

**KATİL MAYA *Lindnera saturnus*' un
BOZUCU MAYALARA ETKİSİ (*in vitro*)**

Çağıl TÜRKAY

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. Muhammet ARICI**

2012

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KATİL MAYA *Lindnera saturnus*' un BOZUCU MAYALARA ETKİSİ
(*in vitro*)

Çağrı TÜRKAY

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof.Dr. Muhammet ARICI

TEKİRDAĞ-2012

Her hakkı saklıdır.

Prof. Dr. Muhammet ARICI danışmanlığında, Çağıl TÜRKAY tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Bitirme tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. Muhammet ARICI *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Ömer ÖKSÜZ *İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serdar POLAT *İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç.Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Katil Maya *Lindnera saturnus*' un Bozucu Mayalara Etkisi (*in vitro*)

Çağıl TÜRKAY

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Bazı maya türleri, buldukları ortama protein yapılı, hücre dışı olan ve katil toksin (killer toxin) adıyla bilinen toksin salgırlar. Bazı belirli ve uygun koşullar altında bu toksinler, bazı duyarlı maya türlerine karşı öldürücüdürler fakat diğer mikroorganizmalara karşı bu yönde bir öldürücü etkileri yoktur. Buna ek olarak, katil toksinler insanlara karşı öldürücü veya zararlı değildirler. Bunun nedeni katil toksinlerin sadece belirli hücre duvarı materyallerine karşı etkili olmaları ve sadece bazı özel hücre duvarı bileşenlerine karşı etkileşim göstermeleridir. Katil karakter mekanizması, her toksin için farklılık gösterebilir çünkü katil özellik, çift zincir RNA, lineer çift zincir DNA veya kromozom üzerinde kodlanmış olabilir. Katil mayalar kendi toksinlerine karşı bağıştırlar bu sebeple birbirlerine karşı etkileri yoktur.

Şimdiye kadar katil mayalar K1'den K11'e 11 farklı çeşit olarak sınıflandırılmıştır. Katil mayaların gıda sektöründe kullanılması birçok araştırmacı için konu olmuştur ve alınan sonuçlar katil mayaların biyoteknoloji, biyomedikal, fermentasyon alanlarında ve koruyucu olarak kullanımı hakkında bilgi verir niteliktedir. Bu araştırma, katil mayaların özellikleri, katil toksin üretimi, salgılanma mekanizması, endüstriyel uygulamaları ve *Lindnera saturnus* var *saturnus* katil toksinin özellikle peynirde ve çeşitli başka ürünlerde bozulmaya sebep olan mayalar üzerindeki etkisine odaklanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada, *in vitro* denemelerde katil mayaların bazı bozucu mayalara karşı inhibisyon etkisi pozitif olarak kanıtlanmıştır. Fakat ürün çalışmalarında katil maya ile ilgili olarak spesifik bir pozitif etkiye rastlanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Katil maya, *Williopsis saturnus*, *Lindnera saturnus*, bozucu maya, inhibisyon

2012, 56 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

The Effect of Killer Yeast *Lindnera saturnus* on Spoilage Yeasts (*in vitro*)

Çağıl TÜRKAY

Department of Food Engineering
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Namık Kemal University

Supervisor: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Some kind of yeast strains secrete protein based extracellular toxin into the medium known as ‘killer toxin’. Under some available and definite conditions these killer toxins are lethal to some sensitive yeast strains; however they do not have a fatal effect against other types of microorganisms. In addition, killer toxins are not dangerous or lethal to humans because they affect only certain cell wall components and interact with cell wall elements that harbor specific receptors. The killer characteristic mechanism differs for each toxin because it can become coded on double-stranded RNA, linear dsDNA or chromosomal. Killer yeasts have immunity to their own toxins, thus they cannot affect each other.

Until now, killer toxins have been classified into 11 types between K1-K11. The application of killer yeast in food industry has been the subject of many researchers and the result of their studies give insight about killer yeasts use in biotechnology, biomedicine, fermentation process and as a preserver. Some studies also show killer yeast applications in environmental areas. This research mostly focused on general information about killer yeasts, killer toxin production, secretion mechanism and industrial application, using methods of killer toxins in food industry and emphasized effect of killer toxins of *Lindnera saturnus* var. *saturnus* against to the yeasts which causes spoilage on the cheese and other products. As a result, *in vitro* inhibition effect of the killer yeasts against some spoilage yeasts was proved positively in this study; on the other hand, any specific positive effect related killer yeasts was attained food sample trials.

Keywords: Killer yeast, *Williopsis saturnus*, *Lindnera saturnus*, spoilage yeast, inhibition

2012, 56 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı olan, teşvik ve tavsiyelerini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Maya örneklerimin bir kısmını temin eden ve tanımlama işlemlerinde yardımını esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Osman SAĞDIÇ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımnda bilgisini ve yardımını esirgemeyen, beni daima cesaretlendiren Araş. Gör. Gülnaz ÇELİK YURT' a teşekkür ederim.

Üzüm suyu örneklerini temin eden Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu çalışanı Gıda Yüksek Mühendisi Mehmet GÜLCÜ'ye teşekkür ederim.

Bana sadece evlerini değil kalplerinin sıcaklığını da açan teyzem ve eniştem Hilal-Osman AVCI'ya çok teşekkür ederim. Teknik desteğinden ötürü kuzenim Öyküm AVCI'ya sevgilerimi sunarım.

Eğitimim boyunca beni sürekli maddi ve manevi olarak destekleyen annem Seval TÜRKAY, babam Gültekin TÜRKAY ve varlığıyla beni daima neşelendiren, hayatıma yaşama sevinci katan kardeşim Çağlar TÜRKAY'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1.En Çok Bilinen Katil Maya Cinsleri.....	4
2.1.1. <i>Candida</i>	4
2.1.2. <i>Cryptococcus</i>	4
2.1.3. <i>Debaryomyces</i>	5
2.1.4. <i>Hanseniaspora</i>	5
2.1.5. <i>Hansenula</i>	6
2.1.6. <i>Kluyveromyces</i>	7
2.1.7. <i>Pichia</i>	7
2.1.8. <i>Saccharomyces</i>	7
2.1.9. <i>Ustilago</i>	8
2.1.10. <i>Williopsis</i>	8
2.1.11. <i>Zygosaccharomyces</i>	9
2.2.Moleküler Mekanizma ve Katil Toksin Genetiği	9
2.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Katil Fenomeni ile dsRNA Virüs Temelli Katil Sistem	13
2.2.2. <i>Kluyveromyces lactis</i> Fenomeni ile Lineer dsDNA Plasmid Tabanlı Katil Sistem	18
2.2.3.Kromozomal Kodlanmış Katil Sistem.....	19
2.3.Toksin Direncinin Bağışıklık Mekanizması	21
2.4.Katil Maya Toksininin Mayalardaki Etki Örnekleri.....	22
2.5.Katil Mayaların Bakterilere Etkisi.....	25
2.6.Katil Maya Toksinleri ile Bakteriyel Toksinlerin Benzer Etkileri	25
2.7.Katil Toksinlerin Gıda Üretiminde Çeşitli Uygulamalardaki Avantajları ve Riskleri	26
2.7.1.Katil Toksinin Biyoteknoloji ve Fermentasyon Alanı Uygulamaları.....	27
2.7.2.Katil Toksinin Tıbbi Uygulamaları	30
2.7.3.Katil Toksinin Gıda Depolama Uygulamaları.....	32
2.7.4.Katil Toksinin Taksonomik Alan Uygulaması	33
2.7.5.Katil Toksin Riskleri	33

3.MATERYAL ve METOT	35
3.1.Materyal.....	35
3.1.1.Bozucu Mayalar.....	35
3.1.2.Katil Maya	35
3.1.3.Besiyerleri.....	36
3.1.4.Üzüm suyu.....	36
3.2.Metot.....	36
3.2.1. Bozucu Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması	36
3.2.2. <i>Lindnera saturnus</i> 'un Bozucu Mayalara Etkisi (<i>in vitro</i>)	36
3.2.3.Üzüm Suyu Denemesi	37
3.2.4.pH Ölçümü	37
3.2.5.Optik Yoğunluk Ölçümü	37
4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	38
4.1.Bozucu Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması	38
4.2. <i>Lindnera saturnus</i> 'un Bozucu Mayalara Etkisi (<i>in vitro</i>)	38
4.3. <i>Lindnera saturnus</i> 'un Üzüm Suyunda Bozucu Mayalara Etkisi	44
4.3.1.Üzüm Suyunun pH'sında Meydana Gelen Değişiklikler	44
4.3.2.Üzüm Suyunun Optik Yoğunluğunda Meydana Gelen Değişiklikler	46
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	48
6.KAYNAKLAR	49
EKLER	55
EK 1	55
ÖZGEÇMİŞ	56

SİMGELER DİZİNİ ve KISALTMALAR DİZİNİ

CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dsRNA	Double Strain RNA
h	hour (saat)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü)
kDa	Kilo Dalton
Kex1/kex2	Katil toksin proteinleri
kob	koloni oluşturan birim
KT	Katil Toksin
L	Large
l	Litre
log	Logaritma
M	Medium (Orta)
Mr	Bağıl Moleküler Kütle
m ³	Metreküp
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MÖ	Milattan Önce
mRNA	Mesajcı RNA
°C	Degree Celsius
ORF	Açık okuma çerçevesi
PDA	Potato Dextrose Agar
pGKL	Katil toksin plazmiti
Reseptör	R
RNA	Ribonükleik Asit
tRNA	Taşıyıcı RNA
VLPs	Virüs Benzeri Parçacık
XL	Extra Large (Ekstra Büyük)
YEPD	Yeast Extract Pepton Dextrose
N	Normal

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2. Duyarlı maya hücrelerinin <i>Saccharomyces cerevisiae</i> reseptör aracılığıyla katil K1 toksini tarafından öldürülmesi	13
Şekil 2.2.1.1. <i>S. cerevisiae</i> 'nin katil toksin salgılama sistemi	15
Şekil 2.2.1.2. K1 katil toksin-bağıışıklık prekürsörünün taslak yapısı ve olgun toksin yapısı	16
Şekil 2.2.2. pGKL1 ve pGKL2 lineer plasmidlerin genom düzenlemeleri	19
Şekil 2.2.3. Mayanın Hücre Duvarı Yapısı	20
Şekil 2.4.1. <i>S. cerevisiae</i> LS20 (CHS3) ilintili hayatta kalma ve <i>P. acaciae</i> toxin (5xMIC) içeren ortamdaki Δ Chs3 değişimi grafiği.....	23
Şekil 2.4.2. Değişik metotlarla katil maya aktivitesinin farklı patojen mayalar üzerinde değerlendirilmesi	24
Şekil 4.2.1. <i>Lindnera saturnus</i> 'un 15°C'deki bozucu mayalara etki grafiği	39
Şekil 4.2.2. <i>Lindnera saturnus</i> 'un 15°C'deki bozucu mayalara etkisi	40
Şekil 4.2.3. <i>Lindnera Saturnus</i> 'un 25°C'deki bozucu mayalara etki grafiği.....	41
Şekil 4.2.4. <i>Lindnera Saturnus</i> 'un 25°C'deki bozucu mayalara etkisi.....	41
Şekil 4.2.5. <i>Lindnera Saturnus</i> 'un 30°C'deki bozucu mayalara etki grafiği.....	42
Şekil 4.2.6. <i>Lindnera Saturnus</i> 'un 30°C'deki bozucu mayalara etkisi	43
Şekil 4.3.1. Üzüm suyu örneklerinin pH değerlerindeki değişimler	45
Şekil 4.3.2. Üzüm suyu örneklerinin optik yoğunluk değerlerindeki değişimler.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Mayaların tarihi	2
Çizelge 2.2.1. Katil mayalar ve protein toksinleri	11
Çizelge 2.2.2. Mayalarda katil fenotipin genetik temeli	12
Çizelge 3.1.1. Kullanılan bozucu maya kaynakları.	36
Çizelge 4.2.1. <i>Lindnera Saturnus</i> 'un 15°C'deki bozucu mayalara etkisi	39
Çizelge 4.2.2. <i>Lindnera Saturnus</i> 'un 25°C'deki bozucu mayalara etkisi	40
Çizelge 4.2.3. <i>Lindnera Saturnus</i> 'un 30°C'deki bozucu mayalara etkisi	42
Çizelge 4.3.1. Bozucu maya ilave edilmiş üzün suyu örneklerinin pH değişimi	44
Çizelge 4.3.2. Bozucu maya ilave edilmiş üzün suyu örneklerinin optik yoğunluk değişimi..	46

1.GİRİŞ

Mikroorganizmaların öldürücü yeteneği yeni bir biyolojik fenomen değildir. İdrardan izole edilmiş olan *Bacillus anthracis* 'un inhibisyon etkisini gözlemleyen Pasteur ve Joubert (1877) muhtemelen mikroorganizmalar arasındaki rekabeti rapor eden ilk kişilerdir.

Mayalar insan ırkının en eski endüstriyel mikroorganizmaları olarak düşünülür. Mayaların benzersiz özellikleri -*Saccharomyces cerevisiae*- ve 700 çeşit mayanın yıllardır büyük gizli bir potansiyel olarak kullanılması, mayaların araştırma için kullanılmasını tercih sebebi yaptı. Bununla beraber *S. cerevisiae* ve diğer mayalar insan hayatı için kazançlı olan endüstriyel ve medikal uygulamaların çoğunluğunu sağlarlar. Mayaların istenen ürünleri veya hücre komponentleri fermentasyon sırasında üretilir (Vullo ve Wachsmann 2005).

Toksin salgılayan katil mayalar ilk kez 45 yıl önce *S. cerevisiae* laboratuvar suşlarında (Çizelge 1) katil aktivitenin genetik etmeni olan çift zincirli RNA (dsRNA) molekülünde araştırılmıştır (Breining ve ark. 2006; Young ve Yagiu 1978). 1963 yılında *S. cerevisiae* mayasının katil aktivitesi, dsRNA katil virüs tespiti ile tanımlanan katil suşlar, katil (K), duyarlı (S) ve nötral (N) terimleri kullanılarak Bevan ve Makover tarafından keşfedilip 3 grupta sınıflandırılmıştır. Katil mayalar çoğunlukla “duyarlı” maya cinsine ait olan diğer mayalara karşı etkilidirler.

Katil ve duyarlı hücreler aynı ortamda geliştiklerinde, sonradan eklenenin büyük oranda öldüğü gözlenmiştir. Öldürme işlemi katil ve duyarlı hücreler arasında hücre teması olmadan da gerçekleşebilir. ‘Katil faktör’ olarak isimlendirilen etken madde, katil hücre tarafından duyarlı hücreyi öldürmek üzere salınır (Woods ve Bevan 1968).

Saccharomyces cinsinin laboratuvar suşlarında katil aktivitenin genetik etmeni olan çift zincirli RNA (dsRNA) molekülü araştırılmıştır (Young ve Yagiu 1978).

Katil aktivite 90'dan fazla türde keşfedilmiştir ve *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schwanniomyces* and *Williopsis* cinslerinin türlerine ait suşlar tarafından üretilen çeşitli katil proteinler (mycocins), geniş çaplı olarak araştırılmıştır (Buzzini ve ark. 2004). Farklı cinslerin katil türleri toksik bileşen, pH, sıcaklık stabilitesi ve proteolitik enzimlere karşı duyarlılık koşulları farklı olmak üzere izole edilmişlerdir. Katil faktör doğası çalışmalarını doğuran *Saccharomyces* göstermiştir ki, bu protein yüksek spesifik etki spektrumuna sahiptir ve özel pH, sıcaklık ve havalandırma koşullarına bağlıdır (Yener 2006).

Katil maya ekstraktında dsRNA'nın üç türü (XL, L ve M) keşfedilmiştir. En düşük molekül ağırlıklı tür (M) katil aktivite ile birleşmiştir ve katil aktivitesi olmayan (öldürücü faktör üretemeyen) suşlar bu dsRNA açısından nokсандır. Bundan başka, baskılanmış plazmid taşıyan suşlarda M türü eksikliği vardır fakat M türünden daha hafif moleküler ağırlıkta olan S türünü içerirler (Young ve Yagiu 1978).

Çizelge 1. Mayaların tarihi (Feldmann 2005)

Kronoloji	Dönüm Noktası
6000-2000 MÖ	Mayalanma (Sümerler, Babiller)
1680	Mikroskop altında maya (van Leeuwenhoek)
1835	Mayaya bağlı alkol fermentasyonu
1837	Maltta gözlemlenen maya için (<i>S. cerevisiae</i>) isimlendirme
1839	Maya gelişiminde besin kaynağı olarak şeker
1857	Metabolizma ile bağlantılı olarak fermentasyon (Pasteur)
1876	Bira mayası çalışmaları (Pasteur)
1877	“Enzim” terimi (mayalarda) ortaya çıktı (Kühne)
1880	Mayalanma için tekli maya hücreleri ve saf suşlar (Hansen)
1883	Serbest hücre ekstraktlarından alkol ve CO ₂
1915	Gliserol üretimi
1920	Maya fizyolojisi yenilendi
1949	İlk genetik harita (Lindegren); eşleme tipi sistem
1930-1960	Kluyver tarafından mayaların taksonomisi
1966	Mayalarda ilk tRNA yapısı
1978	Mayaların ilk transformasyonu (Hinnen, Hicks ve Fink)
1990-1994	Rekombinant mayalardan ilk ticari farmasötik ürünler (Hepatit B aşısı)
1990-1996	Maya genom projesinin tamamlanması

İnhibitörün sınıflandırılması ya da toksik maddeler çeşitli yollarla elde edilebilirler: (1) duyarlı organizmaya karşı aktivite spektrumlarının belirlenmesi, (2) bir veya daha fazla maddenin mutant direncine karşı aktivitelerinin test edilmesiyle, (3) toksin üreten suştaki karşı reaktivitenin incelenmesi ile (*Ustilago*'daki katil karakter gibi) ve (4) yapısal analiz (Young ve Yagiu 1978).

Katil toksinlerin öldürme işlemi iki aşamalı bir mekanizmadan oluşur. K1 ilk önce mayanın hücre duvarındaki 1-6-β-D-glukan reseptörlerine atak yapar ve bu proses β zinciri tarafından kontrol edilir. Ardından α zinciri maya hücre plazma membranına etki eder ve düzensiz potasyum akışına, sonra da hücrenin ölümüne neden olur (Altuntaş ve Özçelik 2007).

Katil toksin kontaminasyonu gıdalarda problemlere yol açabilir. Buna rağmen, eğer mayaların öldürücü özelliği gıda bozulmasına sebep olan mayaları inhibe etmede kullanılırsa, katil mayalardan avantaj sağlanabilir.

Örneğin katil mayalar, ökaryotlardaki polipeptit prosesinde düzenleme mekanizması, salgılama ve duyarlı hücre ile toksin işlemi çalışmalarında model sistem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca mayalardaki öldürücü sistem ökaryotik virüslerin anlaşılması ve kontrolü çalışmaları için kullanışlı modeller sağlamaktadır. Ek olarak, öldürücü sistemler fermentasyon endüstrisinde ve ilaç sektöründe biyoteknolojik uygulamalara sahip olabilir. Rekombinant DNA teknolojisinde, *S. cerevisiae* ve *Klyuvermyces lactis*'ten elde edilen öldürücü plasmidlerin gönderilen polipeptidlerin etkili salgılanması için vektör kopyalamada görev alma potansiyeli vardır (Marquina ve ark 2002). Üstelik katil toksinler insan ırkına karşı zararlı değildirler, çünkü katil maya toksinleri sadece 'hücre duvarı' ve hücre duvarı bileşenlerine karşı etkileşim gösterirler.

Bu araştırmada, katil mayaların diğer bozucu mayalarla ve diğer mikroorganizmalarla etkileşimi, mayalara olan inhibisyon etkisi incelenmiştir. Buna bağlı olarak katil mayaların gıda sektörüne olası avantajları ve kullanım alanlarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. En Çok Bilinen Katil Maya Cinsleri

2.1.1. *Candida*

Candida galabrata'nın katil fenotipi kromozomal gen temelinde kodlanmıştır ve toksin geni henüz tanımlanamamıştır. Aguiar ve Lucas (2000) tarafından yapılmış bir araştırmaya göre aşırı halotolerant maya olan *Candida nodaensis* katil fenotipinin (K) yüksek tuza karşı da gelişme gösterdiği gözlenmiştir. Toksinin canlı organizmada yüksek tuz konsantrasyonunda etkili olması, özellikle tuzlu fermente gıdaların korunması gibi biyoteknolojik uygulamalarda maya tabanlı biyokontrol stratejilerinin geliştirilmesi için sıra dışı yollar üretebilir.

C. nodaensis katil toksininin (CnKT) potansiyel uygulamalarının denemesi için, kaba özüt hazırlanmış ve bu toksinin ilk fiziksel karakterizasyonu için kullanılmıştır. CnKT bilinen toksinlerin aksine ve genelde dikkate alınan çoğu katil toksin doğasından farklı olarak, zıt doğa koşullarında özelliğini koruyup aşırı dirençli bir toksin olduğunu ispat etmiştir (da Silva ve ark. 2008).

