

***Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* İÇEREN SIRALI FERMANTASYONDA
KARIŞIK BAŞLANGIÇ KÜLTÜRÜNÜN
KULLANILMASINA YÖNELİK TRANSKRİPSİYONEL
YANIT**

**TRANSCRIPTIONAL RESPONSE TO USING MIXED
STARTER CULTURE DURING THE SEQUENTIAL
FERMENTATION INVOLVING *Saccharomyces
cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima***

ELİF BİRCAN MUYANLI

PROF. DR. REMZİYE YILMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

***Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* İÇEREN SIRALI FERMANTASYONDA KARIŞIK BAŞLANGIÇ KÜLTÜRÜNÜN KULLANILMASINA YÖNELİK TRANSKRİPSİYONEL YANIT**

Elif Bircan MUYANLI

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Mayıs 2022, 165 sayfa

Maya, tarih boyunca insanoğlunun temel gıdalarının üretiminde rol almıştır. Bilimin ve teknolojinin gelişmesi ile mayalar hakkında edinilen bilgi her geçen gün artmıştır. Günümüzde maya fermantasyonunda karşılaşılan sorunlar genom bazında çalışmalar, doğru maya seçimi ve kullanımı ile çözülebilmektedir. Fermantasyon sanayisinde karşılaşılan güncel sorunlardan biri küresel ısınma ve çevresel koşulların değişmesinden dolayı nihai ürünlerdeki yüksek alkol seviyesidir. Ayrıca fermantasyon sanayisi, başlangıç kültür kombinasyonu, suş değişimi gibi minimum değişiklikle nihai üründe ulusal ve uluslararası pazarda fark yaratma arayışındadır. Bu nedenle, *Saccharomyces* olmayan mayaların, kaliteli şarap üretimi için fermantasyonda kullanımı son yıllarda daha da yaygın

hale gelmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces* olmayan mayalar karışık kültür olarak kullanıldığında maya-maya karmaşık etkileşimlerin gerçekleştiği ve bunun sonucunda *Saccharomyces cerevisiae*'nin metabolizmasında önemli farklılıklar olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.

Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının sıralı fermantasyonunda meydana gelen maya-maya etkileşimlerin transkriptomik seviyede incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma iki kısımdan oluşacak şekilde planlanmıştır. Birinci kısım, ısı stresinin Ehrlich yolağında yer alan aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin ekspresyon profili üzerindeki etkilerini anlamayı hedeflemiştir. Bu hedef doğrultusunda, açık kaynaklı mikrodizi verisi kullanılarak ısı stresine karşı yerel maya suşundaki aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin (Ehrlich yolak genleri) ekspresyon profili ilk kez bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında ise sıralı karışık başlangıç kültürü (*Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae*) kullanılan alkol fermantasyonu sırasında aromatik bileşik sentezinde yer alan seçilen *ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5* genlerinin transkripsiyonel yanıtının izlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Araştırma Laboratuvarı Kültür Bankası'nda yer alan ve Anadolu'nun farklı bölgelerinden izole edilmiş, önceki çalışmalarda tanımlanmış 16 adet *Saccharomyces cerevisiae* ve 6 adet *Metschnikowia pulcherrima* suşu kullanılmıştır. Şarap fermantasyon ortamına benzer olması nedeni ile bütün canlandırma ve fermantasyon denemeleri üzüm suyunda gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR uygulamaları gerçekleştirilerek *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının açık kaynaklı mikrodizi verilerine göre seçilen alkol dehidrogenaz II ve V (*ADH2*, *ADH5*) gen ifade düzeyi ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının aromatik aminotransferaz I ve II (*ARO8*, *ARO9*) gen ifade düzeyi belirlenmiştir. Daha sonra, farklı koşullardaki ve fermantasyon ortamındaki gelişimlerini incelemek için *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının teknolojik özellikleri incelenmiştir. Gen ifade düzeyine ve

teknolojik özelliklerine göre seçilen suşlardan, *S. cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* suşlarını içeren sıralı karışık kültür kombinasyonları oluşturulmuştur. Transkriptom düzeyinde fermantasyon sürecini izlemek amacı ile fermantasyonun 1. 3. 5. ve 7. gününde alınan örneklerden RNA izolasyonu ve RT-qPCR ile gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sırasında günlük olarak briks, alkol ve pH ölçümü yapılarak fermantasyon süreci biyokimyasal olarak da izlenmiştir.

Çalışmanın sonucunda, *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarındaki maya-maya etkileşimlerinin aromatik bileşik sentezinde rol alan genlerin ekspresyon seviyesinde değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışma, düşük alkollü nihai ürün eldesinin *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür kullanımı ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Sıralı karışık kültür kullanımı ile fermantasyon boyunca ölçülen ortalama alkol miktarının yaklaşık yüzde 30 düştüğü tespit edilmiştir. Burada gerçekleştirilen çalışma sonucunda orijinal/yerel kaynaklardan izole edilen ve tanımlanan bir adet *Saccharomyces cerevisiae* ve bir adet *Metschnikowia pulcherrima* suşunun kombinasyonu, fermantasyon sanayisinde kullanılmak üzere, başlangıç (starter) kültür kombinasyonu olarak önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, Ehrlich Yolağı, RT-qPCR

ABSTRACT

TRANSCRIPTIONAL RESPONSE TO USING MIXED STARTER CULTURE DURING THE SEQUENTIAL FERMENTATION INVOLVING *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima*

Elif Bircan MUYANLI

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

May 2022, 165 pages

Yeast has played a role in the production of basic foods for mankind throughout history. With the development of science and technology, the knowledge about yeasts has increased day by day. Today, problems encountered in yeast fermentation can be solved by genome-based studies, correct yeast selection and use. One of the current problems faced in the fermentation industry is the high alcohol level in the final product due to global warming and changing environmental conditions. In addition, the fermentation industry seeks to make a difference in the final product in the national and international market with minimum changes such as combinations and strain changes in the starter culture. Therefore, the use of non-*Saccharomyces* yeasts in fermentation for high quality

wine production has become more common in recent years. Many studies have shown that complex yeast-yeast interactions occur when *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts are used as mixed cultures, resulting in significant differences in the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*.

This study aims to investigate the interactions occurring in the sequential fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima* strains at the transcriptomic level. For this purpose, the study is to consist of two parts. The first part intends to understand the effects of heat stress on the expression profile of genes involved in aromatic compound synthesis in the Ehrlich pathway. With this purpose, the expression profile of the aromatic compound synthesis-related genes (Ehrlich pathway genes) in the local yeast strain against heat stress, is investigated for the first time within the scope of this thesis, using the open source microarray data. The second part of the study, focuses on monitoring the transcriptional response of selected *ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5* genes involved in aromatic compound synthesis during alcohol fermentation using sequential mixed starter culture (*Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae*).

In the study, 16 *Saccharomyces cerevisiae* and 6 *Metschnikowia pulcherrima* strains isolated from different regions of Anatolia and identified in previous studies have been used in Hacettepe University FoodOmics Research Laboratory Culture Bank. Since it is similar to the wine fermentation medium, all resuscitation and fermentation experiments have been carried out in grape juice. *ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5* genes to be used in the study have been selected according to open source microarray data. RNA isolation, Reverse Transcription and RT-qPCR applications of the *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima* strains have been carried out. Alcohol dehydrogenase II and V (*ADH2*, *ADH5*) and aromatic aminotransferase I and II (*ARO8*, *ARO9*) gene expression levels of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima* strains have been determined. Then, the technological properties of all *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima* strains selected

according to these gene expression levels have been investigated. *S. cerevisiae* pure culture and sequential mixed culture containing *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* strains have been created from the strains selected according to their gene expression level and technological characteristics. In order to monitor the fermentation process at the transcriptome level, RNA isolation and Reverse Transcription-qPCR have been carried out for gene expression analyzes from the samples taken on the 1st, 3rd, 5th and 7th days of fermentation. During the fermentation, daily brix, alcohol and pH measurements have been made and the fermentation process has also been monitored biochemically.

As a result, the study, has found out that the use of *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sequential mixed culture caused changes in the expression level of genes involved in aromatic compound synthesis. The study also shows that low alcohol end product yield is closely related to the use of sequential mixed culture *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae*. It has been determined that the average amount of alcohol measured during fermentation was reduced by about 30 percent with the use of sequential mixed cultures. The combination of one *Saccharomyces cerevisiae* and one *Metschnikowia pulcherrima* strain isolated and identified from original/local sources as a result of the study performed here is recommended as a starter culture combination for use in the fermentation industry.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, Ehrlich Pathway, RT-qPCR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini bana aktararak kendime özgü hem akademik hem de kişisel bakış açısı kazanmamı sağlayan, her daim desteğini hissettiğim, ileride olmak istediğim bilim insanı portföyü hakkında bana ilham veren, öğrencisi olarak onu temsil etmekten onur ve mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Remziye YILMAZ'a ve hayata, bilime bakış açısı ile ufkumu açan, işine gösterdiği saygı ve sevgisi ile yüksek lisans eğitimine başlama kararı almamda ilk etmen olan, kısa sürede çok şey öğrendiğim değerli hocam Prof. Dr. Yaşar Kemal ERDEM'e,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca gösterdikleri özveri ve teknik destekten dolayı Uz. Meltem YILDIRIM, Uz. Yelda ZENCİR'e, Humen CEBBARİ başta olmak üzere BMLab çalışanlarına ve tez çalışmama ait deney materyali olan üzüm sularını sağlayan Kavaklıdere Şarapları A.Ş.'ye,

Verdikleri manevi destek ve bilgilerle yüksek lisans eğitim hayatımı kolaylaştıran, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum FoodOmics Laboratuvar çalışanları değerli arkadaşlarım, Ayşegül Bilge UĞUZ, Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI, Sena ÇAKIR, Yeşim TAŞKIN, Muhammad Usman AKRAM'a, her daim bana inanan ve yanımda olan canım arkadaşlarım Bilgenur AYDIN, Tuğçe GÜRBÜZ, Nurcihan GEÇEN ve Meliha Cemre SARIİŞİK'a,

Varlıkları ile güç bulduğum, bugüne gelmem için yaptıkları fedakarlıkları asla ödeyemesem de onları gururlandırmak için durmadan çalışacağım canım aile üyelerim babam Şener MUYANLI, annem Nurcan MUYANLI ve kardeşim Özgecan MUYANLI'ya ve manevi yönden ikinci ailem gibi hissettiren, destek, ilgi ve alakalarını hiçbir zaman eksik etmeyen AYDIN ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif Bircan MUYANLI

Mayıs 2022, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Morfolojisi ve Hücre Yapısı	5
2.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Üreme Özellikleri	6
2.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Gelişimi İçin Fiziksel Gereksinimler ...	6
2.1.3.1. Sıcaklık	6
2.1.3.2. Su	7
2.1.3.3. pH	7
2.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	8
2.2.1. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 'nin Morfolojisi	9
2.2.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 'nin Fizyolojik Özellikleri	9
2.2.2.1. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 'nin Duyarlılığı	9
2.2.2.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 'nin Antimikrobiyal Aktivesi	12
2.3. Mayada Aromatik Bileşenlerin Oluşmasında Etkili Genler	13
2.4. Karışık Kültür Fermantasyonu	22
2.5. Transkriptomik Analizler ve Mikrodizi	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	30
3.1. Materyal ve Metot	30
3.1.1. Materyal	30
3.1.1.1. Kimyasal ve Besiyeri	30

3.1.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Metschnikowia pulcherrima</i> Suşları	30
3.1.1.3. Mikrodizi Veri Eldesi	32
3.1.1.4. Primerler	33
3.1.2. Metot	33
3.1.2.1. Mikrodizi Verilerinin Analizi	34
3.1.2.2. Suşların Canlandırılması ve Tanımlamanın Doğrulaması	36
3.1.2.3. Fermantasyon Aşaması için Suş Seçimi	37
3.1.2.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suş Seçimi	38
3.1.2.3.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> Suş Seçimi	43
3.1.2.3.3. Teknolojik Özelliklerin Belirlenmesi	44
3.1.2.4. Fermantasyon	49
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	55
4.1. Mikrodizi Verilerinin Analizi	55
4.2. Suşların Canlandırılması ve Tanımlamanın Doğrulaması	58
4.3. Fermantasyon Aşaması için Suş Seçimi	62
4.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suş Seçimi	63
4.3.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşlarının RNA İzolasyonu	63
4.3.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşlarının Ters transkripsiyonu (cDNA Sentezi)	65
4.3.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşlarının RT-qPCR ile Gen İfade Analizi	67
4.3.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> Suş Seçimi	78
4.3.2.1. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> Suşlarının RNA İzolasyonu	78
4.3.2.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> Suşlarının Ters transkripsiyonu (cDNA Sentezi)	80
4.3.2.3. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> Suşlarının RT-qPCR ile Gen İfade Analizi	82
4.3.3 Teknolojik Özelliklerin Belirlenmesi	88
4.4. Fermantasyon Aşaması için Seçilen Suşlar	94
4.5. Fermantasyon	95
4.5.1. Fermantasyon Sürecinin Transkriptomik Analizi	95

4.5.1.1. Fermantasyon Kùltürlerinin RNA İzolasyonu	95
4.5.1.2. Fermantasyon Kùltürlerinin Ters transkripsiyonu (cDNA Sentezi)	98
4.5.1.3. Fermantasyon Kùltürlerinin RT-qPCR ile Gen İfade Analizi	101
4.5.2. Fermantasyon Takibi	114
5. YORUM	120
6. KAYNAKLAR	124
EKLER	133
EK 1 - Açık kaynaklı mikrodizi verileri	133
EK 2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi Analizi	152
EK 3 - Briks ölçümü sonucu elde edilen çizgi grafiklerinin denklem ve eğim hesabı	155
EK 4 - <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının RT-qPCR ile <i>ARO8</i> , <i>ARO9</i> gen ifade analizi	156
EK 5 - RT-qPCR ile gen ifade analizi sonuçları	157
EK 6 - Fermantasyon Takibi Sonuçları	159
EK 7 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	161
EK 8 - Tez Çalışması Orjinallik Rapor	164

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Metschnikowia pulcherrima</i> mayalarının makroskopik ve mikroskopik morfoloji görüntüleri (Makroskopik morfoloji görüntüleri bu tez çalışmasından elde edilmiştir) [25, 33].....	12
Şekil 2.2. Maya metabolizmasındaki Ehrlich yolağı	15
Şekil 2.3. Triptofanın degradasyonunda yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I, aromatik amino asit aminotransferaz II, alkol dehidrojenaz II ve alkol dehidrojenaz V [51].....	16
Şekil 2.4. Tirozin degradasyonunda yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I, aromatik amino asit aminotransferaz II, alkol dehidrojenaz II ve alkol dehidrojenaz V [52].....	16
Şekil 2.5. Fenilalanin degradasyonunda yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I, aromatik amino asit aminotransferaz II, alkol dehidrojenaz II ve alkol dehidrojenaz V [53].....	17
Şekil 2.6. Tirozin biyosentezinde yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I ve aromatik amino asit aminotransferaz II [54]	17
Şekil 2.7. Fenilalanin biyosentezinde yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I ve aromatik amino asit aminotransferaz II [55]	18
Şekil 2.8. Metiyonin eldesinde yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I ve aromatik amino asit aminotransferaz II [56].....	19
Şekil 2.9. Etanol degradasyonunda yer alan alkol dehidrojenaz II [57]	19
Şekil 2.10. Glikoz fermantasyonunun süper yolağında yer alan alkol dehidrojenaz II ve alkol dehidrojenaz V [58].....	20
Şekil 3.1. Metot akış şeması	34
Şekil 3.2. Stok kültür eldesi.....	37
Şekil 3.3. Suşların canlandırılması.....	37
Şekil 3.4. RNA izolasyonu.....	39
Şekil 3.5. RNA izolasyonu protokolü	40
Şekil 3.6. cDNA sentezi	42
Şekil 3.7. RT-qPCR ile gen ifade analizi	43
Şekil 3.8. Teknolojik özelliklerin belirlenmesi	45

Şekil 3.9. Alkol ölçümü	46
Şekil 3.10. Briks ölçümü	47
Şekil 3.11. pH ölçümü.....	47
Şekil 3.12. Köpük oluşumu	48
Şekil 3.13. Fermantasyon deney tasarımı	51
Şekil 3.14. Fermantasyon örneklerinin deneysel tasarımı	51
Şekil 4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının makroskopik görüntüsü (28°C'de 3 gün inkübasyon)	59
Şekil 4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 'nın mikroskopik görüntüsü	61
Şekil 4.3. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının makroskopik görüntüsü (28°C'de 3 gün inkübasyon)	61
Şekil 4.4. Şekil A: <i>Metschnikowia pulcherrima</i> ve <i>Saccharomyces cerevisiae</i> koloni renk karşılaştırması. Şekil B: <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarında kırmızı-kahverengi renkli pigment oluşumu (28°C'de 3 gün inkübasyon) ..	62
Şekil 4.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suş seçimi	63
Şekil 4.6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının fermantasyon takibi	90
Şekil 5.1. Maya metabolizmasındaki Ehrlich yolağının transkripsiyonel düzeyde izlenmesi	122

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Metschnikowia pulcherrima</i> mayalarının özellikleri [25, 33]	11
Çizelge 2.2. <i>ARO8</i> , <i>ARO9</i> , <i>ADH2</i> ve <i>ADH5</i> gen özellikleri [59-62]	21
Çizelge 3.1. FoodOmics araştırma laboratuvarında bulunan <i>S. cerevisiae</i> referans suşu	30
Çizelge 3.2. FoodOmics araştırma laboratuvarında bulunan <i>M. pulcherrima</i> suşları	31
Çizelge 3.3. FoodOmics araştırma laboratuvarında bulunan <i>S. cerevisiae</i> suşları	32
Çizelge 3.4. Primerlerin ID numaraları, sekansları	33
Çizelge 3.5. cDNA sentez bileşenleri ve miktarları I	41
Çizelge 3.6. cDNA sentez bileşenleri ve miktarları II	41
Çizelge 3.7. RT-qPCR protokolü.....	42
Çizelge 4.1. Mikrodizi veri analizi sonucuna göre, Ehrlich yolağında rol alan genlerin ısı stresi öncesi ve sonrasındaki gen ekspresyonlarındaki değişim	57
Çizelge 4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının gelişme özellikleri ve makroskopik, mikroskopik morfolojileri	58
Çizelge 4.3. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının gelişme özellikleri ve makroskopik, mikroskopik morfolojileri	60
Çizelge 4.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının RNA izolasyon sonuçları ..	64
Çizelge 4.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının ters transkripsiyon sonuçları	66
Çizelge 4.6. <i>ARO8</i> geninin standart eğrisi	68
Çizelge 4.7. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının <i>ARO8</i> geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması.....	69
Çizelge 4.8. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının logaritmik <i>ARO8</i> gen ifade düzeyi	69
Çizelge 4.9. <i>ARO9</i> geninin standart eğrisi	70
Çizelge 4.10. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının <i>ARO9</i> geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması.....	71

Çizelge 4.11. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının logaritmik <i>ARO9</i> gen ifade düzeyi	72
Çizelge 4.12. <i>ADH2</i> geninin standart eğrisi	73
Çizelge 4.13. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının <i>ADH2</i> geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması	74
Çizelge 4.14. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının logaritmik <i>ADH2</i> gen ifade düzeyi	74
Çizelge 4.15. <i>ADH5</i> geninin standart eğrisi	76
Çizelge 4.16. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının <i>ADH5</i> geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması	77
Çizelge 4.17. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının logaritmik <i>ADH5</i> gen ifade düzeyi	77
Çizelge 4.18. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının RNA izolasyon sonuçları	79
Çizelge 4.19. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının ters transkripsiyon sonuçları	81
Çizelge 4.20. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının <i>ADH2</i> geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması	83
Çizelge 4.21. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının logaritmik <i>ADH2</i> gen ifade düzeyi	84
Çizelge 4.22. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının <i>ADH5</i> geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması	85
Çizelge 4.23. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının logaritmik <i>ADH5</i> gen ifade düzeyi	86
Çizelge 4.24. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc) ve <i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Mp) suşlarının teknolojik özellikleri	88
Çizelge 4.25. Fermantasyon sırasında <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının % briks değişimi*	92
Çizelge 4.26. Fermantasyon aşaması için seçilen suşlar	94
Çizelge 4.27. RNA izolasyon sonuçları	97
Çizelge 4.28. Fermantasyon kültürlerinin ters transkripsiyon sonuçları	100
Çizelge 4.29. Fermantasyon kültürlerinin <i>ARO8</i> , <i>ARO9</i> , <i>ADH2</i> , <i>ADH5</i> genleri için fermantasyon sırasında ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması*	103

Çizelge 4.30. Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin <i>ARO8</i> gen ifade düzeyindeki değişimi*	105
Çizelge 4.31. Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin <i>ARO9</i> gen ifade düzeyindeki değişimi*	107
Çizelge 4.32. Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin <i>ADH2</i> gen ifade düzeyindeki değişimi*	109
Çizelge 4.33. Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin <i>ADH5</i> gen ifade düzeyindeki değişimi*	111
Çizelge 4.34. Fermantasyon sırasında alınan örneklerin <i>ARO8</i> , <i>ARO9</i> , <i>ADH2</i> ve <i>ADH5</i> gen ifade düzeylerindeki değişimi*	113
Çizelge 4.35. Fermantasyon sırasındaki şeker tüketimi*	115
Çizelge 4.36. Fermantasyon sırasındaki alkol üretimi*	117
Çizelge 4.37. Fermantasyon sırasındaki pH değişimi*	119

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mp	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Ψ_w	Su potansiyeli
mg	Miligram
ng	Nanogram
kob	Koloni oluşturan birim
μm	Mikrometre
mL	Mililitre
μl	Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
Ct (Cq)	Eşik Döngüsü

Kısaltmalar

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>M. pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
RNA	Ribonükleik asit
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	Revers-Transkriptaz Kuantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
H ₂ S	Hidrojen sülfür
SO ₂	Kükürt dioksit
CO ₂	Karbondioksit

H ₂ O	Dihidrojen monoksit, su
H ⁺	Hidrojen iyonu
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	İndirgenmiş NAD ⁺
NAD ⁺	Yükseltgenmiş NADH
NaOH	Sodyum hidroksit
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
YPD	Maya Özü–Pepton–Dekstroz
GC/MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

1. GİRİŞ

M.Ö. 8000'li yıllardan bugüne kadar Anadolu, insanoğlunun hayatında bulunan en eski mikroorganizmalardan biri olan *Saccharomyces cerevisiae* için elverişli olmuştur. Eski çağlarda yaşayan insanlar temel gıdalarını üretirken *Saccharomyces cerevisiae* ve onun fermantasyon yeteneğinden faydalanmışlardır. Günümüzde ise bilim ve teknolojiye dayanarak bu fermantasyon mekanizmasını iyileştirmek, ürün çeşitliliğini, kalitesini, verimini arttırmak, fermantasyon sanayisinde yaşanan sorunlara çözüm bulmak mümkündür. Fermantasyon sanayinin küresel ısınma ve gün geçtikçe kötüleşen çevre koşullarının negatif etkilerini azaltmaya yönelik sıralı karışık kültür kullanımıdır. Fermantasyon ortamında doğal olarak bulunan *Metschnikowia pulcherrima* mayalarının, *Saccharomyces cerevisiae* ile sıralı karışık fermantasyonunda aromatik bileşiklerin salınımını arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca bu mikroorganizmanın etanol içeriğinin düşürülmesine yardımcı olabilecek bir solunum metabolizmasına sahip olduğu için *Saccharomyces cerevisiae* ile sıralı karışık fermantasyonunda faydalı etkileşimler meydana getirebilir.

Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının sıralı fermantasyonunda meydana gelen etkileşimlerin transkriptomik seviyede incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma iki kısımdan oluşacak şekilde planlanmıştır. Birinci kısım, ısı stresinin Ehrlich yolağında yer alan aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin ekspresyon profili üzerindeki etkilerini anlamayı hedeflemektedir. Buradan elde edilen sonuçlar değerlendirilerek seçilen aromatik bileşik sentezinde yer alan bazı genlerin transkripsiyonel yanıtını alkol fermantasyonunda sıralı karışık başlangıç kültürü olarak kullanıldığı durumda ölçmek ve karşılaştırmak ise ikinci kısımda hedeflenmiştir. Çalışmada Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Araştırma Laboratuvarı Kültür Bankası'nda yer alan ve Anadolu'nun farklı bölgelerinden izole edilmiş, önceki çalışmalarda tanımlanmış 16 adet *Saccharomyces cerevisiae* ve 6 adet *Metschnikowia pulcherrima* suşu kullanılmıştır. Şarap fermantasyon ortamına benzer olması nedeni ile bütün canlandırma ve fermantasyon denemeleri üzüm suyunda

gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR uygulamaları gerçekleştirilerek *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının açık kaynaklı mikrodizi verilerine göre seçilen alkol dehidrogenaz II ve V (*ADH2*, *ADH5*) gen ifade düzeyi ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının aromatik aminotransferaz I ve II (*ARO8*, *ARO9*) gen ifade düzeyi belirlenmiştir. Daha sonra, *Metschnikowia pulcherrima* suşları ile, gen ifade düzeylerine göre seçilen *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının teknolojik özellikleri incelenmiştir. Gen ifade düzeyine ve teknolojik özelliklerine göre seçilen suşlardan, *S. cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* suşlarını içeren sıralı karışık kültür kombinasyonları oluşturulmuştur. Transkriptom düzeyinde fermantasyon sürecini izlemek amacı ile fermantasyonun 1. 3. 5. ve 7. gününde alınan örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR ile gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, kontrollü sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasında *S. cerevisiae* metabolizmasındaki Ehrlich yolağında yer alan enzimleri kodlayan genlerin (*ADH2*, *ADH5*, *ARO8*, *ARO9*) gen ifade düzeyini incelemektir. Tez çalışmasında incelenecek genlerin seçimi için [E-MTAB-3459](#) aksesyon numaralı açık kaynaklı mikrodizi verisi kullanılarak ısı stresine karşı yerel maya suşundaki aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin (Ehrlich yolak genleri) ekspresyon profili ilk kez bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir.

Bu çalışma, *M. pulcherrima* ve *S. cerevisiae* maya-maya etkileşimini transkripsiyonel düzeyde araştırmaya yönelik önemli bir girişimdir. Çalışmanın sonucunda, *M. pulcherrima* + *S. cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonunda *M. pulcherrima* varlığının, aromatik bileşik sentezinde rol alan genlerin ifade düzeyini ve alkol üretimini nasıl etkilediğine ilişkin ipuçları sağlanabilir. Bilimsel olarak, *S. cerevisiae* ve *M. pulcherrima* transkriptomik etkileşimi hakkında literatüre katkı sağlanmasının yanı sıra, bu tez çalışması ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda sanayiye, küresel ısınma ve çevresel koşulların fermantasyon üzerindeki negatif etkilerini azaltılmasına, ulusal ve uluslararası pazarda rekabet

gücünün arttırılmasına katkı sağlayacak, orijinal/yerel suşlardan oluşan bir başlangıç kültür kombinasyonu önerisi sunulabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Anadolu, coğrafik konumundan dolayı elverişli, dört mevsimin de yaşandığı, sulak ve geniş tarım arazilerine sahiptir. Bu özellikler, birçok bitki türünün Anadolu topraklarında yetişmesini sağlamaktadır. Bu bitkilerden biri de üzümdür. Çevresel koşulların değişmesinden dolayı Anadolu'da binlerce yıldan bu yana yetiştirilip tüketilen üzümün muhtemelen eski zamanlarda meyve çeşitliliği daha fazlaydı ve Anadolu topraklarında yetişen üzümler daha lezzetli, daha aromatik idi [1].

