/- 0.26517	0.175000
5. Karalahana	0.7619 +/- 0.11476	0.210626
6. Kokulu Kabak	0.6667 +/- 0.31427	0.233333
7. Pembe Gemre	0.3333 +/- 0.21517	0.116667
8. Efes Karası	1.0000 +/- 0.50000	0.350000
9. Şensu Üzümü	0.0000 +/- 0.00000	0.000000
<b>Ortalama</b>	<b>0.5105 +/- 0.01291</b>	<b>0.160383 +/- 0.0013622</b>

olarak bulundu. Cabernet ve Cinsaut üzümünün maya populasyonlarında ise haplotip çeşitliliği bulunmadı. Ortalama haplotip çeşitliliği (Average Haplotype Diversity; AHD) 0.5105+/-0.01291 olarak tespit edildi.

Nükleotid çeşitliliği en fazla Efes Karası üzümü maya populasyonunda (0.350) görüldü. Bu populasyonu takip eden en fazla nükleotid çeşitliliği ise Kokulu Kabak üzümü maya populasyonu (0.233333) ve Karalahana üzümü maya populasyonu (0.210626) olarak belirlendi. En düşük nükleotid çeşitliliğine sahip maya populasyonu Pembe Gemre üzüm çeşidinde (0.116667) görüldü. Cabernet ve Cinsaut üzümünün maya populasyonlarında ise nükleotid çeşitliliği bulunmadı. Ortalama nükleotid çeşitliliği (Average Nucleotide Diversity; AND) 0.160383 +/- 0.0013622 olarak tespit edildi.

REAP (Restriction Enzyme Analysis Programme) programı kullanılarak her bir populasyon için hesaplanan nükleotid çeşitliliği ve populasyonlar arası genetik farklılaşma Çizelge 4.16'da verildi. Hesaplanan nükleotid farklılaşma (Nucleotide Divergency) değerlerine göre birbirinden en farklı populasyon (0.35) Cabernet üzümü maya populasyonu ile Şensu üzümü maya populasyonu arasında hesaplandı. Bunu takiben



Cabernet üzümü maya populasyonu ile Pembe Gemre üzümü maya populasyonunda en fazla farklılaşma (0.291667) kaydedildi. Kınalı yapıncak üzümü maya populasyonu ile çavuş üzümü maya populasyonu, Karalahana üzümü maya populasyonu ve Efes Karası üzüm maya populasyonu arasında hem haplotip hemde nukleotid (kesim bölgesi olarak) çeşitliliğine göre farklılaşma olmadığı veya çok düşük farklılaşma olduğu belirlendi. Benzer durum Çavuş üzümü maya populasyonu ile Karalahana üzümü maya populasyonu ve Efes Karası üzümü maya populasyonu arasında; Vasilaki üzümü maya populasyonu ile Karalahana üzümü maya populasyonu, Kokulu Kabak üzümü maya populasyonu ve Efes Karası üzümü maya populasyonu arasında; Karalahana üzümü maya populasyonu ile Efes Karası üzümü maya populasyonu arasında; Pembe Gemre üzümü maya populasyonu ile Efes Karası üzümü maya populasyonu arasında tespit edildi. Ortalama nukleotid çeşitliliği  $0.222614 \pm 0.0001490$  ve ortalama nukleotid farklılaşması  $0.062232 \pm 0.0003731$  olarak bulundu.

Çizelge 4.16. *M. pulcherrima* maya popülasyonları arasındaki nükleotid çeşitliliği (pair-wise nucleotide diversity) (üst diagonal) ve genetik farklılaşma (nucleotide divergence) (alt diagonal)

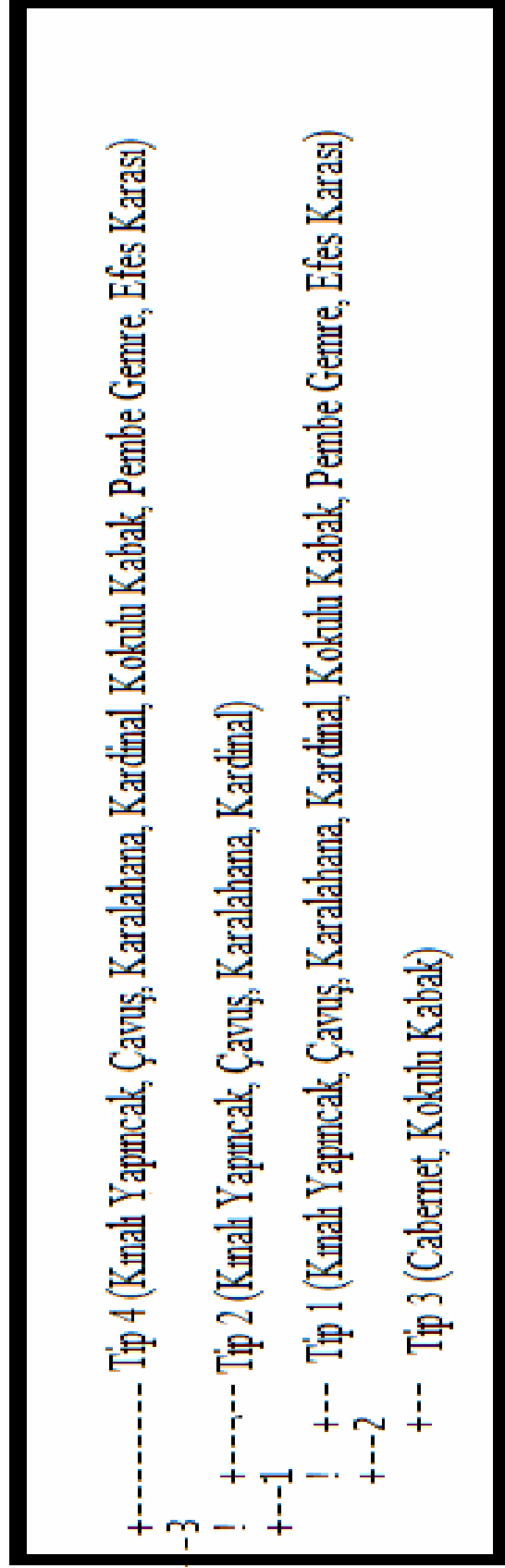
	<b>Cabernet</b>	<b>Kınah Yapımcak</b>	<b>Çavuş Üzüümü</b>	<b>Vasilaki</b>	<b>Karalahana</b>	<b>Kokulu Kabak</b>	<b>Pembe Gemre</b>	<b>Efes Karası</b>	<b>Cinsaut Üzüümü</b>
<b>Cabernet</b>		0.319267	0.305822	0.305822	0.299511	0.233333	0.350000	0.350000	0.350000
<b>Kınah Yapımcak</b>	0.231412		0.171993	0.208300	0.177786	0.258596	0.147578	0.179851	0.131441
<b>Çavuş Üzüümü</b>	0.214767	-0.006917		0.202105	0.178712	0.247774	0.157455	0.181973	0.145196
<b>Vasilaki</b>	0.218322	0.032946	0.023550		0.191485	0.160274	0.244955	0.181973	0.276446
<b>Karalahana</b>	0.194198	-0.015382	-0.017656	-0.001328		0.233170	0.171616	0.182969	0.165939
<b>Kokulu Kabak</b>	0.116667	0.054075	0.040052	-0.043893	0.011191		0.311111	0.233333	0.350000
<b>Pembe Gemre</b>	0.291667	0.001389	0.008067	0.099122	0.007969	0.136111		0.175000	0.058333
<b>Efes Karası</b>	0.175000	-0.083004	-0.084082	-0.080527	-0.097344	-0.058333	-0.058533		0.175000
<b>Cinsaut Üzüümü</b>	0.350000	0.043586	0.054141	0.188946	0.060626	0.233333	0.000000	0.000000	

**4.13. Filogenetik Analiz Sonuçları**

Restriksiyon kesimleri sonucu oluşturulan *M. pulcherrima* maya türüne ait haplotip veri dosyası PHYLIP ver.3.5c programında (Phylogenetic Inference Package, version 3.5c) bir DOLLO ağacı oluşturmak üzere kullanıldı. Elde edilen köksüz DOLLO ağacı Şekil 4.33'te verildi. Tip 4 (BAAB) en 'bazal' ('basal') haplotipi içerdi. Tip 2 (AAAB) ise monofiletik bir 'cluster' oluşturan Tip 1 (AAAA) ve Tip 3'e (BAAA) göre daha 'basal' durumda bulundu.

Tip 4 haplotipi taşıyan bireyler Kınalı Yapıncak, Çavuş, Kardinal, Karalahana, Kokulu Kabak, Pembe gemre ve Efes Karası üzümlerinin yüzeyinden izole edildi. Tip 2 haplotipini taşıyan bireyler (maya suşları) Kınalı Yapıncak, çavuş, karalahana ve kardinal üzümlerinin yüzeyinden; Tip 1 haplotipini taşıyan bireyler Kınalı Yapıncak, Çavuş, Karalahana, Vasilaki, Kokulu Kabak, Pembe Gemre ve Efes Karası üzümlerinin yüzeyinden izole edildi. Tip 3 haplotipini taşıyan bireyler ise yalnızca Cabernet ve Kokulu Kabak üzümlerinin yüzeyinden izole edildi. Elde edilen sonuçlara göre Kınalı yapıncak ve Çavuş üzümleri *M. pulcherrima* maya populasyonlarının diğer üzüm çeşitlerine dağılımında en önemli üzüm türleridir. Ayrıca yalnızca Kocamış Deresi bağ alanından toplanan Kınalı Yapıncak üzüm çeşidinin bu bağ alanında yetiştirilen diğer üzüm çeşitleri (Kokulu kabak ve Karalahana) üzerindeki maya populasyonları için genetik kaynak oluşturduğu düşünülmektedir.

Panayır içi, Kocamış Deresi ve Pazaryeri bağ alanlarından toplanan üzümlere ait *M. pulcherrima* haplotipleri göz önüne alınarak 3 grup oluşturuldu ve AMOVA (Analysis of Molecular Variance) analizleri yapıldı (Weir ve Cockerham, 1984; Excoffier ve Ark., 1992 ve Weir, 1996). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17'de verildi. Yapılan analizlerde genetik varyansın % 88'i populasyon içinde ve istatistiksel olarak önemli (significant,  $p < 0.01$ ) bulundu. Oluşturulan gruplararası populasyonlar arasında genetik varyansın ( $F_{SC} = \%19$ ;  $p < 0.01$ ) yine istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu. Bununla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak önemli herhangi bir farklılaşma ( $F_{CT} =$  negatif değer;  $p > 0.5$ ) gözlenmedi.



Şekil 4.33. *M. pulcherrima* haplotiplerinin köksüz Dollo parsimoni ağacı.

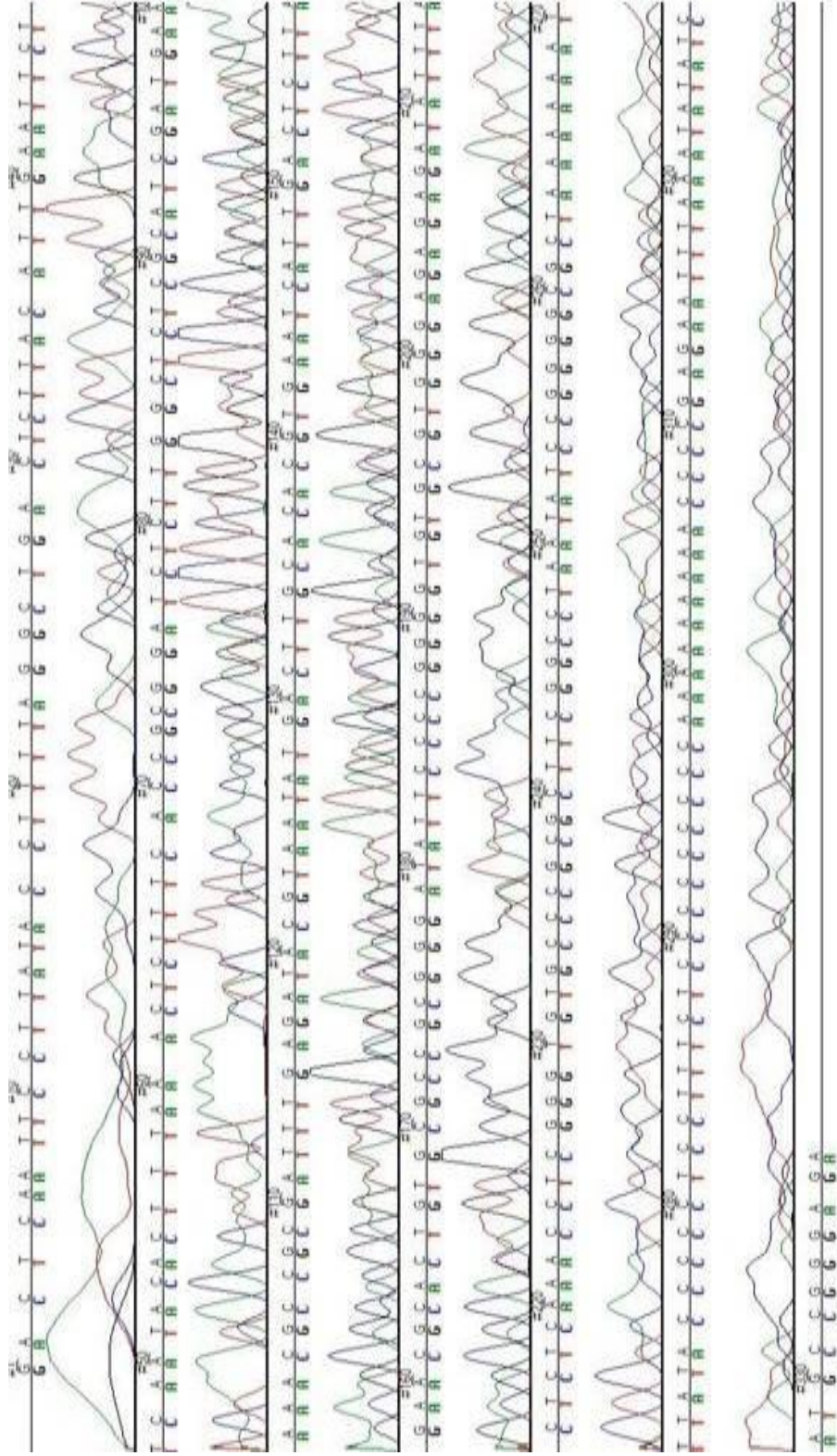
Çizelge 4.17. *M. pulcherrima* maya popülasyonlarının AMOVA analizi (\*1000 permütasyon sonrası  $P < 0.01$ ;  $V_a$ ,  $V_b$ , ve  $V_c$  birleşik kovaryans komponentleri (Associate Covariance Components))