2.1.2. *Cryptococcus*

Diğer birçok maya türü katil fenotipi açığa vururken, şimdiye kadar toksin (mycocin) üretiminin ekstra-kromozomal genetik unsurların varlığıyla ilgili olduğunu gösteren bir kanıt yoktur (Pfeiffer ve ark. 1998). Bir çalışmada *Cryptococcus hungaricus* CBS 6569 suşunda, dsRNA'nın virüs benzeri moleküllerle (VLPs) birleşmiş olduğu ve bunun toksin üretim özelliğini gösterdiği raporlanmıştır. Bu tür, Zsolt (1957) tarafından *Dioszegia hungarica* biyolojik ismiyle izole edilmiş ayrıca Fell ve Phaff tarafından *Cryptococcus* cinsi içinde yeniden adlandırılmış ve konumlandırılmıştır.

Çoğu katil toksin üretildikten çok sonra tanımlanmıştır ve askılı mantar sınıfından olan mayalara karşı aktiftirler. Bu toksinler 10–300 kDa w2–5x moleküler ağırlıklı olarak protein veya glikoprotein olarak görünürler. Yeni olarak, *Cryptococcus humicola*'nın bazitli mantar sınıfından olan maya suşları tarafından üretilen 1kDa kadar oldukça düşük molekül ağırlıklı katil toksinleri keşfedilmiş ve kısmi olarak saflaştırılmıştır. Düşük moleküler ağırlıklarından ve düşük molekül ağırlıklı bakteriyosinlere benzerliklerinden dolayı mikrosin (microcin) olarak isimlendirilmişlerdir (Puchkov ve ark. 1998).

Cryptococcus humicola suşları birçok askılı mantar ve bazitli mantar benzeri mayayı inhibe eden katil toksin (3- 5,5 pH değeri aralığında) salgılar. Bu katil toksinlerde RNA ve DNA plasmidlerine rastlanmamıştır. Aminoasit içeren toksinler düşük M_r 'ye sahip, metanolde çözülebilen proteolize karşı dayanıklı, ısıl stabil, selofan difüzyonu yapabilen ve mikrosin olarak belirlenmişlerdir (Golubev ve Shabalin 1994).

2.1.3. *Debaryomyces*

Debaryomyces hansenii'nin genetik materyali kromozomal olmasına rağmen, toksin gen sistemi henüz tanımlanamamıştır fakat bu toksinin hedef hücredeki reseptörü β -1,6-D-Glukandır (Altuntaş ve Özçelik 2007).

Katil toksin üretimi kültürün bulunduğu koşullar ya da deneyin gerçekleşmesi gereken optimum koşullar tarafından fazlaca etkilenebilir. *D. hansenii* CYC 1021 katil toksini için optimal koşullar *Saccharomyces* suşlarının optimal koşullarıyla - pH 5- karşılaştırıldığında oldukça düşük (pH 4,5) olduğu gözlenmiştir (Woods ve Bevan 1968).

Yapılmış bir çalışmaya göre; katil maya *D. hansenii* CYC 1021'deki toksin üretimi, karışık ortamda büyümeyle ilgili cevap veren üretimdi ve katil toksin üssel gelişim fazından erken-sabit faza geçen hücre gelişimi gibi üretildi. Hücre dışı ortamdaki protein seviyesi, toksin üretiminin ve 20 °C sıcaklıkla yavaş çalkantılı sistemin yansımadır. İyonik olmayan madde (deterjan) ve dimetil sülfoksit (DMSO) ilavesi katil toksinin en yüksek konsantrasyonda olmasına yol açmıştır. Mikrobiyoloji perspektifinden bakılırsa, katil mayalardan faydalanma olasılığının ele alınması kontaminasyon kontrolü için doğrudur (Palpacelli ve ark. 1991).

Debaryomyces toksini için optimal stabilite pH 4,5' ta ve 20° C sıcaklığa kadar belirlenmiştir. pH 4,5 üzerinde aşırı bir stabilite azalması gözlenmiştir. pH 5,1'de ise aktivite çok zor belirlenebilmiştir (Marquina ve ark. 2001).

2.1.4 *Hanseniaspora*

Hanseniaspora uvarum hedef hücrenin β -1,6-Glukan reseptörüne karşı etkili olan bir katil toksine sahiptir. *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* türleri kadar *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Metschnikowia* ve *Candida* türlerinin popülasyonu da üzümlerdeki hasar yüzünden artar (10^6 Kob/mL üzerine) (Querol ve Fleet 2006).

Üzüm suyu fermentasyonunda yapılan çok sayıdaki araştırma *Saccharomyces* olmayan türlerin (özellikle *Kloeckera apiculata* ve *Candida stellata*) fermentasyon süresince önemli bir seviyede (Heard ve Fleet 1988; Ciani 1997) hayatta kaldıklarını göstermiştir fakat düşük etanol toleransları yüzünden fermentasyon sonunda genelde ayırt edilememektedirler.

Kloeckera apiculata (*Hanseniaspora uvarum*) ve *Metschnikowia pulcherrima* gibi bazı *Saccharomyces* olmayan türler önemli proteolitik aktiviteye sahiptirler (Charoenchai ve ark. 1997; Dizzy ve Bisson 2000) ve *Saccharomyces cerevisiae* için gereken aminoasidi salgılayabilirler. *Saccharomyces* olmayan mayaların otolizi (Hernawan ve Fleet 1995) *S. cerevisiae* için olası besin kaynağı sunar.

Katil etkileşimin olması fermentasyon süresince suşların gelişimini ve maya türlerini etkileyen diğer faktörlerin oluşumunu sağlar. Katil fenomen, kendi türlerinin duyarlı hücrelerini öldüren, diğer tür ve cinsleri de sıklıkla öldüren polipeptid toksinlerin salgılanmasına dayalıdır. Ancak katil suşlar kendi ürettikleri toksinlere dayanıklıdırlar (Querol ve Fleet 2006).

Fermente üzüm suyundan elde edilen *S. cerevisiae* izole mayaları hakkında literatürde geniş ölçekte bilgi mevcuttur (Musmanno ve ark. 1999; Guriérrez ve ark. 2001). Querol ve Fleet (2006) 'in araştırmasına göre; *S. cerevisiae*' nin katil suşları fermentasyon sonunda bazen üstünlük sağlayıp, katil aktivitelerini ortaya koyarak fermentasyonu devraldıkları varsayılır. Katil suşlar *Candida*, *Pichia* ve *Hanseniaspora* şarap izolatlarından tespit edilmiştir ve bunlar katil aktivitelerini *S. cerevisiae*'nin şarap suşlarına karşı uygulayabilmektedirler.

2.1.5. Hansenula

Hansenula mrakii hücre membranının geçirgenliğine zarar veren K9 katil toksinine sahiptir. Ayrıca, pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında ve yüksek sıcaklıklarda stabildir. *Saccharomyces cerevisiae*'nin ürettiği K1 toksininden daha küçüktür.

Hansenula mrakii'nin katil karakteristiği kromozomal gen üzerinde kodlanmıştır (Altuntaş ve Özçelik 2007).

HM-I katil toksini *Hansenula mrakii*'den salgılanan polipeptit yapılı toksindir ve büyük ihtimalle DNA, RNA, protein ve yağ sentezini etkilemeyen fakat β -1,3-Glukan sentezini engelleyen duyarlı maya suşlarını öldürür (Kasahara ve ark. 1994).

Bu toksin izoelektrik noktası pH 9,1 olan temel bir proteindir ve 10721 Da. molekül büyüklüğünde 88 aminoasit kalıntısından oluşmuştur. Mannozydandan yoksundur. K1 katil toksininden daha küçüktür (18,5 kDa) (Yamamoto ve ark. 1986).

2.1.6.Kluyveromyces

Kluyveromyces lactis türüne ait olan katil mayalar çift sarmallı linear DNA plasmidi taşımaktadırlar. Yüksek moleküler ağırlıkta iki alt üniteli toksin üretmektedirler. Bu toksin, adenil siklaz aktivitesini inhibe etmektedir. Hedef hücrede bu mikroorganizma toksininin reseptörü kitindir (Altuntaş and Özçelik 2007).

K. lactis mayasının katil suşlarında, toksin proteini üretimi ve toksine olan bağışıklığın tanımı iki linear dsDNA plasmidin - K1 (8,9 kb) ve K2 (13,4 kb) - varlığıyla birleşmiştir. Toksin her *K. lactis*' in katil olmayan her iki suşuna karşı ve *S. cerevisiae* de içeren diğer cinsin bir numarasına karşı aktiftir (Stark ve Boyd 1986).

Yapılan bir çalışma gösterdi ki; plazmidleri ya da sadece K2 içerenleri iyileştiren suşların toksine duyarlı, ölümcül olmayan fenotipe sahip olması, toksin üretimini ve bağışıklığı tanımlayan genetik bilgi küçük olan K1 plazmitinde bulunmaktadır (Wesolowski ve ark. 1982; Niwa ve ark. 1981)

2.1.7.Pichia

Pichia kluveri'ye ait olan toksinler glikoprotein yapısındadır, pH 2,5- 4,7 arasında ve 40 °C'nin üzerinde stabildir. Bu toksin ilk olarak hücre duvarını etkiler ve sonra hücre zarına etki eder. Sonunda porlar tarafından oluşturulan elektro kimyasal potansiyelin yıkımına sebep olur ve son olarak hücre ölümü gerçekleşir (Yener 2006).

2.1.8.Saccharomyces

Saccharomyces cerevisiae 1963 yılında Makower ve Bevan tarafından katil maya olarak tanımlanan ilk mayadır. Woods ve Bevan (1968) ise bu toksin üretimi ve aktivitesi için optimum olan ortam koşullarını tanımlamışlardır.

S. cerevisiae mayasının katil sistemi ile ilgili yapılan araştırmalar virolojinin çeşitli alanlarına, translasyon kontrolüne, protein salgılanması ve hücre duvarı biyogenezine önemli katkılar

sağlamıştır. Biyokimyanın tüm alanları, genetik ve moleküler metotlar, viral transfeksiyon sistemi de dâhil olmak üzere bu sistemin araştırılması için uygundur (Paterson ve ark. 1991).

S. cerevisiae katil, duyarlı ve nötral olmak üzere üç fenotipe sahiptir. Çeşitli toksin çeşitlerine sahip olan *S. cerevisiae* ilk ve en iyi tanımlanmış katil maya türüdür. *S. cerevisiae*'nin genetik çalışmaları katil karakteristiğinin stoplazmik kalıtım olduğunu ve katil hücredeki virüs benzeri partiküllerle ilişkili olarak dsRNA da kodlandığını gösterir. *S. cerevisiae* katil toksininin hedef hücredeki reseptörü β -1,6-D-Glukandır (Marquina ve ark. 2002).

2.1.9.Ustilago

Ustilago geninin türleri, özellikle *U. maydis* ve suşları en iyi bilinen katil toksin üreticilerindedir.

Her ne kadar en çok enfekte olan hücreler çoklu dsRNA segmentine sahipse de, *U. maydis* virüsleri (UmV) *Totiviridae* olarak sınıflandırılır. Bu çoklu segmentlerin iki orijini vardır: bazı segmentler gizli polipeptidlerde kodlanmış, duyarlı hücreleri öldüren uydu virüslerdir ve diğer segmentler ise bağımsız totivirüs genomlarıdır. Her iki yönden de *Ustilago* virüsleri *Saccharomyces cerevisiae* mayasının dsRNA virüsleri ile benzemesine rağmen daha iyi genomik çeşitlilik ortaya koyar (Tavantzis 2002).

U. maydis katil toksineri dsRNA mikovirüsünde kodlanmış küçük proteindir. *U. maydis*'e ait olduğu bilinen 3 toksin KP1, KP4 ve KP6; sırasıyla *U. mayadis* virüslerinden P1, P4 ve P6 özel orta büyüklükteki (M) segmentlerine kodlanmıştır (Santos ve ark. 2010).

2.1.10.Williopsis

Williopsis mraaki ve *Williopsis saturnus* kromozomal gen temelinde kodlanmıştır. *Williopsis saturnus* toksin geninin araştırmaları henüz sonuç vermese de *Williopsis mrakii* HMK toksin genine sahiptir (Altuntaş ve Özçelik 2007).

Bazı mayaların küf ve diğer mayalara karşı olan katil toksinler tarafından üretilen antagonistik (katil aktivite) özelliği vardır (Magliani ve ark. 1997). Bu özellik hasat sonrası küfler sebebiyle oluşan meyve hastalıklarının biyolojik kontrolünde kullanılmaktadır. Birkaç katil toksin üreten maya sadece maya ve küflere değil aynı zamanda bakteriye karşı da etkilidir. *Williopsis* cinsinin tür ve suşları, özellikle *W. saturnus* var. *saturnus*, *W. saturnus* var. *mraki* iyi bilinen katil toksin üreticileridir (Liu ve Tsao 2009).

Goretti ve ark. (2009) *Williopsis saturnus*'un *in vitro* antimikotik etkilerini araştırmıştır. *Williopsis saturnus* tarafından salgılanan saflaştırılmış katil proteinin (KT4561) *in vitro* denemelerdeki antimikotik aktivitesi gıdalarda bozulmaya sebep olan 14 maya cinsinden 21 türün (*Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Yarrowia* ve *Zygosaccharomyces*) 310 suşuna karşı test edilmiştir. Sonuçlara göre ise *Williopsis* suşlarından salgılanan katil proteinlerin K1 proteini ile aynı yolu izlediği açıklanmıştır. Bu sebeple benzer bir mekanizmanın, KT4561 bozucu mayalara karşı göstereceği aktivitenin varlığını açıklayabileceğini varsaymışlardır. Bu çalışmanın sonucunda bazı gıda bozucu maya türleri için KT4561'in uygun amaçlı bir ajan olabileceği ortaya srlmştir (Hodgson ve ark. 1995).

2.1.11. *Zygosaccharomyces*

Zygosaccharomyces bailii'nin gen temeli M-dsRNA toksin geni içerdiği yönde tanımlanmıştır. Hedef hücrenin hücre duvarındaki mannoproteinler bu toksinin reseptörüdür (Altuntaş ve zelik 2007).

Zygosin, osmotolerant bozucu *Zygosaccharomyces bailii* tarafından üretilen ve salgılanan monomerik 10-kDa boyutunda bir proteindir. *Z. bailii* genetik olarak *S. cerevisiae* toksin genomları gibi maya hücresi sitozolünde 2,1-kb lineer M-dsRNA tarafından kodlanmıştır. *Z. bailii*'nin çift zincir RNA virüsü ZbV-M, *S. cerevisiae*'nin katil olmayan suşlarına nükleik asit verebilirdi (Weiler ve Schmitt 2003).

2.2. Moleküler Mekanizma ve Katil Toksin Genetiği

Sitotoksik bileşenlerin mikroorganizmalar tarafından üretilmesi ve salgılanması ölümcül mikrobiyal rekabette sıklıkla başvurulan bir ilkedir. Mayalarda çok sayıda katil sistem geliştirilmiştir. Diğer mayaları öldüren ya da en azından gelişimini engelleyen stratejiler hedef hücredeki transkripsiyon veya replikasyon mekanizmasını, hücre zarı fonksiyonunu veya hücre duvarı sentezini inhibe edici öğelerdir (Klassen ve Meinhardt 2005). Bu toksinlerin katil sisteminin araştırılması için, katil moleküler mekanizma iyi anlaşılmış olmalıdır.

Maya birçok karakteristik özelliği daha gelişmiş yapılı ökaryotik hücrelerle paylaşan tek hücreli basit bir organizmadır. Bu sebeple maya genomunun tümünün insan sekanslarına ve diğer ökaryotik genlere karşı referans olarak aşırı kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Genetik

olarak manipüle edilebilen mayanın sağladığı kolaylık bariz olarak endüstriyel kullanım ile ilgilidir ve bu durumdan dolayı gen düzenlemesi çalışmaları için tercih edilen sistem olmuştur. 1970' ten sonra mayalarda transformasyon sistemi gelişmeleri ve rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemelerden itibaren daha da gelişen bir konudur. Maya genomları son otuz yıldır yoğun araştırmaların konusu olmuştur. Üstelik büyüklüğüne göre en büyük maya kromozomları insan kromozomlarından daha küçüktür ve bu sebeple kromozom yapısı ve fonksiyonu araştırmaları için basit modeller sağlar (Yener 2006).

Katil toksinlerin genel olarak belirli özellikleri vardır: protein yapılıdır, genellikle düşük pH optimizasyonu görülür ve yüksek sıcaklıklarda inaktiftir. Bu ortak özelliklere rağmen katil toksinler türler ve suşlar arasında farklı olabilir, yapısal gen açısından moleküler ağırlık, olgunluk ve bağışıklık karakterleri değişiklik gösterebilir. Tanıma ve duyarlı hücre öldürme mekanizması her toksinde farklıdır. Katil faktörün etkisi, duyarlı organizmalarda lizise sebep olmayan ve bakteriyolitik değil bakteriosidal olan bakteriyosinlere benzer (Woods ve Bevan 1968).

Katil türler direkt hücreler arası temas olmadan katil toksin reseptöründe (KTR) aynı ya da benzer cinslerin hücreleri aracılığıyla düşük molekül ağırlıklı protein ya da glikoprotein salgılar. Mayalar için doğal olan ortamdaki katil toksin üretimi, sınırlı ve uygun besin için savaşan duyarlı savaşçı mikroorganizmaların gelişimini kısıtlayan, ileri biyolojik bir mekanizmayı sergiler (Rai ve Varma 2010). Çeşitli cins ve türlerin katil suşları arasındaki ters reaksiyona dayanarak katil mayalar K1 ve K10 arası 10 gruba ayrılmıştır (Çizelge 2.2.1.).

Çizelge 2.2.1. Katil mayalar ve protein toksinleri (Kepekci 2006)

Katil Toksin Üreten Suşlar	Sınıflandırma
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	K1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	K2
<i>Saccharomyces capensis</i>	K3
<i>Candida glabrata</i>	K4
<i>Pichia anomala</i>	K5
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	K6
<i>Candida valida</i>	K7
<i>Hansenula anomala</i>	K8
<i>Hansenula mrakii</i>	K9
<i>Kluyveromyces drosophilarum</i>	K10
<i>Torulopsis glabrata</i>	K11

*K1 fenotipi *S.cerevisiae*'nin laboratuvar suşlarına ve K1'i öldürme yeteneği olan fermentasyon kontaminantlarına ait yabancı suşlardır.

Bu biyokimyasal ayırım proteolitik enzim, sıcaklık, katil aktivite üzerindeki pH ve katil faktörün saf kromatografisinin etkilerinin analizleri göz önüne alınarak oluşturulmuştur. Sözü edilen katil suşlar *Saccharomyces* cinsinin (K1, K2, K3) suşlarını da içerir (Yener 2006). Ayrıca *Candida glabrata*'nın bir suşu tespit edilmiş ve K11 olarak sınıflandırılmıştır (Joshi ve Pandey 1999).

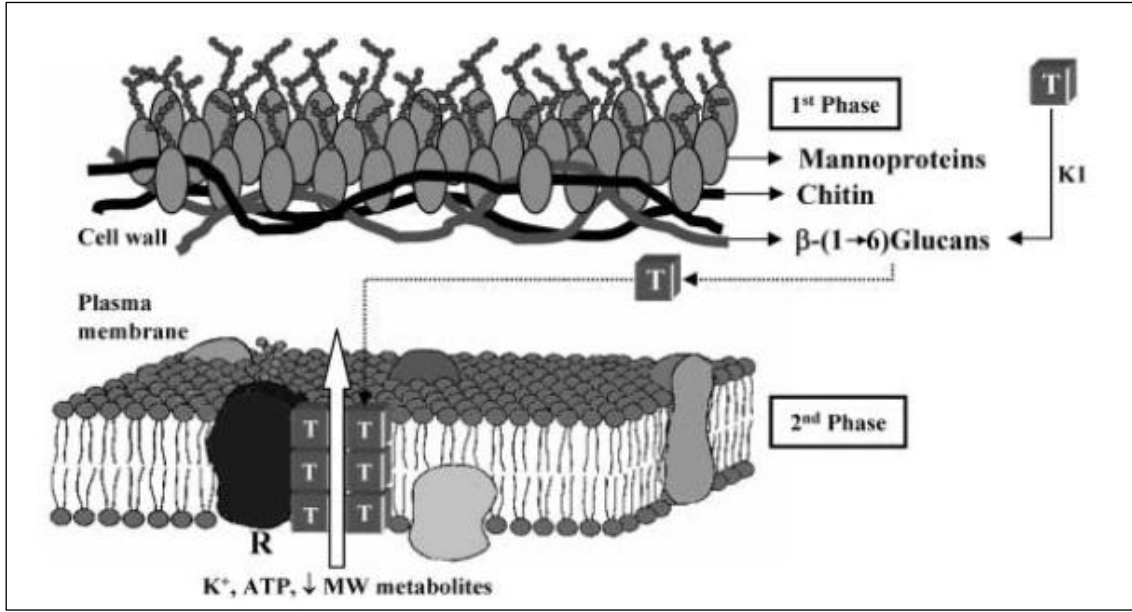
S.cerevisiae keşfedildikten sonra, katil fenomen mayalar arasında yaygın olarak bulunmuştur (Rai ve Varma 2010). Katil karakter sitoplazmik faktörlere ve çeşitli kromozomal genlere bağlı olduğundan beri kompleks bir fenomendir. Bir çok katil toksin çeşidi raporlanmış ve genomlar sitoplazmik kalıtımla çevrili olan çift zincirli RNA virüsünde, lineer çift zincirli DNA plazmitinde veya kromozomal genlerde olmak üzere haritalanmıştır (Schmitt ve Breinig 2002; Goto ve ark. 1990). Katil sistem mekanizma temeli için detaylı araştırma yapmadan önce farklı birimlerdeki tüm genomların tanımlanması daha açıklayıcı olacaktır (Çizelge 2.2.2).