Anadolu'da şarap kültürü M.Ö. 8000'li yıllara dayanmaktadır. O dönem Anadolu'da hüküm süren Hititlerinin (M.Ö. 1600- M.Ö.1200) kültüründe şarabın çok önemli bir yer aldığı bilinmektedir. O döneme ait tabletlere göre Hitit toplumu için üzüm ve üzümünden elde edilen şarap ana besin kaynağından biriydi. Hititler genellikle su, et, şarap ve ekmek tüketirlerdi. Anadolu'da yaşayan diğer kavimler gibi Hititler de fermantasyon ile üzümünden şarap elde etmeyi biliyorlardı. Bazı araştırmacılara göre Hititlerin şarap yapmayı, fermantasyonu iyi bilmeleri, ekmek yapımında dönemin ilerisinde olmalarına neden olmuştur [2, 3].

Saccharomyces cerevisiae, 1837'de maltta keşfedildikten sonra her dilde mayayı temsil eden bu ismi almıştır. Maya muhtemelen insanın tanıdığı ve evcilleştirdiği en eski organizmadır. M.Ö. 6000 yıllarında Sümerliler ve Babilliler mayayı bira yapımı için kullanıyordu. Aynı zamanlarda maya Gürcistan'da şarap yapımı, eski Mısır'da ise hamur yapımı için kullanılıyordu. Bu insanlar nedenini anlamasalar da meyveleri ve tahılları kapalı kaplarda uzun süre bırakarak şarap ve bira üretebileceklerini biliyorlardı. Kaplarda tutulan ezilmiş üzüm parçalarından kabarcıklar çıktığını gözlemledikleri için yaptıkları bu işlem, Latince "kaynamak" anlamında olan *fervere* kelimesinden gelen fermantasyon olarak adlandırılmıştır. O zamanlarda yaşayan insanlar fermantasyonun, çıplak gözle görülemeyen küçük, tek hücreli bir ökaryot mantar olan mayaların yaptığını bilmiyorlardı. Bu mikroorganizmaların keşfi birkaç yüzyıl geçtikten sonra, bilimde devrim yaratan kaliteli lens ve mikroskopların sayesinde olmuştur [4, 5].

Mayaların fermantasyona neden olan bir mikroorganizma olduğunu öne süren ilk araştırmalar 1836 ve 1838 yılları arasında yayınlanmıştır. Julius Meyen, 1838'de *S. cerevisiae*, *S. pomorum* ve *S. vini* adlı üç türü içeren *Saccharomyces* cinsini tanımlamıştır; isimleri bira, fermente elma suyu ve şarapta bulduklarına işaret etmektedir. Louis Pasteur, 1857 yılının ağustos ayında Société des Sciences de Lille'e 'Laktat fermantasyonu' başlıklı bir konferans vermiştir. Pasteur'un savunduğu alkolik fermantasyonun canlı organizmalar tarafından gerçekteştirilen bir işlem olduğu gerçegi *Saccharomyces* cinsini tanımlamasından 20 yıl sonra kabul görmüştür. Maya konusundaki başka bir dönüm noktası ise 1880'lerin başında, saf maya kültürleri elde etmek için teknikler geliştiren Emil Christian Hansen sayesinde gerçekteşmiştir. Bir dizi maya türü seğen Hansen, maya taksonomisini pratik bir ifade haline getirmiştir. O zamandan beri, izole maya suşlarının farklı endüstriyel işlemlerde başlangıç olarak kullanılması mümkün olmuştur. Fermantasyonda, en yaygın olarak kullanılan başlangıç kültürü *Saccharomyces cerevisiae*'dir [6, 7].

1930-1940 yıllarında, Øjvind Winge ve Carl Lindegren'in çalışmaları ile maya genetiği ile ilgili araştırmalar başlamıştır. 1996 yılında, *Saccharomyces cerevisiae*'nin genomu, birkaç farklı dizileme yöntemi ve teknolojisi kullanılarak 94 laboratuvarda çalışan 19 ülkeden uluslararası bir araştırmacılar tarafından tamamen dizilenmiştir. Bu özelliğiyle, tamamen bilinen ilk ökaryotik genom olmuştur. *Saccharomyces cerevisiae* genomu, 16 kromozom üzerinde kompakt bir şekilde düzenlenen 6.275 gen ile yaklaşık 12.2 Mb'dir. Bu genlerin sadece yaklaşık 5800'ünün işlevsel olduğuna inanılmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae*'a ait genom dizisinin bilgileri, yeni güncellemeler, bu konudaki araştırmalar, orijinal model organizma veri tabanlarından biri olan *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (<https://www.yeastgenome.org/>) tarafından uzun süredir araştırmacılara sağlanmaktadır [8-12].

2.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Morfolojisi ve Hücre Yapısı

Mayalar tomurcuklanma veya fisyonla aseksüel olarak bölünen, hücre boyutu; 1-10 µm genişliğinde, 2-3 µm'den 20-50 µm'e değişen yükseklikte tek hücreli

(çoğunlukla *Ascomycete*, *Basidiomycete* veya *Deuteromycete*) fungilerdir. En iyi bilinen maya olan *S. cerevisiae*, genellikle büyük çapı 5-10 µm küçük çapı 1-7 µm olan elipsoit şeklindedir. Katı besiyerinde gelişen mayaların morfolojileri renk, doku ve geometri açısından farklılık göstermektedir. *Saccharomyces cerevisiae* agarda krem renkli koloniler oluşturur [13].

Mantarların hücrelerinde, çekirdek, endoplazmik retikulum, mitokondri, golgi aparatı, salgı vezikülleri ve vakuoller tipik olarak bulunur. Mantarların ökaryotik yapısını tamamlayan organel çekirdektir. Çekirdek çift membranlıdır ve kromozomları nükleoplazmada bulundurur. Çoğu maya ve mantar temel olarak haploid yaşam döngüsüne sahip olsa da *Saccharomyces cerevisiae* gibi bazı türlerinin yaşam döngüsü haploid ve diploid arasında değişebilir. Haploid ve diploid hücrelerin boyutları, gelişme fazına ve türe göre farklılık gösterir. Tipik olarak, diploid hücreler 5-6 µm elipsoid iken, haploid hücreler 4 µm çaplı sferoidlerdir [13-15].

2.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Üreme Özellikleri

Saccharomyces cerevisiae haploid ve diploid hücreler olarak aseksüel şekilde tomurcuklanarak çoğalabilir. Maya hücreleri çifleşme türüne göre iki farklı şekilde tomurcuklanırlar. Haploid hücreler iki çifleşme (a ve α) tipinde bulunur ve bunlar diploid hücre oluşturabilirler [16, 17].

2.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Gelişimi İçin Fiziksel Gereksinimler

Mayaların optimum gelişimi için genellikle ılık, nemli, asidik, şeker içeren aerobik ortamlar gereklidir. Ekstrem fiziksel ve kimyasal koşullarda gelişimi tercih eden çok az maya suşu vardır [13].

2.1.3.1. Sıcaklık

Sıcaklık, mikroorganizmaların gelişme hızını etkileyen en önemli fiziksel özelliklerden biridir. Genellikle, laboratuvar ve endüstri mayalarının optimum

gelişme sıcaklığı 20-30 °C arasında değişmektedir. *S. cerevisiae* için optimum gelişme sıcaklığı 28 °C, maksimum gelişme sıcaklığı ise 35-43 °C'dir [16, 18].

Maya hücrelerinin bölünmesi, kromozom yapısı / fonksiyonu, protein sentezi, fermantasyon nihai bileşimi, hücre yüzey topolojisi, hücre iskeleti bütünlüğü, hücre boyutu gibi çeşitli morfolojik özellikleri optimum olmayan gelişme sıcaklığından etkilenmektedir [4, 19].

2.1.3.2. Su

Mayalar metabolizmalarının işlevi için yüksek konsantrasyonlarda suya ihtiyaç duyarlar. Substrat ve enzimlerin tamamı sulu çözelti veya koloidal süspansiyondadır. Bu nedenle yeterli su olmadığında maya metabolizmasında enzimatik aktivite gerçekleşemez. Ancak substratın su içeriği, suyun hücredeki enerjik kullanılabilirliğini göstermez. Hücre içi ve/veya çevresel su mevcudiyetindeki değişiklikler, maya hücresinin bütünlüğünü ve metabolizmasını etkiler. Bu nedenle, su mevcudiyetinin ölçülmesi hem teorik hem de pratik olarak önemlidir. Çözünmüş çözünenlerin varlığında suyun mevcudiyetini ölçmek için kullanılan su potansiyeli terimi (ψ_w , megapaskal cinsinden ifade edilir, MPa) suyun potansiyel enerjisini ifade eder. *Saccharomyces cerevisiae* mayası non-osmotolerant türdür ve ψ_{opt} değeri -1.5 MPa civarındadır. Su aktivitesi (a_w), ise bir su kütlesinin (%100) veya substratın (%100'den az) denge bağılı nemi ölçülerek, bu değer 100'e bölünmesi ile hesaplanır. Maya türlerinin çoğu ve *Saccharomyces cerevisiae* dar bir su aktivitesi aralığında (0.9-1.0) gelişirler. *Saccharomyces cerevisiae*'nin optimum gelişme a_w 'si 0.975 ile 0.999 arasındadır [16, 20-22].

2.1.3.3. pH

Maya gelişimi için en uygun pH aralığı, ortamın sıcaklığına, oksijen varlığına ve maya suşuna bağlı olarak değişebilir. Çoğu mayanın gelişimi için gerekli optimum pH değeri 4.5-6.5 aralığındadır. *Saccharomyces cerevisiae* asidik ortamlarda daha iyi gelişim gösteren, asidofilik bir organizmadır [16, 23].

2.2. *Metschnikowia pulcherrima*

Latince'de '*pulcherrima*', güzel anlamına gelen bir sıfatın üstün bir halidir. Bu yüzden, *Metschnikowia pulcherrima*, 'en güzel' maya anlamına gelmektedir. *Metschnikowia pulcherrima*, (*Candida pulcherrima*, anamorf; *Torula pulcherrima*, *Torulopsis pulcherrima*, *Rhodotorula pulcherrima*, *Saccharomyces pulcherrimus*, *Cryptococcus castellanii*) gibi birçok farklı isimde ifade edilmektedir. *Metschnikowia pulcherrima* meyvelerde, çiçeklerde ve nektarlarda bulunan, spontan fermantasyonlarda sıklıkla görülen, genellikle üzüm suyu fermantasyonunun erken aşamalarında bulunan *Saccharomyces* olmayan bir mayadır. *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida stellata* gibi *Saccharomyces* olmayan mayalar, *Saccharomyces* maya hücreleri ortama hakim olmadan önce fermantasyona başlayarak *Saccharomyces* mayaları için ortamı hazırlarlar ve fermantasyona katkı sağlarlar. *Saccharomyces* olmayan mayalar alkol içeriği %5'e ulaşana kadar şarabı fermente ederek, ortamdaki *Saccharomyces* dışındaki tüm maya türlerini inhibe eder. *Saccharomyces* olmayan mayaların inokülasyonundan 1-2 gün sonra *Saccharomyces* türleri, özellikle *S. cerevisiae* fermantasyon ortamında gelişir ve yüksek miktarlarda etanol üreterek fermantasyona hakim olur. %5 etanolden sonraki tüm şarap fermantasyonlarından *Saccharomyces* sorumludur [24-27].

Fermantasyon ortamında *Metschnikowia pulcherrima*, *Kloeckera apiculata* ve *Torulaspora magnolia* tarafından salgılanan asit proteazlarının, hem şarap hem de model çözeltilerde şarap proteinlerinin parçalanmasında etkili olduğu tespit edilmiştir. *M. pulcherrima* özel olarak incelendiğinde yüksek bir β -glukozidaz üreticisidir ve karışık kültürlerdeki varlığı uçucu asitliği azaltabilir ve orta zincirli yağ asitleri, yüksek alkol, esterler, terpenoller ve gliserolün üretimini artırabilir. *M. pulcherrima*'nın şarapların titre edilebilir asitliğini azaltabildiği bildirilmiştir. Toplam asitlik üzerindeki bu etki, üzüm suyunun başlangıçtaki asitlik seviyesine bağlı olarak pozitif veya negatif olarak kabul edilebilir. Ayrıca *M. pulcherrima*'nın, alkolik fermantasyon sırasında *S. cerevisiae*'ya kıyasla polisakkarit salma kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. *Metschnikowia pulcherrima*'ya olan şu

anki ilgi, bazıları varital aromatik bileşiklerin salınımını artıran birçok hücre dışı aktivitenin ekspresyonu ile desteklenmektedir [25, 28-30].

2.2.1. *Metschnikowia pulcherrima*'nın Morfolojisi

Metschnikowia pulcherrima hücreleri elipsoidal şeklinde, küresel, kalın duvarlı ve oldukça kırılmazdır. Tomurcuklanarak çoğalırlar. Anaerobik koşullar altında psöдохif oluşturabilirler. Krem renkli koloni oluşturan *Metschnikowia pulcherrima* suşları pulcherrimin adı verilen kırmızı-kahverengi renkli çözümlü pigment ürettikleri için koloniler renklenebilir (Çizelge 2.1) [25].

2.2.2. *Metschnikowia pulcherrima*'nın Fizyolojik Özellikleri

Fermantasyon sırasında *Metschnikowia pulcherrima* genellikle Glukozu kullanır, bazı durumlarda Galaktozu kullandığı da belirtilmiştir. *Metschnikowia pulcherrima*'nın asimile edebildiği bileşikler Galaktoz, Sükroz, Maltoz, Sellobiyoz, Melezitoz, Mannitol, Trehaloz, D-Ksiloz, Süksinat, Ribitol, Glukitol, Mannitoldür. Sorboz, Süksinati, Arbutin, Salisin, Etanol asimilasyonu ise değişkendir. *Metschnikowia pulcherrima* mayası nitrat veya nitriti asimile edemez (Çizelge 2.1). Bu suş temel azot kaynağı olarak kadaverini kullanır. Bazı durumlarda Etilamin, Lizin, Triptofan kullanabilir. *Metschnikowia pulcherrima* vitamin içermeyen ortamda gelişemez, gelişmesi için biotin gereklidir. Optimum gelişme sıcaklığı 37°C olup değişkenlik gösterebilir. Maksimum gelişme sıcaklığı ise 39°C civarındadır (Çizelge 2.1). *Metschnikowia pulcherrima* 25°C'nin altındaki sıcaklıklarda sporülasyonunu gerçekleştirebilir. Fermantasyonu sonrası alkoldeki son ürünler lipaz ve mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip pulcherrimin pigmentidir [25].

2.2.2.1. *Metschnikowia pulcherrima*'nın Duyarlılığı


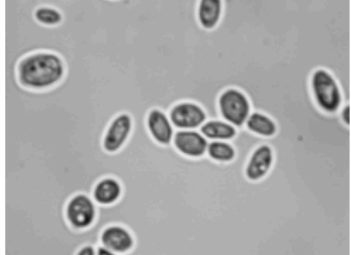
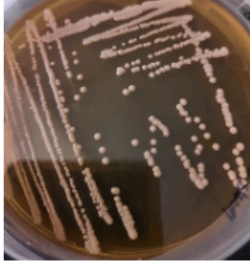
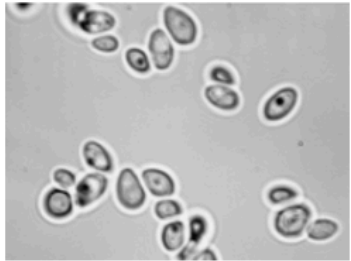
Metschnikowia pulcherrima %10 NaCl konsantrasyonunu tolere edebilir, yüksek glikoz konsantrasyonlarında gelişebilirler ancak sikloheksimite duyarlılıkları vardır. *M. pulcherrima* düşük pH değerlerinde canlılık gösterir ve organik asitlere karşı özellikle hassas değildir. Fermantasyon ortamının pH'ı 3.6'nın üzerinde

olduğunda ortam bakteri ve diğer mikroorganizmalar için elverişli olur. pH'ın 7'nin üzerinde olduğu ortamlarda ise *M. pulcherrima* mayası inhibe olur. SO₂ varlığı *M. pulcherrima*'nın gelişimini engeller. Şarap fermantasyonunda SO₂ kullanılmasının nedeni *Brettanomyces bruxellensis* gibi şarap fermantasyon ortamında istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini engellemektir. Ancak şarap yapımında kullanılan SO₂ alerjik bünyelerde reaksiyona neden olur. *M. pulcherrima* gibi yabancı mayaları inhibe eden ve *S. cerevisiae* mayasının gelişmesini engellemeyen mayalar şarap endüstrisinde antimikrobiyal aktivesinden dolayı kullanılabilir. Ayrıca SO₂ muamelesi, *Saccharomyces* olmayan mayaların gelişimi durduktan çok daha sonra yapılan şarap fermantasyonlarında, bu mayaların moleküler izleri kalmaktadır. *Metschnikowia pulcherrima* sorbata duyarlı değildir. Dimetil dikarbonat (DMDC) ise özellikle 30 °C'nin altındaki sıcaklıklarda, 12 saat boyunca inhibe etki gösterir ve daha sonra inhibitör etkisini kaybeder (Çizelge 2.1) [25, 30-32].

Fermantasyon ortamındaki etanol konsantrasyonu %5'in üzerine ulaşana kadar maya etanolü tolere edebilir, daha sonra *Metschnikowia* canlılığını yitirir ve *Saccharomyces* fermantasyona başlar. *Metschnikowia pulcherrima* minimum su aktivitesinde gelişebilir ve metabolizması için oksijen gereklidir. Bu nedenle fermantasyon ortamındaki oksijen yetersizliği *Metschnikowia pulcherrima* gelişimini inhibe eder. *M. pulcherrima* ve *M. reukaufii*'de, farklı ascus ana hücrelerinin varlığıyla, yaygın olarak adlandırılan klamidosporlar ve pulcherriminin üretimi, *Metschnikowia*'ya özgü ayırt edici özelliklerdir (Çizelge 2.1) [25].

Çizelge 2.1. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* mayalarının özellikleri [25, 33]

Maya Adı	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Cins/tür (takma adlar)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Candida robusta</i> , anamorf, <i>Cryptococcus fermentans</i> , <i>Saccharomyces</i> (birkaç tür), <i>Torula cerevisiae</i> , <i>Torulopsis fermentans</i> , <i>Torulopsis sexta</i>)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (<i>Candida pulcherrima</i> , anamorf; <i>Torula pulcherrima</i> , <i>Torulopsis pulcherrima</i> , <i>Rhodotorula pulcherrima</i> , <i>Saccharomyces pulcherrimus</i> , <i>Cryptococcus castellanii</i>)
Sınıflandırma	Ascomycete, teleomorf	Ascomycete, teleomorf
Morfoloji	Hücre: Tomurcuklanarak çoğalır, küresel ila oval, hiç veya basit psödohifa yoktur	Hücre: tomurcuklanarak çoğalır, oval ila elipsoidal, kalın duvarlı, tek, büyük bir yağ damlası içerir
	Koloni: Orta boy beyaz-krem dışbükey dairesel	Koloni: Krem renkli koloniler, kolonileri renklendiren kırmızımı-kahverengi pigment (pulccherimin) üretir.
	Spor: Genellikle dördü gruplar halinde küresel	Spor: bir ila iki iğnemi ila filiform (mızrak şeklinde) sporelar oluşabilir
	Zigot: Dambıl şeklinde	Zigot: Klamidosporlar
	Ascus: Dördü bir konformasyonda düzenlenmiş dört spor grubu	Ascus: tek bir lipid globülü içeren küresel klamidosporlardan kaynaklanır; asci spheropedunculate'dir.
Fizyolojik Özellikler	Fermantasyon: Glikoz, değişken fermantasyonu: Galaktoz, Sükroz, Maltoz, Trehaloz, Melibioz, Raffinoz, Melezitoz, Nişasta.	Fermantasyon: Glikoz; değişken: Galaktoz
	Asimilasyonu: Galaktoz, Sükroz, Maltoz, Trehaloz, Melibioz, Raffinoz, Melezitoz, Nişasta, Gliserol, Laktat, Etanol; Nitrat veya nitrit asimilasyonu yok, tek N kaynağı olarak etilamin, lizin veya kadaverin kullanılmaz; vitaminsiz ortamda değişken gelişme, çoğu suş biotin ve/veya tiamin gerektirir.	Asimilasyon: Galaktoz, Sükroz, Maltoz, Melezitoz, Sellobiyoz, Trehaloz, D-Xyloze, Ribitol, Mannitol, Süksinat, Glusitol, Mannitol, değişken: Sorboz, Salisin, Arbutin, Sitrat, Süksinat, Etanol; Nitrat veya nitrit asimilasyonu yok, Tek N kaynağı olarak kullanılan kadaverin; tek N kaynağı olarak Etilamin, Lizin, triptofanın değişken kullanımı; Vitaminsiz ortamda gelişme olmaz, biotin gerektirir
	Gelişme: 37, 40, 42 °C	Gelişme: 37 °C
	Gelişme Duyarlılıkları: yüksek glikoz ve NaCl'ye karşı değişken direnç; sikloheksimide duyarlı	Gelişme Duyarlılıkları: %10 NaCl: +; yüksek glikoz konsantrasyonlarında gelişir, sikloheksimide dayanıklı değil
Ekolojik Özellikler	<i>S. cerevisiae</i> doğada insanla ilişkili olarak bulunur ve daha nadiren üzüm kabuklarında bulunur.	Maya, karasal habitatlarda, özellikle meyvelerde, çiçeklerde ve nektarlarda bulunur. Ekipman uygun şekilde sterilize edilmezse, maya şaraphane ekipmanında kalabilir ve sonraki aşılamalara yol açabilir.
Hassasiyetler	Sorbit,DMDC, Isı	SO ₂ : Mayanın gelişmesini engeller, ancak <i>Saccharomyces</i> olmayan mayaların moleküler imzaları, SO ₂ ile muamele edilen şarap fermantasyonlarında, bu popülasyonlar kültürlenemez hale geldikten çok sonra kalabilir
		DMDC: 12 saat boyunca inhibe eder ve ardından artık inhibitör etkisi olmaz. 30C'nin altındaki sıcaklıklarda en etkilidir.
		pH: Maya, düşük pH'ları tolere edebilir, ancak 7'nin üzerindeki pH engelleyicidir ve 3,6'nın üzerindeki bir pH, bakteri ve diğer mikroorganizmalarla rekabete izin verir.
		Etanol: Maya, ortam %5'i aşan bir konsantrasyona ulaşana kadar etanolü tolere edebilir, ardından <i>Metschnikowia</i> ölmeye başlar ve <i>Saccharomyces</i> fermantasyonu devralır.
		Anaerobiosis: Gelişmeye izin veren minimum su aktivitesi. Maya metabolizması için oksijen gereklidir, bu nedenle oksijen eksikliği engelleyicidir.
Sıcaklık: Gelişme için maksimum sıcaklık yaklaşık 39 °C'dir. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> 'nın sporlanması için üst sıcaklık limiti, en uygun ortamlar dışında hepsinde 25 °C'nin altındadır.		

Maya adı	Makroskobik morfoloji	Mikroskobik morfoloji
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		

Şekil 2.1. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* mayalarının makroskobik ve mikroskobik morfoloji görüntüleri (Makroskobik morfoloji görüntüleri bu tez çalışmasından elde edilmiştir) [25, 33]

2.2.2.2. *Metschnikowia pulcherrima*'nın Antimikrobiyal Aktivesi

M. pulcherrima'nın ilgi çekici bir başka yönü de antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasıdır. Karışık kültür fermantasyonunda *M. pulcherrima* mayasının varlığı *S. cerevisiae*'nin gelişmesini etkilemez, ancak fermantasyon ortamında istenmeyen yabancı bozulma mayaları da dahil olmak üzere *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Brettanomyces* / *Dekkera Hanseniaspora* ve *Pichia* cinsleri ve *Botrytis cinerea*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Monilia* spp. gibi mantarların üzerinde de kapsamlı ve etkili bir antimikrobiyal etki gösterir. Ayrıca *M. pulcherrima*, hasat sonrası meyvelerde temel besin maddeleri için rekabete girerek *Botrytis* gelişimini etkili bir şekilde azaltabilen bir biyofungisittir. *Metschnikowia pulcherrima* mayasının doğal antimikrobiyal özelliği, ürettiği antifungal aktiviteye sahip kırmızı-kahverengi pigment olan pulcherriminden kaynaklanmaktadır. Maya için anormal çevre koşulları altında, pulcherrima hücreleri klamidosporeler olarak işlev görebilir ve daha sonra vejetatif hücre formuna geri dönebilir. Pulcherrimin pigmentinin etkisi sayesinde *Metschnikowia pulcherrima* mayası biyolojik bir kontrol ajanı olarak kullanılabilir. Bu antimikrobiyal aktivite, pulcherrimin pigmentin bir öncüsü olan pulcherriminik asit ile etkileşimin neden

olduğu demir (III) iyonlarının çökmesi yoluyla demirin ortam içinde tükenmesiyle ortaya çıkar. Bu şekilde ortam, gelişimleri için demir gerektiren diğer mikroorganizmalara karşı elverişsiz hale gelir. *Metschnikowia pulcherrima*'nın fermantasyon ortamındaki antimikrobiyal etkilerinden dolayı diğer *Saccharomyces* olmayan mayalar üzerinde bazı rekabet avantajlarına sahiptir. Bununla birlikte, *S. cerevisiae* bu antimikrobiyal aktiviteden etkilenmemiş gibi görünmektedir. *Metschnikowia pulcherrima*'nın bütün bu avantajları dikkate alındığında, sıralı ve/veya karışık kültür fermantasyonunda *S. cerevisiae* mayası ile seçilmiş bir başlangıç kültürü olarak kullanımının modern enolojide büyük ilgi çekeceği söylenebilir [27, 30, 31, 34-36].

2.3. Mayada Aromatik Bileşenlerin Oluşmasında Etkili Genler

Ekmek, bira ve şarap, alkol fermantasyonu ile ortamdaki mayalanabilir şekeri kullanarak etanol ve karbondioksit üreten mikroorganizmaların yardımıyla meydana gelirler. Etanol ve karbondioksit alkol fermantasyonunun ana ürünleridir ancak fermantasyon sonunda bu bileşiklerden farklı olarak fermente gıdanın lezzetini ve kalitesini belirleyen çok sayıda yan ürün oluşur. Fırıncılık ürünleri, bira ve şarap yapımında kullanılan mayaların büyük bir çoğunluğu *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Ancak aynı maya olmasına rağmen karakteristik fermantasyon özellikleri ve yan ürün oluşumu bakımından birbirlerinden farklıdır [6, 37].

Saccharomyces cerevisiae fermantasyon yeteneğine bağlı olarak şekerleri etanol ve karbondioksite verimli bir şekilde dönüştürür. Bu temel işlevi yerine getirirken, *S. cerevisiae* ayrıca esterler, uçucu yağ asitleri, yüksek alkoller ve uçucu kükürt bileşikleri gibi fermente ürünün aromasına önemli ölçüde katkıda bulunan bir dizi ikincil metabolit üretir. Bu bileşikler alkoller, aldehytler, organik asitler, esterler, organik sülfidler, karbonil bileşiklerdir ve nihai fermantasyon ürünün kalitesi üzerindeki etkileri büyüktür. Fermente edilmiş gıdalardaki bu bileşiklerin ince aroma dengesi, genellikle belirli ürünler ve markalar için organoleptik bir parmak izi olarak kullanılır. Üretilen aroma bileşiklerinden ortamda en çok bulunan yüksek alkoller ve esterler, amino asitlerin katabolizması yoluyla türetilirler. Bu amino asitler, büyümeyi desteklemek ve biyokütle oluşturmak için maya tarafından

metabolize edilir. Fusel yağı (kötü likör) adını Almanca fusel (fuzel) kelimesinden alır ve alkollü içkilerin damıtılması sırasında elde edilirler. Fusel yağı, maya ve laktik asit bakterilerinin fermantasyonu ile üretilen alifatik ve aromatik alkollerle zenginleştirilir. Fusel alkol ve esterlerinin düşük konsantrasyonlarının fermente gıdaların tat ve aromalarına güçlü katkısı varken yüksek konsantrasyonları gıda ürünlerine tat vermez [38-40].