Varyansın Kaynağı	d.f.	Kareleri Toplamı	Varyans Komponentleri	Yüzdellik Varyans	Fiksasyon İndeksleri
Gruplar arası	2	1.653	-0.03675 $V_a$	-7.37*	$F_{CT} = -0.07375$
Grup içi	6	6.019	0.09578 $V_b$	19.22*	$F_{ST} = 0.11846$
Popülasyonlar içi	67	29.433	0.43929 $V_c$	88.15*	$F_{SC} = 0.17901$

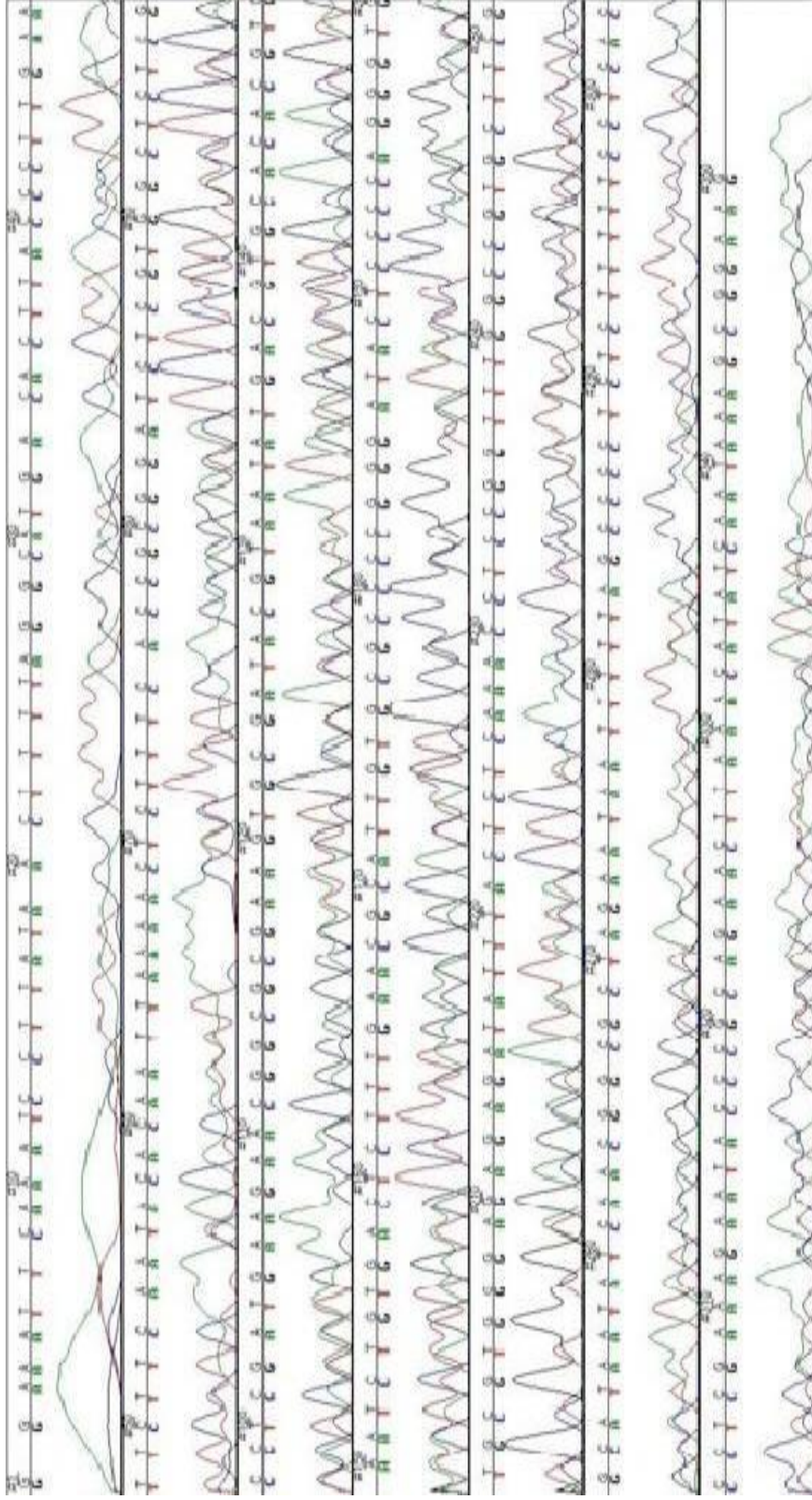
#### **4.14. DNA Dizi Analizleri**

Elde edilen sonuçlara göre MP-57 ve MP-63 *M. pulcherrima* maya suşlarının PCR bölgelerinin DNA dizilemeleri REFGEN firmasına yaptırıldı. MP-57 maya suşu için dizi analizi sonuçları Şekil 4.34'te, MP-63 maya suşu için elde edilen dizi sonucu Şekil 4.35'te verildi. MP-57 maya suşu için elde edilen DNA dizisi Şekil 4.36'da, MP-63 maya suşu için elde edilen DNA dizisi Şekil 4.37'de verildi. DNA dizi benzerlik analizleri (DNA Sequence Similarity Analysis) NCBI servisinin sunduğu BLAST analiz programı kullanılarak yapıldı. Kontrol maya suşu olarak kullanılan UMY12 (Gene Bank Accession number:FJ172528) ile MP-57 maya maya suşu arasında yapılan BLAST sonucu Şekil 4.38'te, UMY12 ile MP-63 arasında yapılan BLAST sonucu Şekil 4.39'da ve MP-57 ile MP-63 arasında yapılan BLAST analizi sonucu Şekil 4.40'da verildi. MP-57, MP-63 ve UMY12 maya suşları arasında yapılan çoklu dizi analizi (Multiple allignment) sonucu ise Şekil 4.41'de verildi. MP-57 ve MP-60 *M. pulcherrima* maya suşlarının ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgesinin BLAST analizleri sonucunda MP-57 maya suşunun UMY12 ile % 81 homoloji, MP-63 maya suşunun UMY12 ile % 85 homoloji gösterdiği, MP-57 ile MP-62 maya suşlarının birbiri ile % 86 benzerlik gösterdiği bulundu.

Ribozomal DNA bölgelerinin çok fazla tekrarlı olması nedeniyle dizileme sonucu elde edilen DNA dizisi Gen Bankasında bulunan diğer dizilerle (MB513 ve MB510) çok düşük benzerlik gösterdi.



Şekil 4.34. MP-57 *M. pulcherrima* maya türünün DNA dizi analizi sonucu



Şekil 4.35. MP-63 *M. pulcherrima* maya türünün DNA dizi analizi sonucu

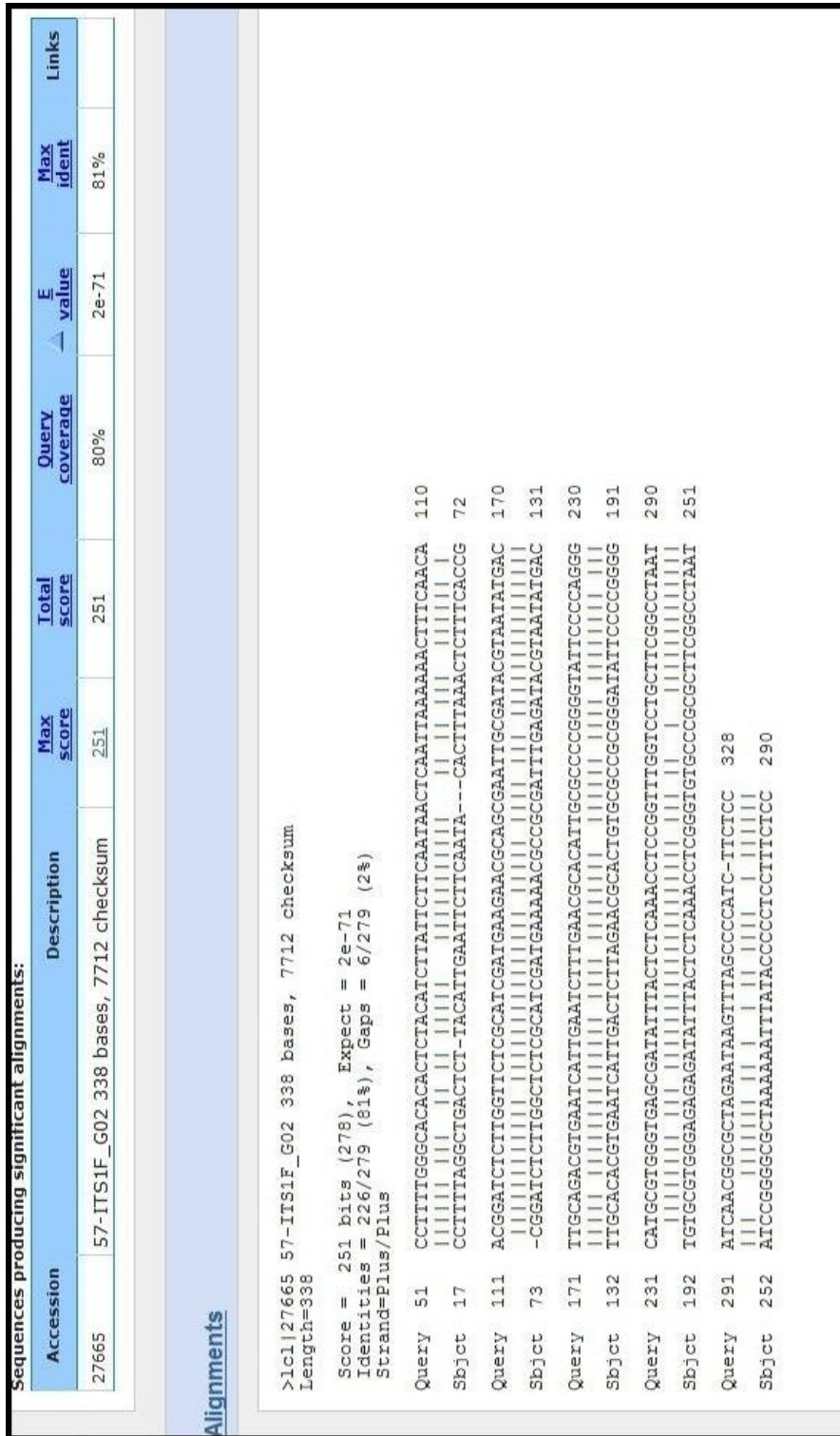


```
GACTCAATTCCTTATACTTTTAGGCTGACTCTTACATTGAATTCTTCAATACAC
TTTAAACTCTTTCACCGCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAAACGCCGC
GATTTGAGATACGTAATATGACTTGCACACGTGAATCATTGACTCTTAGAACG
CACTGTGCGCCGCGGGATATTCCCCGGGGTGTGCGTGGGAGAGAGATATTTAC
TCTCAAACCTCGGGTGTGCCCGCGCTTCGGCCTAATATCCGGGGCGCTAAAAA
ATTTATACCCCCTCCTTTCTCCCCCCCCAAAAAAAACCCCGAGAATTTAAAT
ATATCATGCCGGGAGA
```