Çizelge 2.2.2. Mayalarda katil fenotipin genetik temeli (Altuntaş ve Özçelik)

Maya	Genetik Temel	Toksin Geni
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dsRNA virus	M1-, M2-, M28
<i>Hansenula uvarum</i>	dsRNA virus	M-dsRNA
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	dsRNA virus	M-dsRNA
<i>Ustilago maydis</i>	dsRNA virus	M-dsRNA
<i>Kluyveromyces lactis</i>	linear dsDNA plasmid	pGK11
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Kromozomal	Tanımlanamamış
<i>Pichia acaice</i>	lineer dsDNA plasmid	pPac1
<i>Pichia inositovora</i>	lineer dsDNA plasmid	pPin1
<i>Pichia kluyveri</i>	Kromozomal	Tanımlanamamış
<i>Pichia farinosa</i>	Kromozomal	SMK1
<i>Pichia anomala</i>	Kromozomal	Tanımlanamamış
<i>Williopsis mrakii</i>	Kromozomal	HMK
<i>Williopsis saturnus</i>	Kromozomal	Tanımlanamamış
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Kromozomal	Tanımlanamamış
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Kromozomal	Tanımlanamamış
<i>Candida glabrata</i>	Kromozomal	Tanımlanamamış

Tüm katiller için karakteristik olan belirli protein toksinin salgılanması, farklı tür ve cinslerin duyarlı suşları için ölümcüldür. Hücre ölümü genelde reseptör aracılıklı proseslerde, maya hücrenin dış yüzeyinin içindeki reseptörlere ilk toksin bağlanması ihtiyacında (örneğin: β -1,6-D-glukan, α -1,3-mannoprotein veya kitin) ve sonra plazma zarı reseptörüne gerçekleşecek transferde meydana gelir. Toksin cinsine bağlı olmak üzere, plazma zarındaki hasar, G1/S hücre döngüsünün bloke olması veya DNA sentezindeki hızlı inhibisyon ölüme sebep olabilir (Schmitt ve Reiter 2008).

Salgılanmış olan toksinin duyarlı hücre üzerindeki genel katil etkisi ve mekanizması Şekil 2.2' de görülmektedir.



Şekil 2.2. Duyarlı maya hücrelerinin *Saccharomyces cerevisiae* reseptör aracılığıyla katil K1 toksini tarafından öldürülmesi (Marquina ve ark. 2002)

Hücre duvarına bağlandıktan sonra K1 katil toksini hücre zarına transfer ediliyor ve iyon akışını bozup ardından da ölüme sebep olan, voltaj-bağımsız katyonik zar içi kanallar tarafından şekillendirilir. Zardaki reseptörler (R) ispatsız olarak doğru kabul edilir (Marquina ve ark. 2002).

2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* Katil Fenomeni ile dsRNA Virüs Temelli Katil Sistem

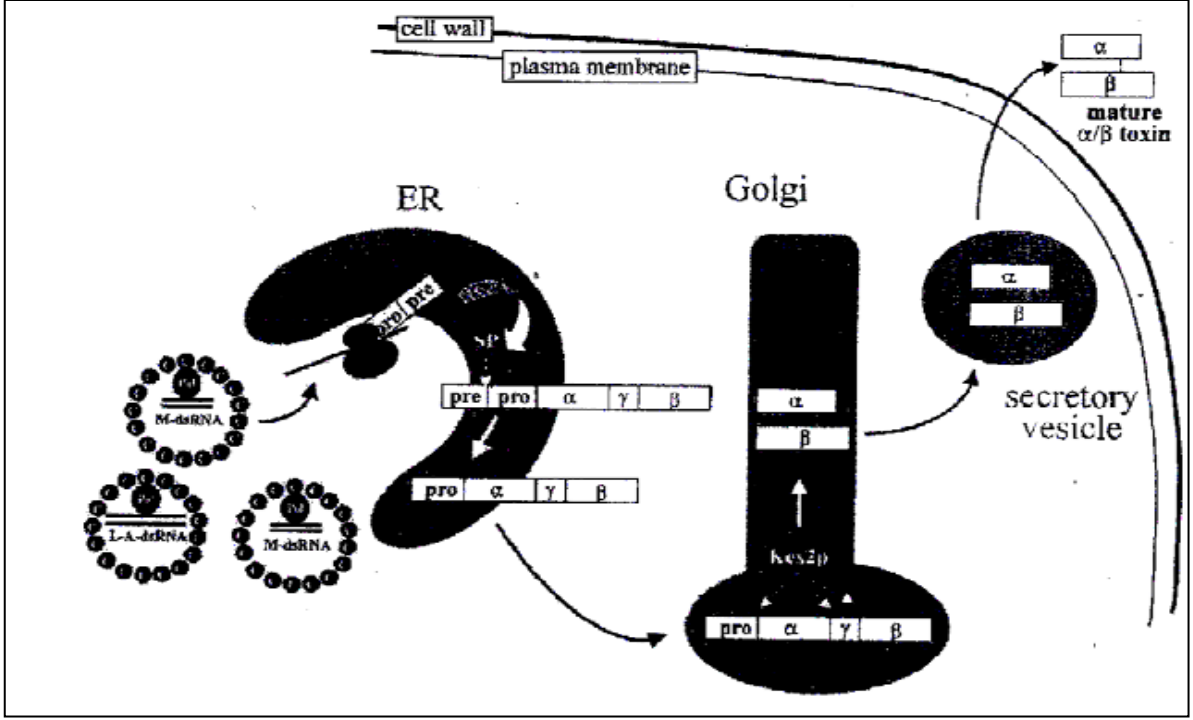
Sitoplazmik Mendelyen olmayan genetik belirleyici faktörlerin ilişkisinin bulunduğu katil fenomen doğasının araştırıldığı ilk çalışmalarda, tahmin edildiği gibi mayalarda çift zincirli RNA (dsRNA) nın virüs benzeri parçacıklarla (VLPs) birleşmiş olduğu ortaya çıkmıştır (Marquina ve ark. 2002).

Katil fenomenin nükleer genlerle olan ilişkisi dsRNA temeli ile açıklanabilir. dsRNA molekülleri virüs-benzeri moleküllere (VLPs) yakın olduklarından *Saccharomyces* virüsü olarak adlandırılır. Bu dsRNA virüs mayalarının önceden enfeksiyona sebep olmadıkları düşünülmüştür çünkü doğal iletim yolları tanımlanamamıştı. dsRNA virüs mayaları dikey iletim yaparlar ve bu iletim sadece üreme ve gelişme süresince sitoplazmik karışım tarafından veya hücre birleşmesi tarafından gerçekleştirilir ve stoplazmik genetik eleman olarak oluşur. Sitoplazmada virüs benzeri molekül oluşumu ve bundan ötürü viral kodlanmış protein

toksinin salgılanması hücreye “katil” karakteristiğini verir. Virüs molekülü içermeyen suşlar, kendi katil faktörlerine karşı bağışık olan suşlar tarafından üretilen toksinlere duyarlıdırlar (Yener 2006).

Saccharomyces cerevisiae'nin katil toksinleri (K1, K2 ve K28) sitoplazmik kalıtsal olan ve virüs benzeri molekül içinde kapside olmuş farklı uydusal dsRNA'lar (M1, M2 ve M28) tarafından kodlanmıştır (Marquina ve ark. 2002). *S. cerevisiae*'nin suşlarında L-A, L-BC, T, W ve M olmak üzere beş dsRNA ailesi vardır. Bunların üçü (L-A, L-BC ve M) mikovirüsün virüs benzeri molekülleri içindeki genel temel kapsid proteini tarafından ayrı olarak paketlenmiştir. Hepsi Mendelyen olmayan tipte kalıtım gösterir (Yener 2006). Bu uyduların replikasyonu ve enkapsidasyonu için başka bir grup yardımcı maya virüse (L-A) gereksinim vardır. Bu iyi karakterize dsRNA virüsler *Totiviridae* familyasının üyeleridir. M dsRNA uydusunun hücrelerdeki varlığı, katil suşlarda gözlemlenen katil-bağışıklı fenotipten sorumlu L-A virüsüyle koenfekte olmuştur (Marquina ve ark. 2002). *S. cerevisiae* dsRNA virüsünden iki aileyi (L-A ve onun uydusu ve L-BC), iki ssRNA replikonu (20S RNA ve 23S RNA) ve en az beş retrovirüs benzeri unsuru içerir ve unsurlar “retrotransposon” olarak adlandırılır (Kück 2004). L-A kapsüle edilmiş LdsRNA ve MdsRNA'daki VLPs'nin temel kılıf proteinini kodlar. Tümüyle L-BC yoksunu olan katil suşlardan dolayı L-BC ve dsRNA'ların herhangi bir katil fenomenle ilişkisi olup olmadığı kesin değildir (Tipper ve Bostian 1984; Bussel ve ark. 1997).

Saccharomyces tarafından salgılanan K1 katil toksini açısından bakarsak; 35-Da olan prekürsörden işlenir, M1dsRNA üzerinde kodlanır (Şekil 2.2.1.1.) ve 21 kDa molekül ağırlığıyla α/β -heterodimer şeklinde salgılanır. Bu protein 103 aminoasit kalıntısından oluşan ölüm kanalı formunda, iki hidrofobik gerilimli, geçirgen zar aracılığıyla etki eden α - alt birimine sahiptir. Kanal oluşumundaki bir role ek olarak, görünene göre α -alt birimi hücre duvarı reseptörünü ve toksin bağışıklığını bağlayıcı olarak çok fonksiyonludur. Benzer şekilde β - alt birimi de α -alt birimine sülfür bağıyla bağlıdır. Bu aminoasit hidrofildir ve 83 aminoasit kalıntısıyla daha küçüktür. β -alt birim hedef duyarlı hücrede α - glukan hücre duvarı reseptörüne bağlayıcılıkla ilişkilidir. Proteinin etki alanını aşma yapısı alışılmamış olarak diğer bilinen toksinlerden farklılık gösterir. Toksinin aminoasit sekansı veritabanlarında olan proteinlere benzerlik göstermez (Wickner ve ark. 1995).



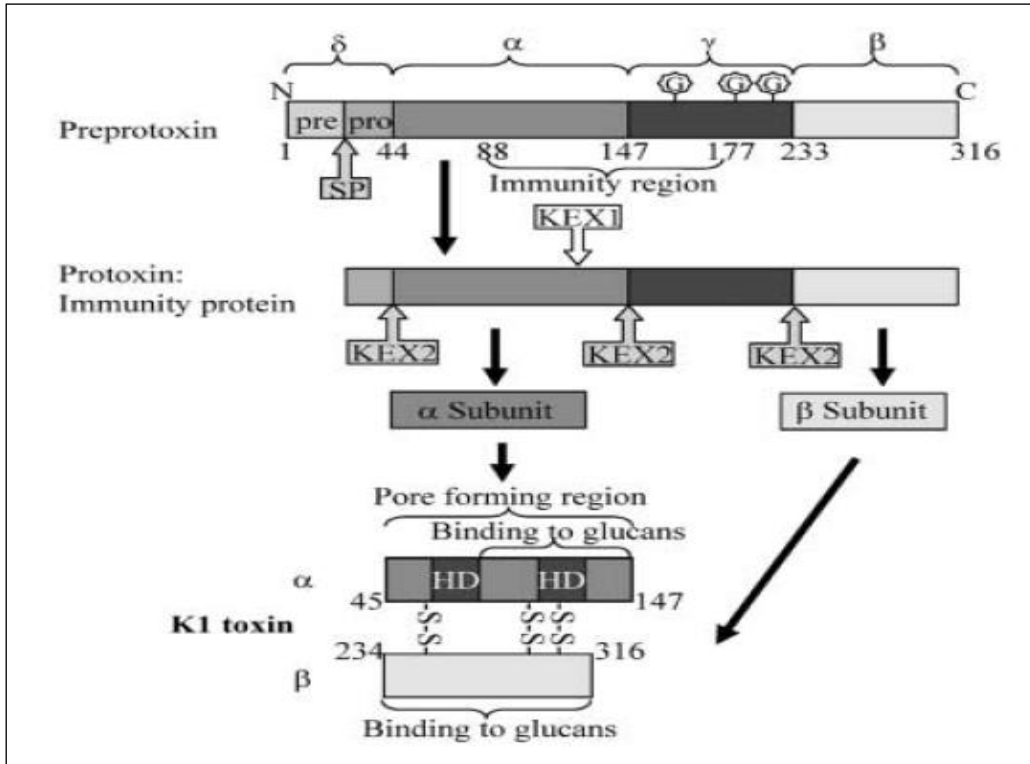
Şekil 2.2.1.1. *S. cerevisiae*'nin katil toksin salgılama sistemi (Herring ve Bevan 1974)

Birçok çeşit toksin analiz edilip iyice anlaşılmıştır. Breining ve ark. (2006)'a göre en geniş çalışılan K1 ve K28 şimdiye kadar keşfedilmiş üç katil toksindir. Her bir katil toksin daha sonra hücreden serbest bırakılan ve ortama salgılanan olgun ve sitotik α/β heterodimere işlenen yerdeki maya salgılanma yoluna ithal edilen ön protoksin prekürsörü olarak çevrilmiştir. Klassen ve Meinhardt (2005), K1 katil toksininin hücre zarı fonksiyonunu etkilemesinin dsRNA virüsü tarafından kodlandığını ve aktive edici Tok1 potasyum kanalları tarafından hareket eder. Glikozilfosfatidilinozitol-bağlı hücre yüzeyi proteini Kre1p, K1 toksini için yakın zamanda hücre zarı reseptöründe tanımlanmıştır. Her iki toksin de başlangıçta maya hücre duvarı içindeki reseptöre bağlıdır ve sonra ikincil toksin reseptörü ile birbirini etkilediği hücre zarına doğru yer değiştirdi. Oysa hücre zarı reseptörü K28 için bilinmezliği sürdürür ve sonra K28 reseptör aracılıklı endositozis tarafından kendi hedef hücrelerine girer ve DNA sentezini bloklar, G1/S hücre döngüsü engellenir ve kaspaz aracılıklı programlanmış hücre ölümü gerçekleşir (Breinig ve ark. 2006).

Toksin Prosesi ve Salgılanması: *S. cerevisiae*'nin viral olarak kodlanmış katil toksinleri arasında üretim ve salgılama açısından en çok çalışılmış olanları K1 ve K28 toksin proteinleridir. Bunla beraber her iki toksin de aminoasit kompozisyonları ve moleküler

aksiyon halleri açısından belirgin farklılıklar gösterirler fakat sentez, proses ve salgılama açısından ise benzerdirler (Yener 2006).

Çoğu katil toksinin ön-protoksinden (pptox) enzimatik prosese doğru üretildiği görülmüştür. K1 ve K28 toksinlerinin ikisi de dsRNA virüsleri ve MdsRNA da depolanmış katil toksin sentezi bilgileri tarafından kodlanmıştır (Yener 2006). Marquina D. ve ark. (2002), genelde salgılanan proteinlerin, potansiyel kex1/kex2 ayrımının ve N-bağlantılı glikozilasyon konumlarının üzerinde bulunanlardan daha büyük olan ve hidrofobik amino uç içeren tekli polipeptid protoksin olarak sentezlenen toksini tekli “açık okuma çerçevesi” (ORF)’nin kodladığından söz etmişlerdir. Protoksin önce sentezlenir, ardından endoplazmik retikulum, golgi aparatı ve salgı vesikülleri tarafından protein sentezi sonrası modifikasyonlara uğrar. Son olarak olgun, aktif toksinin salgılanması gerçekleşmiş olur (Şekil 2.2.1.2.).



*SP: sinyal peptidaz, KEX: toksin üretimindeki proteaz içeren katil tanım; G: glikozile asparajin kalıntısı içeren lokasyon, HD: hidrofobik domain.

Şekil 2.2.1.2. K1 katil toksin-bağışıklık prekürsörünün taslak yapısı ve olgun toksin yapısı(Marquina ve ark. 2002)

Protein prekürsörü, yüksek hidrofobik N-terminal salgılama sinyali tarafından maya endoplazmik retikulumuna girer. Ardından endoplazmik retikulumda ve golgi kompleksinde sonunda olgun α/β heterodimetrik protein olarak salgılanıncaya kadar protein sentezi sonrası modifikasyonlar gerçekleşir (Herring ve Bevan 1974).

N-terminal öncüsü, prekürsör proteini endoplazmik retikuluma konvansiyonel sinyal sekansı fonksiyoneli olarak yönlendirir. Bu molekül endoglikosidaz H faaliyetleri tarafından 34 kDa türüne dönüştürülmüş olarak gösterilen protoksidir, bu sebeple glikoproteindir. Glikozilasyon toksin salgılanma verimi açısından gereklidir. Aktif K1 katil toksini glikozile değildir bu sebeple toksin olgunlaştırma işlemi boyunca glikozile kısmı uzaklaştırılmalıdır (Marquina ve ark. 2002).

Karşılaştırılabilir olarak K2 toksini de K1 toksinine, küçük dsRNA molekülüne kodlanmış olması (M2); KEX1 ve KEX2 bağımlı toksin/bağışıklık yapan prekürsörler; bir 1,6- β -D glukozilasyon hücre duvarı reseptörünün küçük protein salgılanırken kullanılması ve membran düzensizliği tarafından öldürülme durumu açısından benzerlik göstermektedir. Bu sebeple, ardışık olan K2 prekürsörü ve haberci K2 toksin alt birimlerinin aminoasit sekans seviyesinde K1 toksiniyle benzerlik göstermemesi sürpriz olmuştur. Buna rağmen toksin prekürsör molekülleri bütünüyle benzer organizasyon gösterir ve büyük olasılıkla toksinler benzer şekilde davranır.

K2 prekürsörü öngörülebilir proteinin 362 aminoasit kalıntısını, N-terminusundaki bölünebilir farz edilen sinyal sekansı ile beraber kodlar. α - alt birimi hidrofobiktir, N glikozilasyonu için bazı konumlara sahiptir ve büyük olasılıkla KEX2 tarafında 220 kalıntıya komşu bir temel kalıntıya sonlanır. Hidrofilik β - alt biriminin takip ettiği dokular arası γ - peptid ve α - alt birimleri yoktur. Bağışıklık prekürsörde kodlanmıştır ve α - alt biriminin hidrofobik domainindeki mutasyon bağışıklığı ortadan kaldırmıştır fakat alıkoyulan toksin aktivitesi pH'ya bağlı ölümcül mutant üretir (Wickner ve ark. 1995).

Salgılanan toksinle çalışmak zor olmuştur fakat 21,5 kDa protein (α varsayılıyor) ve hem daha küçük hem daha az verimli olan bir proteinin (β varsayılıyor) her ikisi de K2 antikoruyla beraber keşfedilmiştir. 21,5 kDa büyüklüğündeki protein endoglikosidaz-H muamelesinde değişkenliği arttırdığı gibi N-glikoziledir. K2 toksin etkisi hakkında az şey bilinmektedir. Genelde şarap mayasında bulunur ve K1 toksininden biraz düşük olarak 4,2-4,3 pH seviyelerinde yaşayabilecek kapasitededir (Pfeiffer ve Radler 1984). Mutantlar KRE 1, 5, 6, 9,

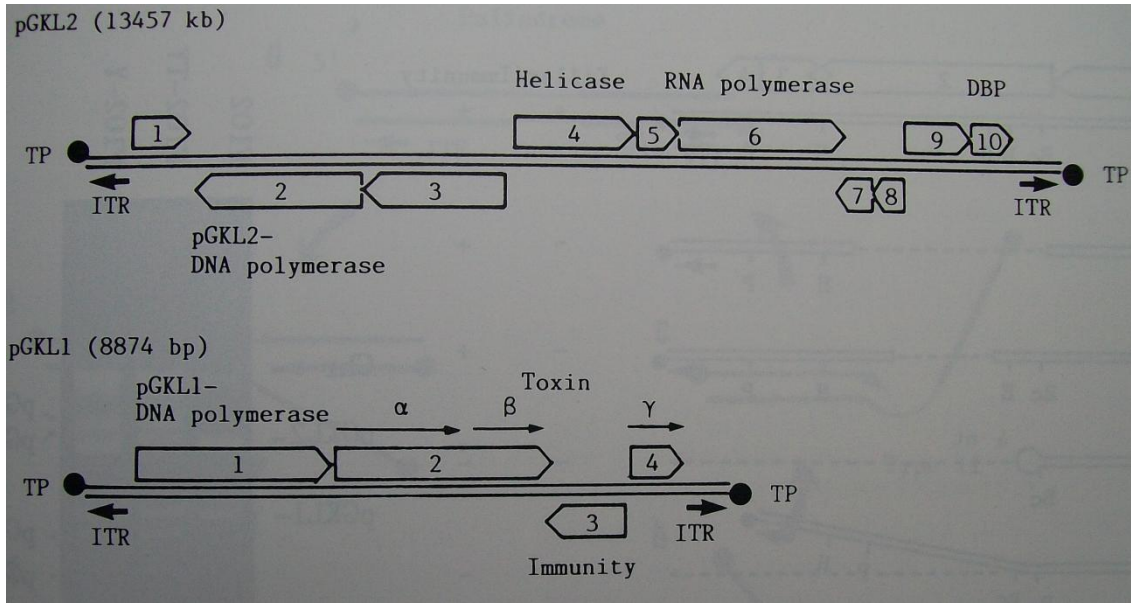
11 genlerindeki kusurlarla K1 ve K2 toksinlerine karşı dirençlidir ve 1,6- β -D glukanın her iki protein için de reseptör olduğu öne sürülmektedir.