Fusel alkollerini amino asit katabolizmasında Alman biyokimyacı Felix Ehrlich (1877-1942) tarafından önerilen Ehrlich yolağı ile üretilir. Maya için üzüm ve şıradan elde edilen kullanılabilir azot kaynağı olan amino asitler (valin, lösin, izölösin, metiyonin ve fenilalanin) Ehrlich yolağına fermantasyon boyunca yavaşça ve sıra ile alınır. Ehrlich yolağı ile aromatik bileşenlerin oluşumu 3 aşamada gerçekleşir. Bunlar; transaminasyon, dekarboksilasyon ve indirgenmedir [38, 41].

Transaminasyon

Ehrlich yolundaki ilk adım, α -keto asit oluşturmak için aminoasidin transaminasyonunu içerir. Sırası ile aromatik aminotransferaz I ve II'yi kodlayan *ARO8* ve *ARO9* genleri, L-triptofan, L-fenilalanin ve L-tirozin transaminasyonunda rol alır. Maya hücreleri üretilen α -keto asit ortama bırakmadan önce, onları Ehrlich yolağı ile fusel alkollere veya asitlere dönüştürürler [38, 42].

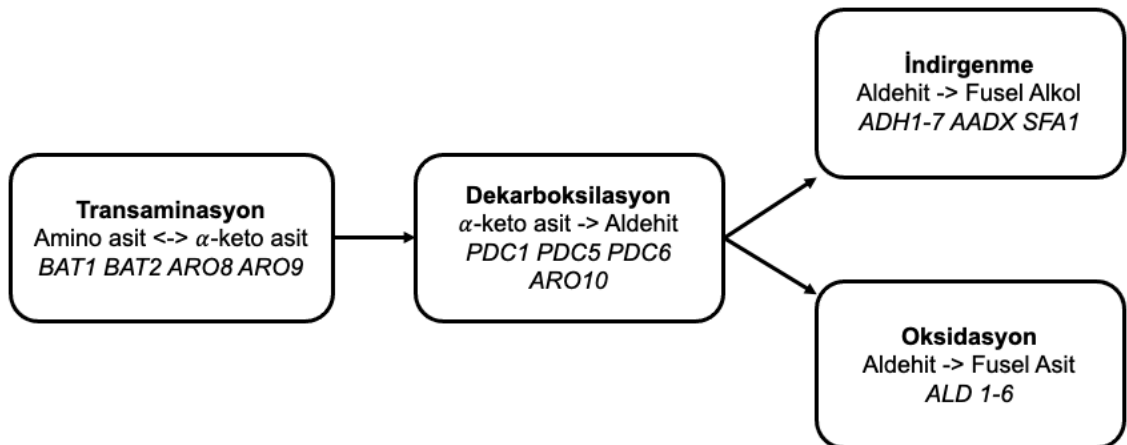
Dekarboksilasyon

Ehrlich yolağının ikinci reaksiyonu olan dekarboksilasyon aşamasında transaminasyon aşamasında üretilen α -keto asitler, karşılık gelen aldehitleri verecek şekilde geri dönüşümsüz olarak dekarboksilatlanır. Ehrlich yolağının dekarboksilasyon aşamasında, 2-fenilpiruvatın 2-fenilasetaldehit oluşturmak üzere dekarboksilasyonunu katalizleyen *ARO10* geni ve piruvat dekarboksilazları kodlayan *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* genleri görev almaktadır [43, 44].

İndirgenme / Oksidasyon

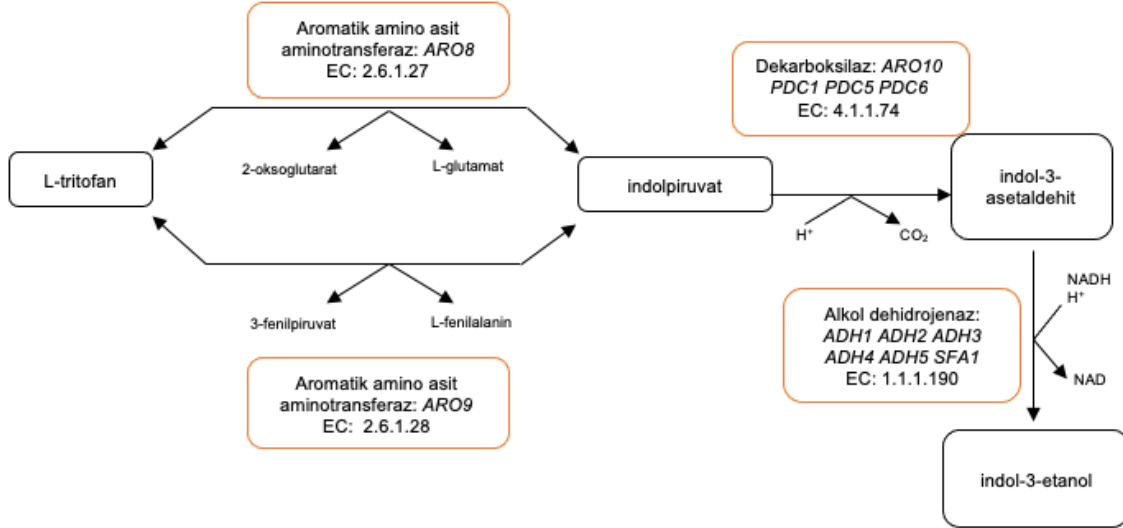
Ehrlich yolunun son aşaması, dekarboksilasyon adımıyla oluşan fusel aldehytların alkol dehidrogenaz ve aril-alkol dehidrogenaz tarafından alkolle indirgenmesidir. Bu aşamada aldehytların neredeyse tamamı fusel alkolle dönüşürken aldehytların oksidasyonu ile az miktarda fusel asit oluşur. Lösin, metionin ve fenilalanin tek nitrojen kaynağı olduğu durumlarda fusel asit üretilir, oluşan fusel alkolünün konsantrasyonu çok düşüktür. Ancak tek nitrojen kaynağı fenilalanin olduğu durumda Ehrlich yolunun indirgenme aşaması sonucunda %90 fusel alkol (feniletanol) ve %10'dan daha az fusel asit (fenilasetat) oluşturulur. Ehrlich yolunun indirgenme aşamasında etanol dehidrogenaz enzimini kodlayan genlerden *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5* veya formaldehit dehidrogenaz enzimini kodlayan *SFA1* geni rol alabilir. Bu genler genellikle fusel alkol üretiminden ziyade etanol üretimi hakkında fikir verir [44-48].

Mayaların alkol fermantasyonu sırasında Ehrlich yoluyla ürettiği yüksek alkol (3-metil bütanol (izoamil alkol), 2-metil bütanol (aktif amil alkol), izo-bütanol (2-metil propanol) ve n-propanol (1-propanol)) *M. pulcherrima* ve *Torulasporea delbrueckii* ile fermente edilen şaraplarda, *S. cerevisiae*'nin saf ve karışık kültürleri ile fermente edilmiş şaraplardan daha az üretildiği tespit edilmiştir [49].

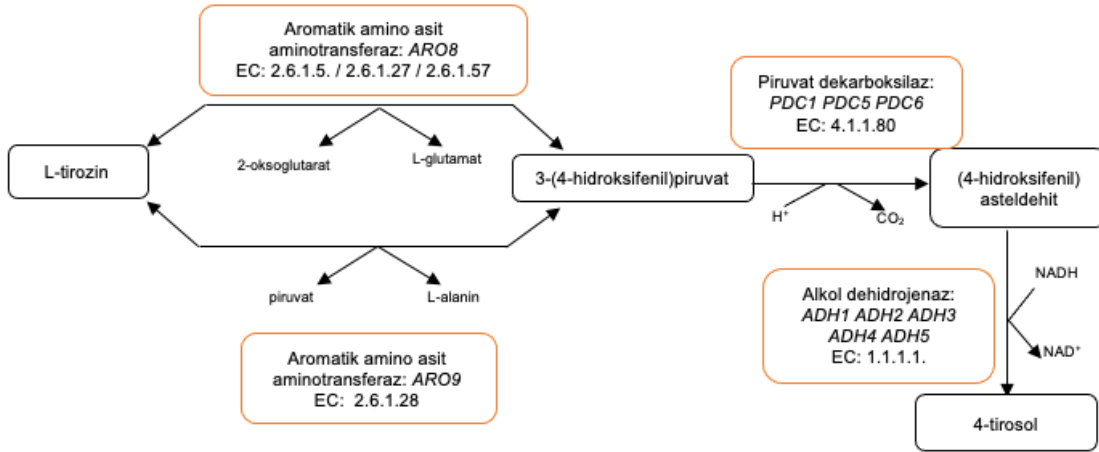


Şekil 2.2. Maya metabolizmasındaki Ehrlich yolu

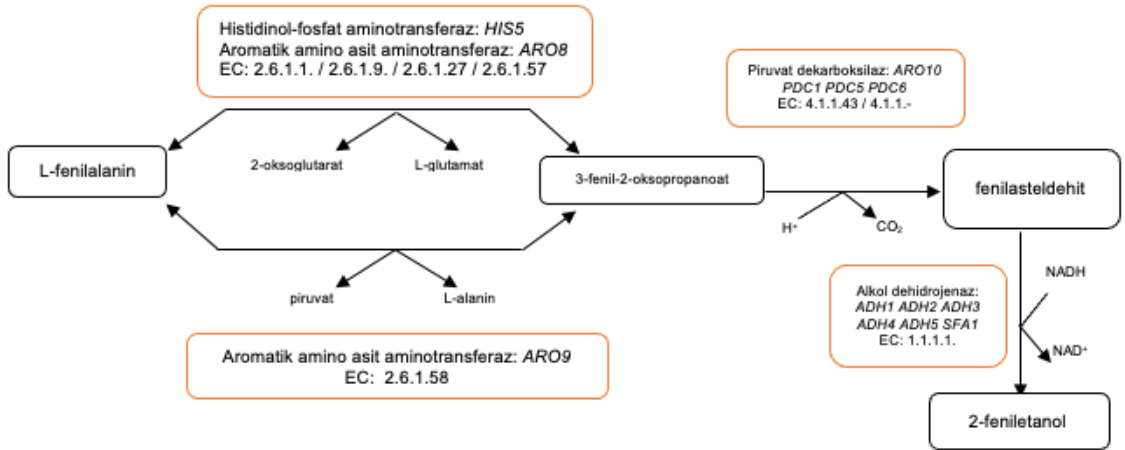
Dallanmış zincirli amino asitlerin (lösin, valin ve izolösin), aromatik amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) ve kükürt içeren amino asitin (metiyonin) katabolizması fusel asitlerinin ve fusel alkollerinin oluşumuna yol açar [38, 39, 50].



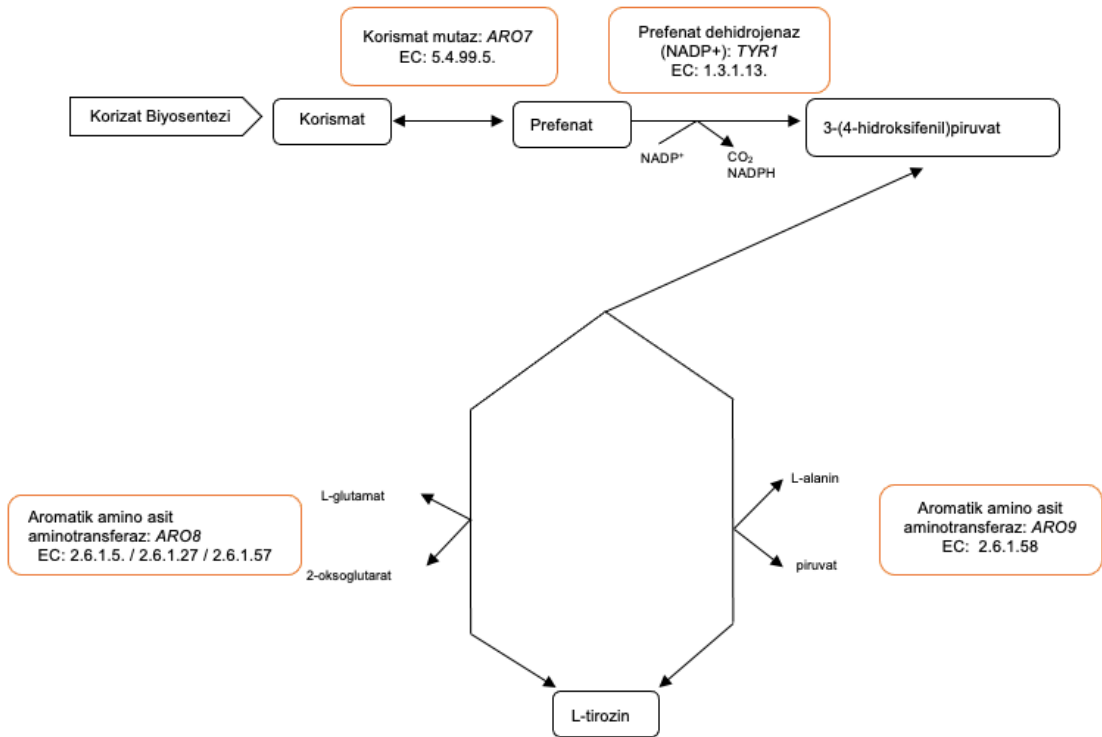
Şekil 2.3. Triptofanın degradasyonunda yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I, aromatik amino asit aminotransferaz II, alkol dehidrojenaz II ve alkol dehidrojenaz V [51]



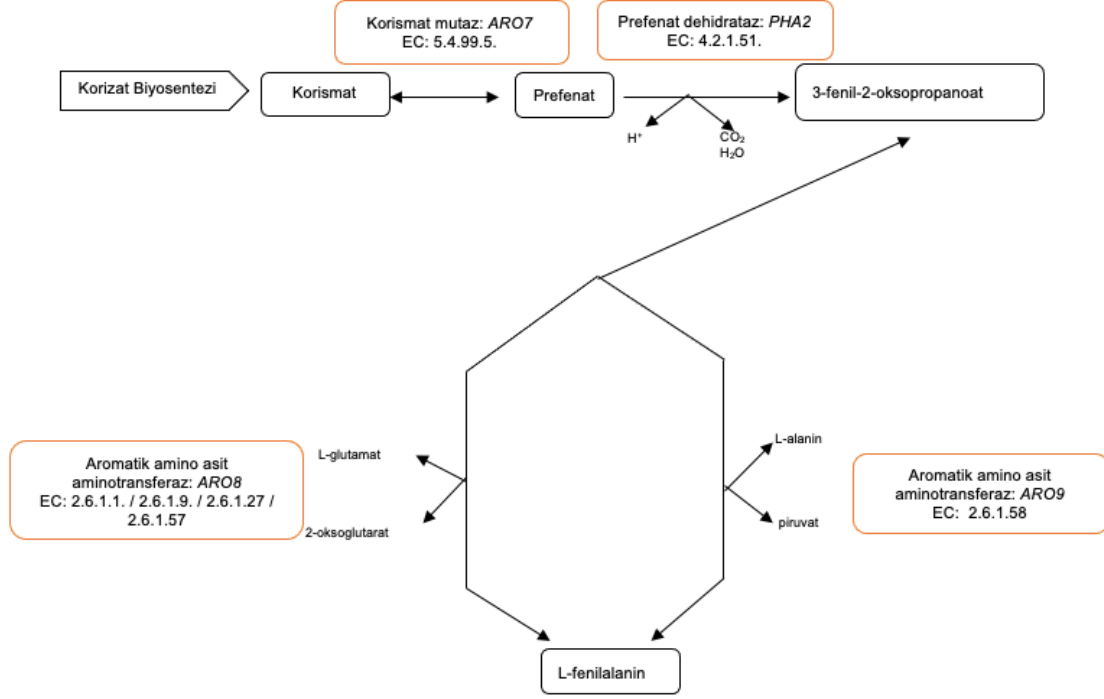
Şekil 2.4. Tirozin degradasyonunda yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I, aromatik amino asit aminotransferaz II, alkol dehidrojenaz II ve alkol dehidrojenaz V [52]



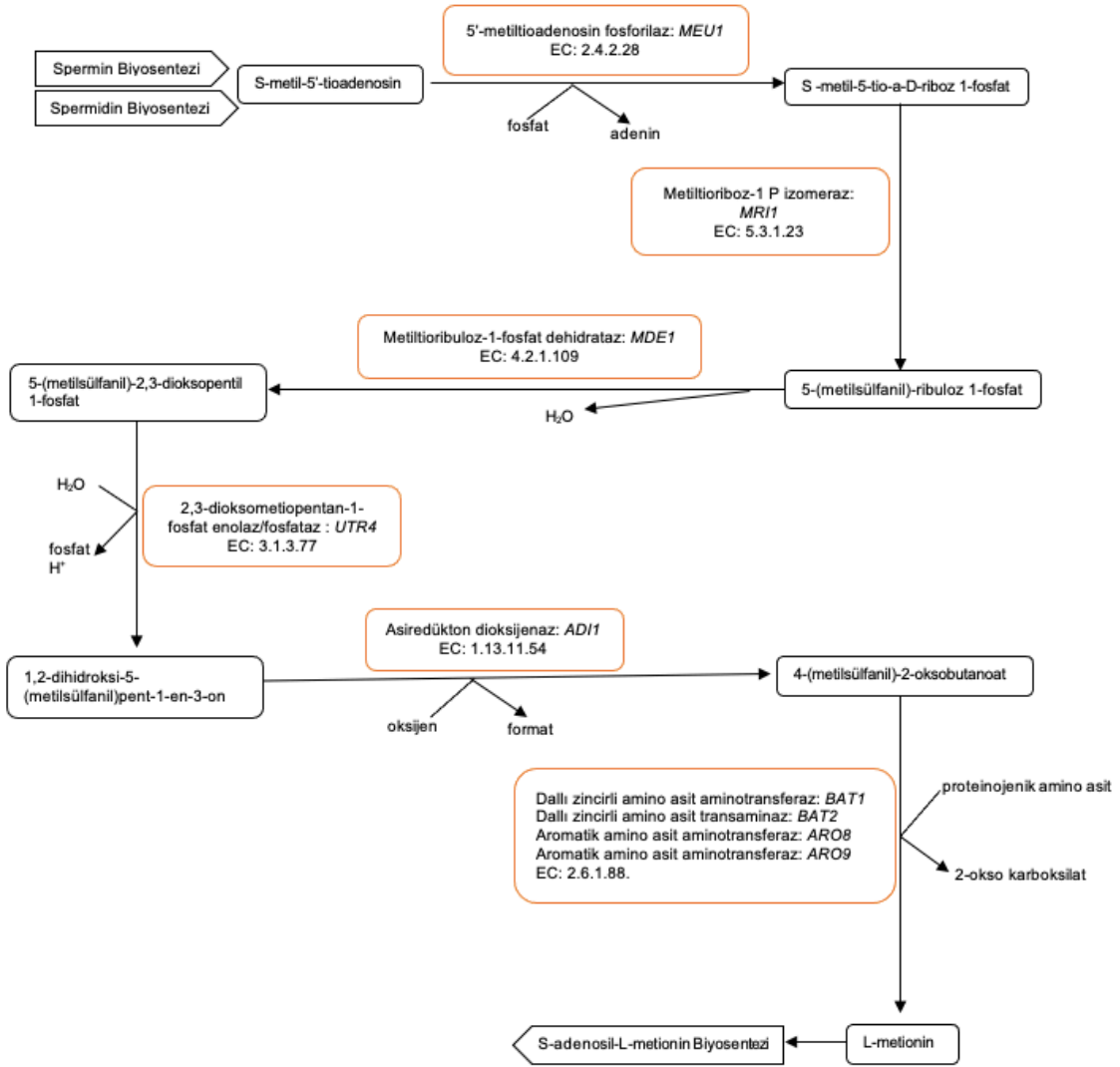
Şekil 2.5. Fenilalanin degradasyonunda yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I, aromatik amino asit aminotransferaz II, alkol dehidrojenaz II ve alkol dehidrojenaz V [53]



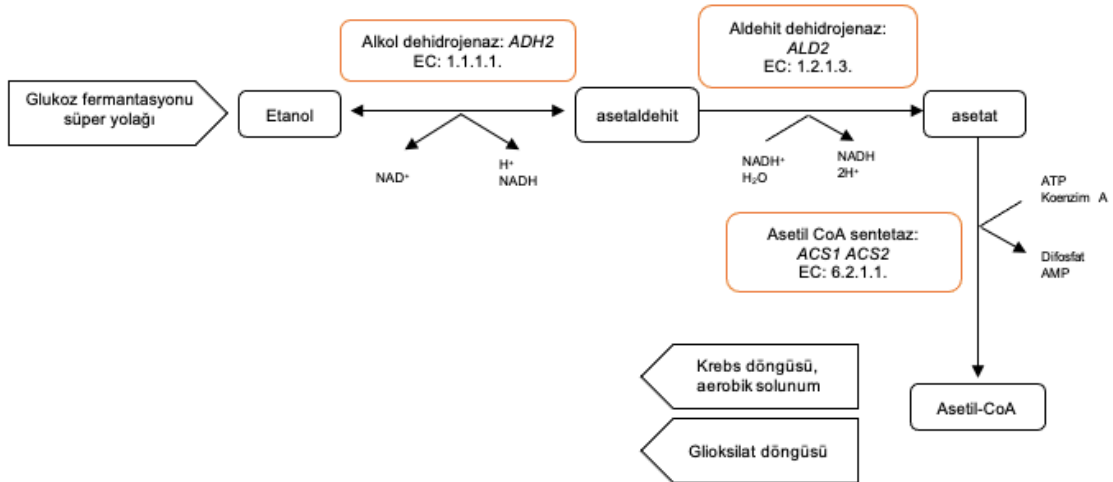
Şekil 2.6. Tirozin biyosentezinde yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I ve aromatik amino asit aminotransferaz II [54]



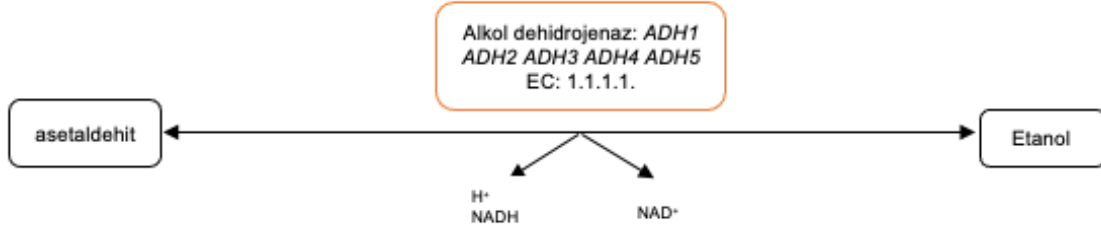
Şekil 2.7. Fenilalanin biyosentezinde yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I ve aromatik amino asit aminotransferaz II [55]



Şekil 2.8. Metiyonin eldesinde yer alan aromatik amino asit aminotransferaz I ve aromatik amino asit aminotransferaz II [56]



Şekil 2.9. Etanol degradasyonunda yer alan alkol dehidrojenaz II [57]



Şekil 2.10. Glikoz fermantasyonunun süper yolağında yer alan alkol dehidrojenaz II ve alkol dehidrojenaz V [58]

Çizelge 2.2. *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen özellikleri [59-62]

	<i>ARO8</i>	<i>ARO9</i>	<i>ADH2</i>	<i>ADH5</i>
Protein	Aromatik/aminoadipat aminotransferaz 1	Aromatik amino asit aminotransferaz 2	Alkol dehidrojenaz 2	Alkol dehidrojenaz 5
UniProtKB ID	P53090	P38840	P00331	P38113
Biyolojik Süreç	Alfa-amino asit metabolik süreç	Alfa-amino asit metabolik süreç	Ehrlich yolu yoluyla alkole amino asit katabolik süreci	Ehrlich yolu yoluyla alkole amino asit katabolik süreci
	Aromatik amino asit ailesi katabolik süreç	Aromatik amino asit ailesi katabolik süreç		
	Aromatik amino asit ailesi metabolik süreç	Aromatik amino asit ailesi metabolik süreç	Etanole glikoz fermantasyonunda yer alan etanol biyosentetik süreç	Etanole glikoz fermantasyonunda yer alan etanol biyosentetik süreç
	Metiltioadenozinden L-metiyonin kurtarma	L-kinurenin katabolik süreç		
	L-fenilalanin biyosentetik prosesi	Metiltioadenozinden L-metiyonin kurtarma	NADH oksidasyonu	NADH oksidasyonu
	Aminoadipik asit yoluyla lizin biyosentetik süreci	Aminoadipik asit yoluyla lizin biyosentetik süreci		
Tirozin biyosentetik süreci	L-fenilalanin biyosentetik prosesi Tirozin biyosentetik süreci			
Reaksiyon (Katalitik Aktivite)	2-oksoglutarat + aromatik bir L - α -amino asit = aromatik bir okso-asit + L - glutamat	2-oksoglutarat + aromatik bir L - α -amino asit = aromatik bir okso-asit + L - glutamat	Bir birincil alkol + NAD + = bir aldehit + H + + NADH	Bir birincil alkol + NAD + = bir aldehit + H + + NADH
	4-metilsülfanil-2-oksobutanoat + aromatik bir L - α -amino asit = aromatik bir okso-asit + L - metionin	4-metilsülfanil-2-oksobutanoat + aromatik bir L - α -amino asit = aromatik bir okso-asit + L - metionin	İkincil alkol + NAD + = bir keton + H + + NADH	İkincil alkol + NAD + = bir keton + H + + NADH
	2-oksoglutarat + L - 2-aminoadipat = 2-oksoadipat + L - glutamat	2-oksoglutarat + L - kinurenin = H ₂ O + kinurenat + L - glutamat		
Moleküler Fonksiyon	2-aminoadipat transaminaz aktivitesi	2-aminoadipat transaminaz aktivitesi	Alkol dehidrojenaz (NAD+) aktivitesi	Alkol dehidrojenaz (NAD+) aktivitesi
		Aromatik-amino-asit:2-oksoglutarat aminotransferaz aktivitesi		
	Aromatik-amino-asit:2-oksoglutarat aminotransferaz aktivitesi	Kinurenin aminotransferaz aktivitesi	Çinko iyonu bağlama	Çinko iyonu bağlama
	L-fenilalanin:2-oksoglutarat aminotransferaz aktivitesi	Kinurenin-oksoglutarat transaminaz aktivitesi		
	Piridoksal fosfat bağlanması	L-fenilalanin:2-oksoglutarat aminotransferaz aktivitesi		
	Transaminaz aktivitesi	Piridoksal fosfat bağlanması		
	Transaminaz aktivitesi			

2.4. Karışık Kültür Fermantasyonu

Şarap pazarında uluslararası rekabet, yeni şarap stilleri için tüketici talepleri ve şarap üretiminin çevresel sürdürülebilirliği konusundaki artan endişeler, şarap fermantasyonunda yenilik için yeni zorluklar yaratmaktadır. Toplam üretim zinciri içinde, üzüm suyunun mayalar tarafından alkollü fermantasyonu, şarap üreticilerinin daha iyi maya yönetimi yoluyla şarap karakterini ve değerini yaratıcı bir şekilde tasarlayabilmeleri ve böylece şarapları stratejik olarak değişen bir pazara uyarlamaları için önemli bir süreçtir. Bu yüzden bu konuda birçok araştırma yapılmaktadır [63].