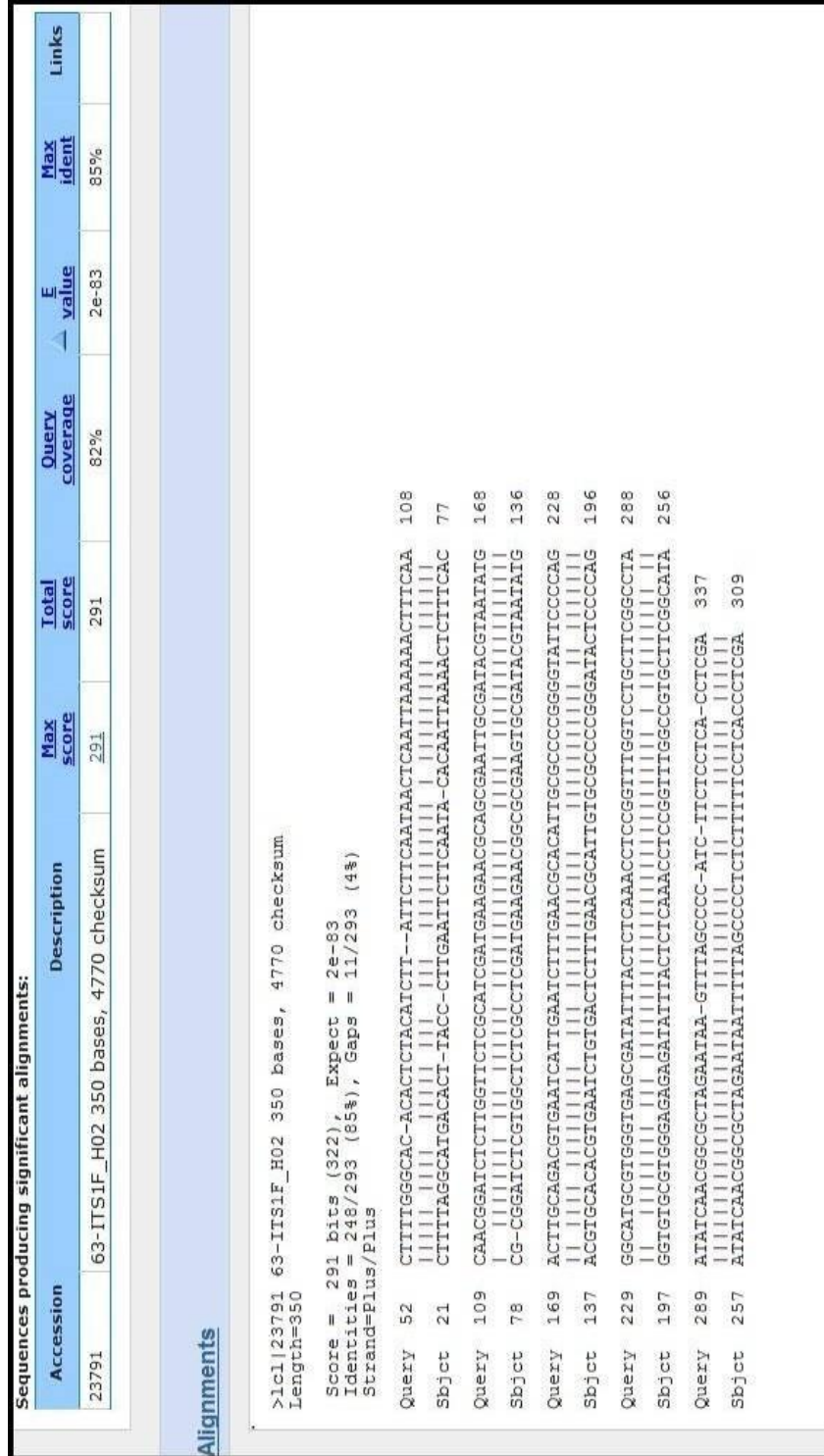
Şekil 4.36. MP-57 *M. pulcherrima* maya türünün DNA dizisi.

```
GGAAATTCAAATCCTTATACTTTTAGGCATGACACTTACCCTTGAATTCTTCA
ATACACAATTA AAACTCTTTCACCGCGGATCTCGTGGCTCTCGCCTCGATGAAG
AACGGCGCGAAGTGCGATACGTAATATGACGTGCACACGTGAATCTGTGACTC
TTTGAACGCATTGTGCGCCCCGGGATACTCCCCAGGGTGTGCGTGGGAGAGAG
ATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGCCGTGCTTCGGCATAATATCAACGGCG
CTAGAATAATTTTAGCCCCTCTTTTTCTCACCCCTCGAAAGAATACCCGCA
GAACTTAAACATATCAATAAAGCGGAAG
```

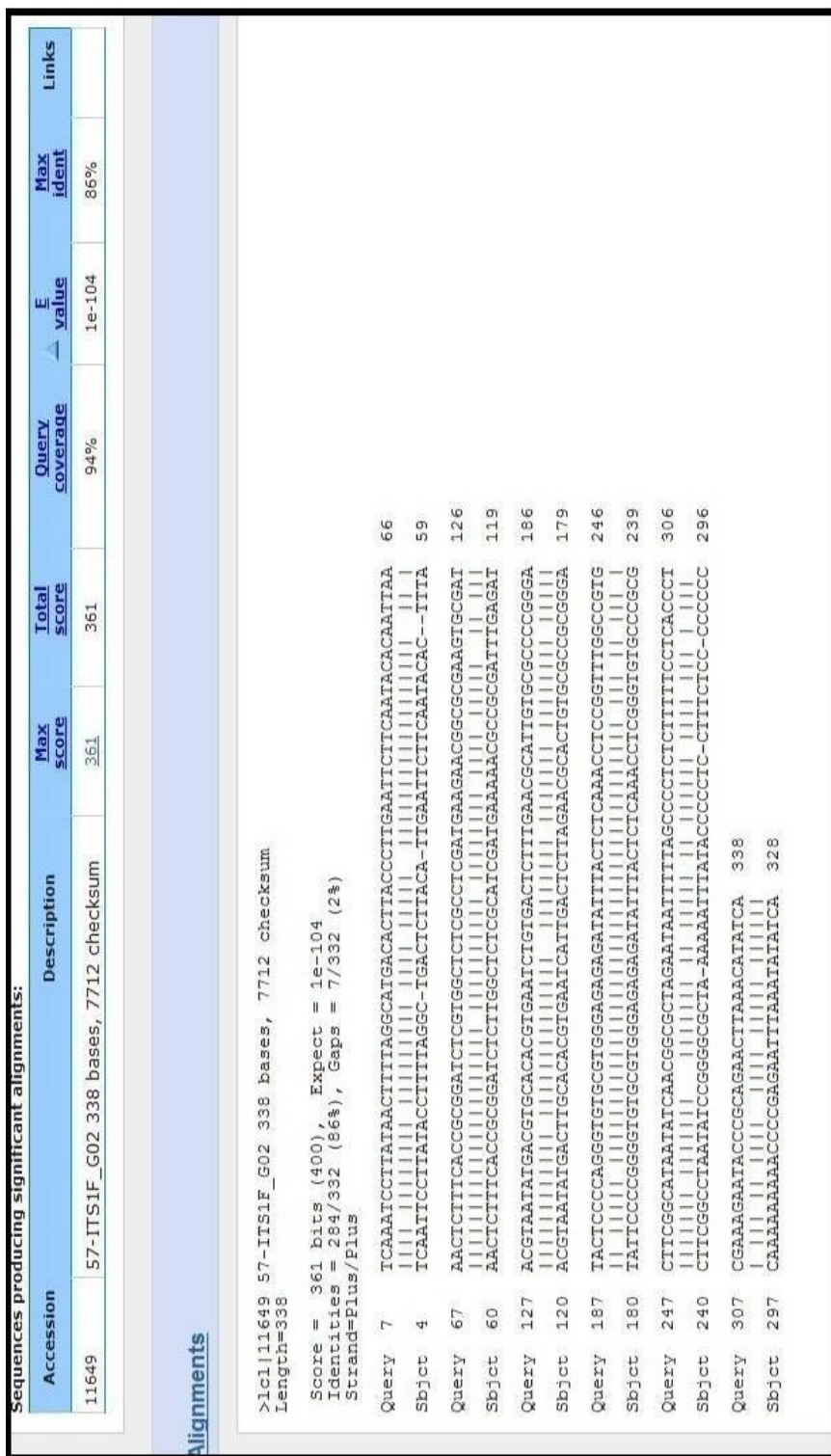
Şekil 4.37. MP-63 *M. pulcherrima* maya türünün DNA dizisi.



Şekil 4.38. BLAST: MP-57-UMY12



Şekil 4.39. BLAST: MP-63-UMY12



Şekil 4.40. BLAST: MP-57-MP-63

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

57-ITS1F_G02      -----GA-----CTCAAT----TCCTTATAACC-TTTTAGGC 26
63-ITS1F_H02      -----GGAAA-----TTCAAA----TCCTTATAAC-TTTTAGGC 29
UMY12             CTTTTCTGTAGGGTGCACGTGGGGAGGGCTCTTTAAAAACATTTTACACCCCTTTTGGGC 60
                    *      * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * *

57-ITS1F_G02      -TGA CTCT-TACA-TTGAATTCTTCAATA-CAC--TTTAAACTCTTTCACCG-CGGATCT 79
63-ITS1F_H02      ATGACACT-TACCCTTGAATTCTTCAATA-CACAATTA AAACTCTTTCACCG-CGGATCT 86
UMY12             AC-ACACTCTACA-TCTTATTCTTCAATAACTCAATTA AAAA ACTTTCACAACGGATCT 118
                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

57-ITS1F_G02      CTTGGCTCTCGCATCGATGAAAAACGCCGCGATTGAGATACGTAATATGACTTGCACAC 139
63-ITS1F_H02      CGTGGCTCTCGCCTCGATGAAGAACGCCGCGAAGTGCGATACGTAATATGACGTGCACAC 146
UMY12             CTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGAC 178
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

57-ITS1F_G02      GTGAATCATTGACTCTTAGAACGCACTGTGCGCCGCGGGATATCCCCGGGGTGTGCGTG 199
63-ITS1F_H02      GTGAATCTGTGACTCTTGAACGCATTGTGCGCCCCGGGATACTCCCCAGGGTGTGCGTG 206
UMY12             GTGAATCATTGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTG 238
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

57-ITS1F_G02      GGAGAGAGATATTTACTCTCAAACCTCGGGTGTGCCCGCGCTTCGGCCTAATATCCGGGG 259
63-ITS1F_H02      GGAGAGAGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGCCGTGCTTCGGCATAATATCAACGG 266
UMY12             GGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCAACGG 298
                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

57-ITS1F_G02      CGCTAAAA-AATTTATACCCCTC-CTTTCTCCCC-CCCCAAAAAAAACCCCGAGAAT 316
63-ITS1F_H02      CGCTAGAATAATTTTAGCCCTCTCTTTTCTCACCCTCGAAAGAATACCCGCAGAAC 326
UMY12             CGCTAGAATAAGTTTAGCCCATC---TTCTCTCACCTC-----GAGC 339
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

57-ITS1F_G02      TTAAATATATCAT---GCCGGGAGA 338
63-ITS1F_H02      TTAAACATATCAATAAAGCGGAAG- 350
UMY12             TCCGATT----- 347
                    * * *
    