Oysaki KRE2 mutantları K2 toksinine karşı duyarlıdır, hala glukanın, K1 toksininin bağlanmasını engelleyen mannosilasyon hatalarıyla bile K2 toksini tarafından tutulduğunu gösterir. K2 fizyolojisi hakkındaki ilk çalışmalarda potasyum akışına sebep olduğu ve K1 toksinine benzer olduğu ileri sürülmüştür (Kück 2004).

2.2.2 *Kluyveromyces lactis* Fenomeni ile Lineer dsDNA Plasmid Tabanlı Katil Sistem

Sitoplazmik olarak yerleşmiş lineer çift zincirli DNA plasmid temelli mayalar *Debaryomyces*, *Wingea*, *Kluyveromyces* ve *Saccharomyces* gibi çeşitli cinslerden izole edilmiştir. Bu türdeki katil toksinler, dsRNA aracılıklı katil maya olan *S.cerevisiae*'den üretilen toksinlerden moleküler ağırlık, öldürme etki mekanizması ve çeşitli mayalara karşı sahip olunan öldürme spektrumu gibi özellikler açısından farklılık gösterirler (Bostian ve ark. 1980). Örneğin bir *K. lactis* suşu olan IFO 1267, her biri her haploid hücre için 50-100 kopyadan oluşan DNA plasmidlerinden pGKL1 (8,9 kb) ve pGKL2 (13,5 kb) yi Mendelyen olmayan özellik gösteren katil fenotip eşliğinde içerir. Bu suş *Saccharomyces* suşunda bulunan RNA plasmidini içermez. *K. lactis*' in katil aktivitesi *Saccharomyces*' in optimum pH ve duyarlı suşlarından ayırt edilebilir (Kück 2004; Niwa ve ark. 1981). Sırasıyla K1 ve K2 olarak çağırılan özdeş plazmidler *K. lactis* CBS2359' da da bulunmuştur (Gunge 1995).

K. lactis' in katil sistemi, toksin üretiminin sırasıyla K1 (pGKL1) ve K2 (pGKL2) olarak isimlendirilen iki lineer dsDNA plasmidinin varlığına bağlı olduğunu göstermiştir. Daha küçük olan plasmid pGKL1 katil ve dayanıklılık karakterlerini kodlar, büyük olan pGKL2 plasmid ise muhtemelen lineer plasmid replikasyonu ve sürekliliği için gereklidir (Yener 2006). Bu plasmidler katil toksin salgılar ve ortaklaşarak α (97 kDa), β (31kDa), γ (28kDa) alt birim formunda saflaştırır. Toksin alt birimleri birbirinden ayrı olarak saflaştırılmış ve N terminal aminoasit serisi ilk 15-24 kalıntı için saptanmıştır (Stark ve Boyd 1986). pGKL1' in nükleotid sekans verilerinin karşılaştırılması göstermiştir ki, proteolitik proses tarafından büyük prekürsör protein kodlayan ORF2, α ve β alt birimlerini üretmiştir: sırasıyla prekürsörün N-terminal 2-3. ve C-terminal 1-2.sinden türemişlerdir. γ alt birimi ise farklı olarak ORF4 geni tarafından kodlanmıştır (Şekil 2.2.2.) (Gunge 1995).



*pGKL ORF 1,3,5,7-9 (açık okuma çerçevesi) henüz karakterize edilmemiştir. DBP (DNA bağlayıcı proteini), TP (terminal- uç protein), ITR (İnvert Terminal Tekrar)

Şekil 2.2.2. pGKL1 ve pGKL2 lineer plasmidlerin genom düzenlemeleri (Gunge 1995)

Toksin Prosesi ve Salgılanması: Mayalardan ve diğer ökaryotlardan salgılanan proteinler endoplazmik retikulum içindeki yer değişiminde payı olan kısa sinyal sekanslarını (yaklaşık 15-30 hidrofobik aminoasit) sağlarlar. N-terminal sekans analizinin, LYS-Arg dipeptidindeki aminoasit hidrofilik pro sekans sonlanması tarafından takip edilen bir 16 aminoasitlik hidrofobik ön (sinyal) sekanstan oluşan bir lider peptide sahip α - β alt birim prekürsörünü, pGKL-ORF2'nin kodladığı gözler önüne serilmiştir (Stark ve Boyd 1986). Ayrıca ön işlem yapısı, α faktör (çiftleşme feromonu), maya karboksipeptidaz Y gibi çeşitli ökaryotik salgı proteinlerini ortaya koyar. pGKL katil toksinindeki ön işlem sekansı, Lys-Arg kısmı terminalindeki proteolitik bölünme tarafından α - β prekürsöründen kaldırılır. Bu proteoliz endopeptidazı kodlayan kromozomal bir gen (KEX1) tarafından *K. lactis*'te gerçekleşmiştir (Wesolowski ve ark. 1982).

2.2.3. Kromozomal Kodlanmış Katil Sistem

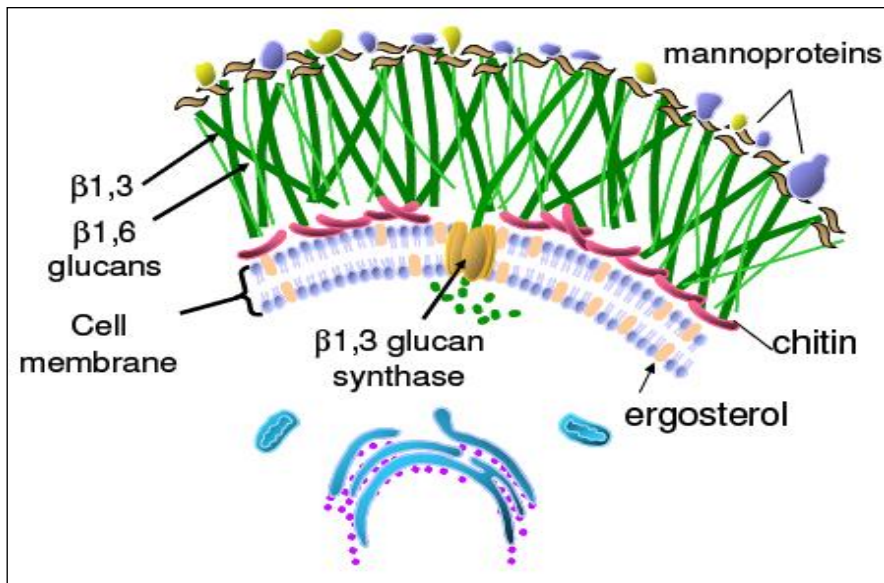
Williopsis, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces* ve *Torulopsis* suşlarının dsRNA virüsü ya da dsDNA plazmidi ile ilişkili olması ile katil karakterin ifade edileceğini gösteren uygun bir kanıt yoktur. Diğer sistemler için bir bulgu olmadığından, bu mayalarda katil karakterin kromozomla kalıtsal olduğu varsayılmıştır (Yener 2006).

Goto ve ark. (1990) tarafından bilinen katil suş aktivitelerinden daha güçsüz olan iki yeni katil aktivite keşfedilmiştir. Bu genler *S. cerevisiae*'nin kromozomal DNA'sında kodlanmış olarak bulunmuştur. KHR olarak adlandırılan gen 9. Kromozomda kodlanmıştır ve diğer bir gen ise kromozomda KHS olarak adlandırılmıştır.

HMK geni *Hansenula mrakii* katil toksini kodlar ve HSK geni Yamamoto ve ark. (1986) tarafından saflaştırılmış *Hansenula saturnus* katil toksinini kodlar. Bu iki genin toksinleri yüksek ısı stabilite ve diğer katil toksinlerden daha geniş pH sabitliği göstermiştir.

Toksin Etkisi ve Hücre Ölümü: Bu katil toksinin biyolojik etkisinin iki basamaklı reseptör aracılıklı prosesi olduğu düşünülür. İlk basamak duyarlı hedef hücrenin hücre duvarı içindeki toksin reseptörüne hızlı ve enerji bağımsız şekilde bağlanmasını içerir. İkinci enerji bağımlı sistem toksinin sitoplazmik zara transfer edilmesi ve ölüme yol açan ikincil membran reseptörü etkileşimini içerir (Yener 2006).

Protoksin golgi aparatından geçtiği zaman proteolitik bölünme meydana gelir, her iki α ve β disülfid bağlı toksin formu hücre zarıyla füzyon tarafından serbest bırakılır. Hücre zarından salgılandığında hücre dışı ortamda iki durum toksin miktarını azaltır: 1) katil suşun hücre duvarında katil toksin için bulunan reseptörler ve 2) hücredeki fenilmetilsülfonilflorid-duyarlı proteaz aktivitesi salgılanmış toksin moleküllerini büyük oranda azaltır. Hücre duvarındaki 1,6- β -D-Glukan toksinin duyarlı hücreye bağlanmasında temel rolü oynar (Şekil 2.2.3.).



Şekil 2.2.3. Mayanın Hücre Duvarı Yapısı (Yener 2006)

Doğal komünitelerde farklı rekabetçi mekanizmalar arasında çoğalma ve kurtulmayı kullanabilen mikroorganizmalar için, antimiyokrobiyal toksin üretimi aynı habitattaki rekabetçi suşların/türlerin elenmesinde genel, etkili ve spesifik ekolojik yollar sunar. Özbağışıklıkları olan toksin üretici mikroorganizmalar seçilip, öldürme ya da duyarlı suşların uygunluğunu azaltmayla, spesifik ortamlarında dominant olabilirler. Bu zıt yarışın benzer örnekleri ökaryot mikroorganizmalarda olduğu kadar bakterilerde de (bakteriyosin) tanımlanmıştır. Özellikle mayalar (katil maya fenomeni) tarafından katil toksin üretimi ciddi bir ilgiyi harekete geçirmiştir çünkü bu mikroorganizmaların içeriği, teknolojik transferi ve ilgi çekici perspektifi merak uyandırıcı düzeydedir (Rai ve Varma 2010).

2.2. Toksin Direncinin Bağışıklık Mekanizması

Tüm toksin üreten mikroorganizmalar ürettikleri toksinden korunmak için bir yönteme sahip olmalılar. K1 toksininin durumunda, mayanın toksine karşı olan duyarsızlığını yani fenotip terimi olarak “bağışıklığı” prekürsör gen sağlar (Gunge 2005). Katil toksinlerin bağışıklık sistemleri suşlar arasında farklı detaylı özelliklere sahiptir fakat genellikle bu sistem mekanizması kabataslak olarak Marquina ve ark. (2002)’nin çalışmasındaki özelliklerle benzerlik gösterir yani katil toksinler yapı koşulları, gen, moleküler boyut, olgun yapı ve bağışıklık gibi konularda tür ve suşlar arasında farklılık gösterir. Bazı suşlar toksin üretmezler ama katil maddeye karşı bağışıklıdırlar. Bunlar “nötral” olarak isimlendirilirler (Wickner 1974).

Katil suşlar kendi toksinlerine bağışıklıdırlar, diğer bağışıklı grubun toksin etkilerine karşı duyarlılık gösterirler. Bu sebeple genelde fermentasyonda kontaminasyonu engellemek için önerilen çözüm, katil toksin üreten bağışıklı endüstriyel suşların düzenlenmesi ve kontaminantların engellenmesidir (Izgü ve ark. 2004). Buna göre, özellikle belirli bir tür mayaya karşı öldürücü olan toksin muhtemelen diğer maya türlerine karşı öldürücü değildir.

Bağışıklığın moleküler temelleri tam olarak anlaşılmış olmasa da, KEX mutant fenotipleri ve prekürsör bağışıklığındaki alan hedefli mutajenez bazı bilgiler sağlar. KEX1 ve KEX2 proses proteazlarındaki mutasyonlar ve prekürsör genindeki mutasyonlar işlem prekürsörü hatasına yol açar ve prekürsör yığılmasına sebep olur, bağışıklık fenotipini alıkoyar. Prekürsördeki bağışıklık alanı haritalanması, toksinin α -alt birim toksin olduğunu ve katyon iletkenlik ölümü gerektiren alan örtüşümlü olduğunu göstermiştir. Birkaç model şu durumu anlatmak için bir hücre bağlantılı prekürsörü kapsar: (1) toksin prekürsörü olgun toksin yeteneği ile direkt

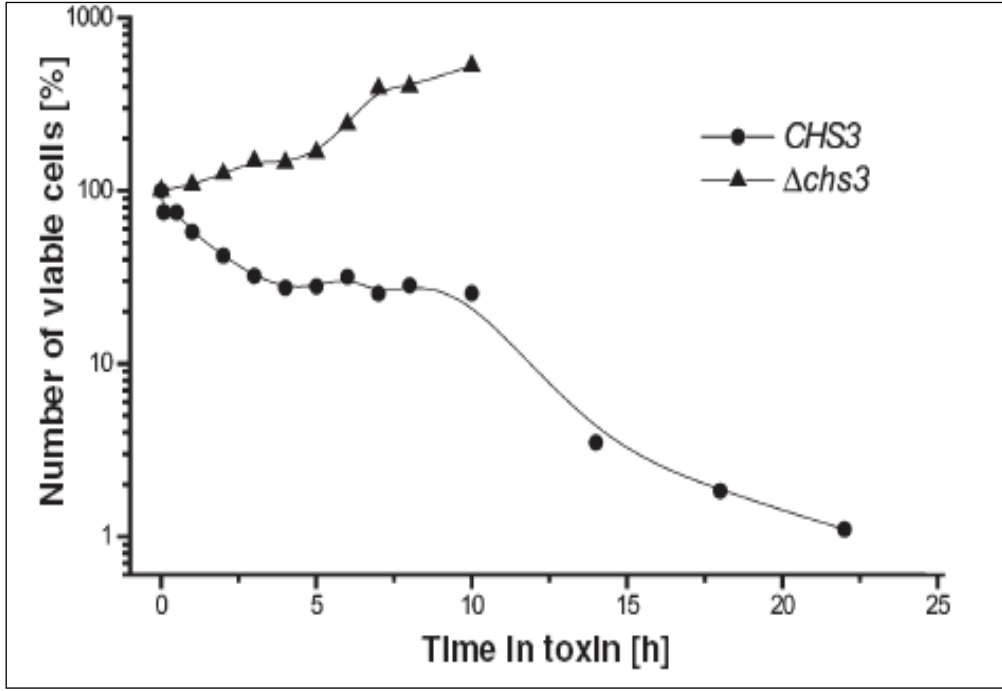
olarak ölümcül kanala etki edebilir. (2) prekürsör toksin ilavesi için gerekli olan bazı hücre zarı reseptörlerini işgal edebilir. (3) alternatif olarak işlenmiş prekürsörün bazı ürünleri yukarıda anlatılan (1) ve (2) deki yollar ile bağışıklığa yol açabilir. Fakat bu modelin deneysel desteklenmesi maalesef eksiktir (Kück 2004).

Katil mayada, fonksiyonel bağışıklık, hücrenin hayatta kalması için esastır ve zorunludur; çünkü toksinler yalnız ökaryotik hücre fonksiyonlarını hedef alır ve inhibe ederler. Bu durum bakteriler tarafından üretilen, seçici olarak ökaryotları öldüren, bundan dolayı bağışıklık yapan ve önemsiz prokaryotik konakta kendini koruyan protein toksinlere (Kolera toksini ve Shiga toksini gibi) karşı zıtlık içindedir (Breinig ve ark. 2006).

2.3. Katil Maya Toksininin Diğer Mayalardaki Etki Örnekleri

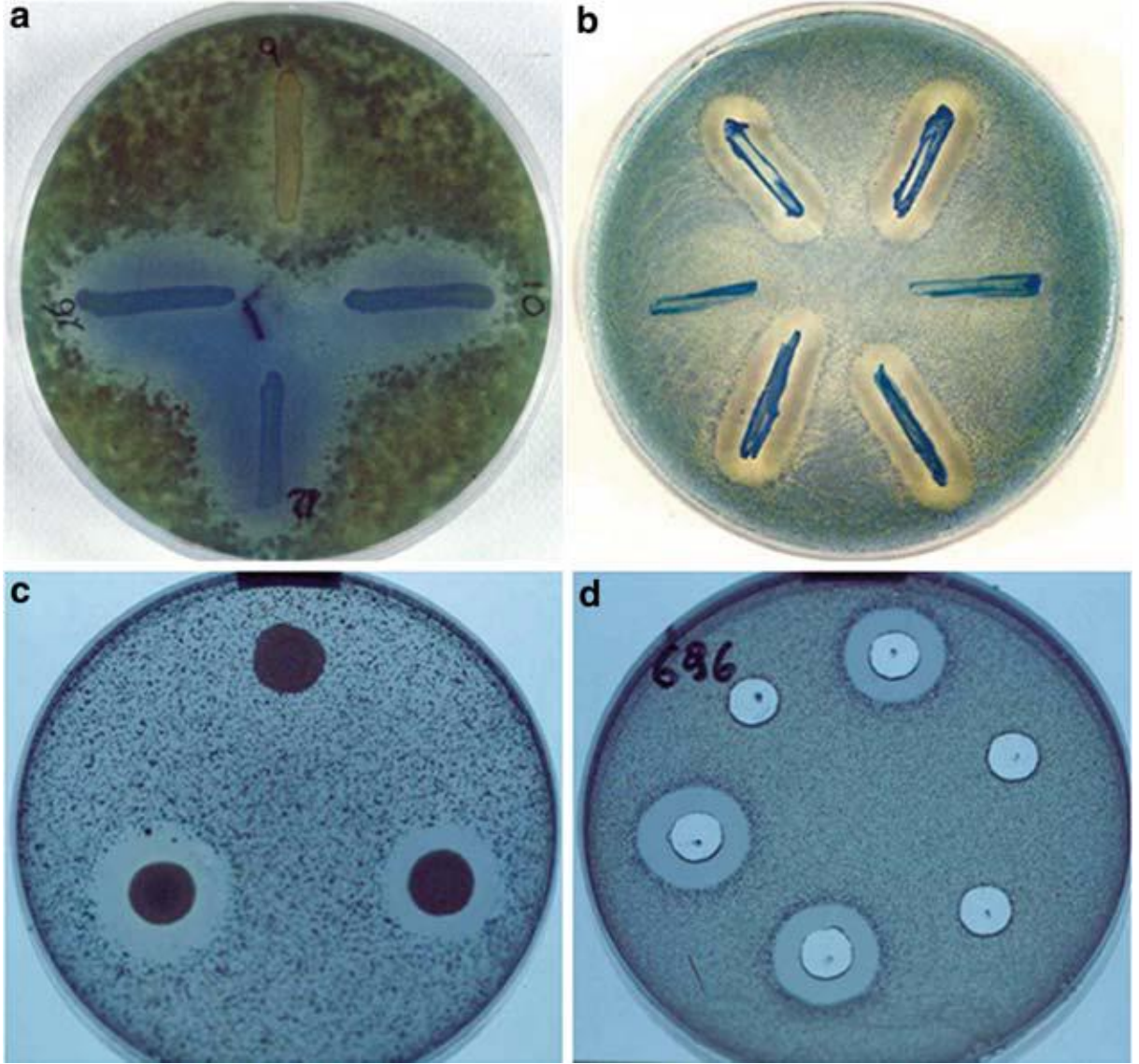
Saccharomyces cerevisiae' nin *Pichia acaciae*'nin lineer kodlanmış bir katil toksinine olan hücrenel etkisi analiz edilmiştir. *Kluyveromyces lactis* katil toksinine (zymocin) bakıldığında, yakın geçmişte hedef hücrenin kitinine bağlandığı ve muhtemelen toksin alt birimi alımını kolaylaştırıcı olarak davrandığı görülür.