Şarap yapımında en acil endişelerden biri, şaraptaki etanol konsantrasyonunun giderek artmasıdır. Küresel ısınma ve sıkıştırılmış bağbozumu olgusu ile daha da kötüleşen daha olgun meyve arayışındaki son eğilimler, üzümlerde aşırı şeker birikimine yol açarak şaraplarda istenmeyen yüksek etanol seviyelerine dönüşmektedir. Kaliforniya'da şarap yapımında kullanılan üzümlerin, 1980 yılında 21.4 briks olan şeker içeriğinin 2008'de 23.3 brikse yükseldiği gözlemlenmiştir. Artan şeker oranına bağlı olarak son yirmi yılda, şarapçılık bölgelerinde etanol konsantrasyonu yaklaşık %2 v/v artmıştır. Bu artışın nedeni temel olarak iklim değişikliği ve tüketicinin optimum fenolik olgunluğa sahip iyi yapılandırılmış şaraplara karşı tercihlerindedir. Yüksek şeker / alkol, alkollü ve malolaktik fermantasyonların her birinde sorun oluşturarak, bu fermantasyonların zamanında tamamlanmasını ve başarıya ulaşmasını engeller. Ayrıca şaraptaki yüksek alkol seviyeleri, kısmen şarap aroması bileşiklerinin uçuculuğunun azalması nedeniyle şarapların duyuşal profillerini değiştirdiği de gösterilmiştir. Bunun nedeni, yüksek etanol içeriğinin şarabın duyuşal profilini değiştirerek şaraptaki acılığı, büzülmeyi ve sıcaklık algısını artırabilmesi ve bazı uçucu bileşikler maskelenebilmesidir. Sonuçta elde edilen şarapların kimyasal ve duyuşal profilleri, artan sıcaklık ve azalan aroma kompleksi şarabın pazarlanabilirliğini olumsuz etkilemektedir. Dahası orta alkol seviyelerine sahip şaraplara yönelik artan talep, belirli alkol yüzdesinin (v/v), tüketici kabulünü azalmaktadır [24, 63-69].

Yılmaz ve Gökmen'in 2021'de yaptıkları bir çalışmada şarap fermantasyonunda ticari *Saccharomyces* olmayan mayaların ve *Oenococcus oeni* suşunun kullanılmasının amino asit türevlerinin oluşumu / tüketimi için etkili olduğu ve benzeri araştırmaların, gelecekte sağlığa yararlı amino asit türevleri açısından zengin şarap üretimini destekleyici olduğu bildirilmiştir. Yüksek alkol konsantrasyonuna sahip şarapların ise, insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Yüksek alkol içeren şaraplar birçok ülkede daha yüksek vergilere tabidir. Örneğin ülkemizde Gelir İdaresi Başkanlığı'nın 04.01.2021 tarihinde yürürlüğe koyduğu 4760 sayılı Özel Tüketim Vergisi Kanununun (12/3) maddesi uyarınca güncellenen listesinde alkol derecesi hacim itibariyle %18 veya daha az şarapların asgari maktu vergi tutarı 95.2890 TL iken, alkol derecesi hacim itibariyle %22 ve daha fazla olan şarapların 326.9929 TL'dir [70-73].

Yüksek alkol içeriğine sahip şarapların olumsuz etkilerinden kaçınmak için bağ konsantrasyonu, üzüm şırası ön fermantasyon uygulamaları, fermantasyon sırasında mikrobiyolojik yaklaşımlar ve fermantasyon sonrası işleme teknolojileri gibi birçok farklı alanda düşük alkol konsantrasyonuna sahip şarap üretimi stratejisi önerilmiştir. Şaraptaki yüksek alkol oranını azaltmak için uygulanacak en cazip strateji, *Saccharomyces* olmayan maya suşlarının kullanımudur. Önceki çalışmalarda şaraptaki aroma ve tat profilini geliştirmek, aynı zamanda şaraptaki istenmeyen mikroflora gelişmesini önlemek için *Saccharomyces* olmayan mayalar kullanılmıştır. Örneğin Sun ve diğerlerinin 2022 yılında yaptıkları bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile *Saccharomyces* olmayan mayaların karışık kültür fermantasyonlarında saf *Saccharomyces cerevisiae* fermantasyonuna kıyasla daha fazla çeşit ve konsantrasyonda uçucu madde üretildiği, sıralı fermantasyonunun ester ve terpen konsantrasyonlarının artarak, şarapların çiçek ve tatlı meyve notalarını iyileştirdiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda ayrıca, *Saccharomyces cerevisiae* ile bazı *Saccharomyces* olmayan maya türünün karışık kültür veya *S. cerevisiae* ile sıralı inokülasyon halinde kullanımının, şarap fermantasyonunda düşük etanol konsantrasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Canonico ve diğerlerinin 2019 yılında yaptığı çalışmada ise *Saccharomyces* olmayan mayaların kullanımı ile, az miktarda

oksijen bulunan ortamda, düşük etanol içeriğine sahip şarapların üretilebileceği ve fermantasyonun erken aşamalarında, ortamda bulunan oksijen miktarının bu şarapların uçucu bileşimini etkileyebileceği belirtilmektedir [24, 31, 65, 74-83].

Birçok çalışma ile, *Saccharomyces* olmayan türlerin *S. cerevisiae* ile karışık kültür fermantasyonlarında, maya gelişmesinin genel kinetiğine önemli bir katkı yaptıkları doğrulanmıştır. *Saccharomyces* olmayan türlerin çoğunun (özellikle *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* ve *Metschnikowia* türleri), meyve suyu ortamında alkol fermantasyonunu kendiliğinden başlattığı, ancak kısa bir süre sonra fermantasyonun final aşamasının orta seviyelerinde *S. cerevisiae*'nin fermantasyon ortamına hakim olduğu bilinmektedir. *Saccharomyces* olmayan mayalar, spontan şarap fermantasyonlarında benzer bir şekilde gelişirler, ancak sıcaklık, kükürt dioksit ilavesi, inokülasyon seviyeleri ve inokülasyon süresi gibi koşullar, *Saccharomyces* olmayan mayaların canlı kalma oranlarını ve fermantasyona katkılarını arttırmak için manipüle edilebilir. *Metschnikowia pulcherrima* düşük fermantasyon gücüne sahiptir ve üzüm şirasını tamamen fermente etmek için *Saccharomyces cerevisiae* ile sıralı veya eş zamanlı inokülasyonlu karışık kültür olarak kullanılması gerekir. Ayrıca *Metschnikowia pulcherrima* mayası düşük ile orta şiddette uçucu asitlik ve düşük H₂S seviyesi üretiminde *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile iyi uyumluluk gösterir. Bu özelliklerinden dolayı, *Metschnikowia pulcherrima*'nın *Saccharomyces cerevisiae* ile sıralı ve/veya karışık fermantasyonlarında seçilmiş bir başlangıç kültürü olarak kullanımının modern enolojide büyük ilgi uyandırabileceği bildirilmiştir [27, 37, 41, 84-86].

Sıralı inokülasyon fermantasyonunda *S. cerevisiae*'nin inokülasyonundan önce üzüm suyuna etanole duyarlı veya daha yavaş gelişen *Saccharomyces* olmayan mayaların aşılınması *S. cerevisiae*'nin fermantasyona olan katkılarını arttırmak için tercih edilen bir stratejidir. *Saccharomyces* olmayan mayalar sıralı ve/veya karışık kültür fermantasyonunun ilk aşamalarında ortamın alkol seviyesi %3-4 civarına ulaşıncaya kadar yani *S. cerevisiae* ortama hakim olmaya başlamadan önce fermantasyonda mevcut ve aktiftir. En sülfid ve alkole duyarlı

Saccharomyces olmayan maya türleri alkol seviyesi %3-4 olunca canlılıklarını yitireceklerdir, ancak daha esnek türlerin bazıları fermantasyonun sonraki aşamalarında metabolik olarak aktif kalabilir. *Metschnikowia pulcherrima* mayası ise fermantasyon ortamının alkol içeriği %5'e ulaşmış etanole karşı duyarlılığın dolaylı inhibe olana kadar şarabı fermente eder ve *Saccharomyces* olmayan tüm maya türlerinin inhibe olmasını sağlayarak ortamı *S. cerevisiae* için hazırlar [25, 86-88].

Fermantasyon ortamında bulunan *Saccharomyces* olmayan mayaların fermantasyonun başlangıç evresindeki aktivitesi, şarapların nihai aromatik profili için önemli kabul edilmesinin nedeni *Saccharomyces* olmayan mayaların, yüksek alkoller, esterler, asitler ve şarapların duyuşsal özellikleri için önemli olan karbonil bileşikler gibi çok çeşitli uçucu ve uçucu olmayan son ürünler geliştiren farklı enzimatik reaksiyonların sorumlusu olmalarıdır. Fermantasyon sırasında mayaların biyosentezi ile şekerden ve amino asit varlığında Ehrlich yoluyla üretilen yüksek alkollerin ana bileşenleri 3-metil bütanol (izoamil alkol), 2-metil bütanol (aktif amil alkol), izo-bütanol (2-metil propanol) ve n-propanol (1-propanol)'dür. Ehrlich yoluyla aromatik bileşenlerin oluşumunda transaminasyon aşamasında, dallanmış zincirli amino asit transaminazlar olan aromatik aminotransferaz I ve aromatik aminotransferaz II (sırasıyla *ARO8* ve *ARO9* genleri tarafından kodlanmış) aminlerin, amino asitler ve keto asit arasında transferini katalizlemektedir. Sadineni ve Kondapalli 2012 yılında yaptıkları çalışmada sadece tekli *M. pulcherrima* ve *Torulaspora delbrueckii* (NCIM ve IIHR) kültürleri kullanılarak fermente edilenlerin aksine, *S. cerevisiae*'nin saf ve karışık kültürleri ile fermente edilmiş şaraplarda, şarabın nihai aromatik profili üzerinde etkili olan bu alkollerin daha fazla üretiminin söz konusu olduğunu bildirilmiştir [49, 89-92].

Garcia ve arkadaşlarının 2017'de yaptığı bir çalışmaya göre *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae* olmayan suşların karışık kültür fermantasyonunda nihai üründe düşük uçucu asiditeye neden olan *Metschnikowia pulcherrima* ve *Lachancea thermotolerans* suşları karışık kültür fermantasyonu için seçilmişlerdir. *S.*

cerevisiae olmayan suş olarak *Metschnikowia pulcherrima*'nın seçildiği şarap fermantasyonunda gliserol ve olgunlaşmış meyve aromasında bir artış gözlenmiştir. Şarap fermantasyonunda meyve ve çiçek aromaların kaynağı olan asetat esterlerin üretimi asetat ve alkollerle ilişkilidir. Koenzim Asil-CoA / etanol O-asiltransferaz ile üretilen etil esterler, asetat esterler ile benzer bir şekilde meyve benzeri aroma verirler ancak şarap fermantasyonundaki konsantrasyonları asetat esterlerden çok daha düşüktür [46, 93].

Şarap fermantasyonunda aromatik bileşen eldesini araştıran Morata ve arkadaşlarının çalışmasına göre *Metschnikowia pulcherrima* saf kültür fermantasyonu negatif duyuşal yansımalara neden olan aşırı etil asetat üretimine neden olmuştur. Ancak *Metschnikowia pulcherrima*'nın *Saccharomyces uvarum* ile karışık kültür fermantasyonu hem etil asetat üretimini azaltmış hem de 2-fenil etanol ve 2-feniletıl asetat oluşumunu desteklemiştir. Başlatıcı olarak *Metschnikowia pulcherrima*'nın kullanıldığı *Metschnikowia pulcherrima*-*Saccharomyces cerevisiae* karışık kültür fermantasyonu, yoğun hücre dışı enzimatik aktivitesi ile türetilen ester üretimini arttırdığı için şarapların aromatik karmaşıklığı bu şekilde giderilebilir. Ayrıca *Metschnikowia pulcherrima*-*Saccharomyces cerevisiae* sıralı inokülasyonunda yüksek konsantrasyonlarda izobütanol ve feniletanol ile daha fazla yüksek alkol üretimi gerçekleştirilir. *Metschnikowia pulcherrima*'nın, sekonder metabolitlerin üretimini modüle etme, alkollü içeceklerin tadı ve aroması üzerinde olumlu bir etkiye sahip olan β -glukosidaz üretimi, orta fermantasyon gücü, yüksek enzimatik kapasite, biyokontrol ajanlığı gibi özelliklerinden dolayı günümüz şarapçılık endüstrisi sorunlarının çözümü olabilir. Önemli olan *Metschnikowia pulcherrima* ve karışık kültür fermantasyonunu tamamlayan diğer maya türünün doğru kombinasyonunu, doğru aşılama oranını ve zamanını belirleyebilmektir [27, 49, 94].

Mayaların substrat üzerindeki doğrudan etkisi ile ortaya çıkan duyuşal özellikler, fermente gıda ve içeceklerin kalitesini oluşturmakta önemli bir role sahiptir. Endüstriye yönelik başlangıç kültür üretiminde ilk adım, istenilen şarap karakterini

belirlemek ve buna yönelik mikroorganizma seçmektir. Daha sonra sırası ile belirlenen maya suşunun izolasyonu ve seçimi, biyokütlenin üretimi ve konsantre edilmesi, kurutma ve paketleme işlemleri gerçekleştirilir. Şarap üretiminde kullanılacak ve başlangıç kültür olarak piyasaya sunulacak maya suşlarını seçerken bir dizi kriter incelenmektedir. Bu kriterler; fermantasyon gücü, etanol ve oksidatif strese direnç, ozmotik strese tepki, nitrojen talebi, sülfid direnci, ısı strese direnç, kriyotolerans, öldürücü faktör iken şarabın duyuşal nitelikleri üzerine yoğunlaşan ek kriterler ise; ikincil aroma, aroma çeşitliliği, gliserol seviyesi, uçucu asitlik, hidrojen sülfid seviyesi, etil karbamat seviyesi ve tadıdır. Transkriptomik analizler bu kriterleri incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Örneğin Marks ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae* mayasının "fermantasyon stres yanıtı" transkriptomik analizlerle incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda fermantasyon sırasında çeşitli noktalarda dramatik olarak indüklenen fermantasyon stres yanıtı genleri olarak adlandırılan 223 genlik bir grup tanımlanmıştır. Bu genler fermantasyonun son anına kadar yüksek indüksiyon seviyesi ve gen ifade seviyelerinde ise 4-80 kat arasında değişiklik göstermişlerdir. Varol ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mikrodizi teknolojisini ve karşılaştırmalı istatistiksel veri analizlerini kullanarak, ısı streslerinin *Saccharomyces cerevisiae* mayası gen ekspresyon profilleri üzerindeki etkileri araştırılmış ve elde edilen mikrodizi verisi açık kaynak olarak araştırmacılara sunulmuştur [95-109].

2.5. Transkriptomik Analizler ve Mikrodizi

Maya transkriptomu, tek bir maya hücresinde veya hücre popülasyonunda üretilen tüm RNA molekülleri kümesi demektir. Ökaryotik mikroorganizma olan *Saccharomyces cerevisiae* mayasının tam genom dizisinin mevcudiyeti, gen transkripsiyonunu genom çapında incelenmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca 2006 yılında, Hierro ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre, ölü hücrelerden izolasyonu içeren şaraptan mikrobiyal DNA'nın doğrudan kullanımı olası bir sorundur. RNA'nın ters transkripsiyonu ile cDNA eldesi sonrası RT-PCR uygulaması, DNA'nın saptanması uygulamasına göre hücre canlılığı açısından daha iyi bir göstergedir. Örneğin Velculescu ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada gen ekspresyonunun seri analizi ile, transkriptom olarak

adlandırılan maya genomundan eksprese edilen gen seti analiz edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda 60.633 transkriptin analizi, hücre başına 0.3 ila 200 transkript arasında değişen ekspresyon seviyeleri ile 4.665 gen ortaya çıkarılmıştır. Belirli bir fizyolojik veya gelişimsel koşullar kümesi altında maya hücresinde bulunan ve etiketlenmiş olan mRNA veya cDNA molekülleri maya genomu tarafından tanımlanan yaklaşık 6000 protein kodlayan genlerin tümünü temsil eden "hedef" molekül dizileridir ve hibridizasyon içeren transkriptom analizinde kullanılır. Bahsedilen hedefler PCR sonucu üretilmiş mikro, makro ürünler veya oligonükleotidler olabilir. mRNA veya cDNA etiketlenirken hibridizasyon problemleri, radyoaktif veya floresan olarak etiketlenebilir. Transkriptom analizlerinde farklı deneysel yöntemler izlenebilir ancak hibridizasyon dizilerini kullanan tüm transkriptom analizlerinin ortak noktası büyük miktar veri üretip bu veriler sayesinde anlamlı bilgiye ulaşılmasıdır. Elde edilen biyolojik veriler biyoinformatik biliminden faydalanarak bilgi depolama, dağıtım ve analiz teknikleriyle ilişkilendirilir [110-116].

Açık kaynaklı veri setleri ve sağladıkları bilgi sayesinde üzüm seçimi, üzüm ekim materyali seçimi ve bağcılık uygulamaları, fermantasyon için mikrobiyal suş seçimi, fermantasyon koşulları ve diğer oenolojik süreçler hakkında karar vermek ve uygulamak kolaylaşır. Örneğin, Varela ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae* mayası için karşılaştırmalı genom dizileme verileri, son ürünün lezzetine ve kalitesine zarar vermeden daha düşük alkol konsantrasyonlarına sahip şarap üretimini sağlayacak gen hedeflerinin belirlenmesini amaçlayan bir sistem tabanlı yaklaşım sağlamışlardır. Yılmaz ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı çalışmaya göre ise, mikrodizi teknolojisini kullanarak gen ekspresyon verisi üretmek, birçok potansiyel değişkenlik kaynağına sahip ayrıntılı bir süreçtir. Standart numune hazırlama protokolleri, hibridizasyon deneylerinde kaliteli RNA'nın kullanılmasını sağlamak amacıyla bir dizi kalitatif değerlendirmeyi içerir. Hibridizasyon ve görüntü işlemeyi takiben, her mikrodizi çipi, verilerin kalitesini değerlendirmek için kullanılacak zengin bir bilgi sağlar. Tavsiye edilen hibridizasyon sonrası kalite değerlendirmesi, genel görüntü kalitesi değerlendirmesi ve özel problemlerin yoğunluk ölçümlerinin analizini içerir. Bu tür çalışmalar, sentetik biyoloji yaklaşımlarından elde edilen veriler,

çağdaş maya suşu geliştirme programları (maya klonal seçimi, üreme, mutajenez, genetik ve metabolik mühendisliği dahil) için temeldir. Açık kaynaklı veri setlerinden yararlanılarak, evcilleştirilmiş ve yabani maya popülasyonlarının daha verimli kültürleri ile arzu edilen lezzet profilli, düşük alkollü şaraplar üretimi gerçekleştirilebilir [88, 117-119].

Bu çalışmanın amacı ise, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının sıralı fermantasyonunda meydana gelen etkileşimlerin transkriptomik seviyede incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasında *S. cerevisiae* metabolizmasındaki Ehrlich yolağında yer alan enzimleri kodlayan genlerin (*ADH2*, *ADH5*, *ARO8*, *ARO9*) gen ifade düzeyleri incelenmiştir.

Çalışma bilimsel olarak, *M. pulcherrima* + *S. cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonunda *M. pulcherrima* varlığında meydana gelen maya-maya etkileşimlerinin aromatik bileşik sentezinde rol alan genlerin ifade düzeyi ve nihai ürün özellikleri üzerindeki etkisi hakkında yeni bilgiler sağlayabilir.

Ekonomi ve sanayi açısından ise çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda fermantasyon sanayisinde yerel maya kültürlerinin kullanımını arttırarak, doğru ve etkili başlangıç kültür kombinasyonu hakkında fikir vererek sanayi sorunlarına çözüm bulup, ulusal ve uluslararası pazarda rekabet gücünün arttırılması hedeflenmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal ve Metot

3.1.1. Materyal

3.1.1.1. Kimyasal ve Besiyeri

Suşların gelişmesi için SIGMA-ALDRICH ®'dan alınan YPD broth besiyeri (maya ekstraktı 10 g / L, pepton 20 g / L, glukoz 20 g / L, pH 5.3) ve YPD Agar (agar 15 g / L, bakteriyolojik pepton 20 g / L, glikoz 20 g / L, maya özü 10 g / L) kullanılmıştır. Üzüm suyu olarak Kavaklıdere Şarapları A.Ş. tarafından temin edilen beyaz pastörize üzüm suyu (200 mL x 110) kullanılmıştır. Çalışmada toplam RNA izolasyonu için EURx RNA Extracol (katalog numarası: E3700) kiti ve etanol (%96), 2-propanol (%≥99.5), kloroform (%≥99.5) kimyasalları kullanılmıştır. cDNA sentezi için EURx smART First Strand cDNA sentez (katalog numarası: E0804-02) kiti kullanılmıştır. RT-qPCR çalışması için 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (katalog numarası: 08-25-00001) kiti kullanılmıştır.

3.1.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* Suşları

'*Saccharomyces cerevisiae* DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Veri Tabanının Oluşturulması' adlı doktora tezi kapsamında elde edilmiş Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ITS, RPB2, Malditof tür analizleri yapılmış *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3) [120].

Çizelge 3.1. FoodOmics araştırma laboratuvarında bulunan *S. cerevisiae* referans suşu

No	İzolasyon Kodu	Kaynağı	Tür ITS	Tür RPB2	Malditof
22	HUF16M1C0004	Şarapçılık (Chr. Hansen)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>

Çizelge 3.2. FoodOmics araştırma laboratuvarında bulunan *M. pulcherrima* suşları

No	İzolasyon Kodu	Kaynağı	Tür ITS	Tür RPB2	Malditof
33	HUF16M3A11002	Kayseri Üzüm	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Candida pulcherrima</i>
40	HUF16M3B11020	Kırıkkale Üzüm	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Candida pulcherrima</i>
46	HUF16M3C11034	Kırşehir Üzüm	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Candida pulcherrima</i>
58	HUF16M3G11089	Eskişehir Üzüm	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Candida pulcherrima</i>
65	HUF17M3C21050	Kırşehir1 Üzüm	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Candida pulcherrima</i>
106	HUF17M3H21175	Çankırı1 Üzüm	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Candida pulcherrima</i>

Çizelge 3.3. FoodOmics araştırma laboratuvarında bulunan *S. cerevisiae* suşları

No	İzolasyon Kodu	Kaynağı	Tür ITS	Tür RPB2	Malditof
3	HUF16MOT10003	Pak yaş maya	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
22	HUF16M1C0004	Şarapçılık (Chr. Hansen)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
25	HUF16M2K10004	Hacettepe Üniversitesi	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
41	HUF16M3B11021	Kırıkkale Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
44	HUF16M3C11032	Kırşehir Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
45	HUF16M3C11033	Kırşehir Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
57	HUF16M3G11088	Eskişehir Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
59	HUF16M3H11101	Çankırı Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
66	HUF17M3C31063	Kırşehir2 Üzüm	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
72	HUF17M3D31088	Nevşehir2 Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
81	HUF17M3E21113	Aksaray2 Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
82	HUF17M3E21114	Aksaray2 Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
85	HUF17M3F21122	Ankara1 Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
116	HUF17M3H21208	Karaman2 Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
117	HUF17M3H21209	Karaman2 Üzüm	<i>Saccharomycete sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
133	HUF18M2Y10013	Ankara Üniversitesi	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>

3.1.1.3. Mikrodizi Veri Eldesi

Çalışmada kullanılan veri 2018 yılında Varol vd. tarafından ArrayExpress Database'e yüklenen [E-MTAB-3459](#) aksesyon numaralı açık veridir [109].

3.1.1.4. Primerler

Çalışmada kullanılan *ARO8* ve *ARO9* primerleri, Primer3 web version 4.1.0 programı (<http://primer3.ut.ee/>) kullanılarak tasarlanmıştır. *ADH2* ve *ADH5* primerlerinin sekansları ise Wang vd. tarafından 2021 yılında yayınlanan makaleden elde edilmiştir. Primerler, *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen bölgelerine spesifik olarak yaklaşık 18-22 bp uzunluğa, %50'nin üzerinde bir G / C içeriğine ve yaklaşık 55-60 ° C'lik bir Tm'ye sahiptir [121].

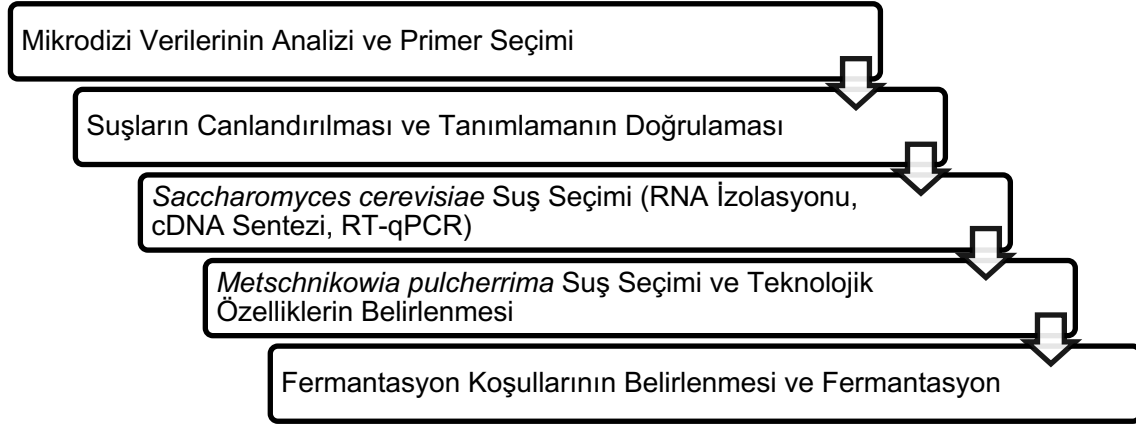
Çizelge 3.4. Primerlerin ID numaraları, sekansları

Gen	SGD ID	NCBI ID	Primer Adı	Sekans	Kaynak
ARO8 / YGL202W	SGD:S000003170	852672	ARO8F	5'-ATTCACCCAAGCCTCCTTTT-3'	*
			ARO8R	5'-GACCAGCACTGAACCCGTAT-3'	
ARO9 / YHR137W	SGD:S000001179	856539	ARO9F	5'-TTACCAGTTGGCCCAAAGAC-3'	*
			ARO9R	5'-ACGGGCATCTGTATCCAAAG-3'	
ADH2 / YMR303C	SGD:S000004918	855349	ADH2F	5'-TAAGACTCTGTAACCCATCGC-3'	[121]
			ADH2R	5'-AGCCGCTCACATTCCTCA-3'	
ADH5 / YBR145W	SGD:S000000349	852442	ADH5F	5'-TACTGTCGTCCTGGTTGG-3'	[121]
			ADH5R	5'-CGAAGAAATCTAAAGCCTCC-3'	

*Primer3 web version 4.1.0 programı (<http://primer3.ut.ee/>) kullanılarak düzenlenmiştir.

3.1.2. Metot

Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* içeren sıralı fermantasyonda karışık başlangıç kültürünün kullanılmasına yönelik transkripsiyonel yanıtın araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla Şekil 3.1'deki iş akış diyagramında gösterilen yol izlenmiştir.