```

Şekil 4.41. ALIGNMENT MP-57, MP-63, UMY-12

**BÖLÜM 5****SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Çalışmamızda Bozcaada bulunan (Çanakkale, Türkiye) 8 farklı bağ bölgesinden 12 farklı üzüm çeşidine ait 15 üzüm örneğinden maya izolasyonu yapılmıştır. Üzüm örnekleri içerisinde en fazla maya yoğunluğu Kınalı yapıncak ve Karalahana üzüm çeşitlerinde en düşük maya yoğunluğu ise Cabernet üzüm çeşidinde tespit edildi. Üzüm çeşitleri üzerindeki maya yoğunluğunun  $10^3$  ile  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> arasında değiştiği belirlendi. Örnekleme yapılan üzüm çeşitlerinden 392 maya izole edilerek 266 tanesi tanımlandı. Tanımlanan türler *Cryptococcus spp.*, *Metschnikowia spp.*, *Candida spp.*, *Kloeckera spp.* ve *Rhodotorula spp.* cinslerine ait 16 maya türü olarak bulundu. Bunlar *Cr. humicola*, *Cr. laurentii*, *Cr. albidus*, *Cr. neoformans*, *C. famata*, *C. holmii*, *K. apis*, *K. apiculata*, *C. magnoliae*, *C. membranifaciens*, *C. zeylanoides*, *C. sake*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, *R. glutinis* ve *R. muciliginosa* maya türleridir. En fazla maya dağılımının bulunduğu üzüm çeşitleri Çavuş, Kınalı Yapıncak, Alphonse ve Cinsaut olarak belirlendi. Üzüm çeşidi dağılımının en fazla olduğu bağ bölgeleri Panayır İçi ve Kocamış Deresi olup Alphonse ve Çavuş üzümleri Panayır İçi bölgesinden, Kınalı Yapıncak üzüm çeşidi ise Kocamış Deresi bağ alanından toplandı. Beklendiği gibi üzüm yüzeyinden *S. cerevisiae* maya türünün izole edilme olasılığı çok düşük olup yalnızca bir *S. cerevisiae* örneği Alphonse üzüm çeşidi üzerinden izole edildi.

Elde edilen verilere göre üzüm çeşidi üzerinde bulunan maya çeşitliliği bağ bölgesinin içerdiği üzüm çeşitliliğine bağlı olarak değişmektedir. Bölgede yetiştirilen üzüm çeşidi ne kadar fazla ise üzüm yüzeyinden farklı maya türü izole etme olasılığı da o kadar artmaktadır. Ayrıca bazı maya türlerinin yalnızca tek çeşit üzüm yüzeyinden izole edilmesi (örneğin *C. magnolia* ve *C. membranifaciens* maya türlerinin yalnızca Pembe Gemre üzüm çeşidinden izole edilmesi gibi) mayaların üzüm çeşitlerini tercih ederken seçici davrandıklarını göstermektedir. Bununla birlikte Çavuş üzümü gibi bazı üzüm çeşitlerinin birçok maya türünün tercih ettiği bir yaşam alanı oluşturabildiği görülmektedir. *Cr. laurentii* ve *M. pulcherrima* gibi maya türleri kozmopolit maya türleri olup hemen hemen tüm üzüm çeşitlerinin yüzeyinde barınabilmektedir.

Araştırmamızda tanımlanan 78 *M. pulcherrima* maya suşunun çoğunluğu Kınalı Yapıncak ve Çavuş üzümleri yüzeyinden izole edildi. Kınalı Yapıncak ve Çavuş üzüm

çeşitleri yüksek maya yoğunluğuna ( $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) ve çeşitliliğine (tanımlanan 14 maya türünün 7-8 tanesini içermesi) sahip olması nedeniyle bu türlerde *M. pulcherrima* maya türünün yoğun olarak bulunması doğaldır.

Sukroz içeren ortamda *M. pulcherrima* maya suşlarının daha iyi üreme gösterdiği ve daha geniş alana difüz edebilen pigment sentezlediği görüldü. Ancak pigment sentezinin her maya suşunda farklı oranlarda bazı suşlarda ise olmadığı gözlemlendi. Sukroz üzümlerde bulunan bir disakkarit şeker olup mayalar tarafından kullanılan ve tercih edilen bir karbon kaynağıdır. Bu nedenle *M. pulcherrima* maya türünün sukroz içeren ortamda daha iyi üreyebilmesi beklenen bir sonuçtur. Pulcherrimin pigment üretimi *M. pulcherrima* maya türü için karakteristik olup üreme ortamının içeriğine göre pigment üretiminin değişken olduğu gösterilmiştir (Gimenez ve ark., 1995; Kluyver ve ark., 1953). Bu nedenle *M. pulcherrima* maya suşlarının farklı karbon kaynaklarında değişik oranlarda ve bölgelerde pigment sentezlemeleri normaldir.

*M. pulcherrima* maya türünün azot içermeyen ve farklı azot kaynakları (amonyum sülfat, prolin ve lösin) içeren üreme ortamlarının pigment sentezine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada ilginç sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Azot kaynağı olarak sadece amonyum sülfat kullanıldığında pulcherrimin pigment sentezi gözlenirken diğer azot kaynakları kullanıldığında ve azot içermeyen ortamda pigment sentezi olmadığı görülmüştür.

Pulcherrimin pigmenti iki lösin molekülünün birleşerek oluşturduğu pulcherriminic asit ve ferrik iyonlarından oluşan kompleks bir moleküldür (MacDonald, 1965; Cook ve Slater, 1956). Pulcherrimin pigmenti suda çözünmeyen ve difüz edemeyen renksiz bir başlangıç molekülünden sentezlenmektedir. Başlangıç molekülünün lösin amino asiti olmadığı ve hücre dışına salgılanmadığı belirlenmiştir (Sipiczki, 2006). Araştırmamızda lösin içeren ortamda pigment sentezinin gözlenmemesi hücre dışında bulunan lösin amino asitinin de başlangıç molekülü olmadığını göstermektedir.

Prolin zayıf azot ve zayıf karbon kaynağı olmasına rağmen *S.cerevisiae* tarafından sadece azot kaynağı olarak kullanılır. *S. cerevisiae* laboratuvar suşları için prolin oldukça az tercih edilen bir azot kaynağı olmasına rağmen, doğal olarak üzümde bol miktarda bulunan azot (prolin), yabani maya türleri için tercih edilen bir azot kaynağıdır (Huang ve Brandriss, 2000). Amonyum sülfat ise glutamin gibi tercih edilen bir azot kaynağı olup *S. cerevisiae* maya türünde TOR (Target of Rapamycin) protein kompleksini aktive ederken

zayıf azot kaynağı kullanımında gerekli olan genleri (PUT1 ve PUT2 gibi) baskılar (Crespo ve ark., 2002; Ter Schure ve ark., 2000).

*S. cerevisiae* maya türünde azotun yokluğu veya düşük miktarda varlığı TOR aktivitesini baskılar ve TOR kompleksi tarafından baskılanan Snf1 proteini aktif hale geçerek Mig1 proteinini baskılar. Bu sayede derepres olan SUC genleri sukrozu kullanarak üreyebilir. Benzer şekilde düşük glikoz sinyali Snf1p kinazı aktifleştirerek Mig1 proteinini baskılar. Sukroz kullanımı için gerekli olan genler aktive olur ve üreme gözlenir. Zengin azot kaynağında ise TOR kompleksi aktifleşir ve Snf1 protein kinaz kompleksini baskılayarak Mig1 proteini aktifleştirir. Aktif Mig1 proteini sukroz kullanımı için gerekli olan SUC genlerini baskılar ve üreme gözlenmez. Benzer durum yüksek glikoz konsantrasyonunda gözlenir.

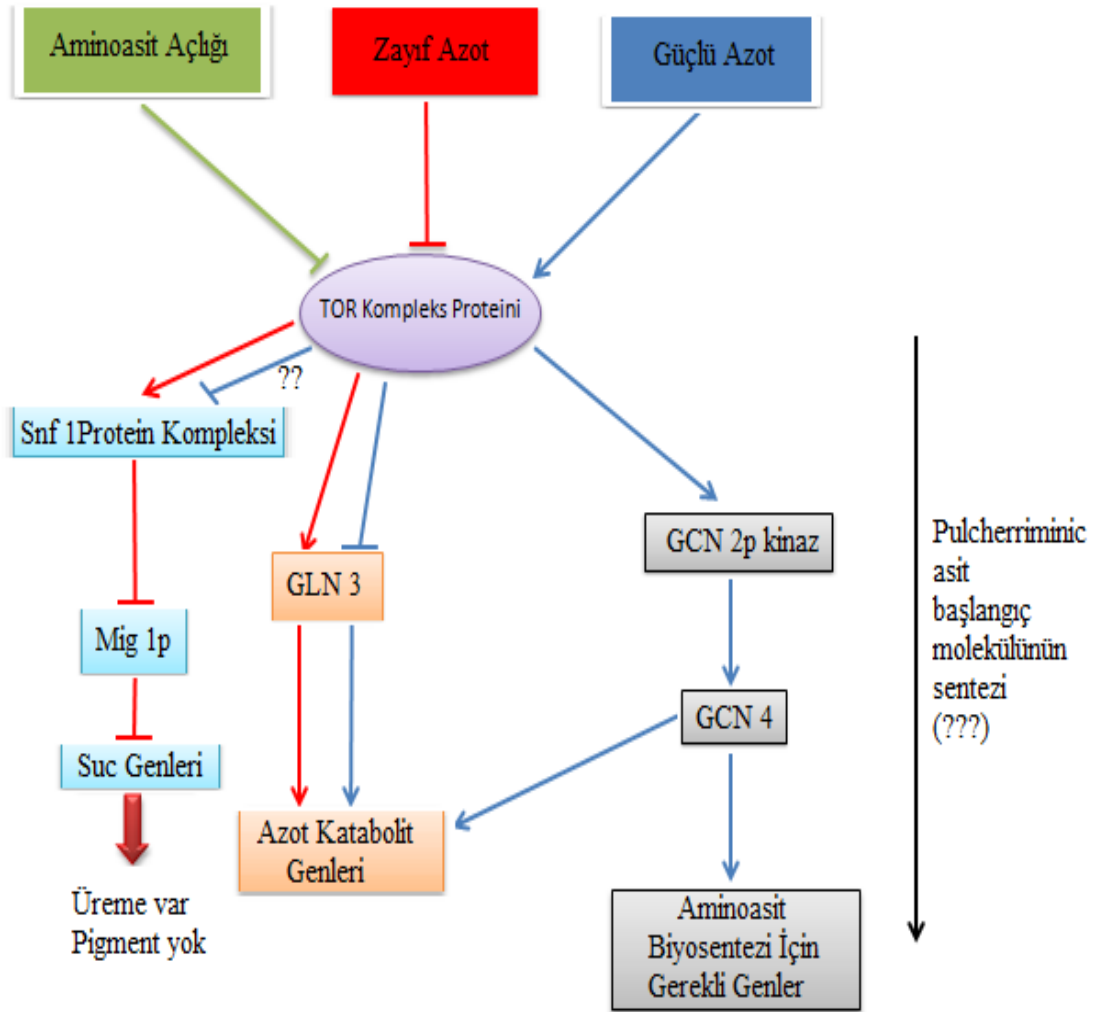
*M. pulcherrima* maya suşları azot içermeyen veya zayıf azot kaynağı (prolin) içeren ortamda azot kaynağı içeren ortamdaki (Amonyum sülfat) oranda üreme göstermiştir. Bu durum *M. pulcherrima* maya türlerinde TOR benzeri kompleksin glikoz konsantrasyonundan etkilenmediğini, azot miktarının alternatif karbon kaynakları ile ilgili olan genlerin transkripsiyonunda rolü olmadığını düşündürmektedir. Ancak bu sonucu kesinleştirmek için mutant TOR ve Snf1 *M. pulcherrima* maya suşları ile çalışmaların yapılması gereklidir.

Ayrıca azot açlığının dolayısıyla amino asit açlığının üremeyi etkilemediği, azot açlığı ile oluşturulan amino asit açlığı stresine karşılık maya hücrelerinin oldukça dirençli olduğu gözlemlendi. *S. cerevisiae* maya türünde TOR iz yolunun amino asit, ATP, mitogens, düşük oksijen ve fosfatidik asit gibi streslere karşı TOR aktivitesini düşürerek strese dayanıklı oldukları gösterilmiştir (Reiling ve Sabatini, 2006). *M. pulcherrima* maya türünde de amino asit açlığı olası TOR kompleks proteinini baskılayarak maya hücrelerini strese dirençli hale getirip üremeyi etkilemiş olabilir.

Pigment sentezinin yalnızca yüksek azot kaynağı içeren ortamda gözlenmesi azot kaynağı içermeyen veya düşük oranda içeren ortamda gözlenmemesi ise yine olası TOR kompleks proteininin aktifleştirilerek amino asit sentezi için gerekli olan genleri ve faktörleri aktifleştirmesi sırasında oluştuğunu düşündürmektedir. *S. cerevisiae* maya türünde amino asit açlığı (YNB ortamı) stres oluşturur ve TOR kompleksini baskılar. Benzer şekilde zayıf azot kaynağı (YNB-Pro ortamı) TOR kompleks proteininin aktivitesini azaltır. *M. pulcherrima* maya suşlarında YNB ortamında (amino asit açlığı) ve



YNB-Pro ortamında (zayıf azot kaynağı) pigment sentezi gözlenmemesi yalnızca amonyum sülfat içeren ortamda gözlenmesi TOR benzeri bir kompleksin varlığını ve pulcherrimin pigmentinin başlangıç (precursor) molekülünün bu kompleks tarafından aktifleştirilen amino asit metabolizması içerisinde oluşturulduğunu düşündürmektedir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *M.pulcherrima* maya türünde olası TOR kompleks proteini ve pulcherrimin sentezi (Özgün ).

*M. pulcherrima* maya suşlarında hem üreme, hemde pigment sentezi ozmotik stresten ve ısı stresinden etkilenmektedir. Örneğin ısı stresinde bazı *M. pulcherrima* maya suşlarının üremesinin durduğu ve pigment sentezinin olmadığı gözlenmiştir. Özellikle 37°C 'de gözlenen sonuçlar pigment sentezinin maya suşuna bağlı olarak lokalizasyonunun değiştiğini veya bloke olduğunu bazı maya suşlarında ise üremenin olmadığını göstermiştir. Bu durum maya hücrelerinin farklı stres koşullarına karşılık farklı şekilde pigment sentezlediklerini dolayısıyla strese cevap oluşturmaları arasında farklılıklar olduğunu göstermektedir. Ayrıca stres koşullarında belirlenen glikojen birikiminin stresin yoğunluğu ile bağlantılı olduğu, maya suşları arasında farklı oranlarda biriktirildiği belirlenmiştir.

Maya hücrelerinin değişik stres koşullarından (azot açlığı, sıcaklık, ozmotik ortam, ağır metal veya oksidatif bileşiklerin varlığı gibi) etkilendiği bilinmektedir. Maya hücrelerinin streslere karşı geliştirdikleri cevaplarda benzerlikler olduğu gibi bir strese maruz kalmanın diğer bir strese karşı olan toleransı arttırdığı belirtilmektedir (Parrou ve ark. 1997). Glikojen çevre koşullarına ve hayat döngüsü aşamalarına bağlı olarak maya hücrelerinde biriktirilen bir karbonhidrattır (Parrou ve François 1997, Lillie ve Pringle 1980). Mayalarda glikojen, çözünebilir stoplazmik glikojen ve hücre duvarı bileşenlerine kovalent olarak bağlı bulunan çözünemeyen glikojen olmak üzere iki değişik formda bulunur (Arvindekar ve Patil 2002). İyot boyama tekniği hücre duvarındaki glikojenin varlığını gösteren bir yöntemdir. Aynı stres koşulları altında *M. pulcherrima* maya suşları arasında gözlenen farklı glikojen birikimleri hücre duvarındaki glikojen miktarlarının farklı olmasından dolayı olup sitoplazmik glikojen birikimlerini yansıtmamaktadır. Bu nedenle kalitatif olarak elde edilen glikojen sonuçlarının enzimatik olarak belirlenmesi gereklidir.

*M. pulcherrima* maya türleri patojenlere karşı biyolojik kontrol potansiyeline sahip maya türlerinden biridir. Bazı *M. pulcherrima* maya suşlarının *Escherichia coli* ve *Proteus vulgaris* gibi bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etkisi olduğu bilinmektedir. Araştırmamızda *M. pulcherrima* maya suşlarının, aynı bakteri türü olmalarına rağmen farklı suşlar olmalarından dolayı [(*E. coli* (1) ile *E. coli* (2) ve *S. typhimurium* (1) ile *S. typhimurium* (2)] benzer antibakteriyel etkiye sahip olmadıkları belirlendi. Ayrıca bir *M. pulcherrima* maya suşunun (MP-76) antibakteriyel etkisinin diğer maya suşlarından daha fazla ve geniş spektrumlu olduğu gözlemlendi. Farklı araştırmalarda *M. pulcherrima* maya türünün *S. cerevisiae*, *Debaryomyces occidentalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida dupliniensis*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon*

*mucoides* ve *Candida albicans* gibi maya türlerine karşı antifungal etkisi olduğu belirtilmektedir. Araştırmamızda *M. pulcherrima* maya suşlarının *C. glabrata* ve *Cr. neoformans* maya türlerine karşıda antifungal aktivitesi olduğu gözlemlendi. Ancak antibakteriyel etkide gözlemlendiği gibi MP-45 *M. pulcherrima* maya suşunun antifungal etkisinin diğer *M. pulcherrima* maya suşlarından daha fazla olduğu görüldü. Bu durum *M. pulcherrima* maya türünün antagonistik aktivitesinin türlere göre değil suşlara göre belirlenmesi gerektiğini göstermektedir. Daha önce bazı *M. pulcherrima* maya suşlarının *Aspergillus spp.* ve *Penicillium spp.* türlerine karşı farklı antagonistik etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Janisiewicz ve ark., 2001; Bleve ve ark., 2006). Benzer durum araştırmamızda da tespit edilmiştir.

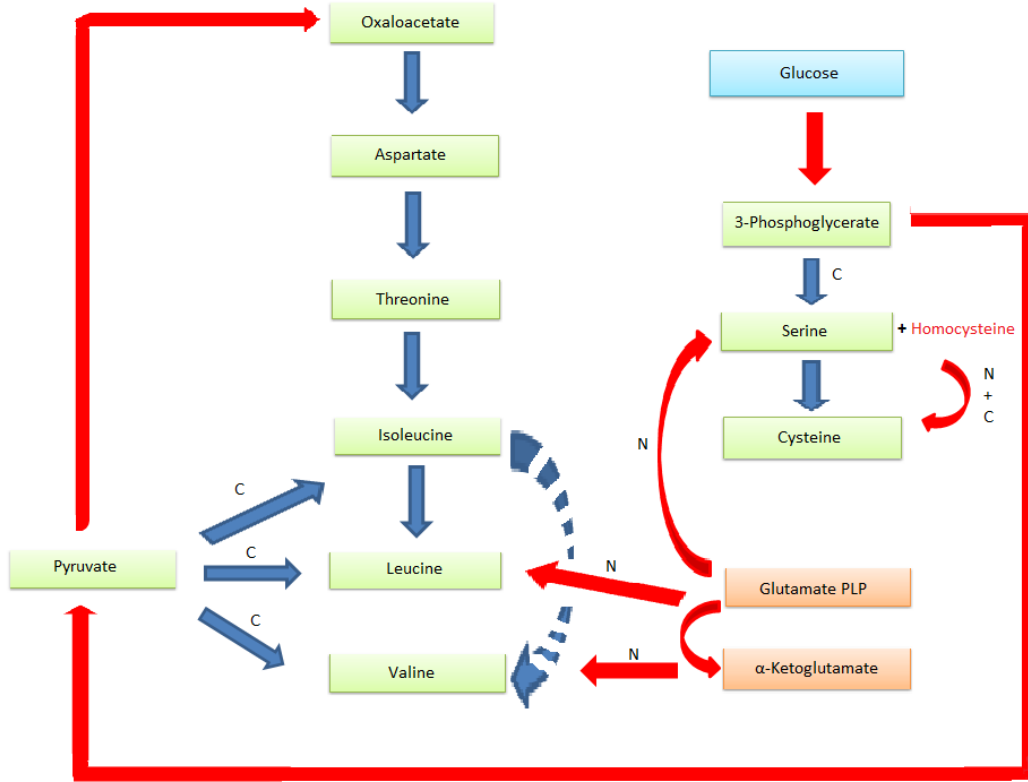