Klassen ve Meinhard (2005), *S. Cerevisiae*' nin *P. acaciae* toksinine maruz kaldığında sergilediği, iki basamaklı gerçekleşen, zamana bağlı yaşayabilirlik kaybına neden olan hücrenel tepkisi ile alakalı detaylı bir çalışma gerçekleştirdiler. Bu çalışmalara göre; *K. lactis* ve *S. cerevisiae* arasındaki ölümcül etkileşim heterodimerik protein toksin olan ve α , β , γ alt birimleri içeren süt mayasının pGKL lineer plasmidi tarafından kodlanmış olan katil toksine (zymocin) dayanır. α alt birimi hedef hücre kitinine bağlanır ve dikkat çeken hidrofobik β alt birimi muhtemelen hedef hücre içindeki γ alt birimi hücrenel alımında yer alır, γ RNA-polimeraz 2 bağımlı transkripsiyonu engeller ve sonunda G1 (interfaz G1) safhasındaki hedef hücreyi önlemek için fonksiyonel RNA-polimeraz II Elongator birleşmesine ihtiyaç duyar (Klassen ve Meinhardt 2005). *P. acaciae* toksininin *in vitro* şartlarda kitine bağlandığı ve temel kitin sentetaz (Chs3) kaybı, hücreleri toksinin gelişmeyi inhibe eden etkisine karşı koruduğu bilinmektedir. Devamlı olarak kültür ekimlerinde, Chs mutant yaşayabilir hücrelerinin sayısı toksin varlığına rağmen artış göstermiştir oysaki bozulmamış CHS3 aleli ile (yabani tip) beraber, hücrelerin yaşayabilirliği ilk 4 saat boyunca inoküle edilen canlı hücrelerle karşılaştırmalı olarak % 100den % 30a düşmüştür (Şekil 2.4).



Şekil 2.4.1. *S. cerevisiae* LS20 (CHS3) ilintili hayatta kalma ve *P. acaciae* toxin (5xMIC) içeren ortamdaki Δ Chs3 değişimi grafiği (Klassen ve Meinhardt 2005)

Katil mayaların biyotiplerini ve diğer mayalar arasındaki fiziksel ilişkiyi açıklayan birçok biyolojik deney vardır. Bu bağlamda 1980'lerden itibaren yapılan katil maya toksinlerindeki biyotip tanımlamalarında katil toksinlerine veya katil suş panellerine karşı olan katil duyarlılık örnekleri tespitlerini temel alan kolay ve moleküler olmayan etkili metotlar benzeri metotlar öne sürülmüştür. Ortam bileşenlerinin standardizasyonu, inokulum miktarı, test ve inkübasyon yönteminden sonraki laboratuvar prosedürü, katil toksinin önceden ilgili suşun ekildiği agar plak üzerine direkt sürülmesini içeren en basit biyotipleme laboratuvar prosedürüdür. Canlı gelişimi üzerine, katil maya ortama katil toksini salgılar ve uygun inkübasyondan sonra, her bir seçilmiş katil mayanın etrafında oluşan hale şeklindeki, duyarlılığın toplam spektrumunun imkan verdiğiince beliren inhibisyon zonları sayesinde duyarlılık basitçe gözlemlenebilir (Şekil 2.4.2) (Magliani ve ark. 2010).



Şekil 2.4.2. Değişik metotlarla katil maya aktivitesinin farklı patojen mayalar üzerinde değerlendirilmesi(Magliani ve ark. 2010).

Katil toksinler önceden inoküle edilmiş ilgili küf (Şekil 2.4.2.a) ya da maya (Şekil 2.4.2.b) suşlarının üzerine direk olarak sürülmüştür. Katil suşların sürülmesine dayalı olan prosedürün uygulaması basit ve kolay olsa bile, salgılanmış mevcut katil toksinin standardize edilmesinin zorluğundan dolayı çelişkili sonuçlara yol açabilir. Kısmen daha fazla ya da daha az saflaştırılmış katil toksinler ile (Şekil 2.4.2.d) katil hücrelerin (Şekil 2.4.2.c) veya kuyucukların standardize edilmiş süspansiyonunu içeren spotların kullanılması, aynı anda oluşan katil mayaların ve katil toksin duyarlısı suşların farklı gelişme koşullarının metodunu bağımsız yapmıştır. Katil suşlar standardize edilmiş 50 µl lik damlalar halinde, önceden ilgili

maya suşlarının (Şekil 2.4.2.b,c,d) inoküle edildiği agar plakaların yüzeylerine yerleştirilmiştir. Ekim yapılmış agarlarda çapları 10 mm olan kuyucuklar oluşturulup içleri 100 µl konsantre edilmiş katil toksinle doldurulmuştur. Uygun inkübasyondan sonra oluşan gelişimi inhibe eden zonlar katil suşa karşı oluşturulan duyarlılığı kanıtlar. İnhibisyon zonlarının çapları, araştırılan suşların ve uygulamaların biyotiplerinin bilgisayar destekli tanımlama programları metodun yeniden üretilebilirliğinin ileri düzey iyileştirilmesini olanaklı hale getirmek için kullanılmıştır (Rai ve Varma 2010).

2.5. Katil Mayaların Bakterilere Etkisi

Katil mayaların antibakteriyel hareketleri hakkında bilinenler oldukça azdır. Çoğu toksin 20 kDa altı salgılanmış küçük peptitlerdir ama bazı *Williopsis* suşları 85kDa boyutundan daha büyük aktif bileşenler salgılar. Geçmiş bir araştırma *Hansenula anomala*, *Williopsis mrakii*, *Kluyveromyces drosophylarum*, *Kluyveromyces lactis* ve *Candida tropicalis* türlerinin Gram pozitif patojenik ve patojenik olmayan bakterilere karşı gelişimi inhibe eden potansiyele sahip olduklarını göstermiştir (Ochigava ve ark. 2010). Çalışmalarına göre *Streptococcus pneumoniae* insanlar için önemli patojen bir bakteridir ve yeni antimikrobiyal bileşen gelişmelerinin antibiyotik rezistans ihtiyaçlarında artışa sebep olur. Birçok rapor katil maya toksinlerinin bakterilere karşı aktivite gösterdiğini öne sürmüştür ve bundan dolayı *S. pneumoniae*'ye karşı olan *Williopsis saturnus* var. *mrakii* NCYC 500 katil toksini K9 araştırılmıştır. Oysaki sıvı kültürde ve agar difüzyondaki konsantre K9 denemelerinde hiçbir bakteriyel gelişme gözlenmemiştir. Buna rağmen hücre morfolojisi K9 muamelesinden hafifçe etkilenmiştir, hücresel canlılıkta bir etki görülmemiş ve K9'un β-laktam (hücre duvar sentezini inhibe eden antibiyotik madde) ya da Triton X-100 (yüzey aktif-organik bir biyolojik deterjan) tarafından indüklenmiş hücre lizisinde hiçbir uyarıcı etkisi yoktur. Bu durum K9' un hücre duvarına zarar vermediğini kanıtlamıştır. Bundan başka, akış sitometresi katil toksine maruz kalmış tüm hücrelerin duyarlılık değerlendirmesi gibi kullanılmıştır. *S. pneumoniae* hücrelerinin hiçbir zararı belirgin olarak ortada değildir, buna rağmen flöresandaki minör değişiklikler, K9 katil toksininin bakteriyel yüzey bileşenleriyle karşılıklı etkileşimde olabileceğini ileri sürmüştür.

2.6. Katil Maya Toksinleri ile Bakteriyel Toksinlerin Benzer Etkileri

Mayalardaki katil faktör - *Saccharomyces cerevisiae* - irsi ve öldürücü olan diğer herhangi bir ajanla karşılaştırılabilir ama katil toksin ve bakteriosin arasındaki analogi kısmen dikkat

çekicidir. Her iki suştaki hareket aynı veya benzer olarak türlerle bağlantılıdır ve protein tabanlıdır. Katil faktörün ve bazı bakteriosinlerin stabilitesi ve üretimi optimal titre için çok dikkatli olunması gereken mikroorganizma gelişme koşullarına oldukça bağlıdır. Katil faktör agar ortamda sıvı besiyerinden belirgin olarak daha stabildir. Benzer olarak agarda üretilmiş inhibisyon zonlarındaki birçok kolisin suş sıvı besiyerinde çok az etki edebilir ya da hiç etki göstermeyebilir (Woods ve Bevan 1968).

Katil faktör boyutu tam olarak bilinmese de deneyler makro moleküler bir protein olduğunu ileri sürmüştür. Katil faktörün bakterisidal etkisi ve megasinin bu etkisi birçok açıdan çok benzerdir. İlk olarak, ölümden önce işlem gören duyarlı organizmanın gelişimi gözlenmelidir. İkinci olarak, duyarlı hücrelerin fizyolojik durumu ölüm miktarını etkiler ve üçüncü olarak, organizmaların absorpsiyonu ve ölümü iki ayrı işleme ayrılır. Holland (1962), *Bacillus megaterium* suşlarında megasin üretmekte yaşa bağlı olan duyarlılık azalmasının, yayılmış bakteri tabakasının ilerleyen gelişmesi ile eş zamanlı olduğunu raporlamıştır. Yayılmış tabakanın ölümcül etkinin kullanıldığı yapılardaki megasin etkisini yavaşlattığını ya da engellediğini öne sürmüştür. Şu ana kadar logaritmik faz boyunca duyarlı maya hücrelerinin katil faktör etkisine olan duyarlılık artışının sebebi bilinmemektedir.

Katil faktörün ve megasinin her ikisinin de absorpsiyon sonrası hareketi gelişim koşulları tarafından etkilenmiştir. İlk organizmanın gelişme boyunca ki katil faktör stabilitesi için optimum koşullara maruz kalmasını gerektirir ama ikincisi organizma optimum yetiştirme koşullarına maruz kalmadığında zorunlu öldürücü değildir (Woods ve Bevan 1968).

2.7. Katil Toksinlerin Gıda Üretiminde Çeşitli Uygulamalardaki Avantajları ve Riskleri

İstenmeyen mikroorganizma olarak etiketlenen katil mayalar gıdalarda bozulmaya ve riske sebep olurlar. Diğer taraftan genetik ilerlemeler ve rekombinant DNA teknolojisi ya da ilerleyen monoklonal antikor (antibody) çalışmaları ile genetik materyalde yapılan katil özellik düzenlemeleri sayesinde, bilim adamları zararlı koşullar altında bile katil mayaların faydalı etkilerini kullanmanın mümkün olduğunu raporlamışlardır. Katil fenomen tanımlanıp çalışılmaya başlandığından itibaren birçok potansiyel uygulama ileri sürülmüştür. Fermentasyon endüstrisinde katil faktör yabancı ve bulaşıcı *Saccharomyces* suşlarını öldürmek için kullanılabilir (Yener 2006).

Rekombinant DNA' da *S. cerevisiae* – sadece *S. cerevisiae* değil aynı zamanda diğer konak hücreler olan *Schizosaccharomyces pombe* ve *Pichia pastoris*' te de – *K. lactis* ve diğerlerinden elde edilen katil plazmidler yabancı ökaryotik proteinlerin etkili algılanması ve ifadesi için klon vektörler olarak kullanılmaktadır (Magliani ve ark. 2010). Ayrıca mayalardaki katil sistem virüs tabanlı anlatımı ve kontrolü çalışmaları için kullanışlı modeller sağlar. Ek olarak katil sistemler hem gıda hem fermentasyon endüstrisi hem de ilaç sektörü için biyoteknolojik uygulamalarda görev alabilir. Katil sistemler duyarlı hücreler üzerindeki geniş öldürme spektrumlarından dolayı insan ve bitki patojenlerine karşı antifungal ajan olarak kullanılabilir (Kepekci 2006). Katil mayaların endüstriyel uygulamalarda kullanılması araştırması, oldukça yenidir. Doğadan elde edilen daha fazla suş toksin aktivite alanı için taranmıştır; karmaşık genetikleri, düzenleme mekanizmaları, uygunlukları ve toksin üretim seviyeleri daha iyi ölçüde anlaşılacaktır. Bu artan bilgi birikimi geniş menzilli istenmeyen vahşi tip mayalara karşı hedeflenmiş şarap, bira ve diğer katil aktiviteye sahip olan endüstriyel mayaların seçimine ve yapımına olanak verecektir (Marquina ve ark. 2002).

2.7.1. Katil Toksinin Biyoteknoloji ve Fermentasyon Alanı Uygulamaları

Kompleks genetik anlayışının, mekanizma düzenlemelerinin, katil toksin üretimi ve salgılanması mekanizmasının uygunluğunun gelişmesi birçok endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamayı akla getirmiştir. Şunu unutmamak gerekir ki; bazı mayalar basit etanol mekanizmaları ya da katil toksin üretimleri tarafından diğer mayaların hayatta kalmasını ve gelişimini etkiler. Bu özellikler bakteri ve ipliksi mantarı pekiştirebilir ve aslında mayaların muhtemelen şu anda fark edilenden daha iyi potansiyel biyokontrol ajanı olabileceğine dikkat çekebilir. Bu konu için daha fazla araştırma gerekir. Etanol ve katil toksin üretimi şarap üretiminde maya seçimi ve ticaretinde ayırt edici özelliklerdir (Querol ve Fleet 2006).

Birada ve şarap fermentasyonunda starter kültür olarak seçilen katil maya inkübasyonu, fermentasyonun ilk aşaması süresince kontaminant mayaların kontrolü ve bozulmanın önlenmesi için önerilmiştir. Şarapçılıkla alakalı istenen özellikler ile doğal ya da genetik modifiye edilmiş katil suşlar içeceklerin kalitesini arttırmak amacıyla seçilip düzenlenmiştir (Magliani ve ark. 2010). Fermentasyon işleminde katil toksin üreten maya türleriyle gerçekleşebilen kontaminasyon potansiyel bir problemdir. Katil fenomen katil özelliğin duyarlı starter suşlara tanıtılması ile fermentasyon prosesinin maya kontaminasyonuna karşı korunması için kullanılabilir. Bağışıklı endüstriyel suşlar protoplast füzyonu ya da sitodüksiyon metotlarını kullanarak yapılandırılmışlardır. Şarap yapımında *S. cerevisiae*'ye ait

katil mayalar fermentasyonu başlatmak, şarap kalitesini ve prosesini geliştirmek için şu anda kullanılmaktadır (Kepekci 2006).

Araştırmalarına göre Petering ve ark. (1991) üzüm suyundaki katil maya aktivitesini saptamak için işaretli *Saccharomyces* şarap mayası suşu kullanmışlardır. Belirli üzüm bağlarından ve dünyanın çeşitli bölgelerindeki şaraphanelerden elde ettikleri örneklerde mayalarda katil aktivite keşfettiler. Teorik olarak, seçilen katil mayalar üzüm suyu fermentasyonu boyunca istenmeyen *S. cerevisiae* yabani suşlarının gelişimini bastırmak için inoküle edilmiş suş olarak kullanılabilir. Ek olarak, farklı cins mayalar arasında katil etkileşim meydana geldiğinin raporlanması gibi, genetik mühendisliği sonucunda geniş spektrumlu *S. cerevisiae* katil suşları bulunmaktaydı. Uygulama sonuçlarına göre katil suşlara karşı olan duyarlı maya türlerinde düşüş vardır. Bunu takip eden araştırmalarda katil suşların şarap yapımıyla olan uygulamaların, seçilmiş maya kültürünün fermentasyonu indüklemek için şıraya inoküle edildiği ülkelerde ilgi gördüğüne karar verdiler. Bu konu doğal olarak şıraya bulunan mayaların gözlemlenmesinden dolayı pekişmiştir. Ayrıca şıraya doğal olarak bulunan bu mayalar “saf” kültür fermentasyonu olması gereken fermentasyonda belirgin rol oynar. Bu doğal mayalar *Kloeckera*, *Candida*, *Hansenula* ve *Saccharomyces* cinslerinden türleri içerir. *Saccharomyces* katil şarap mayası suşu fermentasyon süresince doğal *Saccharomyces* maya suşlarını durdurmak için etkili olabilir ve katil mayaların geniş çaplı mühendisliği sonucunda diğer cinslerden suşları kontrol etme olasılığı olabilir. Şarap yapımında katil karakter taraması hakkındaki diğer bir araştırmaya göre *Kluyveromyces* cinsinin 23 suşu arasından 3 suş katil karakter özelliği göstermiştir (*K. phaffii*, *K. vanudenii* ve *K. wikenii*). Özellikle *K. phaffii*'nin birçok suşunu inhibe etmiştir ve şarap yapımında fermentasyondan önce üzüm suyunun genelde pastörize edilmemesinden dolayı, *Kloeckera apiculata* düşük etanol toleranslı kontaminantına karşı katil aktivite üretmeye uygun bir mayadan bu şekilde fayda sağlanması kullanışlı olabilir. *K. phaffii* ile ön inokulasyon yapılmış preslenen üzüm suyu ya da saflaştırılmış katil toksinlerinin eklenmesi veya transfer edilen *K. phaffii* katil özelliğinden elde edilen yeni suşların seçilmiş *S. cerevisiae* şarap yapıcı suşlarına direk inokülasyonu, geleneksel SO₂ kullanımına gerek kalmadan limon biçimli maya florasının kolay kontrolüne olanak verebilir (Rosini 1987).

S. cerevisiae katil faktörünün ilk tanımlanışından itibaren NaCl varlığında katil aktivite gösteren birçok halotolerant katil maya tuzlu sebze, soya sosu gibi çoğu fermente gıdadan izole edilmiştir. Bu bilgiyle beraber yeşil zeytinlerin bozucu mayalardan korunması

hakkındaki diğer bir araştırmada katil aktiviteli mayalar, bozulmanın engellenmesi için koruyucu ve tuz kullanımı ihtiyacını azaltması ile zeytin paketlemesini geliştirebilir. Bu özellik zeytin izolatlarında test edilen katil suşların en yüksek yüzdelik dilimine sahip olan genin *Debaryomyces* olduğunu gözleyen birçok yazar tarafından raporlanmıştır ve bu izolatlardan elde edilecek starter kültürün bozucu mayalarına karşı biyo-kontrol metodu olarak kullanılabilceğini öne sürmüşlerdir. Spontane gerçekteşen zeytin salamura fermentasyonundan izole edilen mayalarla gerçekteştirilen destekleyici çalışmalarda *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida* ve *Torulaspora* cinslerinin suşları *S. cerevisiae*'nin katil-duyarlı suşlarına karşı katil aktivite göstermiştir (Arroyo-López ve ark. 2008).

Birkaç rapora göre, Walker ve ark. (1995) bazı tahta saprofiti ve bitki patojeni mantarları inhibe edici olarak tanımlanmış katil mayayı (*Pichia anomala* NCYC 435, *S. cerevisiae* 28, *P. membranifaciens* 333, vb.) ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu durum katil mayaların zirai ve çevresel anlamda maya-küflere karşı yeni bir biyokontrol ajanı olarak kullanılma olasılığını da arttırmıştır. Masih ve ark. (2001) *P. membranifaciens*'in asma bitkisini *Botrytis cinerea*'ye karşı koruduğunu ispatlamışlardır. Nunes ve ark. (2002), Vinas ve ark. (1998), Curtis ve ark. (1996), Kurtzman ve Droby (2001), *Candida sake*'nin elma ve armutu *Penicillium expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı koruduğunu göstermişlerdir. Santos ve ark. (2004) *B. cinera*'nın sebep olduğu elma zararı için çözüm yolu araştırmıştır. Araştırma *P. membranifaciens*'in bitkiler için katiyen patojenik bir maya olmadığına bu sebeple *B. cinera*'ya karşı olarak, hasat sonrası bozulmayı etmek amacıyla kullanılan mantar ilacı kullanımından kaçınmak için kullanılabilceğini ortaya koymuştur.

Williopsis saturnus var. *saturnus*'un bozucu mayalara (galaktozu fermente eden) karşı olan biyo-koruyucu etkisi laboratuvar koşulları altında peynir örneğinde araştırılmıştır. *W. saturnus* peynire 10^6 kob/g seviyesindek inoküle edildiğinde, bu katil maya laktozu fermente etmeyen ama galaktozu fermente eden, 10^3 kob/g oranında peynire önceden inoküle edilmiş maya *S. cerevisiae* VL1' i inhibe etmiştir. Ayrıca katil maya *W. saturnus*, galaktoz üreten starter kültür *Streptococcus thermophilus* ile beraber gelişen, laktozu ve galaktozu fermente eden 10^3 – 10^4 kob/g oranında inoküle edilmiş *Kluyveromyces marxianus* ATCC8640 maya gelişimini de inhibe etmiştir. Bu çalışma, peynir olgunlaşması için ikinci kültür seçmede, sadece küf peyniri ve olgunlaştırılmış peynirleri değil diğer peynir çeşitleri için de bazı bulguları içermektedir. İkincil kültürün katil maya içermesi diğer mayaların gelişimini geciktirebilir hatta durdurabilir ve bu sebepten dolayı peynir olgunlaşmasını etkileyebilir. Mayaların katil

aktivite ve katil aktiviteye olan duyarlılıklarına yönelik taranması peynir için ikincil kültürün geliştirilmesinde gereklidir. *W. saturnus* ve *W. californica* 'yı da kapsayan *Williopsis* mayaları peynir mikrotasında doğal olarak bulunur. Patojenik, proteolitik veya lipolitik değildir. Bu sebeple peynir tadında veya dokusuna tesir etmeleri beklenmez. Aynı zamanda *W. saturnus* var. *saturnus* CBS254 kendi başına peynirde herhangi bir uçucu metabolit (istenen veya istenmeyen) üretmez (Liu ve Tsao 2009).