Şekil 3.1. Metot akış şeması

3.1.2.1. Mikrodizi Verilerinin Analizi

Varol vd. (2018) çalışmasında mikrodizi veri eldesi için, Pakmaya'dan (Türkiye) pres mayası olarak elde edilen ticari ekmek mayası (*S. cerevisiae*) kullanılmıştır. Tek bir koloniden alınan maya hücreleri, 30 °C YPD sıvı besiyerinde (%1 maya özütü, %2 pepton, %2 glikoz, pH: 5.3) OD600 = 0.5 (~1,5x10⁷ hücre/mL) 130 rpm'de çalkalanarak geliştirilmiştir. Başlangıç kültürlerini elde etmek için, 40 mL YPD sıvı besiyerine 1 mL kültür inoküle edilmiş ve hücreler 130 rpm'de çalkalanarak 30°C'de 20 saat geliştirilmiştir. Gelişmiş hücreler, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 3000xg'de santrifüjlenerek (SIGMA 3K30 Santrifüj) pellet elde edilmiştir. Her hücre pelleti, RNA hazırlığına kadar -80 °C'de saklanmıştır. Pellet, 10 mL YPD besiyerinde yeniden süspansiyon edilmiştir ve daha sonra bu stok kültürden her 1 mL, sırasıyla önceden ısıtılmış (30 °C (kontrol), 25 °C ve 37 °C YPD sıvı besiyerine (40 mL)) aşılmıştır. Bütün gruplar 6 saat inkübe edilmiştir [109].

Isı şoku stresi için 25°C'de 6 saat boyunca geliştirilen hücreler 3000xg'de 10 dakika boyunca santrifüjleme yoluyla toplandıktan sonra eşit hacimde 37°C'lik ortamda yeniden süspansiyon edilmiştir. 37°C'de 60 dakika inkübasyon sonunda pelletler, oda sıcaklığında 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır.

Sıcaklık değişim stresi için ise 37°C'de 6 saat boyunca geliştirilen hücreler 3000xg'de 10 dakika boyunca santrifüjleme yoluyla toplandıktan sonra eşit hacimde 25°C'lik bir ortamda yeniden süspansiyon edilmiştir ve 25°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oda sıcaklığında 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir. Gen ekspresyonu altında ısı şoku ve sıcaklık değişim uygulamaları, bir kontrol olarak 30°C'de gelişen hücrelerdeki ekspresyonla doğrudan karşılaştırılmıştır. Kontrol deneyinde hücreler, aynı ısı şoku ve sıcaklık değişim uygulama stratejisi ile 30°C'de 40 mL YPD besiyerinde inkübe edilmiştir.

Toplam RNA, Chomczynski ve Sacchi'nin (1987) yöntemine göre bazı küçük değişikliklerle Invitrogen TRIzol reaktifi kullanılarak hücre pelletlerinden izole edilmiştir. Bu modifikasyonlar, litikaz (100 µl maya pelleti (6×10^7 hücre) için 5 mg/mL) ve Invitrogen TRIzol reagent volume (1.5 mL) ile farklı ön-muamele uygulamasını içermektedir. RNA bütünlüğü ve verimi, agaroz jel elektroforezi ve Alpha Spect 3000 Spektrofotometre ile değerlendirilmiştir.

Tüm hibridizasyonlardan elde edilen veriler, GeneSpringGX 12.1 (Agilent) ve R 2.15.2 program dili kullanılarak ayrıca analiz edilmiştir. GeneSpring, normalleştirmede, farklı şekilde ifade edilen genlerin saptanmasında, yol analizi adımlarında uygulanmıştır. Varyans analizinde ve kümeleme adımlarında R kullanılmıştır. GeneChip Yeast Genome 2.0 için prob açıklamaları, GenBank, UniGene ve EntrezGene veritabanlarından güncellenmiştir.

Bu çalışmada, bahsedilen açık kaynaklı bu verilerin analizi sonucunda çalışmada kullanılacak Ehrlich yolağında rol alan genler belirlenmiştir. Varol vd. (2018) çalışmasında stres uygulamasının *ADH2* ve *ADH5* gen ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek ve mikrodizi veri eldesi için, Pakmaya'dan (Türkiye) pres mayası olarak elde edilen ticari ekmek mayası (*S. cerevisiae*) kullanıldığından dolayı tez çalışmasında 3 nolu HUF16MOT10003 izolasyon kodlu Pak yaş mayanın *ADH2*, *ADH5* gen ekspresyon profili de incelenmiştir [109].

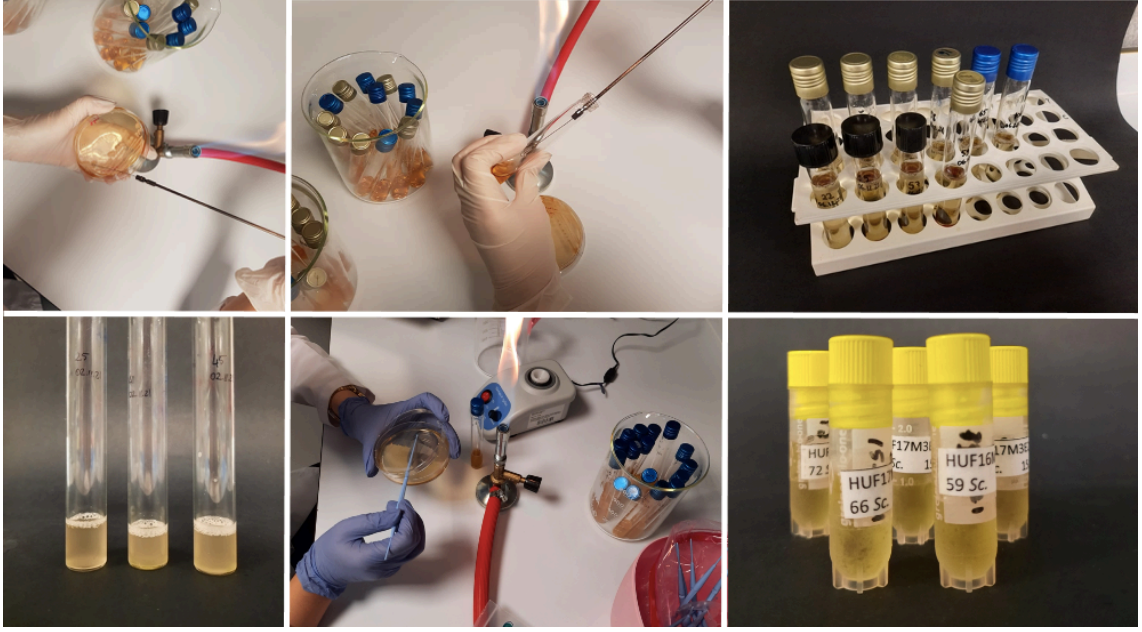
3.1.2.2. Suşların Canlandırılması ve Tanımlamanın Doğrulaması

Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Araştırma Laboratuvarı Kültür Bankası'nda yer alan ve Anadolu'nun farklı bölgelerinden izole edilmiş, önceki çalışmalarda tanımlanmış 228 maya suşu YPD Broth besiyerinde canlandırılarak (24 saat, 28°C) tek koloni düşürme yöntemi ile YPD agar besiyerine ekilmiştir. Safılık kontrolünden sonra suşların kriyojenik stok kültürleri elde edilmiştir.

Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Araştırma Laboratuvarı Kültür Bankası'nda bulunan 81 *Saccharomyces cerevisiae* ve 23 *Metschnikowia pulcherrima* suşunun izole edildikleri bölgeler, gelişim özellikleri, ITS, RPB2, Malditof analiz sonuçları dikkate alınarak 16 *Saccharomyces cerevisiae* ve 6 *Metschnikowia pulcherrima* suşu ön eleme ile seçilmiştir.

Kriyojenik olarak saklanan ön eleme yapılmış kültürler (%30 gliserol içinde -20 °C), hazırlanan ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilen YPD Broth besiyerine inoküle edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* suşları 24 saat boyunca 28°C'de geliştirilmiştir. *Metschnikowia pulcherrima* suşları 48 saat boyunca 28°C'de geliştirilmiştir.

Canlandırılan *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının makroskobik, mikroskobik görüntüleri ve 28°C'de sıvı ve katı kültürdeki gelişim özellikleri incelenmiştir.



Şekil 3.2. Stok kültür eldesi



Şekil 3.3. Suşların canlandırılması

3.1.2.3. Fermantasyon Aşaması için Suş Seçimi

Fermantasyon aşamasında kullanılacak suşların seçimi için ön eleme yapılmış *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR ile gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca seçim için, suşların fermantasyon ve farklı koşullardaki gelişim özelliklerini

de anlayabilmek adına *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının teknolojik özellikleri de incelenmiştir.

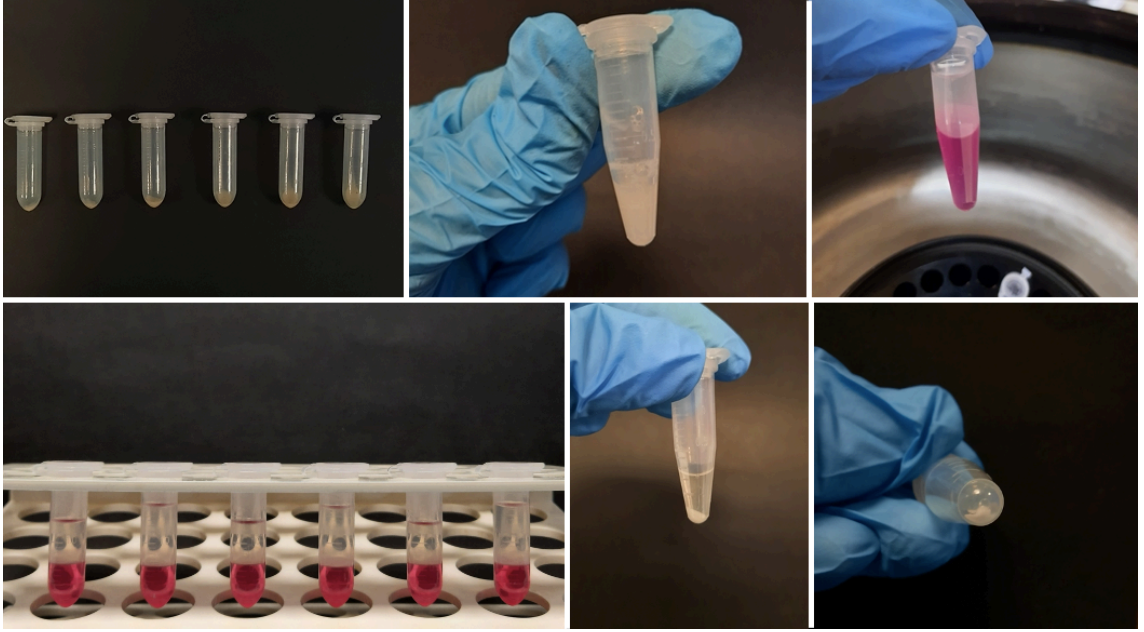
3.1.2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* Suş Seçimi

Tez çalışmasında kullanılacak olan *Saccharomyces cerevisiae* suşların seçimi için RNA izolasyonu, Ters transkripsiyon (cDNA sentezi) ve RT-qPCR ile gene ifade analizi yapılmıştır. Toplam RNA izolasyonu, EURx RNA Extracol (katalog numarası: E3700) kiti ile üretici firmanın sağladığı yöntem optimize edilerek gerçekleştirilmiştir.

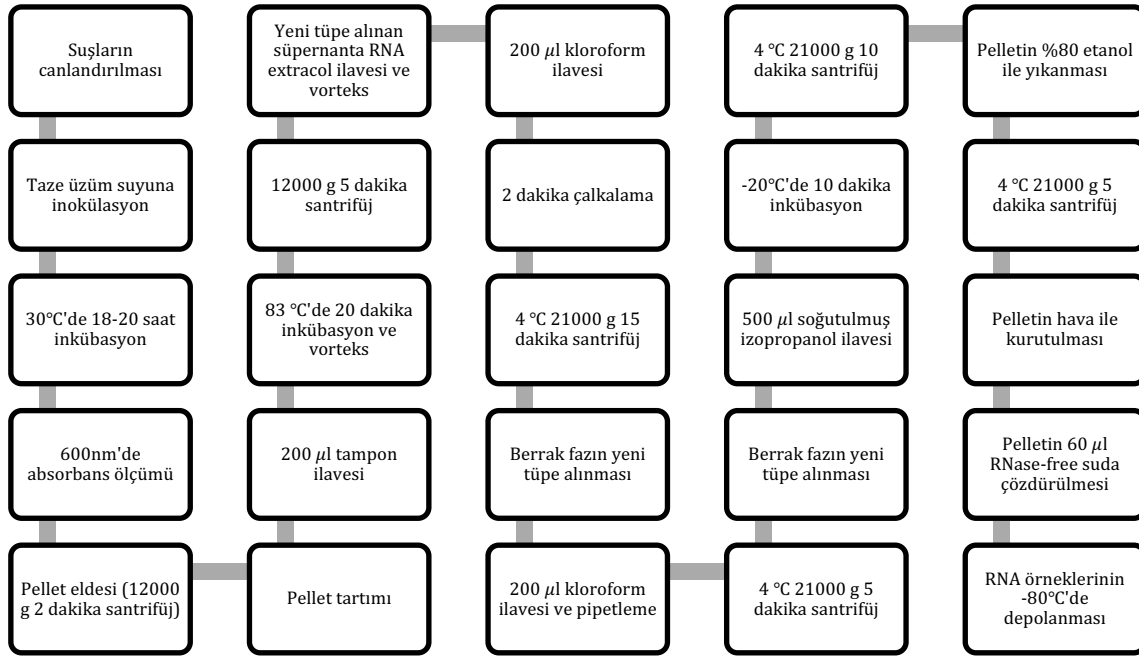
***Saccharomyces cerevisiae* suşlarının RNA izolasyonu**

Kriyojenik olarak saklanan *Saccharomyces cerevisiae* kültürleri 10 mL üzüm suyunda 28°C'de 2 gün geliştirilmiştir. 250 µl kültür taze 10 mL üzüm suyuna inoküle edilmiştir. 28°C'de 18-20 saat geliştirilen kültürlerin 600 nm'de absorbans değerleri Thermo Scientific GENESYS 10S Serisi UV-Görünür Spektrofotometre aleti kullanılarak ölçülmüştür. Ön çalışma olarak hazırlanan, *Saccharomyces cerevisiae* referans suşunun Absorbans-Log(hücre konsantrasyonu (kob/mL)) doğru denklemi kullanılarak gelişen kültürlerin hücre sayısı hesaplanmıştır. Kültürlerin 3 mL'si (OD600= 0.6-0.9) ($\sim 3 \times 10^7$ kob/mL) (ıslak hücre ağırlığı ~ 40 mg) 12000xg'de 2dk santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir. Pelet 200 µl Tris-HCl RNA lizis tamponunda (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, %0.5 SDS, %1 2-merkaptolanol, pH 7.36) yeniden süspanse edilmiştir. Örnekler arada vortekslenerek 83°C'de 20dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 12000xg de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatantları yeni tüpe alınmıştır. Süpernatantın üzerine 1 mL, EURx RNA Extracol eklenmiştir ve 2dk vorteks uygulanmıştır. Her örneğe 200 µl kloroform eklendikten sonra 2dk vorteks kullanmadan çalkalama yapılmıştır. 21000xg'de 15dk (4°C) santrifüj edilen örneklerde faz ayrımı gerçekleşmiştir. Faz ayrımı sonrasında RNA'nın bulunduğu berrak üst faz yeni tüpe alınıp, RNA kalitesini arttırmak için kloroform aşaması tekrarlanmıştır. 200 µl kloform eklenen örnekler 21000xg'de 5dk (4°C) santrifüj edilerek üst berrak faz yeni tüpe alınmıştır. Örneklerin üzerine -20°C'de soğutulmuş 500 µl izopropanol pipetleme yapılarak eklenmiştir ve örnekler 10dk

-20°C'de inkübe edilmiştir. 21000xg'de 10dk (4°C) santrifüj sonrasında elde edilen pellet 1 mL %80 etanol ile yıkanmıştır. 21000xg'de 5dk (4°C) santrifüj sonrasında pelletler hava ile kurulmuştur. Kuruyan pelletler 60 µl Rnase-free suda çözdürülmüş ve -80°C'de depolanmıştır. RNA izolasyonu deneyi buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyon protokolü iki teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. RNA izolasyonu



Şekil 3.5. RNA izolasyonu protokolü

Ekstrakte edilen RNA konsantrasyonlarının nükleik asit miktarı (ng/µl) ve 260 ila 280 nm'deki OD oranı ($A_{260/280}$) Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometresi ile ölçülmüştür.

***Saccharomyces cerevisiae* suşlarının ters transkripsiyonu (cDNA Sentezi)**

$A_{260/280}$ oranına göre seçilen RNA örneklerinden, RT-qPCR deneylerinde kullanılmak üzere cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi EURx smART First Strand cDNA sentez (katalog numarası: E0804-02) kiti ile, ilgili protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Ters transkripsiyon (cDNA Sentezi) protokolü

- 5 x cDNA Tamponunu oda sıcaklığında, çözülerek ve yavaşça vortekslenmiştir.
- RNase-free tüpe montaj reaksiyonu Çizelge 3.5'te gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.5. cDNA sentez bileşenleri ve miktarları I

Bileşen	Miktar
RNA (10 ng-5 µg)	x µl
primer*	1 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
RNase-free Water	12.5 µl'ye kadar

* 50 µM Oligo(dT)20

c. Tüp hafifçe karıştırılmıştır ve kısa süre santrifüjlenmiştir. Örnekler 65 ° C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler buz üzerinde soğutulmuştur.

d. Bileşenler belirtilen sırayla reaksiyon tüpüne eklenmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. cDNA sentez bileşenleri ve miktarları II

Bileşen	Miktar
5 x cDNA Buffer	4 µl
DTT 0.1 M	2 µl
RNase Inhibitor 50 U/µl	0.5 µl
smART (200 U/µl)	1 µl
Toplam	20 µl

f. Örnek önceden 65 ° C'ye ısıtılmış dry bath inkübatörde (Major Science, MD-01N) 45 dakika inkübe edilmiştir.

g. 85 ° C'de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

h. cDNA, RT-PCR çalışması için kullanılmak üzere -80 ° C'de saklanmıştır.

cDNA sentezi iki teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. cDNA sentezi

***Saccharomyces cerevisiae* suşlarının RT-qPCR ile gen ifade analizi**

Saccharomyces cerevisiae suşlarının *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen aktivitelerini analiz edebilmek için RT-qPCR uygulamasında 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (katalog numarası: 08-25-00001) kiti kullanılmıştır.

Çizelge 3.7. RT-qPCR protokolü

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
5x HOT FIREPol®EvaGreen® qPCR Mix Plus	4 µl	1x
Primer Forward (10 µM)	A ¹	B ¹
Primer Reverse (10 µM)	A ¹	B ¹
DNA Şablonu ²	2 µl	Değişken ²
H ₂ O PCR grade	13.4 µl	
Toplam	20 µl	

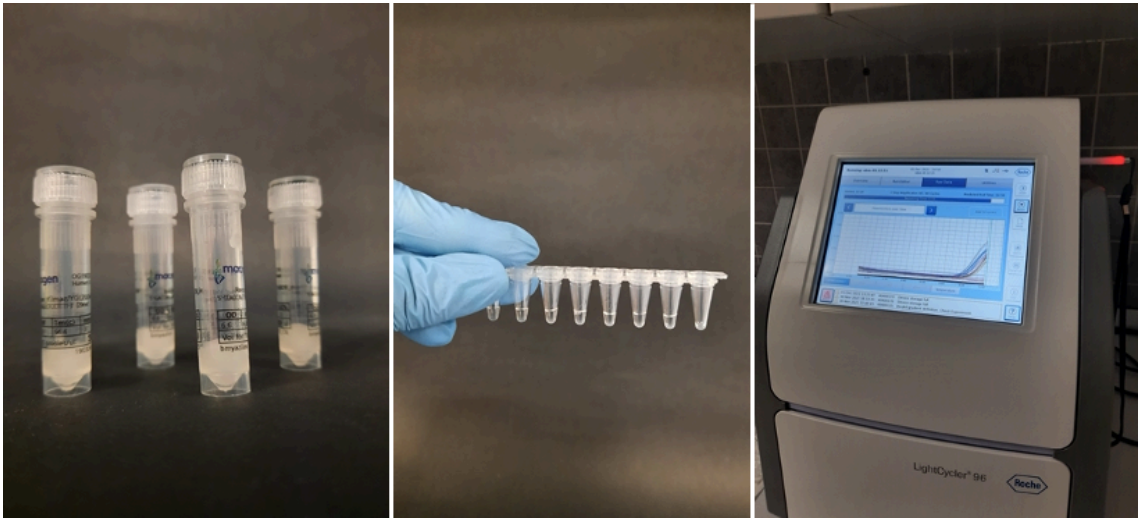
¹ *ADH2* için A=0.50 µl B=0.25 µM, *ADH5* için A=0.40 µl B=0.20 µM, *ARO8* ve *ARO9* için A=0.30 µl B=0.15 µM

² cDNA konsantrasyonu 5-120 ng/µl

Döngü Adımı	Sıcaklık	Zaman	Döngü
İlk aktivasyon ³	95°C	12 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 s	40
Tavlama	C ⁴	20 s	
Uzama	72°C	20 s	

³ Polimerazı aktive etmek için inkübasyon adımı.

⁴ ADH2 için C=60 °C, AR08, ARO9 ve ADH5 için C=54°C



Şekil 3.7. RT-qPCR ile gen ifade analizi

3.1.2.3.2. *Metschnikowia pulcherrima* Suş Seçimi

Tez çalışmasında kullanılacak olan *Metschnikowia pulcherrima* suşların seçimi için RNA izolasyonu, Ters transkripsiyon (cDNA sentezi) ve RT-qPCR ile gene ifade analizi yapılmıştır. Toplam RNA izolasyonu, EURx RNA Extracol (katalog numarası: E3700) kiti ile üretici firmanın sağladığı yöntem optimize edilerek gerçekleştirilmiştir.

***Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RNA izolasyonu**

Metschnikowia pulcherrima suşlarının RNA izolasyonu EURx RNA Extracol (katalog numarası: E3700) kiti kullanılarak 3.1.2.3.1'de anlatıldığı gibi Şekil

3.5'teki protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu iki teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

***Metschnikowia pulcherrima* suşlarının ters transkripsiyonu (cDNA Sentezi)**

$A_{260/280}$ oranına göre seçilen RNA örneklerinden, gerçek zamanlı RT-qPCR deneylerinde kullanılmak üzere *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının cDNA sentezi EURx smART First Strand cDNA sentez (katalog numarası: E0804-02) kiti ile, ilgili protokol izlenerek (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6) iki teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

***Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RT-qPCR ile gen ifade analizi**

Metschnikowia pulcherrima suşlarının RT-qPCR uygulaması ile *ADH2* ve *ADH5* gen aktivitelerinin analizi 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (katalog numarası: 08-25-00001) kiti kullanılarak 3.1.2.3.1'de anlatıldığı gibi Çizelge 3.7'deki protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.3.3. Teknolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Şarap endüstrisinde başlangıç kültür olarak kullanılan, alkol fermantasyonu gerçekleştiren maya suşları için kriterler bulunmaktadır. Bu kriterlere yönelik, *Metschnikowia pulcherrima* ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarında aşağıdaki analizler yapılmıştır [108, 122].



Şekil 3.8. Teknolojik özelliklerin belirlenmesi

Yüksek sıcaklıkta gelişme

Saccharomyces cerevisiae ve *Metschnikowia pulcherrima* suşları ($\sim 10^7$ kob/mL) 10 mL üzüm suyuna aşılanmıştır. Mayalar 37 ° C ve 42 ° C'de 7 gün inkübe edilerek gelişimleri izlenmiştir [123].

Düşük pH değerinde gelişme

Saccharomyces cerevisiae ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının düşük pH değerlerindeki gelişimini incelemek için normal üzüm suyu (pH 3.3) ve pH değerleri 4.0 ve 7.0'e ayarlanan üzüm suyu kullanılmıştır. 28°C'de 24 saat boyunca canlandırılan maya suşları, farklı pH değerindeki (pH 3.3, pH 4.0 ve 7.0) üzüm suyuna inoküle ($\sim 10^7$ kob/ mL) edilmiştir. Suşların 28°C'de gelişimi 7 gün boyunca izlenmiştir [124].

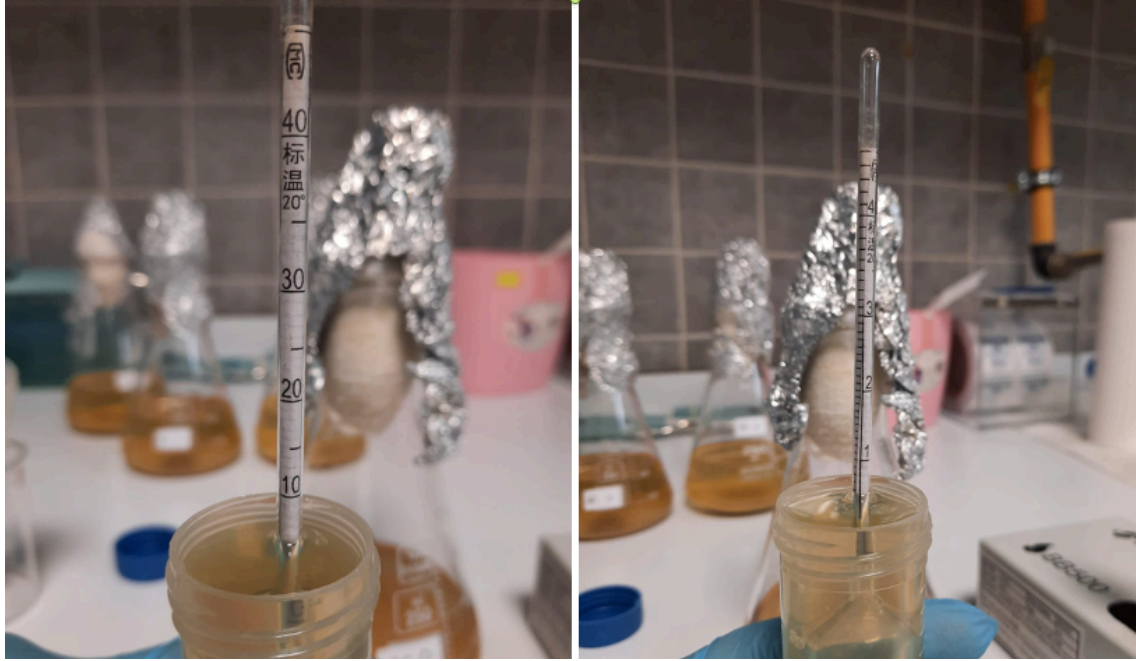
Fermantasyon hızı

Mayaların fermantasyon hızı, fermantasyon süresince şeker ve alkol miktarındaki değişimin izlenmesi ile belirlenebilir. Bu tez çalışmasında 100 mL üzüm suyuna inoküle ($\sim 10^7$ kob/mL) edilen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia*

pulcherrima suşlarının saf kültürleri elde edilmiştir. Kültürlerin fermantasyon hızlarını incelemek için 7 günlük fermantasyon süresince her gün alkol, briks, pH ve sıcaklık ölçümü yapılmıştır [125].