Araştırmamızda pulcherrimin pigmentinin koloni etrafında oluşturduğu zon ile antagonistik etkisi arasında bazı suşlarda paralellikler gözlenirken bazı suşlarda pigment zon çapı ile inhibisyon zon çapı arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Pigment zon çapının inhibisyon zon çapından daha geniş olması antagonistik etkinin yalnızca pulcherrimin pigmentinden kaynaklanmadığını göstermektedir. Kitin, N-acetil glikozamin monomerlerinin  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşan dallanmamış bir homopolimer olup mayaların hücre duvarında bulunur. Kitinaz enzimi bu bağları hidrolize ederek hücre duvarını parçalar. Bazı *Streptomyces sp.* maya suşlarında antifungal aktivitenin kitinolitik aktiviteden dolayı gerçekleştiği bilinmektedir (Narayana ve Vijyalakshmi, 2009). *M. pulcherrima* MACH1 suşunun yüksek kitinaz aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Saravanakumar ve ark., 2009). *M. pulcherrima* maya suşlarının farklı mayalara karşı gösterdiği antagonistik etki kitinaz aktivitesinden kaynaklı olabilir. Ancak üreme ortamında yüksek oranda demir ( $0,02 \mu\text{g/ml FeCl}_3$ ) bulunması *M. pulcherrima* maya suşlarının antagonistik etkisinin kaybolmasına neden olduğu bilinmektedir (Sipiczki, 2006; Türkel ve Ener, 2009). Bu durum *M. pulcherrima* maya suşlarının antagonistik etkilerindeki değişiklik hem kitinaz hemde pulcherrimin pigment sentezinin birlikte oluşturduğu farklılıklardan kaynaklı olabilir.

*Non-saccharomyces* maya türlerinin fermentasyon sırasında üzüm sırasındaki bazı substratların dönüşümünü sağlayan bazı hücre dışı enzimleri ürettiği bu enzimlerin aktivitelerinin şarapların aromalarını oluşturmaya katkıları olduğu kadar olumsuz etkileride olduğu bilinmektedir (Delfini ve Formica, 2001; Fiore, 2003). Örneğin lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, alkali fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz,  $\alpha$ -glukozidaz ve  $\beta$ -glukozidaz gibi enzimlerinde şarap üretimi sürecinde önemli rolleri

olduğu bilinmektedir (Delfini ve Formica, 2001; Nikolaou ve ark., 2006; Nikolaou ve ark., 2007). Araştırmamızda *M. pulcherrima* maya suşlarının çok yüksek oranda lösün ve valin arilamidaz enzim aktivitesine sahip olduğu sistin arilamidaz aktivitesinin ise çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Lösün ve valin arilamidaz endopeptidaz enzimi olup peptidleri lösün ve valin amino asitlerinden kesen enzimlerdir. Her iki enziminde *M. pulcherrima* maya türlerinde yüksek olmasının nedenine açıklık getirilememekle birlikte, gerek lösün ve prolin içeren ortamda pigment sentezinin gözlenmemesi gerekse lösün ve valin arilamidaz aktivitelerinin yüksek olması pulcherrimin pigmentinin başlangıç molekülünün lösün-valin degradasyonundan ziyade biyosentezi ile ilgili bir metabolik yolda oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca bazı stres faktörleri (ısı stresi gibi) pigment sentezi üzerinde etkili olsada pigment başlangıç molekülünün stres metabolizmasından çok amino asit biyosentezi ile ilgili olduğunu düşündürmektedir. *S. cerevisiae* maya türünde güçlü azot kaynağı olan amonyum sülfat amino asit biyosentezi için gerekli olan genleri aktifleştirirken prolin gibi zayıf azot kaynağı baskılamaktadır.

Lösün ve valin amino asitlerinin biyosentezi piruvat başlangıçlı iz yolu üzerinden, gerçekleşmektedir. Sistin amino asit sentezi ise 3-fosfogliserat başlangıçlı farklı bir iz yolu üzerinden gerçekleşir. Lösün ve valindeki azot glutamattan gelirken sistindeki azot ve sülfür homosistin molekülünden gelir (Şekil 5.2). Pulcherrimin pigmentinin başlangıç molekülünün muhtemel sentezlendiği reaksiyonun (reaksiyonların) lösün-valin biyosentezinde olduğu kuvvetli bir ihtimaldir.

Araştırmamızda ayrıca asit fosfataz,  $\alpha$ -glikozidaz ve  $\beta$ -glikozidaz enzim aktivitelerinin *M. pulcherrima* maya türlerinde değişik oranlarda bulunduğu görülmüştür. *M. pulcherrima* maya türünde yüksek hücre içi genel  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi daha önce rapor edilmiştir (Rodriguez ve ark., 2004). Ancak  $\beta$ -glukozidaz enziminin hangisi olduğu bilinmemektedir. Mayalarda genel olarak bulunan çoğunlukla invertaz ve inülinaz olup bazı maya türlerinde levonaz aktiviteside gösterilmiştir. Çalışmamızda *M. pulcherrima* maya türünün sukroz içeren ortamda oldukça iyi üremesi invertaz enzim aktivitesi olduğunu düşündürmesine rağmen sukrozu hidrolize eden enzimin hücre içi inulinaz olduğu bulunmuştur. İnulinaz aktivitesi ile ilgili optimizasyon çalışmaları devam etmektedir. Ayrıca inulinaz enziminin glikoz baskılaması ile kontrol edilip edilmediğini belirlemeye yönelik araştırmalarımız halen devam etmektedir.



Şekil 5.2. Lösin, Valin ve sistin biyosentezi (Özgün )

Klasik yöntemle yaptığımız 78 *M. pulcherrima* maya suşunun moleküler tanımlaması için ITS1-5,8s rDNA-ITS2 bölgesi kullanılmıştır. ITS bölgeleri intraspesifik tür tanımlamalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Dört farklı restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda 6 farklı restriksiyon profili ve 4 farklı haplotip bulunduğu belirlenmiştir. En yaygın haplotip (BAAB) Kınalı Yapıncak, Çavuş, Karalahana, Pembe Gemre, Efes Karası ve Cinsaut üzüm çeşitleri üzerindeki maya populasyonlarında bulunurken en az yaygın olan haplotip (BAAA) Cabernet ve Kokulu Kabak üzüm çeşitleri üzerindeki maya populasyonlarında bulunmuştur. Haplotip ve nükleotid çeşitliliği en fazla Efes Karası üzümü maya populasyonunda en düşük haplotip ve nükleotid çeşitliliği ise Pembe Gemre üzümü maya populasyonunda görülmüştür. Nükleotid farklılaşma (Nucleotide Divergency) değerlerine göre birbirinden en farklı maya populasyonuna sahip üzüm çeşitleri Cabernet üzümü ile Şensu üzümü olarak bulunmuştur. Kınalı yapıncak üzümü maya populasyonu ile çavuş üzümü maya populasyonu arasında hem haplotip hemde nükleotid çeşitliliğine göre farklılaşma olmadığı belirlenmiştir.

Oluşturulan köksüz DOLLO ağacında Tip 4 (BAAB) ‘bazal’ haplotip olurken, Tip 1 (AAAA) ve Tip 3 (BAAA) monofiletik durumda bulunmuştur. Tip 4 haplotipi taşıyan mayaların izole edildiği üzüm çeşitleri ile Tip 1 haplotipini taşıyan mayaların izole edildiği üzüm çeşitleri hemen hemen aynı olmasına rağmen Tip 3 haplotipini taşıyan bireyler yalnızca Cabernet ve Kokulu Kabak üzümünün yüzeyinden izole edildi. Her iki üzüm çeşidinde taşıdığı *M. pulcherrima* maya populasyonlarının bazal haplotipten uzaklaşmasına neden olduğu gibi aynı zamanda diğer maya türleri tarafından da az tercih edilen üzüm çeşitleridirler. Araştırmamızda en az maya çeşitliliği bu üzüm çeşitlerinde tespit edilmiştir. Genetik farklılaşmaya neden olabileceği için mayalar tarafından daha az tercih edilen üzüm çeşitleri olabilirler. Bu nedenle non-*Saccharomyces* maya populasyonu düşük olacağından bu üzüm çeşitleri kullanılarak yapılan şarapların veya diğer fermentasyon içeren ürünlerin kalitesini düşürebilir.

Elde edilen sonuçlara göre Kınalı yapıncak ve Çavuş üzümleri *M. pulcherrima* maya populasyonlarının diğer üzüm çeşitlerine dağılımında en önemli üzüm türleridir. Ayrıca yalnızca Kocamış Deresi bağ alanından toplanan Kınalı Yapıncak üzüm çeşidinin bu bağ alanında yetiştirilen diğer üzüm çeşitleri (Kokulu kabak ve Karalahana) üzerindeki maya populasyonları için genetik kaynak oluşturduğu düşünülmektedir.

AMOVA analizleri sonucunda tek bir üzüm çeşidi üzerindeki maya populasyonu içerisindeki genetik varyansın, aynı bağ bölgesinde yetiştirilen diğer üzüm çeşitleri arasındaki genetik varyanstan ve bağlar arasındaki genetik varyanstan çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı bağ içerisinde yetiştirilen üzüm çeşitleri üzerindeki maya populasyonları arasındaki genetik varyansta yine anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamız sonucunda farklı üzüm çeşitlerinden ve coğrafik konumlardan izole edilen aynı maya türünün farklı suşları arasında önemli derecede çeşitlilikler bulunmuştur. Ribosomal DNA analizinde elde edilen farklılıklar diğer fizyoloji ve metabolik özelliklerinden elde edilen farklılıklardan daha azdır. Bu durum biyokontrol amaçlı kullanılacak maya suşunun aynı bağ bölgesinden hatta aynı üzüm çeşidinden farklı dönemlerde (aylarda ve yıllarda) yapılan izolatlarında yapılacak metabolik ve biyokontrol testlerine göre seçilmesi gerektiğini göstermektedir. Benzer sonuçlar daha önce elmalardan izole edilen *M. pulcherrima* maya suşları için de rapor edilmiştir (Janisiewicz ve ark., 2001).

Ribozomal DNA bölgelerinin çok fazla tekrarlı olması nedeniyle dizileme sonucu elde edilen DNA dizisi UMY12 ile ve Gen Bankasında bulunan diğer dizilerle (MB513 ve MB510) çok düşük benzerlik (% 80 civarında) göstermiştir. Bu kadar farklılığın görülmesindeki temel neden ITS bölgelerinin korunmamış olması ve genom içerisinde çok tekrarlı olmasından kaynaklanmaktadır. Aynı maya suşunda dahi tekrarlar içerisindeki mutasyonların her tekrar içinde aynı oranda ve bölgede gerçekleşmediğini 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.
- Arda M., 1990. *Biyoteknoloji*. A. Ü. Veterinerlik Fak. Mikrobiyoloji A.B.D. Kükem Yayınları, 1: 189.
- Arvindekar, A. U. ve Patil N. B., 2002. Glycogen-a Covalently Linked Component of the Cell Wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 19: 131-139.
- Augustyn, O. P. H., Ferreira D. ve Kock J. L. F., 1991. Differentiation Between Yeast Species, and Strains Within Species by Cellular Fatty Acid Analysis. 4. *Saccharomyces sensu stricto*, *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes* and *Wickerhamiella*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1 (4): 324-334.
- Baleiras-Couto M.M., Eijma B., Hofstra H., Huis in't Veld J.H.J. ve van der Vossen J.M.B.M., 1996. Evaluation of Molecular Typing Techniques to Assign the Genetic Diversity Among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Applied Environmental Microbiology*, 62 (1): 41– 46.
- Baleiras-Couto, M. M., van der Vossen J.M.B.M., Hofstra H. ve Huis in't Veld, J.H.J. , 1994. RAPD Analysis: A Rapid Technique for Differentiation of Spoilage Yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 24: 249–260.
- Barata A., Gonzalez S., Ferreira M. M., Querol A. ve Loureiro V., 2008. Sour Rot-Damaged Grapes are Sources of Wine Spoilage Yeasts. *Federation of European Microbiological Societies*, 8: 1008-1017.
- Barnett, J.A., Payne, R. W. ve Yarrow, D., 1990. *Yeasts: Characteristics and Identification* (2nd ed.). Cambridge University Press.
- Bedrinana R. P., Valles B. S., Tascon N. F., Simon A. Q. ve Madrera R. R., 2007. Yeast Species Associated with the Spontaneous Fermentation of Cider. *Food Microbiology*, 24: 25-31.
- Belloch C., Barrio E., Garcia M. D. ve Querol A., 1998. Phylogenetic Reconstruction of the Genus *Kluyveromyces* : Restriction Map Analysis of the 5.8s rRNA Gene and the Two Ribosomal Internal Transcribed Spacers. *Systematic and Applied Microbiology*, 21:266-273.



- Belloch C., Barrio E., Uruburu F., García D. D. ve Querol A., 1997. Characterization of Four Species of the Genus *Kluyveromyces* by Mitochondrial Analisis. *Systematic and Applied Microbiology*, 20: 397-408.
- Beltran G., Torija, M. J., Novo M., Ferrer N., Poblet M., Guillamon J. M., Rozes N. ve Mas A., 2002. Analysis of Yeasts Populations During Alcoholic Fermentation: a Six Year Follow-up Study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 287–293.
- Bisson F. L. ve Dizy M., 2000. Proteolytic Activity of Yeast Strains During Grape Juice Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51 (2): 155-167.
- Bleve G., Grieco F., Cozzi G., Logrieco A. ve Visconti A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 204–209.
- Briones A. I., Ubeda J. F. ve Fernandez M., 2000. Typing of Non-*Saccharomyces* Yeasts with Enzymatic Activities of Interest in Wine-Making. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 29-36.
- Bruns T. D., Vilgays T. J. ve Taylor J. W., 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 525-564.
- 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.
- Capece A., Salzano G. ve Romano P., 2003. Molecular Typing Techniques as a Tool to Differentiate Non-*Saccharomyces* Wine Species. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 33-39.
- Carlson M., 1998. Regulation of Glucose Utilization in Yeast. *Current Opininn in Genetics and Development*, 8: 560-564.
- Chang T. C., Leaw S. N., Chang H. C., Sun H. F., Barton R. ve Bouchara J. P., 2006. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (3): 693-699.

- Charoenchai C., Fleet G. H., Henschke P. A. ve Todd B. E. N. T., 1997. Screening of Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts for the Presence of Extracellular Hydrolytic Enzymes; *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3: 2-8.
- Chavan P., Mane S., Kulkarni G., Shaikh S., Ghormade V., Nerkar D. P., Shouche Y. ve Deshpande M. V., 2009. Natural Yeast Flora of Different Varieties of Grapes Used for Wine Making in India. *Food Microbiology*, 26: 801–808.
- Chester V. E., 1968. Heritable Glycogen-Storage Deficiency in Yeast and Its Induction by Ultra-Violet Light. *Journal of General Microbiology*, 51: 49- 56.