Lee ve ark. (2010) *Saccharomyces cerevisiae* ve *Williopsis saturnus* mayalarının karışık kültürü tarafından yapılan fermentasyon süresince papaya suyundaki uçucu bileşenlerin oluşumunu ve kullanımını araştırmışlardır. Papaya fermentasyonu süreci *S. cerevisiae* var. *bayanus* R2 ve *W. saturnus* var. *mrakii* NCYC2251 mayaları ve bunların karışık kültüründen oluşmuştur. *Saccharomyces cerevisiae* tekli kültüründe ve karışık kültürde *Saccharomyces cerevisiae* hücre popülasyonundaki değişimler, briks, şeker ihtiyacı ve pH benzerdir. Karışık kültür fermentasyonunda *W. saturnus* için erken gelişim önlenmesi görülmüştür. Sonuç olarak, 1:1000 oranlı *S. cerevisiae* / *W. saturnus* karışık kültürü tarafından, fermentasyon performansı ve aroma bileşenlerinin oluşum/kullanımı tek kültür kullanılan fermentasyonlara karşı değerlendirmiş ve karşılaştırılmıştır. Karışık kültür fermentasyonu, tekli kültürden daha geniş alanlı, farklı seviyeli uçucu bileşenli papaya şarabı üretim yeteneği göstermiştir. *S. cerevisiae* / *W. saturnus* karışık kültürlü papaya suyu fermentasyonu başka bir papaya şarap kalitesinin modülasyonuna olanak sağlamıştır.

2.7.2. Katil Toksinin Tıbbi Uygulamaları

Polonelli ve ark. (1990) çalışmalarında toksin üreten suşla (*Pichia anomala* UCSC 25F) mücadele veren fare dokusundaki katil maya toksin üretimini flüoresan antikor (antibody) tekniği ile ispatlamışlardır. Bu gözlem toksin üretiminin bir şekilde enfeksiyon mekanizmasının katil maya ile birleşmesi ihtimalini ortaya koyar. Katil maya toksinleri, maya kolonilerinin oluşmasından sorumlu patojenik faktör ya da enfeksiyon sürecini etkileyen bir faktör olabilir. Fakat sonuçlar göstermiştir ki, hem katil maya toksinlerinin canlı organizma içindeki üretimlerinin olası biyolojik rolü, hem de enfeksiyonlu hayvanların sıvısal ve hücresele tepkisi, özellikle insan enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan türlerin onaylanmış katil izoleleri açısından, *Candida albicans* 'e ihtiyaç duyulur.

Magliani ve ark. (2005), çalışmalarında bağışıklık sisteminin doğadaki mikroorganizmalar arasında yaygın olan ve savaşmak için kullanılan reseptör aracılıklı katil maya fenomenini

taklit ederek katil toksin antikor (antibody) üretimine ve seçimine dayalı bir antimikrobiyal savunma sistemi geliştirebilecek olduğunu öne sürmüşlerdir. Katil toksin antikor (antibody) aracılıklı çeşitli farklı patojenik ajan karşı antimikrobiyal koruma, ilgili konsantrasyonundan etkilenebilir ya da antikora (antibody) engel olan kontaminant tarafından engellenebilirdi. Bu bilgi, uygun olarak meydana getirilmiş veya monoklonal, rekombinant ya da peptid molekülleri olarak tasarlanmış; genel olarak kullanılan kemoterapiye ilaveten yeniliğe açık geniş spektrumlu farklı mikrobiyal enfeksiyonlara karşı yardımcı terapide kullanılan antimikrobiyal araç olan mikrop öldürücü antikor ailesinin varlığını destekler.

İnsanlar ve diğer hayvanlar doğumlarından itibaren mayalara maruz kalır. Neyse ki sadece 200 civarında fungi türü memelilere karşı patojeniktir buna rağmen birçok patojenik olmayan fungi, alerjik semptomlara sebep olur. Son yirmi yıldır, özellikle yoğun kemoterapi, bağışıklığı bastırıcı ilaçlar ve HIV sebebiyle bağışıklığı zayıflamış hasta insanlarda fungi sebepli enfeksiyonların oranında dramatik bir şekilde artış gözlenmiştir. Avrupa’da ve dünyanın büyük kısmında kandidiyaz (pamukçuk) ve atletlerin ayağında oluşan deri enfeksiyonu olan cilt mantarı gibi koşullarla sınırlı fungal enfeksiyonlar sağlıklı normal insanlarda yaygın değildir. Ancak, bağışıklığı zayıflamış konakta normal küf ya da patojenik olmayan fungi türleri olanak sebep olabilir. Ayrıca, tehlikeli bağışıklık sistemlerinde düşük virulanslı fungal organizmaların sebep olduğu enfeksiyonlar bile yaşamı tehdit edebilir. Örneğin lösemi hastalarının fungal enfeksiyonları % 50 oranla ölümlerine sonuçlanır (Yener 2006).

Katil mayalar özellikle *Candida albicans* ve *C. neoformans* patojenik mayalarının biyotiplenmesinde medikal uygulamalara sahip olabilir. Bu toksinlerin enfeksiyonların tedavisinde yeni antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyeli ortaya atılmıştır. Katil toksinler fizyolojik sıcaklıkta ve pH’da çok değişkendirler. Ancak, tampon çözeltilere eklenmeleriyle deri ve mukozal maya enfeksiyonlarının tedavisinde etkili sonuçlar alınabilir. Katil toksinler sistemik antibiyotikler olarak kullanılamaz, çünkü tahmin edilebileceği gibi büyük yabancı proteinler için antijeniktirler. Katil toksinlerin yerini tutan aynı antimikrobiyal aktivite uygulayan anti-idyotipik antikor elde etmek mümkündür. Polonelli ve ark. (1990) görünüşe göre *P. anomala* toksininin aktif kısmını paylaşan bu antikorları üretmişlerdir. Bu anti-idyotipik antikorlar *C. albicans*’a karşı salgılanmış toksinin katil etkisini taklit etmiştir (Marquina ve ark. 2002).

2.7.3. Katil Toksinin Muhafaza Uygulamaları

Hasat sonrası depolama işleminde meyvelerde ve sebzelerdeki bozulmalar ürünün ekonomik değerini ciddi anlamda sınırlandırır. Antagonistik mikroorganizmaların meyve ve sebzelerdeki hasat sonrası hastalıkların kontrollerini içeren birçok çalışma yapılmıştır. Bu antagonistik mikroorganizmalar arasından katil mayalar, meyve ve sebzelerin hasat sonrası depolanmalarında kullanılan fungisidal kimyasallara karşı alternatif sağlayan biyo-kontrol ajanları olarak umut verici görünmektedir. Katil mayaların bitki patojeni fungilere karşı hareketine bakılırsa, çeşitli maya türleri (*in vitro*) kayda değer antifungal aktivite göstermektedir. Literatürde *Pichia anomala*'nın geniş alanlı öldürme spektrumunu gösteren çeşitli raporlar mevcuttur. Bu sebeple, *Pichia anomala* geniş olarak çalışılmış ve biyo-kontrol ajanı olarak amaçlanmıştır (Kepekci 2006). Olstorpe ve Passoth (2010), *P. anomala* biyo-kontrol mayasının tahıl tanelerine inokülasyonu sonucu *Enterobacteriaceae* ve küf miktarının azalıp gıda hijyenini iyileştirildiğini, protein miktarının artmasıyla ve anti-besinsel bileşen fitat konsantrasyonunu azaltılıp besinsel değer arttığını belirlemişlerdir. *P. anomala* suşları yüksek fitaz aktivitesi göstermiştir. Bazı suşlarda oldukça fazla hücre dışı fitaz aktivitesi gözlenmiştir. Biyokütle konsantrasyonundaki belirli maksimum değer asla *P. anomala* gelişim inhibisyonunu tetikleyen hücre yoğunluğunu gösteren sınırı aşmamıştır.

Nemli buğday yığını (160 kg) depolamak için kullanılan hava geçirmez 0,2 m³ ölçekli pilot silodaki denemelerde, *P. anomala*'nın küf gelişimini engelleme yeteneği onaylanmıştır (Petersson ve Schnürer 1998). *P. anomala* suşları aynı zamanda depolanmış elma ve üzüm üzerindeki gri küf *Botrytis cinerea* gelişimini de engelleyebilir (Jijakli ve Lepoivre 1998; Masih ve ark. 2000).

Laboratuvar ölçeğindeki dikkate değer antagonistik mikroorganizma aktivitesine rağmen, tam ölçekli gerçek deneme laboratuvar koşulları altındaki kadar iyi sonuç vermemiştir. Hasat ve meyvelerin depolanması arasındaki yarım günden birkaç güne kadar çıkabilen kısa zaman hızlı antagonistik hareketi gerektirir. Bir keresinde soğuk depoya yerleştirilen meyvede konağın metabolik oranı ve birleşmiş mikroflorası, seçilmiş sıcaklık rejimine bağlı olarak düşmüştür. Antagonistlerin hasat sonrası yarayı istila eden patojenleri kontrolü için yapılan araştırma, yaralı kısmın hızlı kolonileştiricileri üzerine daraltılmış olmalıdır ki düşük depolama sıcaklığında metabolik aktivite olabilsin (Kepekci 2006).

2.7.4. Katil Toksinin Taksonomik Alan Uygulaması

Mayalar tek hücreli organizmaların yüksek heterojen gruplarından oluşur. Farklı mayaların ayırt edilmesi sıklıkla zor olmasına rağmen çeşitli ayırt edici kriterler mayaların tanımlanmasına olanak sağlar. Moleküler çalışmalar şeker fermentasyonu ve asimilasyonu, spor oluşumu ve morfoloji gibi birçok klasik özelliğin taksonomi tanımı için kullanıldığını göstermiştir. Bu noktada basit testler için geniş olarak kullanılacak araştırmalar ciddi önem taşır. Bu testlerden biri taksonomik olarak, katil toksin üreten mikroorganizmalarla akraba mayalara karşı olan katil mayalar tarafından üretilen toksinlere oluşturulan duyarlılık farklılıklarına dair bulgulara dayanabilir. Katil toksinlere karşı oluşturulan farklı duyarlılıklara göre, mayaların diğer karakteristikleri heterojen olsa dahi tekrar üretilebilen kategorilere ayrılması muhtemeldir (Marquina ve ark. 2002).

2.7.5. Katil Toksin Riskleri

Starter mayaların katil mayalarla kontaminasyonu temel tehlikedir. Sonuç olarak bir şekilde duyarlı fermentasyonu sağlayan mayanın ölümüne sebep olur. Katil mayanın % 1 gibi az bir konsantrasyonu fermenterde fermentasyonu sağlayan starter suşu ortadan kaldırılabılır. Katil mayalar hücre duvarı bileşenlerine bağlanan, hücresel döngünün engellenmesine ya da sızıntıya sebep olan toksinler (ekzotoksin veya zimosin) salgılar. Katil suşlar *Pichia* (yüksek sıklıkta), *Candida* ve *Saccharomyces* (en düşük oranda ve çoğunlukla laboratuvar suşlarında) cinslerinde bulunmuştur (Boekhout ve Robert 2003).

Mayaların ön işbirliği etkileşimi şarap fermentasyonu örneğindeki gibi rakip mayaları azaltır (Boekhout ve Robert 2003). Rakip mayaların avantajı olan katil mayaların aşırı duyarlı suşlara sahip oluşu, doğal habitatta sıklıkla bulunmalarının sebebi olabilir ve sonuç olarak, yeteneklerinden ötürü çoğu kez gıda prosesini ve içki üretimini kontamine etmeleri istenmeyen organoleptik etkilerdir. Şarap yapımında ürünün kalitesi büyük ölçüde fermentasyonu tamamlayan suşun özelliklerinden etkilenir. Katil yabancı şarap mayaları şarabın duyusal kalitesini yavaş ve durgun fermentasyonun sebebi olarak olumsuz yönde etkileyebilir (Magliani ve ark. 2010).

Katil toksin üreten suşlarla meydana gelen kontaminasyon durgun fermentasyon sebebi olan starter mayayı tamamen eleyebilir. Katil mayalar sıklıkla *Saccharomyces* olmayan yabancı mayalar arasında, *Pichia* ve *Candida* gibi türlerde bulunmuştur. Yeni bir çalışmaya göre, *Saccharomyces* kontaminantları arasından *S. cerevisiae* en sık karşılaşılan (% 52), onu takip

eden *S. pastorianus* (% 26) ve *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (% 13)'tur; ve sadece tek bir suş *S. bayanus* olarak tanımlanmıştır (Deak 2008).

Türk fırın endüstrisinde görüldüğü gibi inoküle edilen mayalar öldürüldüğü takdirde katil aktivite ürün kalitesinde ciddi azalışa sebep olacaktır (Querol ve Fleet 2006). *Candida tropicalis*, Türk fırıncılık endüstrisinde kullanılmış fermentasyon suşu olan *S. cerevisiae* BSP starter kültürünün maya tarafından kontaminasyonunda tespit edilen katil fenotipli suştur. Katil toksinlerin endüstriyel suşlara karşı aktivitesi pH 3,9 ve 4,1, sıcaklık 22-25°C'de optimumdur. Bilinen fenotiplerin bazı katil toksin üreten mayalarının *C. tropicalis*'e karşı aktiviteleri saptanmıştır. Test edilen mayalar arasından *S. cerevisiae* K3 ve *Hansenula anomala* K8, *C. tropicalis*'e karşı inhibisyon etkisi gösterir. Bu durum K8 ve /veya K3 katil toksin özelliklerinin endüstriyel suşların *C. tropicalis* kontaminasyonuna karşı direnç oluşumunun yapısında kullanılabileceği sonucuna öncülük eder (Izgü ve ark. 1997).

3.MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bozucu Mayalar

Bu çalışmada kullanılan bozucu mayalar, tesadüfî örnekleme ile piyasadan temin edilmiş beyaz peynir, ev yapımı turşu suyu ve yoğurt gibi ürünlerden izole edilmiş, ayrıca bazı izolatlar Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. Bozucu mayaların kaynakları Çizelge 3.1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.1. Kullanılan bozucu maya kaynakları

Izolat Kodu	İsmlendirme	Izole Edildiği Gıda	Kaynak
A	koyun3.4	Koyun peyniri	Erciyes Üniversitesi
B	koyun3.2	Koyun peyniri	Erciyes Üniversitesi
C	koyun1.6	Koyun peyniri	Erciyes Üniversitesi
D	koyun1.1	Koyun peyniri	Erciyes Üniversitesi
E	koyun 4.2	Koyun peyniri	Erciyes Üniversitesi
F	koyun 5.5	Koyun peyniri	Erciyes Üniversitesi
G	turşu	Turşu suyu	Ev yapımı turşu
H	zeytin	Zeytin salamurası	Ev yapımı zeytin
I	peynir	Beyaz peynir	İnek peyniri

3.1.2. Katil Suşlar

Katil özelliği bilinen *Lindnera saturnus* Y-17396 (Sin. *Williopsis saturnus* var. *saturnus*) suşu ARS kültür koleksiyonundan (Agricultural Research Service, Amerika) liyofilize olarak temin edilmiştir.

3.1.3. Besiyerleri

Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Almanya), Yeast Extract Pepton Dextrose (YEED) (%1 maya ekstraktı, %1 pepton, %2 dekstroz, %1,5 agar), YEED broth (%1 maya ekstraktı, %1 pepton, %2 dekstroz) izolasyon, ön deneme ve agar difüzyon çalışmalarında kullanılan besiyerleridir.

3.1.4. Üzüm suyu

In situ çalışmalarında kullanılmak üzere Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nden pastörize edilmiş beyaz üzüm suyu örnekleri temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Bozucu Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması

Piyasadan temin edilen bozucu mayaların izolasyonu için Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Almanya) besiyeri kullanılmıştır. 25 °C'de 2-3 gün süreli inkübasyon işlemiyle peynir, turşu ve zeytin örneklerinden izole edilen mayaların tür düzeyinde tanımlanması gerçekleştirilmiş ve sonuçlar API ID 32 C (bioMerieux, Fransa) sisteminde değerlendirilmiştir (Ek 1).

3.2.2. *Lindnera saturnus*'un Bozucu Mayalara Etkisi (*in vitro*)

Çeşitli kaynaklardan izole edilen bozucu mayalar PDA'da saflaştırılıp YEED sıvı besiyerinde 25 °C'de 2-3 gün süreyle zenginleştirildikten sonra, *Lindnera Saturnus* ile aralarında olası etkileşimi görmek için agar difüzyon metodu kullanılmıştır.

Bu amaçla sterilize edilen (121 °C 15 dk) YEED sıvı besiyerinin pH ayarlaması tartarik asit ile yapılmıştır. Bozucu mayalar YEED sıvı besiyerine ayrı erlenlerde 50 µL olacak şekilde inoküle edilmiş ve dökme plak yoluyla petrilere aktarılmıştır. Katılacak besiyerinin üzerine 2 tanesi 10⁰, 2 tanesi 10⁻¹ ölçülü seyreltilmiş, 10 µL'lik 4 ayrı nokta şeklinde *Lindnera saturnus* inokülasyonu yapılmıştır. Petriler çeşitli sıcaklıklarda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu işlem 3,5; 4 ve 5 pH da, 15, 25, 30 °C'de gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda *Lindnera saturnus* ve bozucu maya etkileşiminden kaynaklı zon oluşması beklenmiştir. Zon gelişiminin varlığı *Lindnera saturnus* 'un bozucu mayayı inhibe ettiğini gösterir.

3.2.3. Üzüm Suyu Denemesi

Üzüm suyunda yapılan *in situ* denemelerinde 85 °C de 30 dk süreli pastörize edilmiş ürüne *in vitro* denemelerde aktivitesi kanıtlanmış olan, katil maya etkileşiminde en fazla zon oluşumu görülen bozucu maya örnekleri inoküle edilmiş ve mikrobiyal gelişmenin en yoğun olduğu 25 °C’ de inkübe edilmiştir. Bu kombinasyonlar her bozucu maya çeşidi için 3 şekildedir: sadece bozucu maya inokülasyonu (10^4 Kob/mL), bozucu maya ve katil maya inokülasyonu (10^4 Kob/mL ve 10^4 Kob/mL), bozucu maya ve koruyucu ajan (% 0,1 oranında potasyum sorbat). Ayrıca bir üzüm suyu erleni hiçbir inokülasyon yapılmadan kontrol amaçlı inkübe edilmiştir. Bu örneklerin hepsi 7 gün süreyle aynı sıcaklıkta inkübe edilmiş ve 0, 4, 5 ve 7. günlerde çeşitli analizler yapılmıştır.

3.2.4. pH Ölçümü

Üzüm suyu örneklerindeki pH ölçümü WTW pH 330/ SET-1 model pH metre ile yapılmıştır.

3.2.5. Optik Yoğunluk Ölçümü

Üzüm suyu örneklerindeki mikrobiyal yoğunluk Mc Farland birimi cinsinden çapı 16 ve 18 mm olan tüplerde DEN-1 BIOSAN McFarland densitometer ile ölçülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bozucu Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması

API ID 32 C tanımlama testi sonucunda turşu ve peynirden izole edilen mayaların *Candida inconspicua/norvengensis*, zeytinden salamurasından izole edilen mayanın ise *Candida pelliculosa* türü olduğu tespit edilmiştir.

Candida pelliculosa çeşitli meyvelerde, ağaç özünde, toprakta, sebze, yoğurtta, insan derisinde, depolanmış tahılda, taze ve yumuşak peynirde rastlanabilen ve her *Candida* cinsi gibi fırsatçı patojen bir türdür. *Candida inconspicua/norvengensis* ise şalgam suyu, kefir, depolanmış tahıl, okyanus suyu, turşu salamurası, kürlenmiş et, zeytin ve deri yüzeyinde bulunabilir.

4.2. *Lindnera Saturnus*'un ve Bozucu Mayalara Etkisi (*in vitro*)

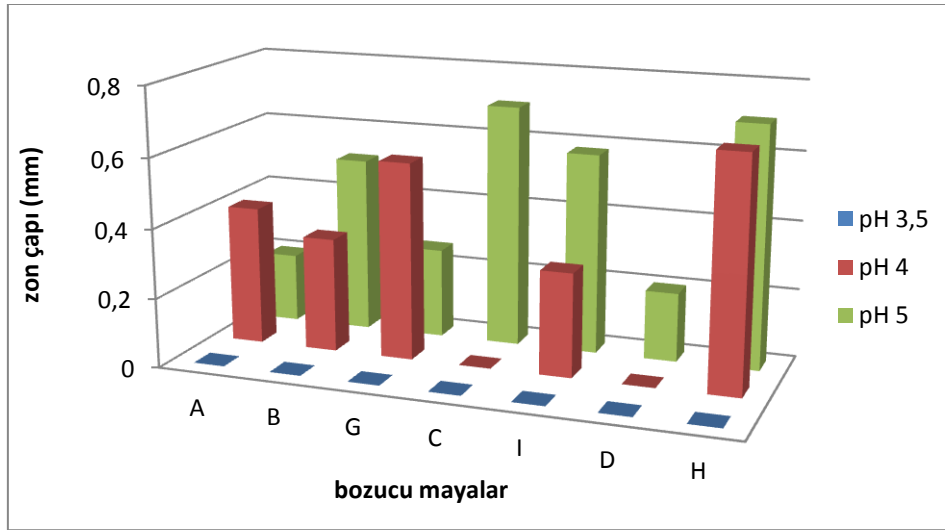
Agar difüzyonu denemelerinde etkileşimin pH ve sıcaklık artışı ile doğru orantılı olarak beklenen inhibisyonda artış görülmüştür. İstisnai durumlar olsa da en düşük inhibisyon pH'nın 3 ve sıcaklığın 15°C olduğu durumlarda belirlenmiştir.