Alkol ölçümü

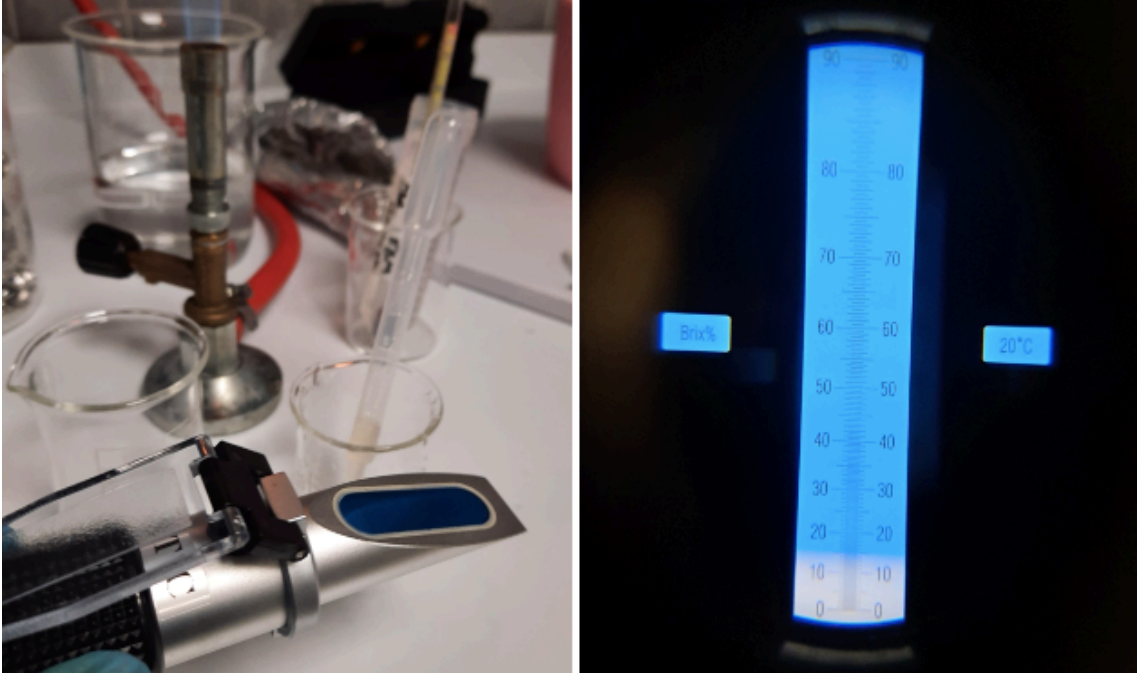
Alkol ölçümü, %0-40 ölçekli AEK-Tech alkolmetresi kullanılarak 24 ° C'de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. Alkol ölçümü

Briks ölçümü

Briks derecesi, ATC (%0-90 Brix) refraktometresi kullanılarak saptanmıştır.



Şekil 3.10. Briks ölçümü

pH ölçümü

Fermantasyon süresince pH ölçümü her gün aynı saatte Adwa Ad12 pH metresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.11. pH ölçümü

Köpük oluşturma

Fermantasyon süresince her gün erlenlerde oluşan köpük miktarı mm olarak ölçölmüştür [124].



şekil 3.12. Köpük oluşumu

Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Araştırma Laboratuvarı'na ait stok költürlerde bulunan ve Çizelge 3.3'te verilen 16 *Saccharomyces cerevisiae* suşu arasından fermantasyon çalışmasında kullanılmak üzere *Saccharomyces cerevisiae* suş seçim için, RT-qPCR uygulaması sonuçlarına bakılarak aromatik aminotransferaz I, II (*ARO8*, *ARO9*) ve alkol dehidrojenaz II, V (*ADH2*, *ADH5*) enzim genlerinin aktiviteleri incelenmiştir.

Metschnikowia pulcherrima suş seçim için, Çizelge 3.2'de verilen 6 *Metschnikowia pulcherrima* suşunun RT-qPCR uygulaması sonuçlarına bakılarak alkol dehidrojenaz II, V (*ADH2*, *ADH5*) enzim genlerinin aktiviteleri incelenmiştir.

Ayrıca fermantasyon aşamasında kullanılmak üzere seçilecek *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının teknolojik özellikleri de incelenmiştir.

Fermantasyon aşamasında kullanılacak 3 *Saccharomyces cerevisiae* ve 2 *Metschnikowia pulcherrima* suşu bu analizler sonucunda belirlenmiştir.

3.1.2.4. Fermantasyon

Tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonu ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonu olmak üzere iki farklı fermantasyon gerçekleştirilmiştir.

Yukarıda bahsedildiği gibi *Metschnikowia pulcherrima*'nın alkol içeriği %5'e ulaşana kadar şarabı fermente edebilme ve *Saccharomyces* dışında tüm maya türlerinin inhibe ederek *Saccharomyces cerevisiae* için uygun fermantasyon ortamı sağlama özelliği vardır. Buradan yola çıkarak, bu çalışmada karışık kültür fermantasyonu sıralı fermantasyon olarak uygulanmıştır. İlk olarak *Saccharomyces* olmayan *Metschnikowia pulcherrima* kültürü inoküle edilmiştir ve 2 gün sonra *S. cerevisiae* ilave edilmiştir.

Üzüm suyu

Şarap fermantasyon ortamına benzerlik sağlayabilmek adına çalışmada iki fermantasyonda da fermantasyon ortamı olarak pastörize ticari beyaz üzüm suyu kullanılmıştır.

Koşullar

Kriyoprotektif ajan olarak gliserol ile desteklenmiş kriyosiyallerde -20 ° C'de tutulan suşlar, 28 ° C'de 10 mL üzüm suyu içinde 48 saat canlandırılmıştır. Canlanan kültürlerden tek koloni düşürme yöntemi ile YPD agara ekim yapılmıştır. Fermantasyon aşamasında kullanılacak suşların canlandırılması için,

bahsedilen YPD agarda gelişen mayalardan öze ile koloni alınıp 10 mL taze üzüm suyuna inoküle edildikten sonra 28 ° C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Sıralı karışık kültür fermantasyonunda, canlandırılan kültürlerden fermantasyonun -2. Günü *Metschnikowia pulcherrima* kültürü (~ 6 x 10⁶ kob/mL) daha sonra fermantasyonun 0. Günü *Saccharomyces cerevisiae* kültürü (~ 2 x 10⁷ kob/mL) 250 mL Erlenmeyerlerdeki 200 mL pastörize üzüm suyuna 3:1 oranında inoküle edilerek sıralı fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Üzüm suyu günde 3 kez çalkalanarak ve bir kez havalandırılarak toplamda 17 gün (-2,-1, 0,...,14) ~24 ° C'de fermente edilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae saf kültür fermantasyonu ise canlandırılan *Saccharomyces cerevisiae* kültürü (~ 2 x 10⁷ kob/mL) fermantasyonun 0. Günü, 250 mL Erlenmeyerlerdeki 200 mL steril üzüm suyuna inoküle edilerek gerçekleştirilmiştir. Üzüm suyu günde 3 kez çalkalanarak ve bir kez havalandırılarak 14 gün ~24 ° C'de fermente edilmiştir.

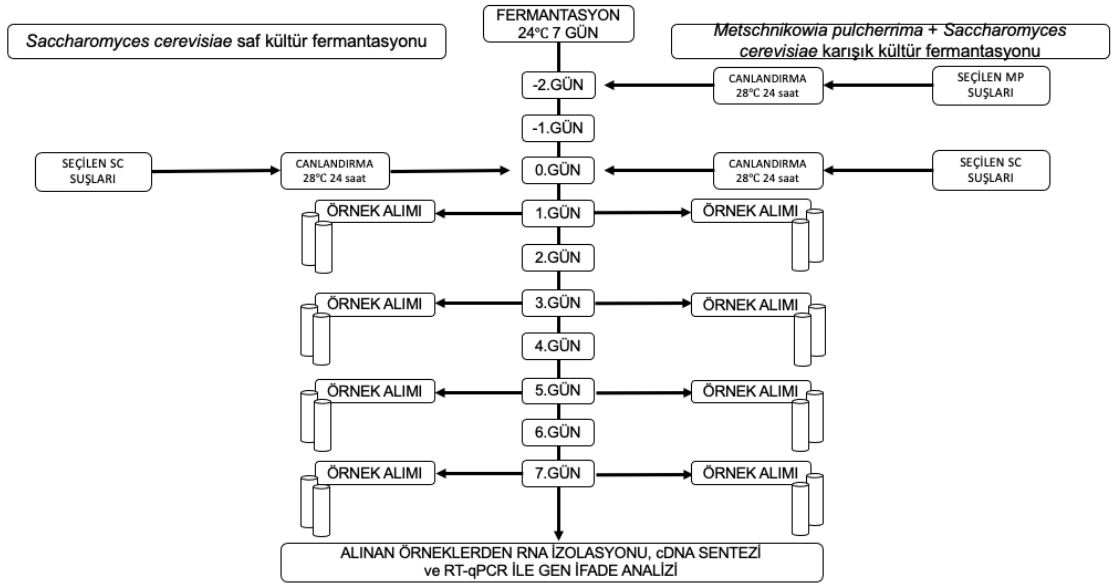
Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültürlerinin fermantasyonu sırasında fermantasyonun 1. 3. 5. ve 7. günlerinde alınan örneklerin RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR ile gen ifade analizi sayesinde fermantasyon süreci transkriptomik olarak izlenmiştir. Ayrıca, toplamda 17 gün süren fermantasyon sırasında yapılan günlük briks, alkol, pH ölçümleri sayesinde fermantasyon takibi gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süreci biyokimyasal olarak da incelenmiştir.

Fermantasyon sürecinin transkriptomik analizi

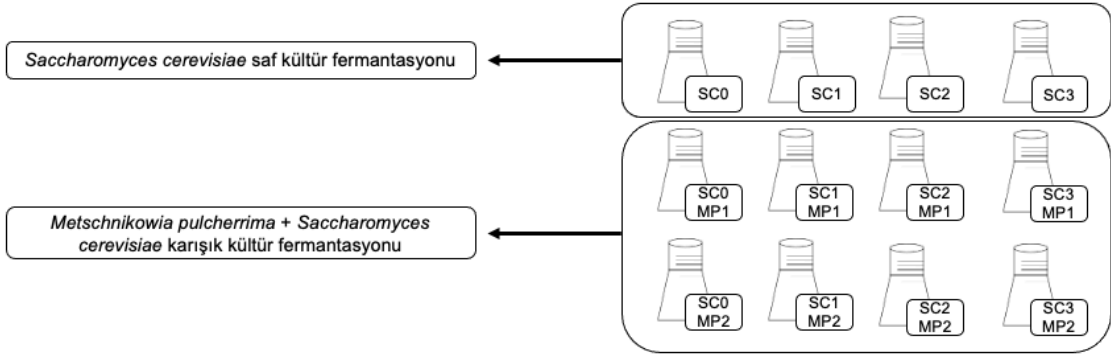
Örnekleme

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonunun 1., 3., 5., ve 7. günü birer teknik tekrarlar örnekler alınmıştır. Toplamda 96 adet (24x4) örnek elde edilmiştir (Şekil 3.13).

Fermantasyon aşamasında kullanılacak *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür kombinasyonlarının deneysel tasarımı Şekil 3.14'te verilmiştir.



Şekil 3.13. Fermantasyon deney tasarımı



Şekil 3.14. Fermantasyon örneklerinin deneysel tasarımı

RNA izolasyonu

RT-qPCR ile gen ifade ve teknolojik özelliklerin belirlenmesi analizi sonuçlarına göre seçilen suşlar ile hazırlanan *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve

Metschnikowia pulcherrima + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasında (1., 3., 5. ve 7. günler) alınan örneklerden RNA izolasyonu EURx RNA Extracol (katalog numarası: E3700) kiti kullanılarak 3.1.2.3.1'de anlatıldığı gibi Şekil 3.5'teki protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu örneğin alındığı gün iki teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Ters transkripsiyon (cDNA sentezi)

Fermantasyon sırasında alınan örneklerden elde edilen RNA örneklerinin nükleik asit miktarı ve kalitesi ($A_{260/280}$ oranı) ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre seçilen RNA örneklerinden, RT-qPCR deneylerinde kullanılmak üzere cDNA sentezi, EURx smART First Strand cDNA sentez (katalog numarası: E0804-02) kiti ile, ilgili protokol izlenerek (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6) iki teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR ile gen ifade analizi

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasında *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen ifade analizindeki değişimleri tespit etmek amacıyla RT-qPCR uygulaması, 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (katalog numarası: 08-25-00001) kiti kullanılarak 3.1.2.3.1'de anlatıldığı gibi Çizelge 3.7'deki protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon takibi

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasında fermantasyon özelliklerini incelemek amacıyla fermantasyon boyunca (17 gün) her gün aynı saatte briks, pH, alkol ölçümü yapılmıştır.

Alkol ölçümü

Alkol ölçümü, %0-40 ölçekli AEK-Tech alkolmetresi kullanılarak 24 ° C'de gerçekleştirilmiştir.

Briks ölçümü

Briks derecesi, ATC (%0-90 Brix) refraktometresi kullanılarak saptanmıştır.

pH ölçümü

Fermantasyon süresince pH ölçümü her gün aynı saatte Adwa Ad12 pH metresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada kullanılan mikrodizi verileri elde edilirken tüm hibridizasyonlardan ve dizi normalleştirilmesinden elde edilen veriler GeneSpringGX 12.1 (Agilent) program dili kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerde gerekli istatistiksel yöntemler karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Normalizasyon adımı için RMA (Robust Microarray Analysis) sonuçları kullanılmıştır. Isı stresi uygulaması altında farklı şekilde ifade edilen genleri belirlemek için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılarak $P < 0.05$ olmak üzere ve en az 2 kat değişim düzeyi incelenmiştir.

RT-qPCR ile gen ifade analizinden sonra Lightcycler 96 yazılımı (Roche Diagnostic) kullanılarak öncelikle Ct değerleri elde edilmiştir. İlgili genlerin standart eğrileri oluşturulurken *Saccharomyces cerevisiae* referans suşunun cDNA konsantrasyonları kullanılmıştır. Tez çalışmasındaki tüm gen ifade düzeyi analizleri, bahsedilen standart eğri denklemleri ve Ct değerleri kullanılarak kesin (absolut) kuantifikasyon metoduna göre belirlenmiştir. Gen ifade düzeyinde kullanılan formül 'Gen İfadesi Miktarı= $10^{(Ct-b)/m}$ 'dir. Formülde Ct kuantifikasyon döngüsünü, b standart eğride y eksenini kesen noktayı, m ise standart eğri eğimini temsil etmektedir [126].

Tez çalışmasında RT-qPCR ile gen ifade analizi sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS-16.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler birbirinden bağımsız üç paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Logaritmik gen ifade düzeylerinin ortalamaları arasındaki istatistiksel anlamlı farklılık tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile incelenmiştir ($P < 0.05$). Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı anlamak için Duncan testi kullanılmıştır.

Gen ifade ve teknolojik özelliklerin belirlenmesi analizi verileri temel bileşen analizi (PCA); dağılım grafikleri ve ısı haritası çizimi ve analizleri için OriginPro Yazılımı (Northampton, MA) kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının sıralı fermantasyonunda meydana gelen maya-maya etkileşimlerin transkriptomik seviyede incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma iki kısımdan oluşacak şekilde planlanmıştır.

Tez çalışmasının birinci kısmında, mikrodizi veri analizi yapılarak ısı stresinin, Ehrlich yolağında yer alan aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin ekspresyon profili üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, mikrodizi analizi ile elde edilen sonuçlar değerlendirilerek seçilen aromatik bileşik sentezinde yer alan bazı genlerin *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasındaki transkripsiyonel yanıtı incelenmiştir. Ayrıca fermantasyon süreci biyokimyasal olarak da izlenmiştir.

4.1. Mikrodizi Verilerinin Analizi

2018 yılında Varol vd. tarafından gerçekleştirilen *Saccharomyces cerevisiae* için ısı stresi yanıtının transkriptomik analizi sonrası elde edilen ve ArrayExpress Database'e yükelenen [E-MTAB-3459](#) aksesyon numaralı açık veri kullanılarak kontrole göre karşılaştırılmıştır. Isı şok uygulamasında 1244 prob setinin ekspresyon seviyelerinde en az 2 kat artış veya azalma tespit edilmiştir. Sıcaklık değişim uygulamasında ise 1317 prob setinin ekspresyon seviyelerinde en az 2 kat fark olduğu tespit edilmiştir [109].

Isı şoku uygulamasında kontrol (30°C) ile ısı şoku öncesi 25°C'de 6 saat inkübe edilen hücrelerin ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında, 186 (P<0.05) transkriptin önemli ölçüde farklı olduğu belirlenmiştir. Bu 186 transkriptten 74'ünün ekspresyon düzeyinde artış, 112'sinin ekspresyon düzeyinde düşüş gözlemlenmiştir. 25°C'de inkübasyondan hemen sonra 37°C'de 1 saat inkübe

edilerek ısı şok stresi uygulanan hücrelerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, anlamlı ($P<0.05$) fark olan transkript sayısının 902'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. 902 transkriptin 185'inde ekspresyon seviyesi artarken 717'sinde ekspresyon seviyesi azalmıştır.

Sıcaklık değişim uygulamasında ise 37°C'de 6 saat inkübe edilen hücrelerin ekspresyon seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 409 transkriptte anlamlı ($P<0.05$) artış veya azalma tespit edilmiştir. 409 transkriptten 125 tanesinin ekspresyon seviyesinde artış, 284 tanesinin ise ekspresyon seviyesinde düşüş tespit edilmiştir. Aynı hücrelerin 25°C'de 1 saatlik inkübasyonundan yani stres uygulamasından sonra ekspresyon profilleri incelendiğinde, anlamlı ($P<0.05$) artış ve azalış olan transkript sayısının 990'a yükseldiği tespit edilmiştir. 990 transkriptin 555'inin ekspresyon düzeyleri artarken, 435'nin gen ekspresyon seviyeleri azalmıştır.

Bu çalışma verisi kullanılarak, *Saccharomyces cerevisiae* genomunun ısı şoku ve sıcaklık değişim stresleri altında genel gen ekspresyon profilinin belirlenmesine ek olarak, önemli farklılık gösteren prob setlerine karşılık gelen gen listeleri üzerinden ısı stresine karşı yerel maya suşundaki aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin (Ehrlich yolak genleri) ekspresyon profili ilk defa incelenmiştir.

Çizelge 4.1.'de ısı stresi uygulaması öncesi ve sonrasında gen ekspresyon düzeyinde önemli bir farklılık gösteren aromatik bileşik sentezi ile ilgili *ADH2*, *ADH4*, *ADH5*, *BAT2*, *PDC5* ve *SFA1* genlerinin prob set ID'si, maya metabolizmasında yer aldığı proses ve ısı stresi uygulaması öncesi ve sonrasındaki gen ekspresyon profilleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. Mikrodizi veri analizi sonucuna göre, Ehrlich yolağında rol alan genlerin ısı stresi öncesi ve sonrasındaki gen ekspresyonlarındaki değişim

Probe Set ID	Proses	Gen	Isı Şok Öncesi (C / 6 saat 25 °C)	Isı Şok Sonrası (6 saat 25 °C / 1 saat 37 °C)	Sıcaklık Değişimi Öncesi (C / 6 saat 37 °C)	Sıcaklık Değişimi Sonrası (6 saat 37 °C / 1 saat 25 °C)
1774070_at	Transferaz aktivitesi	<i>ADH2</i>	-	-	13.30 ↑	16.76 ↑
1778317_at	Oksidoredüktaz aktivitesi	<i>ADH4</i>	-	-	4.75 ↓	6.78 ↓
1779344_at	Oksidoredüktaz aktivitesi	<i>ADH5</i>	3.24 ↓	4.24 ↓	-	-
1777344_at	Moleküler fonksiyon	<i>BAT2</i>	-	-	-	2.07 ↑
1774937_at	Metabolik proses	<i>PDC5</i>	-	-	3.31 ↓	2.80 ↓
1769952_at	Katalitik aktivite	<i>SFA1</i>	-	3.99 ↑	-	-

Çizelge 4.1'e göre ısı şok uygulaması öncesi ve sonrasında gen ekspresyon seviyesinde anlamlı bir farklılık gösteren, aromatik bileşik sentezi ile ilgili tek gen *ADH5*'tir.

Çizelge 4.1'e göre ısı değişim uygulaması öncesi ve sonrasında ise kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında gen ekspresyon seviyesindeki en büyük artış *ADH2* geninde olmuştur.

ADH2 ve *ADH5* genleri Ehrlich yolağının indirgenme aşamasında etanol dehidrojenaz enzimini kodlayan genlerdir. Bu genler genellikle fusel alkol üretiminden ziyade etanol üretimi hakkında fikir verir (Bölüm 2.3). Çalışmada kullanılmak üzere ısı stresi uygulamasında gen ekspresyon seviyelerinde önemli bir farklılık gösteren ve Ehrlich yolağında bulunan *ADH2* ve *ADH5* genleri seçilmiştir.

Ehrlich yolağının transaminasyon aşamasında aromatik aminotransferaz I ve II'yi kodlayan *ARO8* ve *ARO9* genleri çalışmada kullanılmak üzere seçilen diğer iki gendir. Böylece bu çalışmada Ehrlich yolağının iki farklı aşaması da (transaminasyon ve indirgenme) izlenebilmiştir.

4.2. Suşların Canlandırılması ve Tanımlamanın Doğrulaması

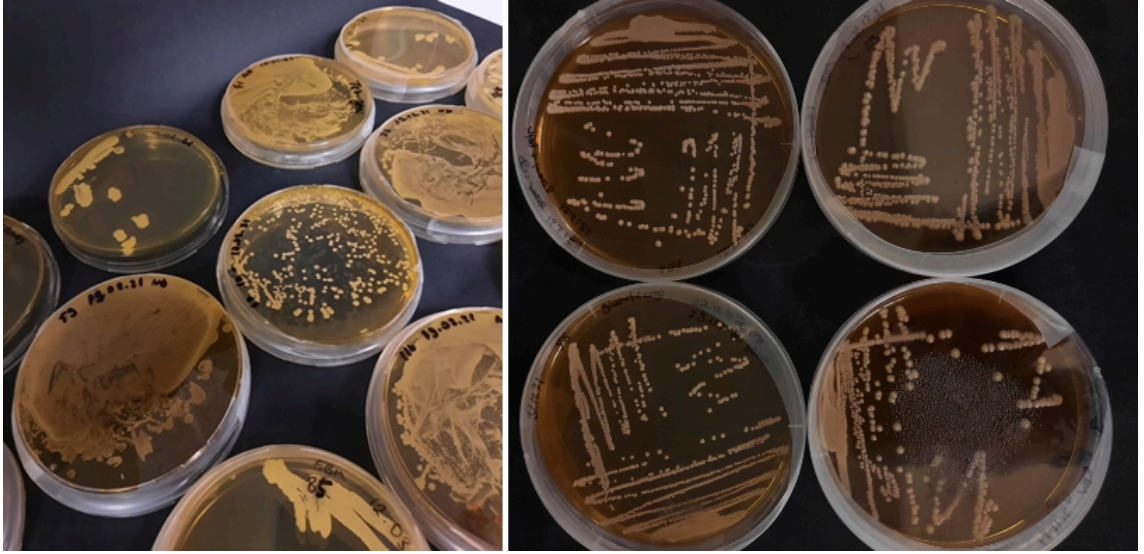
Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Araştırma Laboratuvarı Kültür Bankası'nda bulunan izole edildikleri bölgeler, gelişim özellikleri, ITS, RPB2, Malditof analiz sonuçları dikkate alınarak ön eleme ile seçilen, kriyojenik olarak saklanan 16 *Saccharomyces cerevisiae* (28°C'de 24 saat) ve 6 *Metschnikowia pulcherrima* suşu (28°C'de 48 saat) canlandırılmıştır. Çizelge 4.2'de YPD Broth besiyerinde, 28°C'de 24 saat geliştirilen *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının numarası, izolasyon kodu, izole edildiği bölge, gelişme özellikleri, makroskopik ve mikroskopik morfolojisi verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gelişme özellikleri ve makroskopik, mikroskopik morfolojileri

No	İzolasyon Kodu	Kaynağı	Gelişme	Makroskopik Morfoloji	Mikroskopik Morfoloji
3	HUF16MOT10003	Pak yaş maya	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
22	HUF16M1C0004	Şarapçılık (Chr. Hansen)	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
25	HUF16M2K10004	Hacettepe Üniversitesi	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
41	HUF16M3B11021	Kırıkkale Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
44	HUF16M3C11032	Kırşehir Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
45	HUF16M3C11033	Kırşehir Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
57	HUF16M3G11088	Eskişehir Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
59	HUF16M3H11101	Çankırı Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
66	HUF17M3C31063	Kırşehir2 Üzüm	İyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
72	HUF17M3D31088	Nevşehir2 Üzüm	İyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
81	HUF17M3E21113	Aksaray2 Üzüm	İyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
82	HUF17M3E21114	Aksaray2 Üzüm	İyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
85	HUF17M3F21122	Ankara1 Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
116	HUF17M3H21208	Karaman2 Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
117	HUF17M3H21209	Karaman2 Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik
133	HUF18M2Y10013	Ankara Üniversitesi	İyi	Krem, Mat, Pürüzsüz	Oval, Tipik

Canlandırma sonucunda *Saccharomyces cerevisiae* suşlarından 66, 72, 82, 82 ve 133 numaralı suşların gelişimi diğer suşlardan zayıf olduğu gözlemlendi.

Saccharomyces cerevisiae suşlarının hepsi benzer makroskobik ve mikroskobik morfoloji göstermiştir. 28°C'de 3 gün inkübasyon edilen *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının makroskobik görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının makroskobik görüntüsü (28°C'de 3 gün inkübasyon)

Çizelge 4.3'te YPD Broth besiyerinde, 28°C'de 48 saat geliştirilen *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının numarası, izolasyon kodu, izole edildiği bölge, gelişme özellikleri, makroskobik ve mikroskobik morfolojisi verilmiştir.

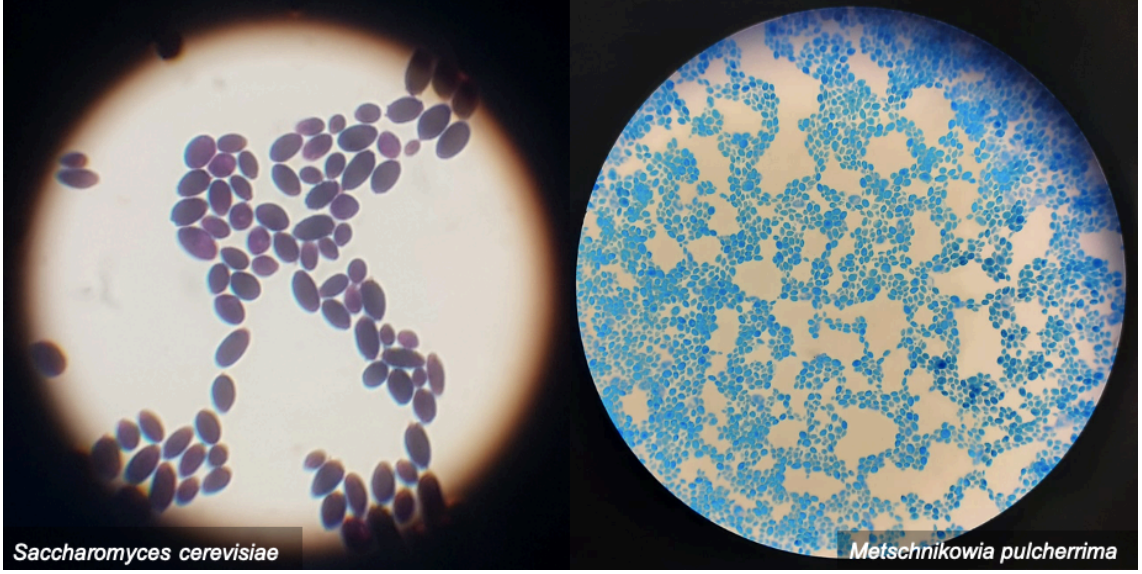
Saccharomyces cerevisiae ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının mikroskobik görüntülerinin karşılaştırılması Şekil 4.2'de verilmiştir.

28°C'de 3 gün inkübasyon edilen *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının makroskobik görüntüsü Şekil 4.3'te verilmiştir.