- Chi Z. M., Zhang T., Cao T. S., Liu X. Y., Cui W. ve Zhao C. H., 2011. Biotechnological Potential of Inulin for Bioprocesses, *Bioresource Technology*, 102: 4295-4303.
- Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G. Ve Yue L., 2009. Inulinase-Expressing Microorganisms and Applications of Inulinases, *Applied Microbiology Biotechnology*, 82:11-220.
- Ciani, M., Beco L. ve Comitini F., 2006. Fermentation Behaviour and Metabolic Interaction of Multistarter Wine Yeast Fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108:239-245.
- Clavijo A., Calderón I. L. ve Paneque P., 2010. Diversity of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Yeasts in Three Red Grape Varieties Cultured in the Serranía de Ronda (Spain) Vine-Growing Region. *International Journal of Food Microbiology*, 143: 241–245.
- Clemente-Jimenez J. M., Mingorance-Cazorla L., Martinez-Rodriguez S., Las Heras-Vazquez F. J. ve Rodriguez-Vico F., 2004. Molecular Characterization and Oenological Properties of Wine Yeasts Isolated During Spontaneous Fermentation of Six Varieties of Grape Must. *Food Microbiology*, 21: 149–155.
- Combina M., Mercado L., Borgo P., Elia A., Jofré V., Ganga A., Martinez C. ve Catanis C., 2005. Yeasts Associated to Malbec Grape Berries from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 1055–1061.
- Combina M., Mercado L., Dalcero A. ve Masuelli R., 2007. Diversity of *Saccharomyces* Strains on Grapes and Winery Surfaces: Analysis of Their Contribution to Fermentative Flora of Malbec Wine from Mendoza (Argentina) During Two Consecutive Years. *Food Microbiology*, 24: 403-412.
- Cook A. H. ve Slater. C. A., 1956. The structure of Pulcherrimin. *Jornal of the Chemical Society*, p: 4133-4135.

- 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.
- Cordero-Bueso G., Arroyo T., Serrano A., Tello J., Aporta I., Vélez M. D. ve Valero E., 2011. Influence of the Farming System and Vine Variety on Yeast Communities Associated with Grape Berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 132–139.
- Coton E., Coton M., Levert D., Casaregola S. ve Sohier D., 2006. Yeast Ecology in French Cider and Black Olive Natural Fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (1): 130-135.
- Cottrell, M., Kock, J. L. F., Lategan, P. M. ve Britz, T. J., 1986. Long-Chain Fatty Acid Composition as an Aid in the Classification of the Genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, 18: 166-168.
- Cox J., Teoh A. L. ve Heard G., 2004. Yeast Ecology of Kambucha Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 119-126.
- Cregg J. M. ve Cereghino J. L., 2000. Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiological Reviews*, 24: 45-46.
- Crespo J. L., Powers T., Fowler B. ve Hall M. N., 2002. The TOR-Controlled Transcription Activators *GLN3*, *RTG1*, and *RTG3* are Regulated in Response to Intracellular Levels of Glutamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 14: 6784-6789.
- De Curtis E., Torriani S., Rossi E. ve De Cicco V., 1996. Selection and Use of *Metschnikowia pulcherrima* as a Biological Control Agent for Postharvest Rots of Peaches and Table Grapes. *Annals Microbiology Enzymology*, 46: 45–55.
- De Vit M. J., Wadle J. A., Johnston M., 1997. Regulated Nuclear Translocation of Mig1 Glucose Repressor. *Molecular Biology of the Cell*, 8: 1603-1618.
- Deak T. ve Beuchat L. R., 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. Boca Raton, FL: CRC Press. USA.
- Deak, T., 1995. Methods for the Rapid Detection and Identification of Yeasts in Foods. *Trends in Food and Science Technology*, 6: 287-292.
- Deighton N., Muckenschnabel I, Goodman B. A., Williamson B., Piano S., Neyrotti V., Migheli Q ve Gullino M. L., 1997. Biocontrol Capability of *Metschnikowia*

- pulcherrima* Against *Botrytis* Postharvest Rot of Apple. *Postharvest Biology and Technology*, 11: 131–140.
- Delfini C. ve Formica J. V., 2001. Wine Microbiology Science and Technology, Marcel Dekker, Inc., pp. 490 , Italy.
- Di Maro E., Ercolini D ve Cappola S., 2007. Yeast Dynamics During Spontaneous Fermentation of the Catalanesca Grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 201-210.
- Diguta C. F, Vincent B., Guilloux-Benatier M., Alexandre H. ve Rousseaux S., 2011. PCR ITS-RFLP: A Useful Method for Identifying Filamentous Fungi Isolates on Grapes. *Food Microbiology*, 28 (6): 1145-1154.
- Domizio P., Lencioni L., Ciani M., Di Blasi S., Pontremolesi C. ve Sabatelli M. P., 2007. Spontaneous and Inoculated Yeast Populations Dynamics and Their Effect on Organoleptic Characters of Vinsanto Wine Under Different Process Conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 281–289.
- Edmondson D. G., Smith M. M., Roth S. Y., 1996. Repression Domain of the Yeast Global Repressor Tup1 Interacts Directly with Histones H3 and H4. *Genes and Development*, 10: 1247-1259.
- Enjalbert B., Parrou J. L. , Vincent O. ve François J., 2000. Mitochondrial Respiratory Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Accumulate Glycogen and Readily Mobilize it in a Glucose-Depleted Medium. *Microbiology*, 146: 2685–2695.
- Ercolini D., Di Maro E. ve Coppola S., 2007. Yeast Dynamics During Spontaneous Wine Fermentation of the Catalanesca Grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 201-210.
- Ertan F., Aktac T., Kaboglu C., Ekinçi F. ve Bakar E., 2003. Determination of Optimum Cultivation Conditions on the Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani*, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6 (16): 1386-1388.
- 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.
- Evans D. G., Everis L. K., ve Betts G. D., 2004. Use of Survival Analysis and Classification and Regression Trees to Model the Growth/ No growth Boundary

- of Spoilage Yeasts as Affected by Alcohol, pH, Sucrose, Sorbate and Temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 55–67.
- 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.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package, version 3.5c). Department of Genetics, SK, University of Washington, Seattle, WA.
- Fiore C., 2003. Enzymatic Activities in Various Yeast Species and Strains of Wine Origin. Book of Abstracts 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest.
- Fleet G. H. ve Heard G. M., 1993. Yeast Growth During Fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Chur: Harwood Academic Publishers, p: 27-54.
- Fleet G. H., 2003. Yeast Interactions and Wine Flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11–22.
- Fleet G. H., 2008. Wine Yeasts for the Future. *FEMS Yeast Research*, 8: 979–995.
- Fleet G. H., Charoenchai C., Henschke P. A. ve Todd B. E. N. T., 2008. Screening of Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts for the Presence of Extracellular Hydrolytic Enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3 (1): 2-8.
- Fleet G. H., Prakitchaiwattana C., Beh A. L. ve Heard G., 2002. The Yeast Ecology of Wine Grapes. In: Ciani, M. (Ed.), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Research Signpost, Kerala, India, p. 1–17.
- Frezier V. ve Dubourdiou D., 1992. Ecology of Yeast Strain *Saccharomyces cerevisiae* During Spontaneous Fermentation in a Bordeaux Winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 375–380.
- Gancedo J. M., 1992. Carbon Catabolite Repression in Yeast. *European Journal of Biochemistry*, 206: 297-313.
- Gao L., Chi Z., Sheng J., Wang L., Li J. ve Gong F., 2007. Inulinase-Producing Marine Yeasts: Evaluation of Their Diversity and Inulin Hydrolysis by Their Crude Enzymes, *Microbial Ecology*, 54: 722-729.
- Gellissen G., 2000. Heterologous Protein Production in Methylophilic Yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 741-750.

- Ghormade V., Chavan P., Mane S., Kulkarni G., Shaikh S., Nerkar D. P., Shouche Y. ve Deshpande M. V., 2009. Natural Yeast Flora of Different Varieties of Grapes Used for Wine Making in India. *Food Microbiology*, 26: 801-808.
- Gimenez-Jurado G., Valderrama M. J., Sanogueira I. ve Spencer-Martins I., 1995. Assessment of Phenotypic and Genetic Diversity in the Yeast Genus *Metschnikowia*. *Antonie Leeuwenhoek*, 68: 101-110.
- Golden, D. A., Beuchat, L. R. ve Hitchcock, H. L., 1994. Changes in Fatty Acid Composition of *Zygosaccharomyces rouxii* as Influenced by Solutes, Potassium Sorbate and Incubation Temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 21: 293-303.
- Goldstein A. ve Lampen J. O., 1975.  $\beta$ -D-Fructofuranoside Fructohydrolase from Yeast. *Methods in Enzymology*, 42: 504-511.
- Golunski S., Astolfi V., Carniel N., Oliveira D., Luccio M., Mazutti M.A. ve Treichel H., 2011. Ethanol Precipitation and Ultrafiltration of Inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*, 78: 261-265.
- Gong F., Sheng J., Chi Z., Li J., 2007. Inulinase Production by a Marine Yeast *Pichia guilliermondii* and Inulin Hydrolysis by the Crude Inulinase, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34: 179-185.
- Gong F., Zhang T., Chi Z., Sheng J., Li J., Wang X., 2008. Purification and Characterization of Extracellular Inulinase from a Marine Yeast *Pichia guilliermondii* and Inulin Hydrolysis by the Purified Inulinase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13: 533-539.
- Gonzalez S. S., Barrio E. ve Querol A., 2007. Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts Isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1018–1025.
- 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., Querol A., Jimenez M. ve Huerta T., 1993. Phylogenetic Relationships Among Wine Yeast Strains Based on Electrophoretic Whole-cell Protein Patterns. *International Journal of Food Microbiology*, 18: 115-125.

- 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.
- Guillamon, J. M., Sabate J., Barrio E., Cano J. ve Querol A., 1998. Rapid Identification of Wine Yeast Species Based on RFLP Analysis of the Ribosomal ITS Regions. *Archives of Microbiology*, 169: 387-389.
- Heras-Vazquez F. J. L., Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez J. M., Rodriguez-Vico F., 2003. Identification of Yeast Species from Orange Fruit and Juice by RFLP and Sequence Analysis of the 5.8S rRNA Gene and the Two Internal Transcribed Spacers. *FEMS Yeast Research*, 3: 3-9.
- Herrero P., Martinez-Campa C., Moreno F., 1998. The Hexokinase 2 Protein Participates in Regulatory DNA-protein Complexes Necessary for Glucose Repression of the *SUC2* Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 434: 71-76.
- Huang H. L. ve Brandriss M. C., 2000. The Regulator of the Yeast Proline Utilization Pathway is Differentially Phosphorylated in Response to the Quality of the Nitrogen Source. *Molecular and Cellular Biology*, 20: 892-899.
- Huffman J. L., Molina F. I. ve Jong S. C., 1992. Authentication of ATCC Strains in the *Saccharomyces cerevisiae* Complex by PCR Fingerprinting. *Experimental Mycology*, 6: 316-319.
- Ibeas J. I., Lozano I., Perdigonés F. ve Jimenez I., 1997. Dynamics of Flor Yeast Populations During the Biological Aging of Sherry Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 75-79.
- 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 *Torulaspota*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 189-194.
- Janisiewicz W. J., Tworkoski T. J., ve Kurtzman C.P., 2001. Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology*, 91: 1098–1108.
- 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., Hoheisel J. D.,

1997. The Nucleotide Sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome XII. *Nature*, (29) 387: 87–90.
- Jolly N. P., Augustyn O. P. H. ve Pretorius I. S., 2006. The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27: 15–39.
- Kalil S. J., Silveira S. T., Filho F. M. ve Rodrigues M. I., 2010. Evaluation of Different Parameters for the Purification of Inulinase Using an Ion Exchange Fixed Bed, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15: 676-679.
- Klein R. D., Poorman R. A., Favreau M. A., Shea M. H., Hatzenbuehler N. T. ve Nulf S. C., 1989. Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding Invertase from the Yeast *Saccharomyces occidentalis*. *Current Genetics*, 16: 145-152.
- Kluyver A., van der Walt J. P. ve van Triet J., 1953. Pulcherrimin, the Pigment of *Candida pulcherrima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 39: 583–593.
- Krejer-van Rij, N. J. W., 1984. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, (3rd ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Kurtzman C. P. ve Fell I. W., 1998. *The Yeasts - a Taxonomic Study*, (4th ed.). Amsterdam: Elsevier.
- 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.