Lindnera Saturnus'un 15°C'de ve farklı pH değerlerinde bozucu mayalara etkisi Çizelge 4.2.1. ve Şekil 4.2.1.'de görülmektedir. pH 3,5'de *Lindnera saturnus*'un bozucu mayalara etkisi tespit edilememişken, pH 4 ve 5'de katil maya kolonilerinin etrafında farklı büyüklüklerde şeffaf zon görülmüştür. Bununla birlikte, *Lindnera saturnus*'un pH 4'de bazı bozucu mayalara karşı etkisiz oldukları belirlenmiştir. pH'sı 5'e ayarlanan besi yerinde bütün bozucu mayalara karşı etki tespit edilirken, pH'sı 4'e ayarlanan besiyerinde C ve D kodlu bozucu mayalara karşı herhangi bir etki tespit edilememiştir.

Çizelge 4.2.1. *Lindnera saturnus*'un 15°C'deki bozucu mayalara etkisi

Bozucu Maya	Zon çapı (mm)		
	pH 3,5	pH 4	pH 5
A	-	0,40	0,20
B	-	0,33	0,51
G	-	0,57	0,26
C	-	-	0,70
I	-	0,30	0,58
D	-	-	0,20
H	-	0,67	0,70

-Zon oluşumu görülmedi.



Şekil 4.2.1. *Lindnera saturnus*'un 15°C'deki bozucu mayalara etkisi

15°C sıcaklıkta pH 3,5'ta herhangi bir zon oluşumuna rastlanmamıştır fakat Şekil 4.2.2'deki gibi pH artışıyla beraber zon oluşumlarındaki değişim açıkça görülebilmektedir.



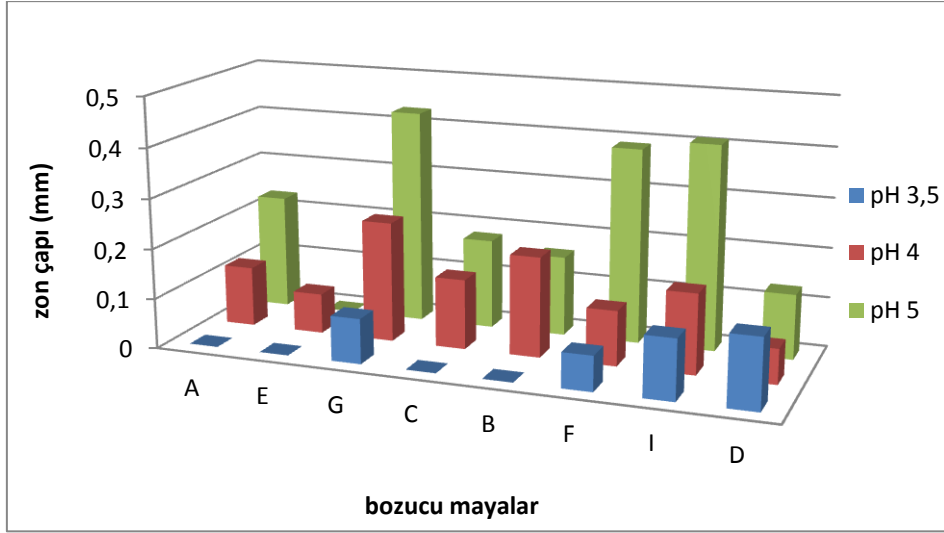
Şekil 4.2.2. *Lindnera saturnus*'un 15°C'deki bozucu mayalara etkisi [pH4 (a) ve pH 5 (b)]

Lindnera saturnus'un 25°C'de ve farklı pH değerlerinde bozucu mayalara etkisi Çizelge 4.2.2. ve Şekil 4.2.3'te görülmektedir. pH 3,5'ta *Lindnera saturnus* bazı bozucu mayalara karşı etki gösteremezken pH artışına paralel olarak bu bozuculara karşı da etki gösterdiği tespit edilmiştir. pH 4'ten pH 5'e arttırıldığında inhibisyon zonlarında genel olarak artış görülmektedir. Bir örnek haricinde *Lindnera saturnus* tarafından, tüm bozucu mayalara karşı pH 4 ve 5'te etki gösterilmiştir.

Çizelge 4.2.2. *Lindnera Saturnus*'un 25°C'deki bozucu mayalara etkisi

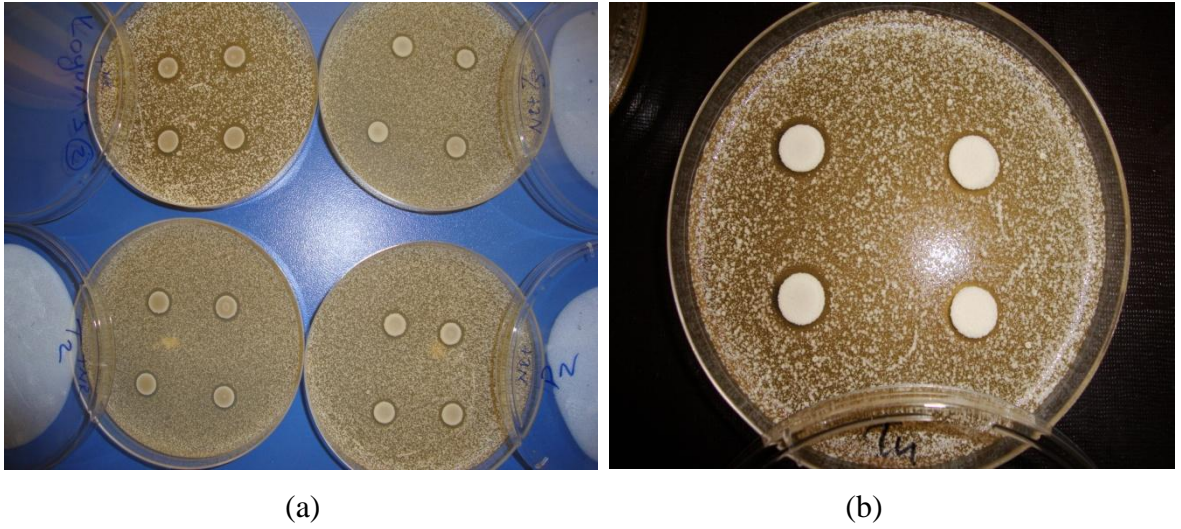
Bozucu Maya	Zon Çapı (mm)		
	pH 3,5	pH 4	pH 5
A	-	0,12	0,23
E	-	0,08	-
G	0,09	0,24	0,43
C	-	0,14	0,18
B	-	0,20	0,16
F	0,07	0,11	0,39
I	0,12	0,16	0,41
D	0,14	0,07	0,13

-Zon oluşumu gözlenmedi



Şekil 4.2.3. *Lindnera Saturnus*'un 25°C'deki bozucu mayalara etkisi

25°C sıcaklıkta pH 3,5 ta zon oluşumu pH 4 ve 5'ten daha azdır fakat Şekil 4.2.4'deki gibi pH artışıyla beraber zon oluşumlarındaki değişim açıkça görülebilmektedir.



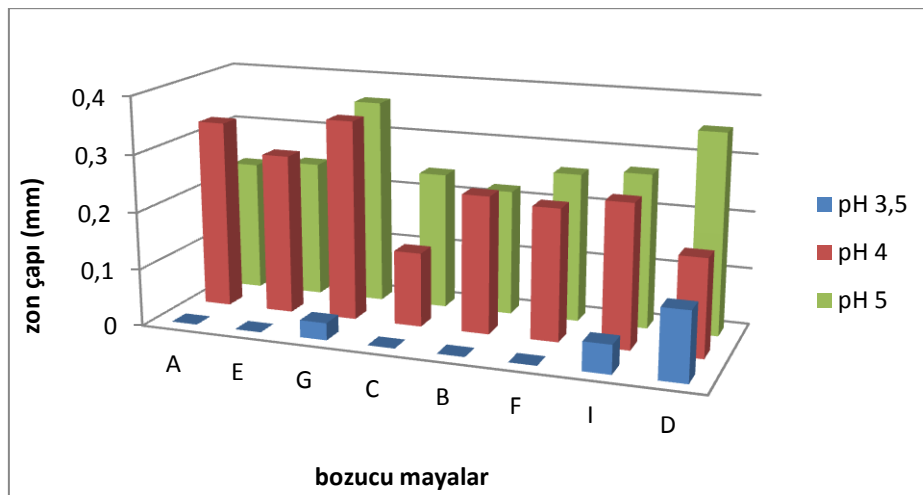
Şekil 4.2.4. *Lindnera Saturnus*'un 25°C'deki bozucu mayalara etkisi [pH 4 (a) ve pH 5 (b)]

Lindnera saturnus'un 30°C'de ve farklı pH değerlerinde bozucu mayalara etkisi Çizelge 4.2.3. ve Şekil 4.2.5.'te görülmektedir. Çeşitli bozucu mayalara karşı 3,5 pH'da aktivite tespit edilmezken pH artışı ile bu örneklere karşı da aktivite gözlemlenmiştir. İstisnalar haricinde pH artışı ile etkileşim zon çapında da artış belirlenmiştir.

Çizelge 4.2.3. *Lindnera Saturnus*'un 30°C'deki bozucu mayalara etkisi

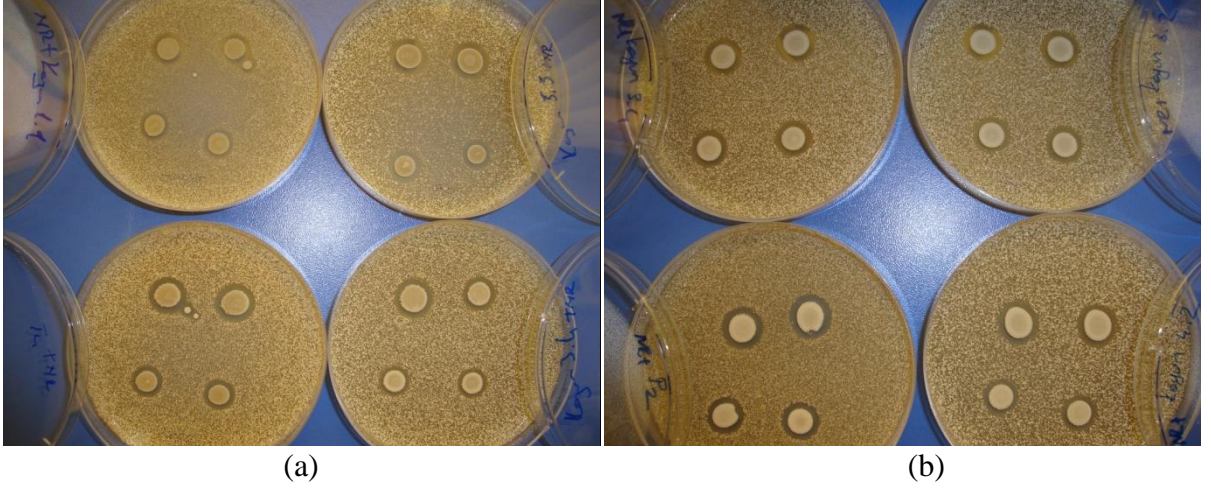
Bozucu Maya	Zon çapı (mm)		
	pH 3,5	pH 4	pH 5
A	-	0,33	0,23
E	-	0,28	0,24
G	0,03	0,35	0,36
C	-	0,13	0,24
B	-	0,24	0,22
F	-	0,23	0,26
I	0,05	0,25	0,27
D	0,12	0,17	0,35

- Zon oluşumu gözlenmedi



Şekil 4.2.5. *Lindnera Saturnus*'un 30°C'deki bozucu mayalara etkisi

Diğer sıcaklıklar için geçerli olan pH 3,5'ta etkileşim zonunun belirgin görülmemesi durumu 30°C için de geçerlidir (Şekil 4.2.6.).



Şekil 4.2.6. *Lindnera Saturnus*'un 30°C'deki bozucu mayalara etkisi [pH4 (a) ve pH 5 (b)]

4.3. *Lindnera Saturnus*'un Üzüm Suyunda Bozucu Mayalara Etkisi

İçerisine *Lindnera saturnus* ve bozucu maya ilave edilerek 25°C'de 7 gün boyunca inkübasyonu sonucu, üzüm suyunun bazı fizikokimyasal özelliklerindeki değişiklikler incelenmiş ve *Lindnera saturnus*'un bozucu mayaları inhibisyon potansiyeli belirlenmeye çalışılmıştır.

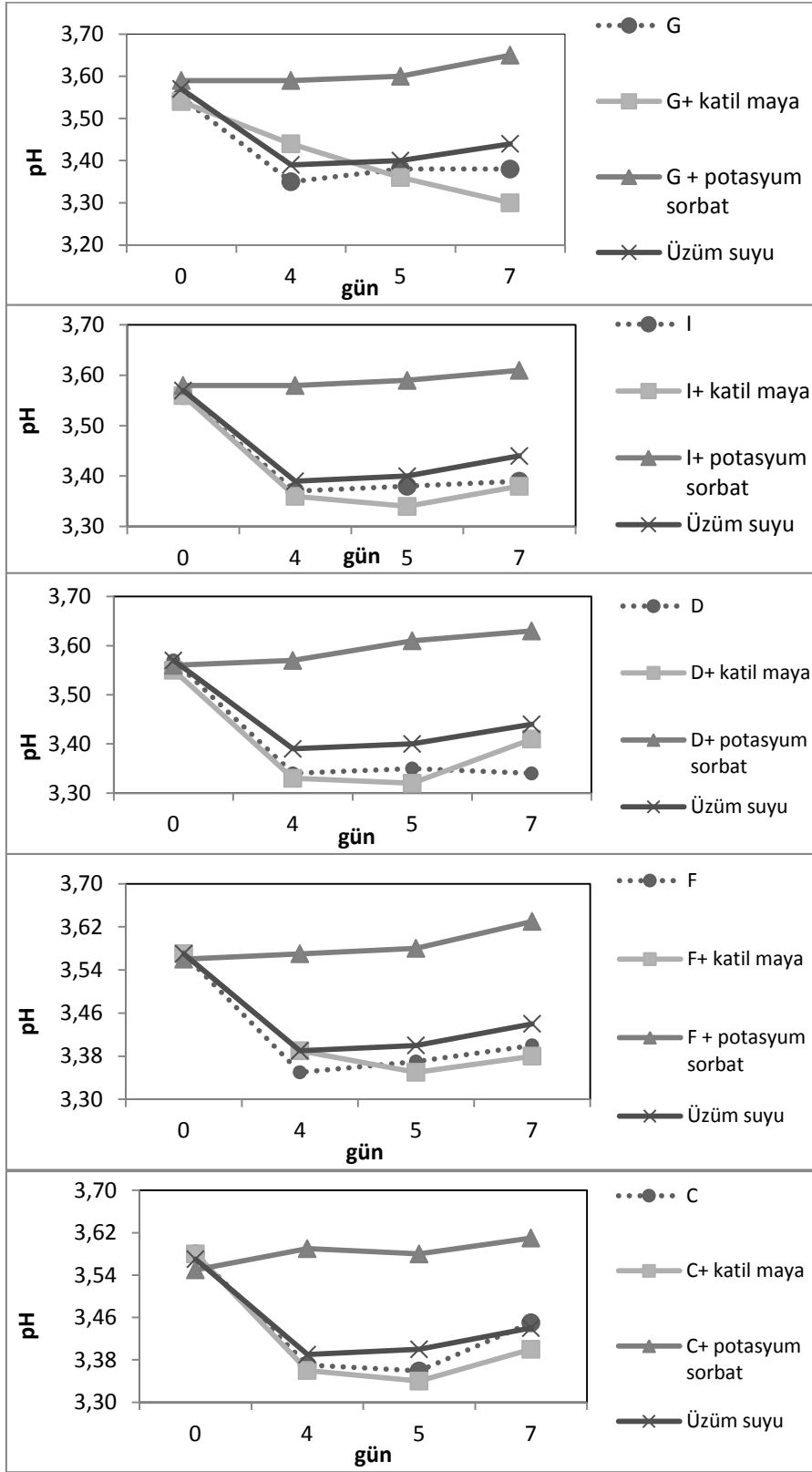
4.3.1. Üzüm Suyunun pH'sında Meydana Gelen Değişiklikler

Lindnera saturnus ve bozucu maya ilave edilmiş üzüm suyu örneklerinin pH'sında meydana gelen değişimler Çizelge 4.3.1. ve Şekil 4.3.1.'de görülmektedir. *Lindnera Saturnus* ile birlikte bozucu maya G eklenmiş üzüm suyunun pH'sı, sadece bozucu maya G'nin eklendiği üzüm suyunun pH'sından çok farklı bulunmamıştır. Buna karşılık potasyum sorbat ve bozucu maya ilave edilen üzüm suyunun pH'sı değişmemiştir. Buradan, her ne kadar *in vitro* çalışmalarda etkili olduğu belirlenmişse de, *Lindnera saturnus*'un üzüm suyu içerisinde bozucu maya G'ye karşı etkili olamadığı sonucu çıkarılabilir. Bu sonuç diğer bozucu mayalar için de hemen hemen benzerlik göstermiştir. En yüksek pH, koruyucu maddenin eklendiği örneklerde görülürken, en düşük pH *Lindnera saturnus* ve bozucu mayanın eklendiği örneklerde ölçülmüştür.

Çizelge 4.3.1. Bozucu maya ilave edilmiş üzüm suyu örneklerinin pH değişimi

Örnek	Gün			
	0.	4.	5.	7.
G	3,55	3,35	3,38	3,38
G+katil maya	3,54	3,44	3,36	3,30
G+potasyum sorbat	3,59	3,59	3,60	3,65
I	3,56	3,37	3,38	3,39
I+katil maya	3,56	3,36	3,34	3,38
I+potasyum sorbat	3,58	3,58	3,59	3,61
I	3,57	3,34	3,35	3,34
D+katil maya	3,55	3,33	3,32	3,41
D+potasyum sorbat	3,56	3,57	3,61	3,63
D	3,57	3,35	3,37	3,61
F+katil maya	3,57	3,39	3,35	3,38
F+potasyum sorbat	3,56	3,57	3,58	3,63
F	3,58	3,37	3,36	3,62
C+katil maya	3,58	3,36	3,34	3,40
C+potasyum sorbat	3,55	3,59	3,58	3,61
C	3,57	3,39	3,40	3,44
Üzüm suyu	3,55	3,35	3,38	3,38

In vitro denemelerde en fazla etkileşim saptanan bozucu maya ve *Lindnera Saturnus*'un inokülesi yapılmış çeşitli örneklerde 0, 4, 5 ve 7. günler boyunca yapılmıştır (Şekil 4.3.1).



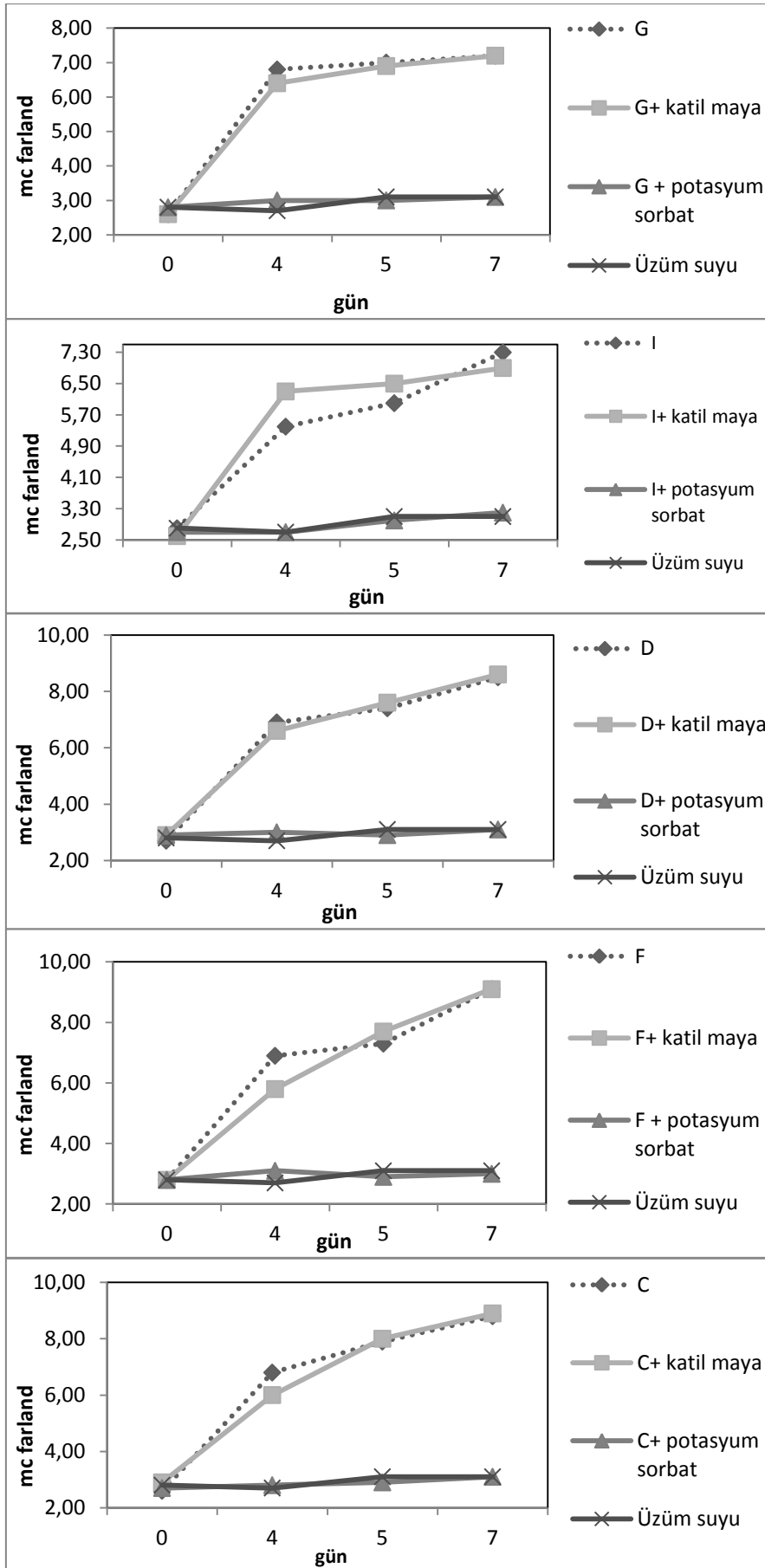
Şekil 4.3.1. Üzüm suyu örneklerinin pH değerlerindeki değişimler

4.3.2. Üzüm Suyunun Optik Yoğunluğunda Meydana Gelen Değişiklikler

Lindnera saturnus ve bozucu maya ilave edilmiş üzüm suyu örneklerinin optik yoğunluğundaki meydana gelen değişimler Çizelge 4.3.2. ve Şekil 4.3.2.'de görülmektedir. Maya gelişmesine bağlı olarak, üzüm suyunun optik yoğunluğunun değişmesi öngörülmüştür. Buna göre, potasyum sorbat ilave edilmiş ve hiç bir şey ilave edilmemiş (kontrol) üzüm sularının optik yoğunlukları değişmezken, sadece bozucu maya ve bozucu maya + katil maya ilave edilmiş üzüm suyu örneklerinin optik yoğunlukları zamana bağlı olarak aralarında önemli bir fark olmaksızın artış göstermiştir.