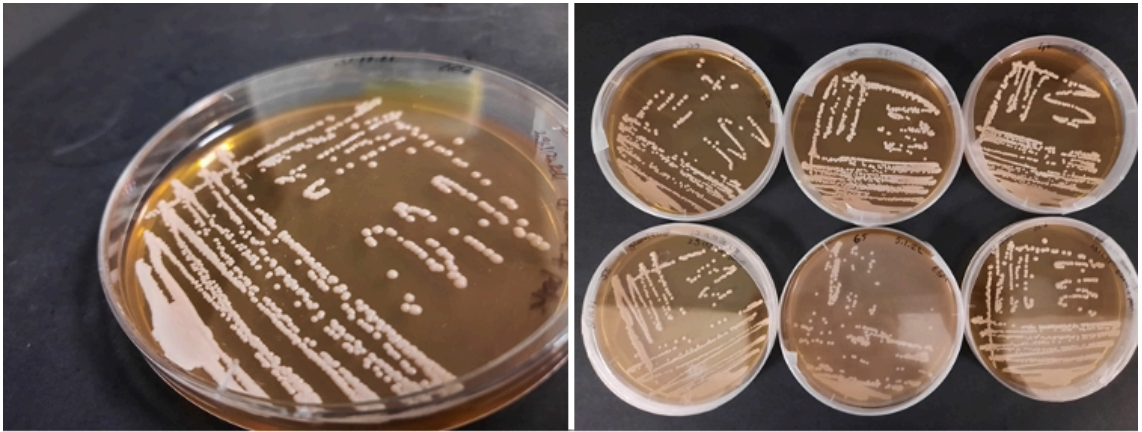
Çizelge 4.3. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının gelişme özellikleri ve makroskobik, mikroskobik morfolojileri

No	İzolasyon Kodu	Kaynağı	Gelişme	Makroskobik Morfoloji	Mikroskobik Morfoloji
33	HUF16M3A11002	Kayseri Üzüm	Çok iyi	Krem, Parlak, Pürüzsüz, Kırmızı Pigment Üretimi	Oval, Tipik
40	HUF16M3B11020	Kırıkkale Üzüm	Çok iyi	Krem, Parlak, Pürüzsüz, Kırmızı Pigment Üretimi	Oval, Tipik
46	HUF16M3C11034	Kırşehir Üzüm	Çok iyi	Krem, Parlak, Pürüzsüz, Kırmızı Pigment Üretimi	Oval, Tipik
58	HUF16M3G11089	Eskişehir Üzüm	Çok iyi	Krem, Parlak, Pürüzsüz, Kırmızı Pigment Üretimi	Oval, Tipik
65	HUF17M3C21050	Kırşehir1 Üzüm	Çok iyi	Krem, Mat, Pürüzlü, Kırmızı Pigment Üretimi	Oval, Tipik
106	HUF17M3H21175	Çankırı1 Üzüm	Çok iyi	Krem, Parlak, Pürüzsüz, Kırmızı Pigment Üretimi	Oval, Tipik

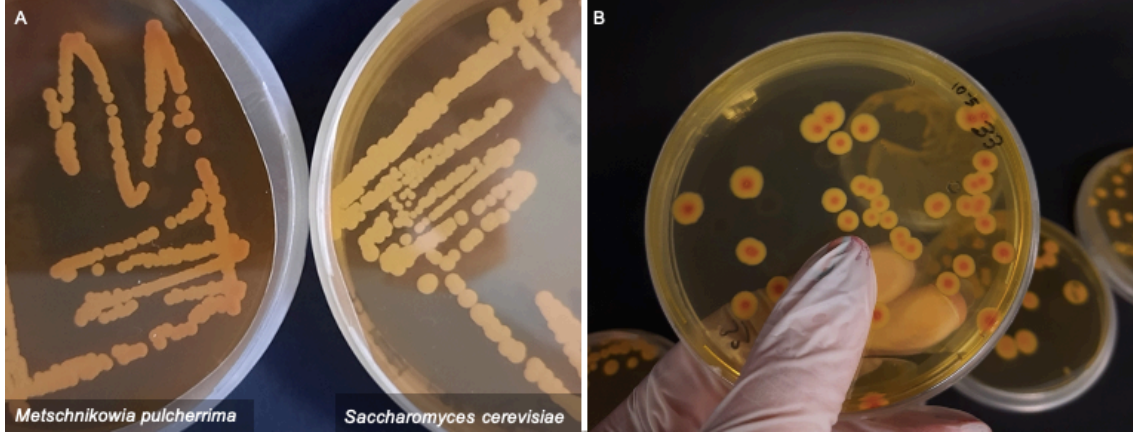
Canlandırma sonucunda *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının gelişme özelliklerinin ve mikroskobik morfolojilerinin benzer olduğu tespit edilmiştir. Makroskobik morfolojilerine bakıldığında 65 numaralı *Metschnikowia pulcherrima* suşunun, diğer suşlardan farklı olarak mat ve pürüzlü olduğu gözlemlenmiştir. 65 numaralı *Metschnikowia pulcherrima* suşunun koloniye kırmızı-kahverengi renk veren pigment üretimi de diğer suşlara göre daha azdır. Koloniye kırmızı-kahverengi renk veren pigment üreten *Metschnikowia pulcherrima* suşu ile pigment üretimi olmayan *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının koloni görüntülerinin karşılaştırılması Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.2. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima*'nın mikroskopik görüntüsü



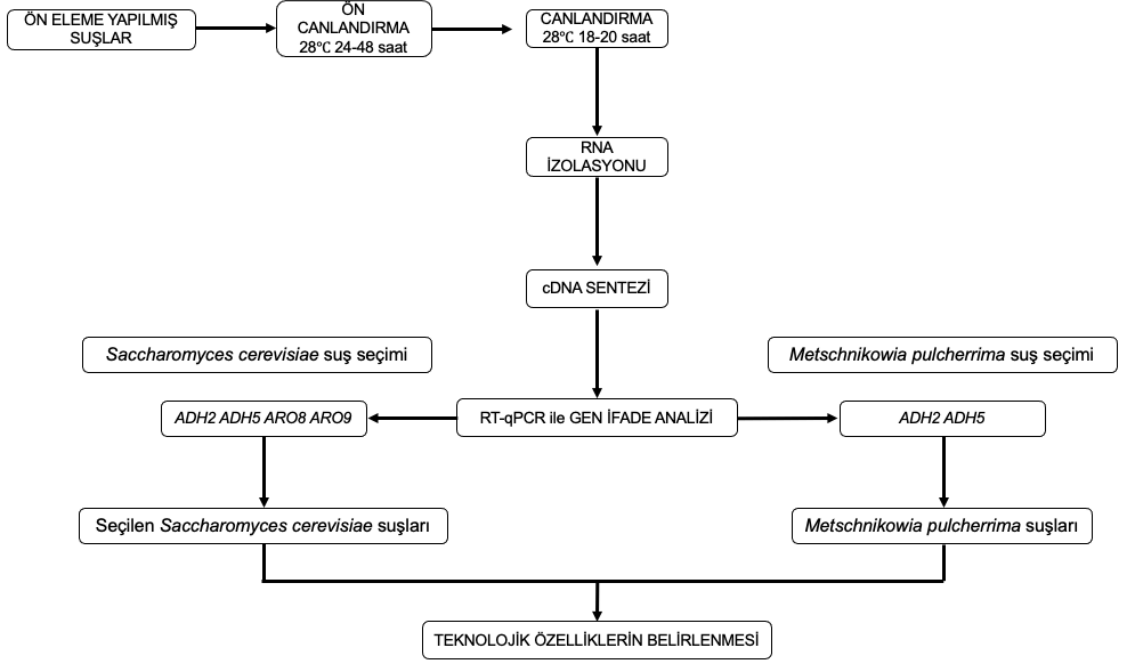
Şekil 4.3. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının makroskopik görüntüsü (28°C'de 3 gün inkübasyon)



Şekil 4.4. Şekil A: *Metschnikowia pulcherrima* ve *Saccharomyces cerevisiae* koloni renk karşılaştırması. Şekil B: *Metschnikowia pulcherrima* suşlarında kırmızı-kahverengi renkli pigment oluşumu (28°C'de 3 gün inkübasyon)

4.3. Fermantasyon Aşaması için Suş Seçimi

Fermantasyon aşamasında kullanılacak suşların seçimi için ön eleme yapılmış suşlar canlandırılmıştır. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RT-qPCR ile gen ifade analizi gerçekleştirilmiştir. Suşların RT-qPCR ile gen ifade analizi sonuçları ve teknolojik özellikleri incelendikten sonra suş seçimi gerçekleştirilmiştir. Suş seçimi sırasında izlenen yol Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suş seçimi

4.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* Suş Seçimi

Fermantasyon aşamasında kullanılmak üzere seçilecek *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR ile *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen ifade analizi yapılmıştır.

4.3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının RNA İzolasyonu

Saccharomyces cerevisiae suşlarının RNA izolasyonu Şekil 3.5'teki protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA konsantrasyonlarının nükleik asit miktarı (ng/µl) ve 260 ila 280 nm'deki OD oranı ($A_{260/280}$) Nanodrop 2000c spektrofotometre ile ölçülmüştür. RNA izolasyonu iki teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4'te *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının numaraları, başlangıç hücre konsantrasyonları, RNA izolasyonu öncesi elde edilen yaş hücre pellet ağırlığı, RNA izolasyonu sonucunda elde edilen nükleik asit konsantrasyonları ve saflık değerleri ($A_{260/280}$) verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının RNA izolasyon sonuçları

Suş No	Başlangıç Hücre kons. (kob/mL)	Yaş hücre ağırlığı (mg)		Nükleik Asit (ng/µl)		Absorbans (260/280)	
		1. Paralel	2. Paralel	1. Paralel	2. Paralel	1. Paralel	2. Paralel
3	3x10 ¹⁴	51.00	46.00	2084.60	2540.40	2.02	1.99
22	3x10 ¹⁰	38.00	38.00	569.70	672.40	1.90	1.88
25	3x10 ³	33.00	27.00	250.70	39.50	1.88	1.67
41	3x10 ⁸	60.00	70.00	616.90	214.10	1.94	1.90
44	3x10 ⁸	52.00	60.00	460.00	377.10	1.92	1.93
45	3x10 ⁷	51.00	43.00	497.10	385.50	1.91	1.87
57	3x10 ⁶	62.00	32.00	386.40	360.80	1.87	1.87
59	3x10 ¹¹	29.00	32.00	635.70	602.40	1.90	1.88
66	3x10 ⁵	23.00	25.00	1038.00	508.30	1.88	1.81
72	3x10 ¹¹	45.00	64.00	507.30	26.40	1.95	1.61
81	3x10 ⁸	43.00	52.00	767.50	555.30	1.91	1.82
82	3x10 ¹⁰	46.00	55.00	1085.30	43.30	1.91	1.69
85	3x10 ⁷	38.00	24.00	485.70	458.20	1.87	1.86
116	3x10 ⁹	31.00	48.00	1868.90	521.30	1.97	1.81
117	3x10 ⁹	58.00	59.00	1615.70	618.90	1.97	1.79
133	3x10 ¹¹	31.00	29.00	533.40	529.30	1.83	1.82
Ortalama nükleik asit = 683.00 ng/µl							
Standart sapma = ±578.50 ng/µl							
Varyasyon kat sayısı = 84.70							

Üzüm suyunda 28°C'de 18 saat canlandırılan maya hücrelerinin yaş hücre ağırlığı ve başlangıç hücre konsantrasyonu RNA izolasyonuna başlamadan önce ölçülmüştür. RNA örneklerinin yaş hücre ağırlığı ortalaması 43.59'dur. Yaş hücre ağırlığı başlangıç hücre konsantrasyonu ve suş çeşidine göre değişmektedir.

28°C'de 18 saat canlandırılan maya hücrelerinin başlangıç hücre konsantrasyonu ön çalışma olarak elde edilen *Saccharomyces cerevisiae* referans suşunun Absorbans-log(hücre konsantrasyonu (kob/mL)) doğru denklemi ($y = 0.0949x - 0.0068$ $R^2 = 0.99$) kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan RNA örneklerinin başlangıç hücre konsantrasyonu ortalaması 10⁹ kob/mL'dir.

İki teknik tekrar ile gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonucunda, elde edilen örneklerin nükleik asit konsantrasyonunun ortalaması 683.00 ng/µl'dir. Çalışmada elde edilen en yüksek nükleik asit konsantrasyonu 2540.40 ng/µl iken en düşük nükleik asit konsantrasyonu 26.40 ng/µl'dir. Standart sapma ise ±578.50ng/µl'dir. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının RNA izolasyonu sonucunda elde edilen nükleik asit konsantrasyonları ileriki çalışmalar için (cDNA

sentezi ve RT-qPCR ile gen ifade analizi) yeterlidir. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının RNA izolasyonunun varyasyon katsayısı 84.70'tir.

Saccharomyces cerevisiae suşlarından izole edilen RNA örneklerinin 260/280 absorbans oranı, saflık değerleri 1.8-2.0 değerlerinin arasında olması çalışmada elde edilen RNA'nın saf olduğu anlamına gelmektedir. RNA izolasyonu sonucunda aynı suş için elde edilen 2 teknik tekrardan saflık değeri 1.8-2.0 aralığında ya da bu değerlere daha yakın olan örnek ileri çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen örneklerin RNA izolasyon sonuçları Çizelge 4.4'te 1. Paralel olarak verilmiştir [126, 127].

4.3.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının Ters transkripsiyonu (cDNA Sentezi)

Saccharomyces cerevisiae suşlarından izole edilen, seçilen RNA örneklerinden, RT-qPCR deneylerinde kullanılmak üzere, cDNA sentezi EURx smART First Strand cDNA sentez (katalog numarası: E0804-02) kiti ile, ilgili protokol izlenerek (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6) iki teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5'te Çizelge 4.4'te 1. Paralel olarak belirtilen *Saccharomyces cerevisiae* RNA'ları kullanılarak elde edilen cDNA örneklerinin nükleik asit konsantrasyonları ve saflık değerleri (260/280) verilmiştir.

Çizelge 4.5. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının ters transkripsiyon sonuçları

Suş No	Nükleik Asit (ng/µl)		Absorbans (260/280)	
	1. Paralel	2. Paralel	1. Paralel	2. Paralel
3	1155.90	1046.10	1.80	1.68
22	955.30	855.90	1.65	1.59
25	1772.00	1519.90	1.72	1.70
41	1594.60	1828.00	1.73	1.73
44	1585.40	1670.60	1.72	1.72
45	1654.20	1699.40	1.72	1.72
57	1406.00	1291.00	1.69	1.64
59	977.40	867.20	1.63	1.62
66	1458.00	1553.30	1.70	1.69
72	1453.50	1419.80	1.70	1.66
81	1786.60	1543.50	1.71	1.68
82	1826.60	1407.30	1.74	1.68
85	1418.50	1571.80	1.69	1.68
116	1933.30	1542.50	1.77	1.71
117	2002.20	1372.50	1.75	1.70
133	870.90	892.90	1.62	1.58
Ortalama nükleik asit = 1435.38 ng/µl				
Standart sapma = ±329.51 ng/µl				
Varyasyon kat sayısı = 22.96				

Çizelge 4.5'te suş numarası verilen *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının cDNA sentezi sonucunda elde edilen nükleik asit konsantrasyonlarının ortalaması 1435.38 ng/µl'dir.

Çalışmada kullanılan en yüksek cDNA konsantrasyonu 2002.20 ng/µl iken en düşük cDNA konsantrasyonu 855.90 ng/µl'dir. Standart sapma ise ±329.51 ng/µl'dir. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının cDNA sentezinin varyasyon katsayısı 22.96'dır.

cDNA sentezi sonucunda aynı suş için elde edilen iki teknik tekrardan saflık değeri 1.8-2.0 aralığında ya da bu değerlere daha yakın olan örnek ileri çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen cDNA örnekleri Çizelge 4.5'te 1. Paralel olarak verilmiştir.

Çizelge 4.4'te verilen RNA örneklerinin saflık değerleri Çizelge 4.5'teki cDNA örneklerinin saflık değerleri ile karşılaştırıldığında genel olarak cDNA sentezi

sonrasında örneklerin saflık değerlerinde düşüş olduğu görülmektedir. Saflık değerleri 1.8 değerinden düşük olan örneklerde protein, fenol veya diğer kirletici kontaminasyon varlığı düşünülebilir. DNase uygulaması ile cDNA örneklerinin saflık değerleri arttırılabilir. Ancak *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının ters transkripsiyonu sonucunda elde edilen cDNA miktarları ve saflık değerleri RT-qPCR ile gen ifade analizi için yeterlidir. Çizelge 4.5'te belirtilen cDNA örnekleri (1. Paralel) ile gerçekleştirilen RT-qPCR çalışmasında inhibisyon oluşmamıştır [126, 127].

4.3.1.3. *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının RT-qPCR ile Gen İfade Analizi

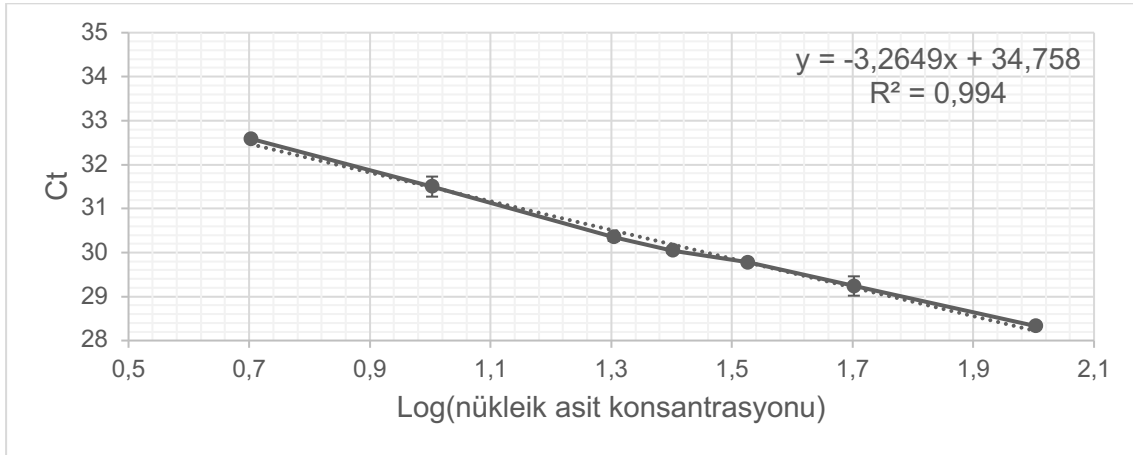
RT-qPCR amplifikasyon eğrilerinden kantifikasyon verilerini elde etmek için, cDNA miktarlarının logaritmasına karşı Ct (Cq) değerlerinin lineer bir regresyon olarak çizilmesi gerekir. Böyle bir gösterime tipik olarak standart eğri denir.

Çalışmadaki genler (*ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5*) için standart eğri oluşturulurken 22 numaralı referans suşun cDNA'sı kullanılmıştır. RT-qPCR analizi sonucunda her gene spesifik standart eğri oluşturulmuştur.

ARO8

Çizelge 4.6'da 22 numaralı referans suşunun RT-qPCR ile *ARO8* gen ifadesi sonuçlarının, aynı örneklerin cDNA konsantrasyonlarının (100.70 ng/μl, 50.35 ng/μl, 33.56 ng/μl, 25.18 ng/μl, 20.14 ng/μl, 10.07 ng/μl, 5.04 ng/μl) logaritmasına karşılık oluşturulan standart eğri bulunmaktadır.

Çizelge 4.6. ARO8 geninin standart eğrisi

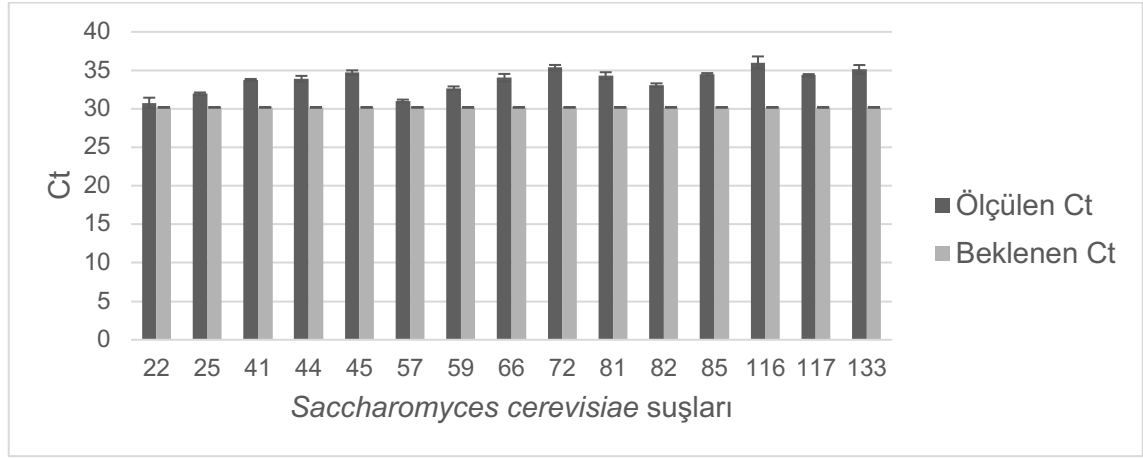


Standart eğrinin eğimi, deney verimliliğinin bir ölçüsüdür. Eğimler -3.1 ile -3.6 (%90 ve %110 verimli) arası kabul edilebilirdir. -3.32'lik bir eğim ise %100 verimliliğin göstergesidir [126].

Çizelge 4.6'da elde edilen doğru denklemi ($y = -3.2649x + 34.758$ $R^2 = 0.99$) kullanılarak PCR verimliliği hesaplanmıştır ($((10^{(-1/-3.2649)}) - 1) \times 100$). RT-qPCR ile ARO8 gen ifadesinde PCR verimliliği %102.44 bulunmuştur [128].

Çizelge 4.7'de RT-qPCR ile ARO8 gen ifadesinde *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının aynı cDNA konsantrasyonundaki (25 ng/μl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.6'da verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerleri karşılaştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının Ct sonuçları referans suşa göre normalleştirilmiştir ve her suş 3 paralel olarak analiz edilmiştir.

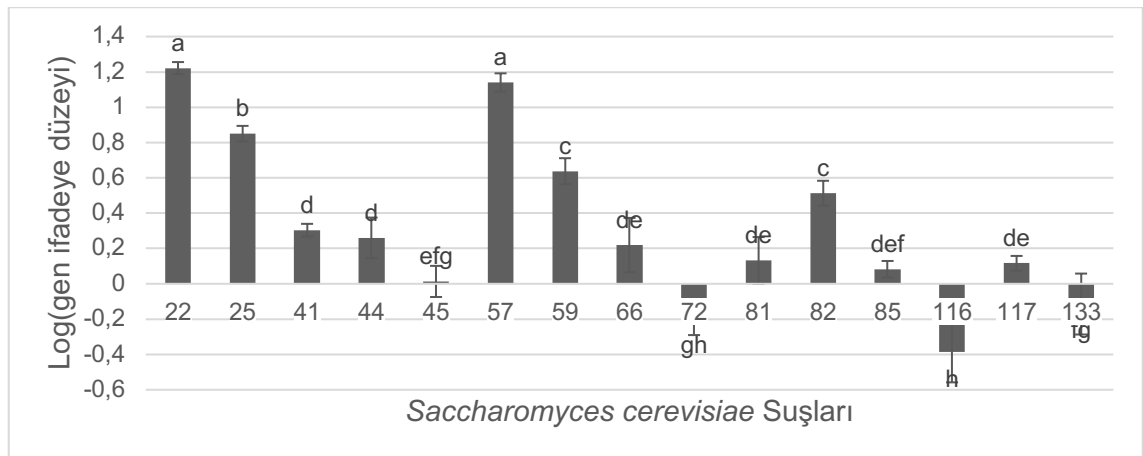
Çizelge 4.7. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *ARO8* geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması



Çizelge 4.7'ye göre 22 numaralı referans suşa en yakın Ct değerine sahip *Saccharomyces cerevisiae* suşları 25, 57 ve 59'dur.

Çizelge 4.8'de RT-qPCR ile *ARO8* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.6'da verilen standart eğri denklemini kullanılarak hesaplanan *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyinin logaritması verilmiştir.

Çizelge 4.8. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının logaritmik *ARO8* gen ifade düzeyi



Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-h) *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

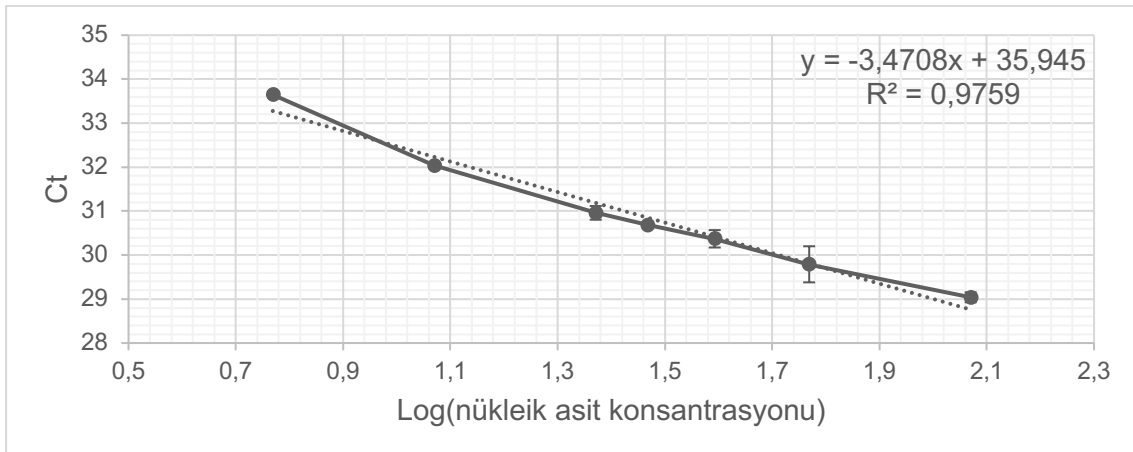
Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ARO8* geni için $m = -3.2649$, $b = 34.758$ 'dir [126].

Çizelge 4.8'e göre *ARO8* için en yüksek logaritmik gen ifadesi 22 (1.22) (a) numaralı referans suşa aittir. Referans suşa en yakın ve aromatik aminotransferaz I enzimini kodalayan gen (*ARO8*) ifadesi yüksek olan diğer 3 *Saccharomyces cerevisiae* suşları 25 (0.85) (b), 57 (1.14) (a) ve 59 (0.64) (c)'dur. 72, 116 ve 133 numaralı *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *ARO8* gen ifade düzeyi ise referans suşun gen ifade düzeyinden daha azdır.

ARO9

Çizelge 4.9'da 22 numaralı referans suşunun RT-qPCR ile *ARO9* gen ifadesi sonuçlarının, aynı örneklerin cDNA konsantrasyonlarının (117.48 ng/μl, 58.74 ng/μl, 39.16 ng/μl, 29.37 ng/μl, 23.50 ng/μl, 11.75 ng/μl, 5.87 ng/μl) logaritmasına karşılık oluşturulan standart eğri bulunmaktadır.