- Kurtzman C. P., ve Droby S., 2001. *Metschnikowia fructicola*, a New Ascosporic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 395-399.
- Kushi R. T., Monti R. ve Contiero J., 2000. Production, Purification and Characterization of an Extracellular Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25: 63-69.
- La Guerche S., Gracia C., Darriet P., Dubourdiou D. ve Labarère 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.



- Lee B. H., 1996. *Fundamentals of Food Biotechnology*, VCH Publishers, USA, p: 431.
- 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.
- Leng Teoh A., Heard G. ve Cox J., 2004. Yeast Ecology of Kombucha Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95 (2): 119-126.
- Li S., Cheng C., Li Z., Chen J. Y., Yan B., Han B. Z. ve Reeves M., 2010. Yeast Species Associated with Wine Grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 85–90.
- Li, W. H., 1997. *Molecular Evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Lillie S. H. ve Pringle J. R., 1980. Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to Nutrient Limitation. *Journal of Bacteriology*, 143: 1384-1394.
- Lin C. C. S. ve Fung D. Y. C., 1987. Critical Review of Conventional and Rapid Methods for Yeast Identification. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 14 (4): 273-289.
- Liu X. Y., Chi Z., Liu G. L., Wang F., Madzak C. ve Chi Z. M., 2010. Inulin Hydrolysis and Citric Acid Production from Inulin Using the Surface Engineered *Yarrowia lipolytica* Displaying Inulinase, *Metabolic Engineering*, 12: 469-476.
- Lopandic, K., Prillinger, H., Molndr, O. ve Gimenez-Jurado, G., 1996. Molecular Characterization and Genotypic Identification of *Metschnikowia* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 9: 393-402.
- Loureiro V. ve Malfeito-Ferreira M., 2003. Spoilage Yeasts in the Wine Industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 23–50.
- Lutfiyya L. L. ve Johnston M., 1996. Two Zinc-Finger-Containing Repressors are Responsible for Glucose Repression of *SUC2* Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 4790-4797.
- MacDonald J. C., 1965. Biosynthesis of Pulcherriminic Acid. *Biochemical Journal*, 96: 533-538.
- Madigan M. T., Martinko, J. M. ve Parker. J., 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, (10th ed.). Prentice Hall, Pearson Education International.
- Martini A., 1993. Origin and Domestication of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*, 4: 165–176.

- Martini A., Ciani M. ve Scozzetti G. 1996. Direct Enumeration and Isolation of Wine Yeast from Grape Surface. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47 (4): 435-440.
- 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.
- Meyer W., Latouche G. N., Daniel H. M., Thanos M., Mitchell T. G., Yarrow D., Schönian G. ve Sorrel T. C., 1997. Identification of Pathogenic Yeasts of the Imperfect Genus *Candida* by Polymerase Chain Reaction Fingerprinting. *Electrophoresis*, 18: 1548-1559.
- Miller M. W. ve Phaff H. J., 1998. *Metschnikowia kamienski*. In: C.P. Kurtzman, J.W. Fell (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, fourth ed., Elsevier, Amsterdam, p: 256–267.
- Mills D. A., Johannsen E. A., ve Cocolin L., 2002. Yeast Diversity and Persistence in *Botrytis*-Affected Wine Fermentation. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 4884 – 4893.
- Molina, F. I., Inoue, T. ve Jong, S. C., 1992. Ribosomal DNA Restriction Analysis Reveals Genetic Heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 499-502.
- Moreira da Silva, M., Malfeito-Ferreira, M., Aubyn, St. ve Loureiro, V., 1994. Long-chain Fatty Acid Composition as a Criterion for Yeast Distinction in the Brewing Industry. *Journal of the Institute of Brewing*, 100: 17-22.
- Mortimer P. ve Polsinelli M., 1999. On the Origins of Wine Yeast. *Research in Microbiology*, 68: 4884–4893.
- Mortimer R. K., Romano P., Suzzi G. ve Polsinelli M., 1994. Genome Renewal: a New Phenomenon Revealed from a Genetic Study of 43 Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Derived from Natural Fermentation of Grape Musts. *Yeast*, 12: 1543-52.
- Nadal D., Colomer B. and Pina, B., 1996 Molecular Polymorphism Distribution in Phenotypically Distinct Populations of Wine Yeast Strains. *Applied Environmental and Microbiology*, 62: 1944–1950.
- Narayana K. J. P. ve Vijyalakshmi M., 2009. Chitinase Production by *Streptomyces sp.* ANU 6277. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 725-733.
- Nei M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

- Nikolaou E, Soufleros E. H., Boulompasi E. ve Tzanetakis N., 2006. Selection of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains According to Their Oneological Characteristics and Vinification Results. *Food Microbiology*, 23: 205-211.
- Nikolaou E., Andrighetto C., Lombardi A. ve Nikolaos T., 2007. Heterogeneity in Genetic and Phenotypic Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Red and White Wine Fermentations. *Food Control*, 18: 1458–1465.
- Nisiotou A. A. ve Nychas G. J. E., 2007. Yeast Populations Residing on Healthy or *Botrytis*-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology*, p: 2765–2768.
- Paraphailong W. ve Fleet G. H., 1997. The Effect of pH, Sodium Chloride, Sucrose, Sorbate and Benzoate on the Growth of Food Spoilage Yeasts. *Food Microbiology*, 14: 459–468.
- Parrou, J. L. ve François J., 1997, A Simplified Procedure for an Rapid and Reliable Assay of Both Glycogen and Trehalose in Whole Yeast Cells. *Anal. Biochem.*, 248:186-188.
- Parrou, J. L., Teste, M. A. ve François, J., 1997. Effects of Various Types of Stress on the Metabolism of Reserve Carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic Evidence for a Stress-induced Recycling of Glycogen and Trehalose. *Microbiology*, 143: 1891-1900.
- Perez J.A., Rodriguez J., Rodriguez L. ve Rutz T., 1996. Cloning and Sequence Analysis of the Invertase Gene *INVI* from the Yeast *Pichia anomala*. *Current Genetics*, 29: 334-340.
- 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.
- Peter G., Lehoczki J. T., Suzuki M. ve Dlauchy D., 2005. *Metschnikowia viticola* sp. nov., New Yeast Species from Grape. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 155-160.
- Prakitchaiwattana C. J., Fleet G. H. ve Heard G. H., 2004. Application and Evaluation of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis to Analyse the Yeast Ecology of Wine Grapes. *FEMS Yeast Research*, 4: 865–877.

- Prakitchaiwattana C. J., Fleet G. H., Spadaro G. M., Vola R., Piano S. ve Gullino M. L., 2002. Mechanisms of Action and Efficacy of Four Isolates of the Yeast *Metschnikowia pulcherrima* Active Against Postharvest Pathogens on Apples. *Postharvest Biology and Technology*, 24: 123–134.
- Pramateftaki P. V., Lanardis P. ve Typas M. A., 2000. Molecular Identification of Wine Yeasts at Species or Strain Level: a Case Study with Strains from Two Vine-Growing Areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 236–248.
- Pretorius I. S., Van der Westhuizen T. J. ve Augustyn O. P. H., 1999. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and its Importance to the South African Wine Industry. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20: 61–74.
- Querol A., Barrio E, Huerta T ve Ramon D., 1992. Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Applied Environmental Microbiology*, 58: 2948–2953.
- Querol A., Guillamon J. M., Sabate 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.
- Querol A., Uruburu F., Esteve-Zarzoso B., Gostincar A. ve Bobet R., 2000. Selection and Molecular Characterization of Wine Yeasts Isolated from the Èl Penedès Area (Spain). *Food Microbiology*, 17: 553-562.
- Quesada, M. P. ve Cenis, J. L., 1995. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR in the Characterization of Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 204-208.
- Raspor P., Milek D. M., Polanc J., Mozina S. S. ve Cadez N., 2006. Yeast Isolated from Three Varieties of Grapes Cultivated in Different Locations of the Dolenjska Vine-Growing Region Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 97-102.
- Reiling J. H., ve Sabatini D. M., 2006, Stress and mTOR Structure signaling. *Oncogene*, 25: 6373–6383.
- Reynolds, D. R. ve Taylor, J.W., 1992. *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, International. Newport Oregon. P: 375.

- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B. ve Lonvaud A., 2000. Cytology, Taxonomy and Ecology of Grape and Wine Yeast, *Handbook of Enology*, vol. 1. JohnWiley and Sons, West Sussex (England), p: 1–49.
- Rodríguez M. E., Lopes C. A., Van-Brook M., Valles S., Ramón D. ve Caballero A. C., 2004. Screening and Typing of Patagonian Wine Yeasts for Glucosidase Activities. *Journal of Applied Microbiology*, 96:84–95.
- Romancino D., Di Maio S., Muriella R., ve Oliva D., 2008. Analysis of Non-*Saccharomyces* Yeast Populations Isolated from Grape Musts from Sicily (Italy). *Journal of Applied Microbiology*, 105 (6): 2248-2254.
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso, M. ve Capece A., 2003. Function of Yeast Species and Strains in Wine Flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 169–180.
- 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.
- Ronne H., 1995. Glucose Repression in Fungi. *Trends in Genetetics*, 11: 12-17.
- 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.
- Sabaté J., Cano J., Esteve-Zarzoso B. ve Guillamón J. M., 2002. Isolation and Identification of Yeasts Associated with Vineyard and Winery by RFLP Analysis of Ribosomal Genes and Mitochondrial DNA. *Microbiology Research*, 157: 267–274.
- 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 B. O. Y. S., Converti A., Filho F. M., 2009. Effects of Carbon and Nitrogen Sources and Oxygenation on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152: 249-261.

- Saravanakumar D., Spadaro D., Garibaldi A. ve Gullino M. L., 2009. Detection of Enzymatic Activity and Partial Sequence of a Chitinase Gene in *Metschnikowia pulcherrima* Strain MACH1 Used as Post-harvest Biocontrol Agent. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 183-193.
- Satora P. ve Tuszyński T., 2005. Biodiversity of Yeasts During Plum Wegierka Zwyczajna Spontaneous Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 43(3): 277-282.
- Schneider, S., Roessli D. ve Excoffier L., 1996. Arlequin: a Software Package for Population Genetics.
- Schutz M ve Gafner J., 1994. Dynamics of the Yeast Strain Population During Spontaneous Alcoholic Fermentation Determined by CHEF Gel Electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 253–257.
- Sheng J., Chi Z., Gong F., Li J., 2008. Purification and Characterization of Extracellular Inulinase from a Marine Yeast *Cryptococcus aureus* G7a and Inulin Hydrolysis by the Purified Inulinase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144: 111-121.
- Sherman F., Fink G. R. ve Hicks J. B., 1986. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 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.
- Spiczki M., 2006. *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10): 6716-6724.
- Spiro R. G., 1966, Analysis of Sugars Found in Glycoproteins. *Methods in Enzymology*, 8: 3–26.
- Taussig R. ve Carlson M., 1983. Nucleotide Sequence of the Yeast *SUC2* Gene for Invertase. *Nucleic Acids Researches*, 11: 1943-1954.
- 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.

- Ter Schure E. G., van Riel N. A., ve Verrips C. T., 2000, The Role of Ammonia Metabolism in Nitrogen Catabolite Repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiological Reviews*, 24: 67-83.
- Tornai-Lehoczki J., Péter G., ve Dlačny D., 2003. CHROMagar Candida Medium as a Practical Tool for the Differentiation and Presumptive Identification of Yeast Species Isolated from Salads. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 189–200.
- 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.
- Tredoux H. G., Kock J. L. F., Lategan P. M. ve Muller H. B., 1987. A Rapid Identification Technique to Differentiate Between *Saccharomyces cerevisiae* Strains and Other Yeasts Species in the Wine Industry. *American Journal of Enology and Viticulture* 38: 161-164.
- Treitel M. A., Kuchin S. ve Carlson M., 1998. Snf1 Protein Kinase Regulates Phosphorylation of the Mig1 Repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 18: 6273-6280.
- Türkel S. ve Ener B., 2009. Isolation and Characterization of New *Metschnikowia pulcherrima* Strains as Producers of the Antimicrobial Pigment Pulcherrimin *Journal of Biosciences- Zeitschrift für Naturforschung*, 64c: 405–410.