Çizelge 4.3.2. Bozucu maya ilave edilmiş üzüm suyu örneklerinin optik yoğunluklarındaki değişim

Örnek Adı \ Gün	0	4	5	7
G	2,60	6,80	5,20	7,20
G+katil maya	2,60	6,40	5,40	7,20
G+potasyum sorbat	2,80	3,00	3,00	3,10
I	2,80	5,40	5,30	7,30
I+katil maya	2,60	6,30	5,00	6,90
I+potasyum sorbat	2,70	2,70	3,00	3,20
I	2,70	6,90	7,40	8,50
D+katil maya	2,90	6,60	7,60	8,60
D+potasyum sorbat	2,90	3,00	2,90	3,10
D	2,80	6,90	7,30	9,10
F+katil maya	2,80	5,80	7,70	9,10
F+potasyum sorbat	2,80	3,10	2,90	3,00
F	2,60	6,80	7,90	8,80
C+katil maya	2,90	6,00	8,00	8,90
C+potasyum sorbat	2,70	2,80	2,90	3,10
C	2,80	2,70	3,10	3,10
Üzüm suyu	2,60	6,80	5,20	7,20



Şekil 4.3.2. Üzüm suyu örneklerinin optik yoğunluk değerlerindeki değişimler

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada katil mayaların bozucu mayalara karşı olası inhibisyon etkisini araştırmak ve olumlu sonuç elde edilmesi halinde endüstriyel gıda uygulamalarında kimyasal koruyucu madde yerine, katil maya kullanımı gibi bir biyolojik yolla çeşitli gıdalarda bozucu maya aktivitesinin ve buna bağlı olarak gıda bozulmalarının önlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre, *in vitro* koşullarda katil maya ve izole edilmiş bozucu mayalar üzerinde yapılan agar difüzyonu çalışmalarında, katil mayanın çoğu bozucu mayaya karşı gösterdiği aktivitenin genel olarak sıcaklık ve pH artışına paralel şekilde arttığı saptanmıştır. Ortam asitliğinin azalıp, sıcaklığın artması durumunda katil maya inhibisyon zonları daha net şekilde gözlemlenmektedir.

Gıda örneğindeki çalışmalarda ise koruyucu madde kullanımının üründeki bozucu maya gelişmesini engellemesi sebebiyle, koruyucu madde kullanılmış örneklerin pH'sının diğer örneklere nazaran daha az bir düşüş göstermesi, hatta stabil olması söz konusudur. Optik yoğunlukta da aynı şekilde, sadece meyve suyu olan ve sadece antimikrobiyal ajan eklenen örneklerin optik yoğunluğu benzer bir stabilite gösterirken, bozucu maya ve katil maya içeren örneklerde mikrobiyal gelişme görülmüştür. Ayrıca bazı denemeler için düşük sıcaklıklarda katil maya etkisinin görülmesi, düşük sıcaklıklarda bozucu maya gelişiminin zayıf oluşu sebebine bağlı olabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada *in vitro* denemelerde *Lindnera saturnus*'un bazı bozucu mayalara karşı inhibisyon etkisi pozitif olarak kanıtlanmıştır, fakat ürün çalışmalarında katil maya ile ilgili olarak spesifik bir pozitif etkiye rastlanmamıştır. Buna rağmen günümüzde katil mayalar hücre füzyon teknolojisindeki, monoklonal antikor çalışmaları ve rekombinant RNA çalışmalarındaki yeni bilimsel ilerlemeler doğrultusunda ciddi ölçüde gıdaların muhafazasında kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde, katil maya kullanımı hakkındaki çoğu örnek teorik olsa bile, katil mayaların gıda endüstrisinde koruyucu ajan veya bozulmayı inhibe eden ajan olarak kullanılmasının pratik etkinliğini kanıtlayan çeşitli araştırmalar mevcuttur. Bu açıdan bakıldığında diğer fermente gıdalarda test edilecek katil mayalar ürün için de olumlu sonuç verebilir.

6. KAYNAKLAR

- Aguiar C, Lucas C (2000). Killer sensitivity phenotypes and halotolerance. *Food Technol Biotechnology*, 38: 39–46.
- Altuntaş GE, Özçelik F (2007). Killer özellikli mayaların etki mekanizmaları ve endüstride yol açtıkları sorunlar. *Gıda*, 32:205-212.
- Arroyo-López FN, Querol A, Bautista-Gallego J, Garrido-Fernandez A (2008). Role of yeasts in table olive production. *International journal of food microbiology*, 128:189-196.
- Bevan EA, Makower M (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. *Proceedings of Eleventh International Congress of Genetics* 1:203.
- Boekhout T, Robert V (2003). *Yeasts in food, beneficial and detrimental aspects*. Behr's Verlag DE, 362-467, Hamburg.
- Breinig F, Sendezik T, Eisfeld K, Schmitt MJ (2006). Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10):3810-3815.
- Bostian KA, Hopper JE, Rogers DT, Tipper D (1980). Translational analysis of the killer-associated virus-like particle ds RNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*: M-ds RNA encodes toxin. *Cell*, 19:403–414.
- Buzzini P, Corazzi L, Turchetti B, Buratta M, Martini A (2004). Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS microbiology letters*, 238(2):359-65.
- Bussel PJ, Benner AM, Love Z, Baggott DM (1997). Cloning, sequencing and expression of a full-length cDNA copy of the M1 double-stranded RNA virus from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(9):829-836.
- Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA, Todd BEN (1997). Screening of non-*Saccharomyces* yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal Grape Wine Research*, 3:2–8.
- Ciani M (1997). Role, enological properties and potential use of non-Saccharomyces wine yeasts Volume:1, *Recent Research and Developments in Microbiology*, (Ed.): Pandalai SG Research Signpost, Trivandrium, 317–331.
- Curtis F, Torriani S, Rossi E, De Cicco V (1996). Selection and use of *Metschnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 46:45–55.
- da Silva S, Calado S, Lucas C, Aguiar C (2008). Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT. *Microbiological research*, 163(2):243-51.

- Deak T (2008). Handbook of Food Spoilage Yeasts, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, 132-134.
- Dizzy M, Bisson LF (2000). Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51:155–167.
- Feldman H (2005). Yeast Molecular Biology. Münih, http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/01%20Introduction.pdf.
- Golubev W, Shabalin Y (1994). Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiol Letters*, 119:105-10.
- Goretti M, Turchetti B, Buratta M, Branda E, Corazzi L, Vaughan-Martini A, Buzzini M (2009). In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 131:178-82.
- Goto KY, Iwase K, Kichise K, Kitano A, Totuka T, Obata, and S. Hara (1990). Isolation and properties of a chromosome-dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54:505–509.
- Gunge N (1995). Plasmid DNA and Killer Phenomenon in *Kluyveromyces*. *The Mycota II- Genetics and Biotechnology*. Ed: Kück U. Springer, Berlin, 190.
- Guriérrez AR, Epifanio S, Garijo P, Lopez R, Santamaria P (2001). Killer yeasts: incidence in the ecology of spontaneous fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52:352–356.
- Heard GM, Fleet GH (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Microbiology*, 65:23–28.
- Herring AJ, Bevan EA (1974). Virus-like Particles Associated with the Double-stranded RNA Species Found in Killer and Sensitive Strains of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Virology*, 22:387-394.
- Hernawan T, Fleet GH (1995). Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *Journal of Industrial Microbiology*, 14:440–450.
- Holland IB (1962). Further Observations on the Properties of Megacin, a Bacteriocin Formed by *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, 4:603-614.
- Izgü F, Altinbay D, Yucelis A (1997). Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiology*, 14(2):125-131.
- Izgü, F, Altinbay D, Derinel D (2004). Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*. *Food Microbiology*, 21(6):635-640.

- Jijakli HM, Lepoivre P (1998). Characterization of an Exo- β -1,3- Glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinera* on apples. *Phytopatology*, 88:335-343.
- Joshi VK, Pandey A (1999). *Biotechnology: food fermentation: microbiology, biochemistry, and technology*, Volume: 1, Educational Publishers & Distributors, New Delhi, 223.
- Kasahara S, Inoue SB, Mio T, Yamada T, Nakajima T, Ichisima E, Furuichi Y, Yamada H (1994). Involvement of cell wall beta-glucan in the action of HM-1 killer toxin. *FEBS letters*, 348(1):27-32.
- Kepekci RA (2006). Antifungal Spectrum Determination Of The K5 Type Yeast Killer Protein On Fungi Causing Spoilage In Citrus Fruits. MSci Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- Klassen R, Meinhardt F (2005). Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cellular microbiology*, 7(3):393-401.
- Kurtzman CP, Droby S (2001). *Metschnikowia fruticola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology*, 24:395–399.
- Kück U (2004). *The Mycota: Genetics and biotechnology*, Volume:2, Springer, Bochum, 211-223.
- Lee PR, Ong YL, Yu B, Curran P, Liu SQ (2010). Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *Food microbiology*, 27(7):853-61.
- Liu SQ, Tsao M (2009). Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *International journal of food microbiology*, 131(2-3):280-2.
- Magliani W, Conti S, Frazzi R, Ravanetti L, Maffei DL, Polonelli L (2005). Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. *Current molecular medicine*, 5(4):443-52.
- Magliani W, Conti S, Giovati L, Polonelli L (2010). *Toxicology and Bioweapons, Part:3, Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, Ed: Rai Mve Varma A, 275-290.
- Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti, Polonelli L (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 369–400.
- Marquina D, Barosso J, Santos A, Peinado JM (2001). Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiological research*, 156:387-391.
- Marquina D, Santos A, Peinado JM (2002). Biology of killer yeasts. *International microbiology the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 5(2):65-71.
- Masih EI, Alie I, Paul B (2000). Can the grey mould disease of the grape vine be controlled by yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 189:233-237.

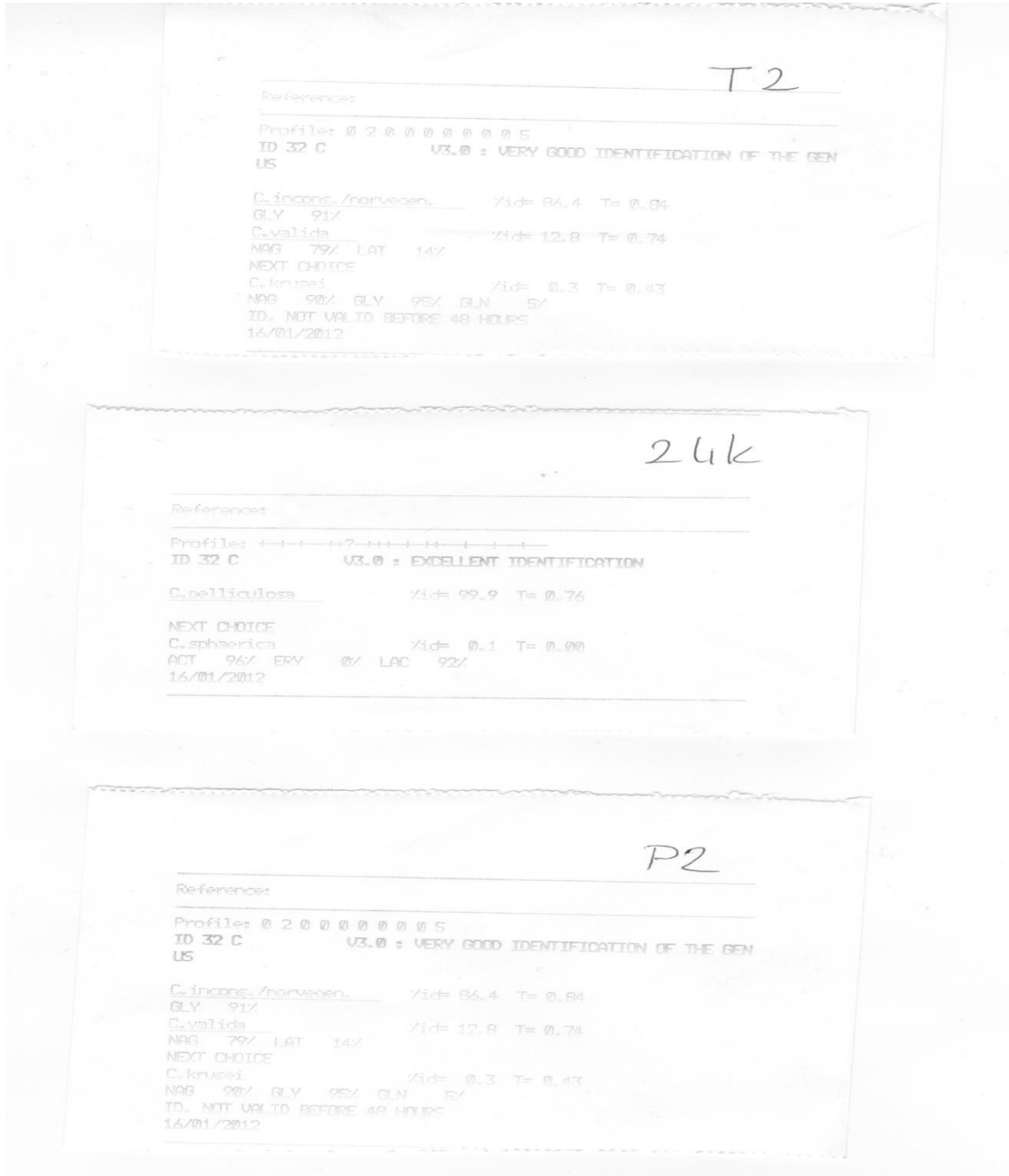
- Masih EI, Paul B (2001). Secretion of β -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the control of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology*, 44:391–395.
- Musmanno RA, Maggio T, Coratza G (1999) Studies on strong and weak killer phenotypes of wine yeasts: production, activity of toxin in must, and its effect in mixed culture fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 87:932–938.
- Niwa O, Sakaguchi K, Gunge N (1981). Curing of the killer deoxyribonucleic acid plasmids of *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 148(3):988-990.
- Nunes C, Usall J, Teixido N, Torres R, Vinas I (2002). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. *Journal of Food Protect*, 65:178–184.
- Ochigava I, Collier PJ, Walker GM, Hakenbeck R (2010). *Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3):559-566.
- Olstorpe M, Passoth V (2010). *Pichia anomala* in grain biopreservation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99:57-62.
- Pasteur L, Joubert JF (1877). Charbon and septicemie. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, Paris*, 85:101–115
- Palpacelli V, Ciani M, Rosini G (1991). Activity of different “killer” yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiology Letters*, 84:78-75.
- Petering JE, Henschke PA, Langridge P (1991). The *Escherichia coli* β -Glucuronidase Gene as a Marker for *Saccharomyces* Yeast Strain Identification. *American journal of enology and Viticulture*, 42:6-12.
- Paterson AH, Tanksley SD ve Sorrells ME (1991). DNA markers in plant improvement, *Advances in Agronomy*, 46:39-90.
- Pfeiffer P, Radler F (1984). Comparison on the killer toxin of several yeasts and purification of a toxin of type K2. *Archives Microbiology*, 137:357-361.
- Pfeiffer I, Gyantar M, Kucsera J, Parducz A (1998). Isolation of dsRNA-associated VLPs from the strain *Cryptococcus hungaricus* CBS 6569. *FEMS microbiology letters*, 162:151-4.
- Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Campani L, Mantovani Mp, Morace G (1990). Production of yeast killer toxin in experimentally infected animals. *Mycopathologia*, 110:169-75.
- Puchkov EO, Yurkova TV, Golubev WI (1998). Effects of *Cryptococcus humicola* killer toxin upon *Cryptococcus terreus* envelope: combined fluorometric and microscopic studies. *Biochimica et biophysica acta*, 1381:61-7.

- Querol A, Fleet GH (2006). The Yeast Handbook, Volume:2, Yeasts in Food and Beverages, Springer, Heidelberg, 6-90.
- Rai M, Varma A (2010). Mycotoxin in Food, Feed and Bioweapons, Springer, Heidelberg, 275-277.
- Rosini G (1987). Killer character in *Kluyveromyces yeasts*: Activity on *Kloeckera apiculata*. FEMS Microbiology Letters, 44:81-84.
- Santos A, Sanchez A, Marquina D (2004). Yeasts as biological agents to control. Microbiological Research, 159:331-338.
- Santos A, Navascues E, Bravo E, Marquina D (2010). Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. International Journal of Food Microbiology, 145:147-154
- Schmitt, MJ, Reiter J (2008). Viral induced yeast apoptosis. Biochimica et biophysica acta, 1783:1413-1417.
- Schmitt MJ, Breinig F (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application, FEMS Microbiology Reviews, 26:257-276.
- Stark MJR, Boyd A (1986). The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. EMBO Journal, 5:1995 -2002.
- Tavantzis SM (2002). dsRNA genetic elements: concepts and applications in agriculture, forestry and medicine, CRC Press, Boca Raton, 109-111.
- Tipper DJ, Bostian KA (1984). dsRNA killer systems in yeast. Journal of Microbiology, 48:125-56.
- Vinas I, Usall J, Teixido N, Sanchis V (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. International Journal of Food Microbiology, 40:9-16.
- Vullo DL, Wachsmann MB (2005). A simple laboratory exercise for ethanol production by immobilized bakery yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), Journal of Food Science Education, 4: 53-55.
- Walker GM, McLeod, AH, Hodgson VJ (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. FEMS Microbiology Letters, 127:213-222.
- Weiler F, Schmitt MJ (2003). Zygoicin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* and its effect on sensitive fungal cells. FEMS yeast research, 3:69-76.
- Wesolowski M, Algeri A, Goffrini P, Fukuhara H (1982). Killer DNA Plasmids of the Yeast *Kluyveromyces lactis*. Current Genetics, 5:191-197.

- Wickner RB (1974). Chromosomal and nonchromosomal mutations affecting the "killer character" of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 76(3):423-432
- Wickner RB, Bussey H, Fujimura T, Esteban R (1995). Viral RNA and Killer Phenomenon of *Saccharomyces*, *The Mycota II- Genetics and Biotechnology*, Ed: Kück U. Springer, Berlin, 219.
- Woods DR, Bevan EA (1968). Studies on the Nature of the Killer Factor Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 51(1):115-126.
- Yamamoto T, Imai M, Tachibana K, Mayumi M (1986). Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. *FEBS letters*, 195:253-7.
- Yener B (2006). Determination of antimicrobial spectrum of k9 type yeast killer toxin and its cell killing activity. MSci Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü, ODTU, Ankara.
- Young TW, Yagiu M (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 44:59-77.
- Zsolt J (1957). A new yeast: *Dioszegia hungarica* nova genus et speices. *Botanikai Közl.* 47:65-66

EKLER

EK 1. API ID 32 C test sonuçları



Peynir, turşu ve zeytin suyundan izole edilen mayaların API ID 32 C tanımlama sonuçları

ÖZGEÇMİŞ

26 Ocak 1987 tarihinde Düzce’de doğdu. Lise öğrenimini 2005 yılında Seyhan Rotary Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2005 yılında Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde başladığı öğrenimini 2009 yılında bitirdi. Aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2010 yılında 6 ay süre ile Almanya’ da Rheinische Friedrich Wilhelms Universität Bonn’ da Erasmus Öğrenci Değişimi Programı’ nı tamamladı.