- Valente, P., Gouveia, F. C., de Lemos, G. A., Pimentel, D., van Elsas, J. D., Mendoga-Hagler, L. C. ve Hagler, A. N., 1996. PCR Amplification of the rDNA Internal Transcribed Spacer Region for Differentiation of *Saccharomyces* Cultures. *FEMS Microbiological Letters*, 137: 253-256.
- Valero E., Cambon B., Schuller D., Casal M. ve Dequin S., 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* Yeast Strains from Grape Berries of Wine-Producing Areas Using Starters Commercial Yeasts. *FEMS Yeast Researches*, 7 (2): 317-329.
- Valles B. S., Bedrinana R. P., Tascon N. F., Simon Q. A. ve Madrera R. R., 2007. Yeast Species Associated with the Spontaneous Fermentation of Cider. *Food Microbiology*, 24:25–31.
- van Vuuren, H. J. I. ve van der Meer, L., 1987. Fingerprinting of Yeasts by Protein Electrophoresis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38: 49-53.

- Vancanneyt, B. P., Hennebert, G. ve Kersters, K., 1991. Differentiation of Yeast Species Based On Electrophoretic Whole-cell Protein Patterns. *Systematic and Applied Microbiology*, 4: 23-32.
- 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.
- Vaughan-Martini A. ve Martini A., 1995. Facts, Myths and Legends on the Prime Industrial Microorganism. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 514–522.
- 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 *Schizosaccharomyce spombe* 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): 655-61.
- Veziñhet F, Hallet J. N, Valade M. ve Poulard A., 1992. Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 83–86.
- Vyas K. V., Kuchin S. ve Carlson M., 2001. Interactions of the Repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 158: 563-572.
- Walker G. M., 2000. *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons. England.
- Weir B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Assoc., Inc.: Sunderland, MA, USA.
- Weir B. S. ve Cockerham C., 1984, Estimating F-statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.



- 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.
- White T.J., Bruns T., Lee S. ve Taylor. J., 1990. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. Academic Press, san Diego, pp. 315-322.
- Wyder, M. T. ve Puhon, Z., 1997. A Rapid Method for Identification of Yeasts From Kefyr at Species Level. *Michwissenschaft*, 52: 327-330.
- Yu X., Guo N., Chi Z., Gong F., Sheng J. ve Chi Z., 2009. Inulinase Overproduction by a Mutant of the Marine Yeast *Pichia guilliermondii* Using Surface Response Methodology and Inulin Hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 266-271.
- Zambonelli C., 1998. *Microbiologia e Biotecnologia dei vini*. Bologna: Edagricole.
- Zhang H., Skelton A., Gardner R. C. ve Goddard M. R., 2010. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* Reside on Oak Trees in NewZealand: Evidence for Migration From Europe and Interspecies Hybrids. *FEMS Yeast Researches*, 10: 941–947.
- Zott K., Miot-Sertier C., Claisse O., Lonvaud-Funel A. ve Masneuf-Pomarede I., 2008. Dynamics and Diversity of Non-Saccharomyces Yeasts During the Early Stages in Winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 197–203.

## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa numarası

Çizelge 3.1.	Üzüm örneklerinin toplandığı bağlar ve üzüm çeşitleri	15
Çizelge 3.2.	PCR bileşenleri ve konsantrasyonları	21
Çizelge 3.3.	PCR reaksiyon şartları	22
Çizelge 3.4.	Restriksiyon enzimlerinin kesim işlemi için reaksiyon bileşenleri	23
Çizelge 4.1.	Üzüm çeşitlerindeki maya yoğunluğu	26
Çizelge 4.2.	İzole edilen mayaların bağlara ve üzüm çeşitlerine göre Dağılımı	27
Çizelge 4.3.	Tanımlanan maya türlerinin üzüm çeşitlerine göre dağılımı	28
Çizelge 4.4.	Toplam izole edilen maya türleri ve yüzdeler dağılımı	31
Çizelge 4.5.	Toplam izole edilen maya cinsleri ve yüzdeler dağılımı	31
Çizelge 4.6.	İzole edilen <i>M. pulcherrima</i> maya türlerinin kod numaraları ve izole edildikleri üzüm çeşidi	33
Çizelge 4.7.	Glikoz içeren ortamda maya hücrelerinin pigment zonu çapları	36
Çizelge 4.8.	Sukroz içeren ortamda maya hücrelerinin pigment zonu çapları	37
Çizelge 4.9.	<i>M. pulcherrima</i> maya türlerinin farklı maya türlerine karşı antifungal etkisi	44
Çizelge 4.10.	<i>M. pulcherrima</i> maya türlerinin farklı bakteri türlerine karşı antibakteriyel etkisi	44
Çizelge 4.11.	<i>M. pulcherrima</i> maya türünde invertaz ve inulinaz aktivitesi	49
Çizelge 4.12.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HinfI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HpaII</i> ( <i>MspI</i> ) ve <i>HhaI</i> ( <i>CfoI</i> ) restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen bant büyüklükleri	72
Çizelge 4.13.	Restriksiyon kesimi sonrası oluşan bant profilleri	73
Çizelge 4.14.	Bileşik Haplotipler ve <i>M. pulcherrima</i> populasyonunda bulunan haplotiplerin frekansı	74
Çizelge 4.15.	Populasyon içi haplotip ve nükleotit çeşitliliğinin ortalaması ve standart hatası	75
Çizelge 4.16.	<i>M. pulcherrima</i> maya populasyonları arasındaki nükleotid	77

çeşitliliği (pair-wise nucleotide diversity) (üst diagonal) ve  
genetik farklılaşma (nucleotide divergence) (alt diagonal)

Çizelge 4.17. *M. pulcherrima* maya populasyonlarının AMOVA analizi 80

## ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa Numarası

Şekil 1.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya türünde ribozomal DNA tekrarının yapısı (35S pre-RNA operon yapısı).	3
Şekil 1.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya türünde ribozomal DNA tekrarları ve çevresindeki diziler.	4
Şekil 1.3.	Pulcherriminic asit biyosentezi.	8
Şekil 3.1.	Çanakkale ve Bozcaada haritası.	14
Şekil .3.2.	Çalışmada kullanılan marker haritası.	22
Şekil 4.1.	Glikoz içeren ortamda <i>M. pulcherrima</i> türlerinin üremesi ve pigment sentezi	34
Şekil 4.2.	Sukroz içeren ortamda <i>M. pulcherrima</i> türlerinin üremesi ve pigment sentezi.	35
Şekil 4.3.	Farklı azot içeren ortamlarda <i>M. pulcherrima</i> maya türünün üremesi ve pulcherrimin pigment sentezi.	38
Şekil 4.4.	<i>M.pulcherrima</i> maya türünde ozmotik stresin üreme ve pigment sentezi üzerine etkisi.	40
Şekil 4.5.	<i>M.pulcherrima</i> maya türünde ısı stresinin üreme ve pigment sentezi üzerine etkisi.	41
Şekil 4.6.	<i>M.pulcherrima</i> maya türünde ozmotik ve ısı stresinin glikojen birikimine etkisi.	42
Şekil 4.7.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri.	45
Şekil 4.8.	Maya hücrelerinin katı ve sıvı besi ortamlarda hücre dışı enzim aktiviteleri	47
Şekil 4.9.	<i>M.pulcherrima</i> maya hücrelerinin hücre dışı enzim aktiviteleri	48
Şekil 4.10.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının PCR ile amplifikasyonu (MP-1 – MP-30)	50
Şekil 4.11.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının PCR ile amplifikasyonu (MP-31 – MP-60)	50
Şekil 4.12.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının PCR ile amplifikasyonu (MP-61 – MP-78).	51
Şekil 4.13.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HaeIII</i> enzim kesim	52

	sonuçları (MP-1 – MP-18).	
Şekil 4.14.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HaeIII</i> enzim kesim sonuçları (MP-19 – MP-36).	53
Şekil 4.15.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HaeIII</i> enzim kesim sonuçları (MP-37 – MP-54).	54
Şekil 4.16.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HaeIII</i> enzim kesim sonuçları (MP-55 – MP-66).	55
Şekil 4.17.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HaeIII</i> enzim kesim sonuçları (MP-67 – MP-80).	56
Şekil 4.18.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>CfoI (HhaI)</i> enzim kesim sonuçları (MP-1 – MP-18).	57
Şekil 4.19.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>CfoI (HhaI)</i> enzim kesim sonuçları (MP-19 – MP-36).	58
Şekil 4.20.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>CfoI (HhaI)</i> enzim kesim sonuçları (MP-37 – MP-54).	59
Şekil 4.21.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>CfoI (HhaI)</i> enzim kesim sonuçları (MP-55 – MP-66).	60
Şekil 4.22.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>CfoI (HhaI)</i> enzim kesim sonuçları (MP-67 – MP-80).	61
Şekil 4.23.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HinfI</i> enzim kesim sonuçları(MP-1 – MP-18).	62
Şekil 4.24.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HinfI</i> enzim kesim sonuçları (MP-19 – MP-36).	63
Şekil 4.25.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HinfI</i> enzim kesim sonuçları (MP-37 – MP-54).	64
Şekil 4.26.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HinfI</i> enzim kesim sonuçları (MP-55 – MP-66).	65
Şekil 4.27.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>HinfI</i> enzim kesim sonuçları (MP-68 – MP-80).	66
Şekil 4.28.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>MspI (HpaII)</i> enzimkesim sonuçları (MP-1 – MP-18).	67
Şekil 4.29.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>MspI (HpaII)</i> enzim kesim sonuçları (MP-19 – MP-36).	68

Şekil 4.30.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>MspI</i> ( <i>HpaII</i> ) enzim kesim sonuçları (MP-37 – MP-54).	69
Şekil 4.31.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>MspI</i> ( <i>HpaII</i> ) enzim kesim sonuçları (MP-55 – MP-66).	70
Şekil 4.32.	<i>M. pulcherrima</i> maya suşlarının <i>MspI</i> ( <i>HpaII</i> ) enzim kesim sonuçları (MP-67 – MP-80).	71
Şekil 4.33.	<i>M. pulcherrima</i> haplotiplerinin köksüz Dollo parsimoni ağacı.	79
Şekil 4.34.	MP-57 <i>M. pulcherrima</i> maya türünün DNA dizi analizi sonucu.	82
Şekil 4.35.	MP-63 <i>M. pulcherrima</i> maya türünün DNA dizi analizi sonucu.	83
Şekil 4.36.	MP-57 <i>M. pulcherrima</i> maya türünün DNA dizisi.	84
Şekil 4.37.	MP-57 <i>M. pulcherrima</i> maya türünün DNA dizisi.	84
Şekil 4.38.	BLAST: MP-57- UMY12.	85
Şekil 4.39.	BLAST: MP-63-UMY12.	86
Şekil 4.40.	BLAST: MP-57-MP-63.	87
Şekil 4.41.	ALIGNMENT MP-57, MP-63, UMY-12.	88
Şekil 5.1.	<i>M.pulcherrima</i> maya türünde olası TOR kompleks proteini ve aktivasyonu.	92
Şekil 5.2.	Lösin, Valin ve sistin biyosentezi.	96

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: İlknur Nezahat ÇILDIR

Doğum Yeri: İSTANBUL

Doğum Tarihi: 18.08.1986

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi /Fen- Edebiyat Fakültesi / Biyoloji  
(Haziran- 2008)

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 Turgut Genç, İlknur N. Çıldır, 2010: Çanakkale'nin bazı vitikültürel alanlarından toplanan üzümlerde doğal maya florasının ve fermentasyon florasının belirlenmesi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi. PAU, Denizli, 21-25 Haziran 2010. (Poster Sunumu)

2- Tülay Turgut Genç, İlknur N. Çıldır, 2010: Metchnikowia pulcherrima maya türlerinde stres koşullarının pulcherrimin pigment sentezine ve glikojen birikimine etkilerinin analizi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi. PAU, Denizli, 21-25 Haziran 2010. (Poster Sunumu)

- 3- Tülay Turgut Genç, İlknur N. Çıldır, Tülay Bican Süerdem, 2010: Üzümlerden izole edilen farklı *Metschnikowia pulcherrima* maya türlerinin antimikrobiyal aktivitesi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi. PAU, Denizli, 21-25 Haziran 2010. (Poster Sunumu)
- 4- 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).
- 5- T. Turgut Genç ve İ. N. Çıldır 2011. Yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in Bozcaada (Çanakkale, Turkey)XVI. Congress of European mycologists, Halkidiki 19-23September 2011. (Oral Presentation).
- 6- 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).
- 7- 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 19-23September 2011. (Oral Presentation).
- 8- 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).



9- Tülay Turgut Genç, Tuğba Çelik ve İlknur N. Çıldır, 2011: Identification of Yeast Species Isolated From Turkish Traditional Beverage, Ayrar. 7th. Balkan Microbiology Congress. Belgrad, Sırbistan. 25-28 October 2011 (Poster Presentation).

10- Tülay Turgut Genç ve İlknur N. Çıldır, 2012: *Metschnikowia pulcherrima* maya türünde pulcherrimin pigment sentezine azotun etkisi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. Ege Üniversitesi, İzmir. 3-7 Eylül 2012 (Poster Sunumu için özet gönderildi).

11- Tülay Turgut Genç ve İlknur N. Çıldır, 2012: Üzümlerden izole edilen *Metschnikowia pulcherrima* maya türlerinin moleküler karakterizasyonu. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. Ege Üniversitesi, İzmir. 3-7 Eylül 2012 (Poster Sunumu için özet gönderildi).

#### c) Katıldığı Projeler

### **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Gökçeada Atatürk Anadolu Öğretmen Lisesi (2011-2012 EĞİTİM ÖĞRETİM YILI)

Gökçeada Lisesi (2011-2012 EĞİTİM ÖĞRETİM YILI)

### **İLETİŞİM**

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