Çizelge 4.9. *ARO9* geninin standart eğrisi

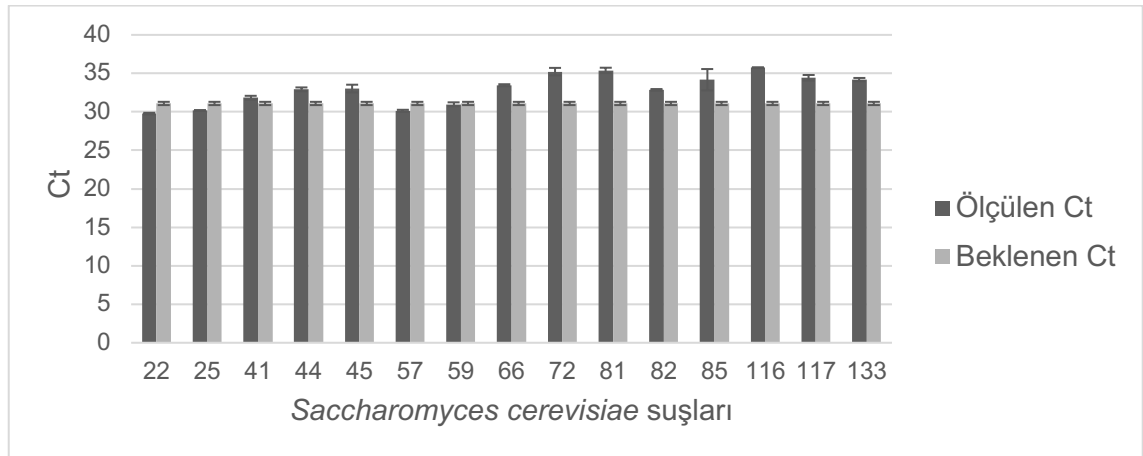


Standart eğrinin eğimi, deney verimliliğinin bir ölçüsüdür. Eğimler -3.1 ile -3.6 (%90 ve %110 verimli) arası kabul edilebilirdir. -3.32'lik bir eğim ise %100 verimliliğin göstergesidir [126].

Çizelge 4.9'da elde edilen doğru denklemi ($y = -3.4708x + 35.945$ $R^2 = 0.97$) kullanılarak PCR verimliliği hesaplanmıştır ($((10^{(-1/-3.4708)} - 1) \times 100)$). RT-qPCR ile ARO9 gen ifadesinde PCR verimliliği %94.14 bulunmuştur [128].

Çizelge 4.10'da RT-qPCR ile ARO9 gen ifadesinde *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının aynı cDNA konsantrasyonundaki (25 ng/μl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.9'da verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerleri karşılaştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının Ct sonuçları referans suşa göre normalleştirilmiştir ve her suş 3 paralel olarak analiz edilmiştir.

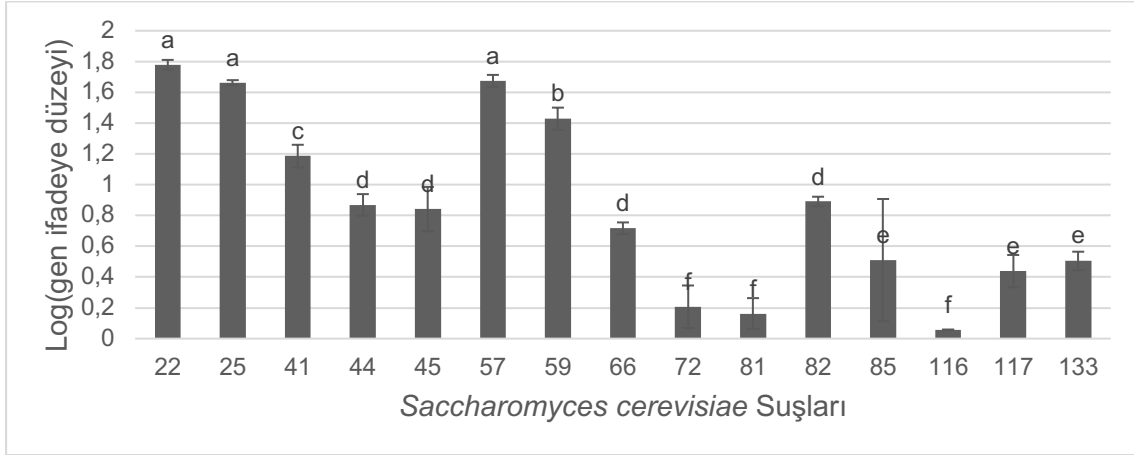
Çizelge 4.10. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının ARO9 geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması



Çizelge 4.10'a göre 22 numaralı referans suşa en yakın Ct değerine sahip *Saccharomyces cerevisiae* suşları 25, 57 ve 59'dur.

Çizelge 4.11'de RT-qPCR ile *ARO9* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.9'da verilen standart eğri denklemi kullanılarak hesaplanan *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyinin logaritması verilmiştir.

Çizelge 4.11. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının logaritmik *ARO9* gen ifade düzeyi



Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-f) *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

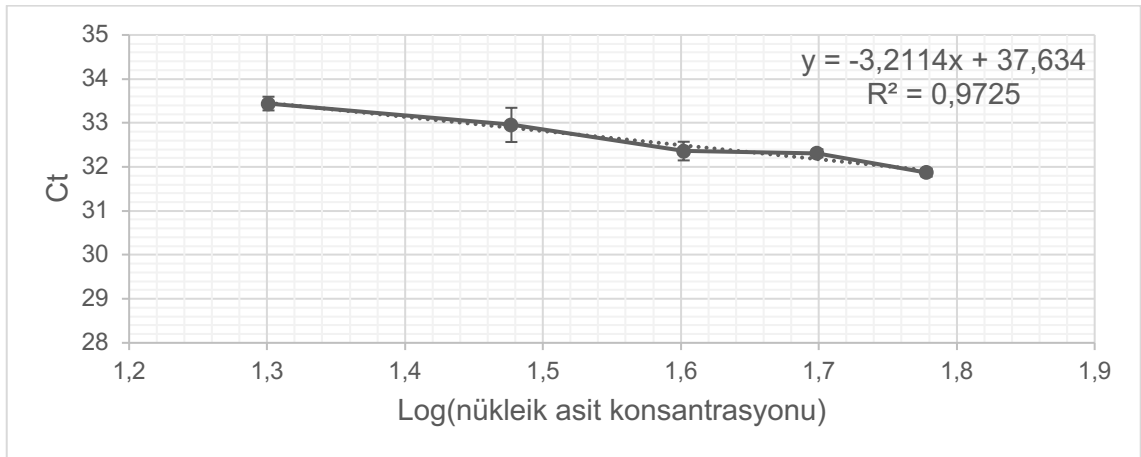
Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ARO9* geni için $m = -3.4708$, $b = 35.945$ 'dir [126].

Çizelge 4.11'e göre *ARO9* için en yüksek logaritmik gen ifadesi, 22 (1.78) (a) numaralı referans suşa aittir. Referans suşa en yakın ve aromatik aminotransferaz II enzimini kodalayan gen (*ARO9*) ifadesi yüksek olan diğer 3 *Saccharomyces cerevisiae* suşları 25 (1.66) (a), 57 (1.67) (a) ve 59 (1.43) (b)'dur.

ADH2

Çizelge 4.12'de 22 numaralı referans suşunun RT-qPCR ile *ADH2* gen ifadesi sonuçlarının, aynı örneklerin cDNA konsantrasyonlarının (60 ng/µl, 50 ng/µl, 40 ng/µl, 30 ng/µl, 20 ng/µl) logaritmasına karşılık oluşturulan standart eğri bulunmaktadır.

Çizelge 4.12. *ADH2* geninin standart eğrisi

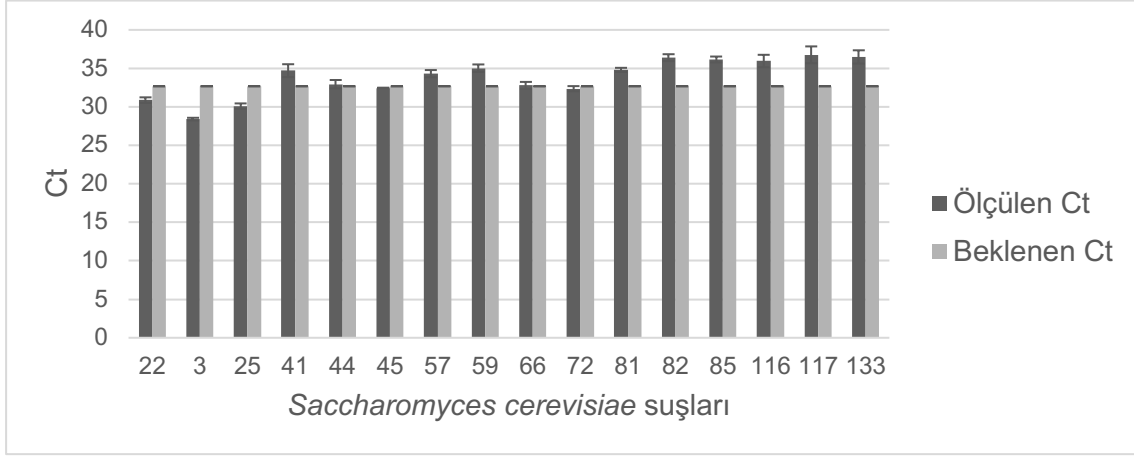


Standart eğrinin eğimi, deney verimliliğinin bir ölçüsüdür. Eğimler -3.1 ile -3.6 (%90 ve %110 verimli) arası kabul edilebilirdir. -3.32'lik bir eğim ise %100 verimliliğin göstergesidir [126].

Çizelge 4.12'da elde edilen doğru denklemi ($y = -3.2114x + 37.634$ $R^2 = 0.97$) kullanılarak PCR verimliliği hesaplanmıştır ($((10^{(-1/-3.2114)}) - 1) \times 100$). RT-qPCR ile *ADH2* gen ifadesinde PCR verimliliği %104.83 bulunmuştur [128].

Çizelge 4.13'te RT-qPCR ile *ADH2* gen ifadesinde *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının aynı cDNA konsantrasyonundaki (35 ng/µl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.12'de verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerleri karşılaştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının Ct sonuçları referans suşa göre normalleştirilmiştir ve her suş 3 paralel olarak analiz edilmiştir.

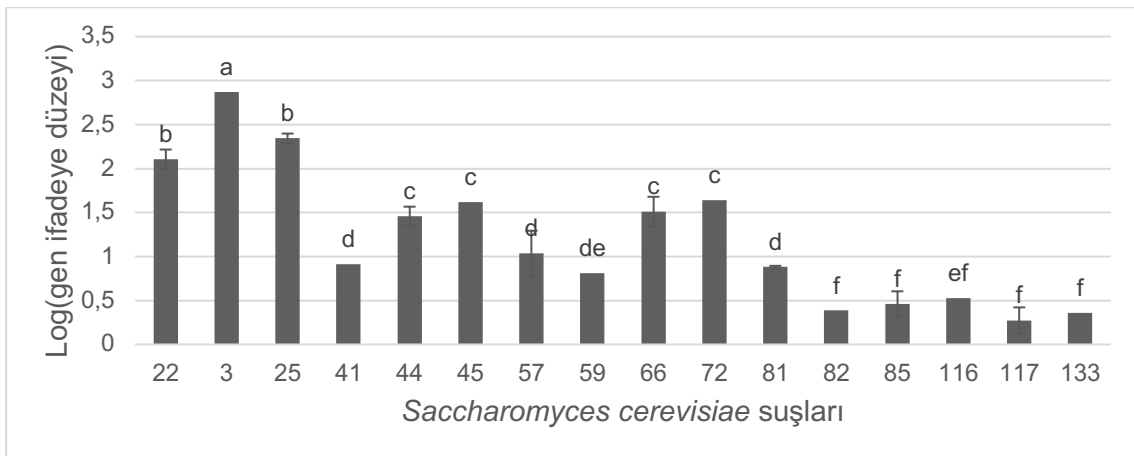
Çizelge 4.13. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *ADH2* geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması



Çizelge 4.7'ye göre 22 numaralı referans suşa en yakın Ct değerine sahip *Saccharomyces cerevisiae* suşları 25, 45 ve 72'dir.

Çizelge 4.14'te RT-qPCR ile *ADH2* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.12'de verilen standart eğri denklemini kullanılarak hesaplanan *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyinin logaritması verilmiştir.

Çizelge 4.14. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının logaritmik *ADH2* gen ifade düzeyi



Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-f) *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemleri kullanılmıştır. *ADH2* geni için $m = -3.2114$, $b = 37.634$ 'dür [126].

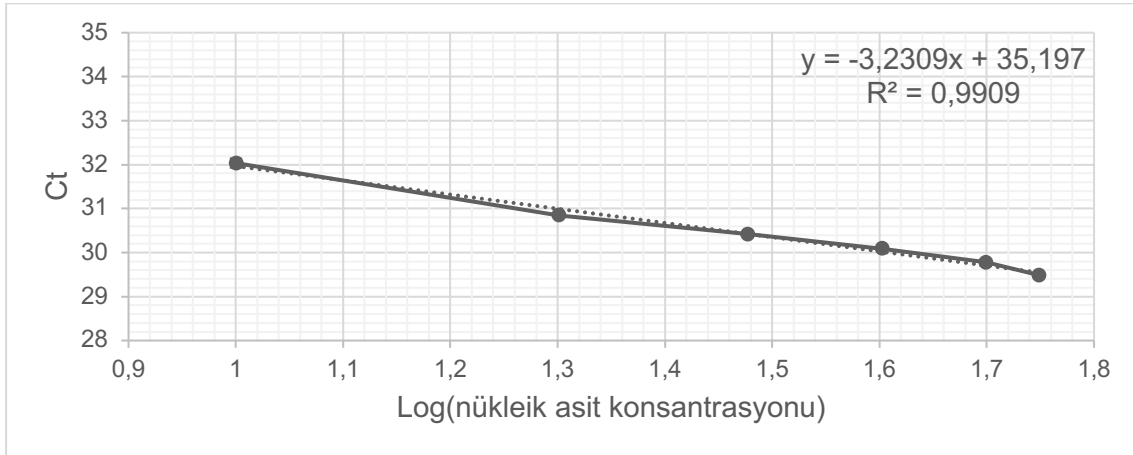
Çizelge 4.14'e göre *ADH2* için en yüksek logaritmik gen ifadesi gösteren Varol vd. (2018) ısı stres uygulaması çalışmalarında seçtikleri 3 (2.87) (a) numaralı ekmek üretimi için kullanılan ticari *Saccharomyces cerevisiae* mayasıdır. Şarap üretiminde kullanılan 22 (b) numaralı referans *Saccharomyces cerevisiae* suşunun logaritmik gen ifade düzeyi ise 2.10 olarak ölçülmüştür. 25 (2.34) (b) numaralı suşun *ADH2* gen ifade düzeyi referans suştan fazladır. Diğer *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *ADH2* gen ifade düzeyi referans suştan az olmuştur [109].

İstatistiksel çalışmalar sonucunda 3 (a) numaralı suş diğer suşlardan anlamlı olarak farklı bulunurken, 22 (b) numaralı suş ile 25 (b) numaralı suşlar benzerdir. 44 (c), 45 (c), 66 (c), 72 (c) suşları ise kendi aralarında anlamlı benzerliğe sahiptir.

ADH5

Çizelge 4.15'te 22 numaralı referans suşunun RTq-PCR ile *ADH5* gen ifadesi sonuçlarının, aynı örneklerin cDNA konsantrasyonlarının (56 ng/µl, 50 ng/µl, 40 ng/µl, 30 ng/µl, 20 ng/µl, 10 ng/µl) logaritmasına karşılık oluşturulan standart eğri bulunmaktadır.

Çizelge 4.15. *ADH5* geninin standart eğrisi

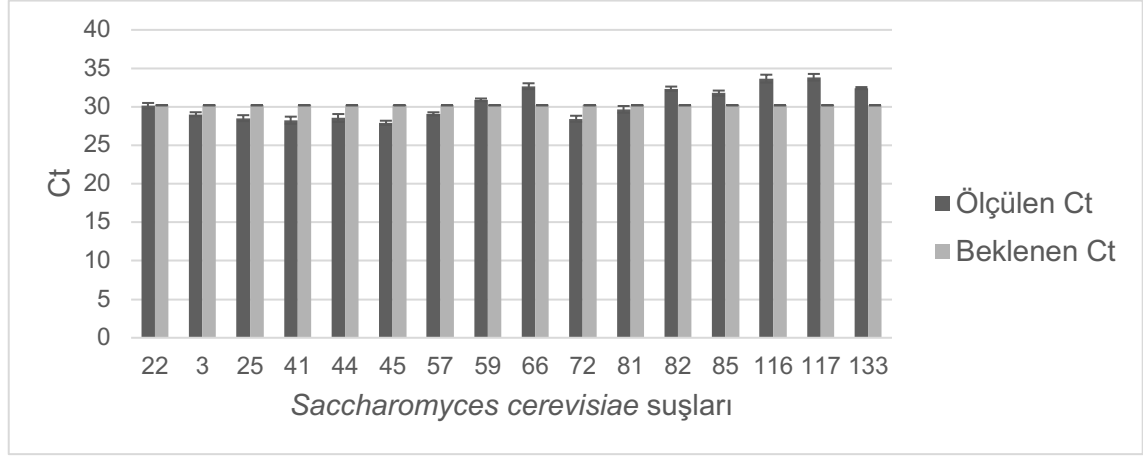


Standart eğrinin eğimi, deney verimliliğinin bir ölçüsüdür. Eğimler -3.1 ile -3.6 (%90 ve %110 verimli) arası kabul edilebilirdir. -3.32'lik bir eğim ise %100 verimliliğin göstergesidir [126].

Çizelge 4.12'da elde edilen doğru denklemi ($y = -3.2309x + 35.197$ $R^2 = 0.99$) kullanılarak PCR verimliliği hesaplanmıştır ($((10^{(-1/-3,2309)}) - 1) \times 100$). RT-qPCR ile *ADH5* gen ifadesinde PCR verimliliği %103.94 bulunmuştur [128].

Çizelge 4.16'da RT-qPCR ile *ADH5* gen ifadesinde *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının aynı cDNA konsantrasyonundaki (35 ng/μl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.15'te verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerleri karşılaştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının Ct sonuçları referans suşa göre normalleştirilmiştir ve her suş 3 paralel olarak analiz edilmiştir.

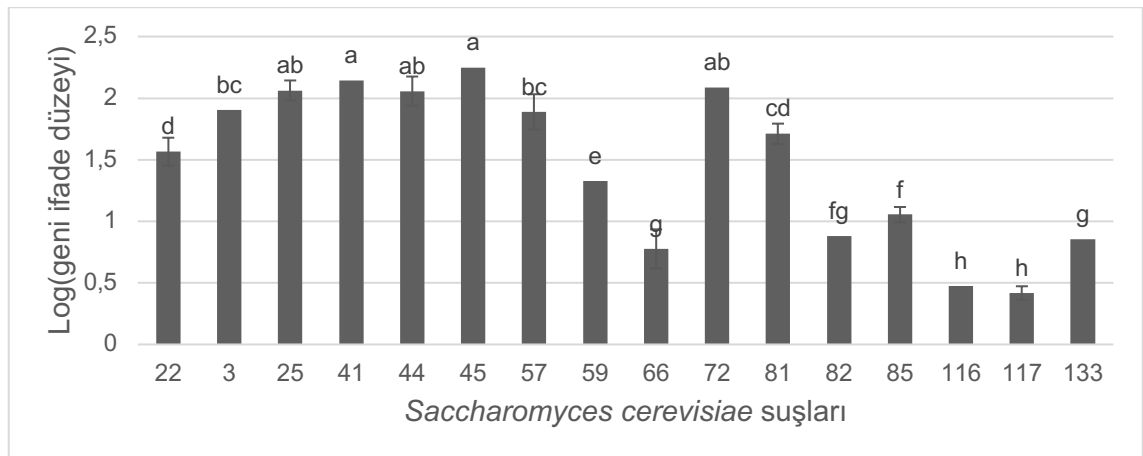
Çizelge 4.16. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *ADH5* geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması



Çizelge 4.16'ye göre 22 numaralı referans suşa en yakın Ct değerine sahip *Saccharomyces cerevisiae* suşları 57, 59 ve 81'dur.

Çizelge 4.17'de RT-qPCR ile *ADH5* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.15'te verilen standart eğri denklemini kullanılarak hesaplanan *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyinin logaritması verilmiştir.

Çizelge 4.17. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının logaritmik *ADH5* gen ifade düzeyi



Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-h) *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ADH5* geni için $m = -3.2309$, $b = 35.197$ 'dir [126].

Çizelge 4.17'ye göre *ADH5* için en yüksek logaritmik gen ifade düzeyi, 45 (2.25) (a) numaralı *Saccharomyces cerevisiae* suşuna aittir. 25(ab), 41(a), 44(ab) ve 72(ab) numaralı *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *ADH5* gen ifade düzeylerinin logaritması yaklaşık 2'dir. 22(d) numaralı referans *Saccharomyces cerevisiae* suşunun gen ifade düzeyi ise 1.57'dir.

4.3.2. *Metschnikowia pulcherrima* Suş Seçimi

Fermantasyon aşamasında kullanılmak üzere seçilecek *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR ile *ADH2* ve *ADH5* gen ifade analizi yapılmıştır.

4.3.2.1. *Metschnikowia pulcherrima* Suşlarının RNA İzolasyonu

Metschnikowia pulcherrima suşlarının RNA izolasyonu Şekil 3.5'teki protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA konsantrasyonlarının nükleik asit miktarı (ng/µl) ve 260 ila 280 nm'deki OD oranı ($A_{260/280}$) ölçülmüştür. RNA izolasyonu iki teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.18'de *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının numaraları, başlangıç hücre konsantrasyonları, RNA izolasyonu öncesi elde edilen yaş hücre pellet ağırlığı, RNA izolasyonu sonucunda elde edilen nükleik asit konsantrasyonları ve saflık değerleri ($A_{260/280}$) verilmiştir.

Çizelge 4.18. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RNA izolasyon sonuçları

Suş	Başlangıç Hücre kons. (kob/mL)	Yaş hücre ağırlığı (mg)		Nükleik Asit (ng/ul)		Absorbans (260/280)	
		1. Paralel	2. Paralel	1. Paralel	2. Paralel	1. Paralel	2. Paralel
33	3×10^4	24	33	162.60	162.30	1.76	1.76
40	3×10^3	28	26	146.30	95.90	1.84	1.67
46	4×10^2	27	34	122.30	97.70	1.77	1.62
58	3×10^5	28	34	159.90	173.70	1.79	1.77
65	3×10^8	30	24	75.70	57.70	1.53	1.69
106	3×10^7	31	45	168.70	159.40	1.74	1.78
Ortalama nükleik asit = 131.85 ng/ul							
Standart sapma = ± 40.38							
Varyasyon kat sayısı = 30.63							

Üzüm suyunda 28°C'de 18 saat canlandırılan maya hücrelerinin yaş hücre ağırlığı ve başlangıç hücre konsantrasyonu RNA izolasyonuna başlamadan önce ölçülmüştür. Çalışmada elde edilen RNA örneklerinin yaş hücre ağırlığı ortalaması 30.33'tür. Yaş hücre ağırlığı başlangıç hücre konsantrasyonu, suş çeşidine göre değişmektedir.

28°C'de 18 saat canlandırılan *Metschnikowia pulcherrima* maya hücrelerinin başlangıç hücre konsantrasyonu ön çalışma olarak elde edilen Absorbans- $\log(\text{kob/mL})$ doğru denklemi ($y = 0.0949x - 0.0068$ $R^2 = 0.99$) kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan RNA örneklerinin başlangıç hücre konsantrasyonu ortalaması 10^5 kob/mL'dir.

İki teknik tekrar ile gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonucunda, elde edilen örneklerin nükleik asit konsantrasyonlarının ortalaması 131.85 ng/ul'dir. Çalışmada elde edilen en yüksek nükleik asit konsantrasyonu 173.70 ng/ul iken en düşük nükleik asit konsantrasyonu 57.70 ng/ul'dir. Standart sapma ise ± 40.38 'dir. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RNA izolasyonu sonucunda elde edilen nükleik asit konsantrasyonları ileriki çalışmalar için (cDNA sentezi ve RT-qPCR ile gen ifade analizi) yeterlidir. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RNA izolasyonunun varyasyon katsayısı 30.63'tür.

Metschnikowia pulcherrima suşlarından izole edilen RNA örneklerinin 260/280 absorbans oranı, saflık değerleri 1.8-2.0 değerlerinin arasında olması çalışmada elde edilen RNA'nın saf olduğu anlamına gelmektedir. RNA örneklerinin absorbans ölçümü sonucunda elde edilen saflık değerleri 1.8 değerinden düşük olduğundan protein, fenol veya diğer kirlenici kontaminasyonu varlığı düşünülebilir. İzole edilen RNA'lardan ters transkripsiyon yapıldıktan sonra cDNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen RT-qPCR denemelerinde inhibisyon oluşmadığı saptanmıştır. RNA izolasyonu sonucunda aynı suş için elde edilen 2 teknik tekrardan saflık değeri 1.8-2.0 aralığında ya da bu değerlere daha yakın olan ve yüksek nükleik asit konsantrasyonuna sahip örnekler ileri çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen örneklerin RNA izolasyon sonuçları Çizelge 4.18'de 1. Paralel olarak verilmiştir [126, 127].

4.3.2.2. *Metschnikowia pulcherrima* Suşlarının Ters transkripsiyonu (cDNA Sentezi)

İki teknik tekrar ile gerçekleştirilen *Metschnikowia pulcherrima* RNA izolasyonu sonucunda elde edilen nükleik asit miktarı ve kalitesine göre belirlenen RNA örneklerinden cDNA sentezi EURx smART First Strand cDNA sentez (katalog numarası: E0804-02) kiti ile, ilgili protokol izlenerek (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6) iki teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.19'da Çizelge 4.18'te 1. Paralel olarak belirtilen *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RNA'ları kullanılarak elde edilen cDNA örneklerinin nükleik asit konsantrasyonları ve saflık değerleri (260/280) verilmiştir.

Çizelge 4.19. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının ters transkripsiyon sonuçları

Suş	1. Paralel Nükleik Asit (ng/µl)	2. Paralel Nükleik Asit (ng/µl)	1. Paralel Absorbans (260/280)	2. Paralel Absorbans (260/280)
33	490.10	403.80	1.38	1.30
40	504.20	511.80	1.37	1.34
46	492.60	511.00	1.38	1.37
58	515.20	576.30	1.48	1.38
65	502.40	481.60	1.36	1.34
106	466.30	548.60	1.46	1.38
Ortalama nükleik asit = 500.33 ng/µl				
Standart sapma = ±42.19 ng/µl				
Varyasyon kat sayısı = 8.43				

Çizelge 4.19'da *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının cDNA sentezi sonucunda elde edilen nükleik asit konsantrasyonlarının ortalaması 500.33 ng/µl'dir.

Çalışmada kullanılan elde edilen en yüksek cDNA konsantrasyonu 576.30 ng/µl iken en düşük cDNA konsantrasyonu 403.80 ng/µl'dir. Standart sapma ise ±42.19 ng/µl'dir *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının cDNA sentezinin varyasyon katsayısı 8.43'tür.

cDNA sentezi sonucunda aynı suş için elde edilen iki teknik tekrardan saflık değeri 1.8-2.0 aralığında ya da bu değerlere daha yakın olan örnek ileri çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen cDNA örnekleri Çizelge 4.19'da 1. Paralel olarak verilmiştir.

Çizelge 4.18'de verilen RNA örneklerinin saflık değerleri Çizelge 4.19'daki cDNA örneklerinin saflık değerleri ile karşılaştırıldığında genel olarak cDNA sentezi sonrasında örneklerin saflık değerlerinde düşüş olduğu görülmektedir. Saflık değerleri 1.8 değerinden düşük olan örneklerde protein, fenol veya diğer kirlenici kontaminasyon varlığı düşünülebilir. DNase uygulaması ile cDNA örneklerinin saflık değerleri artırılabilir. Ancak *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının ters transkripsiyonu sonucunda elde edilen cDNA miktarları ve saflık değerleri RT-qPCR ile gen ifade analizi için yeterlidir. Çizelge 4.19'da belirtilen cDNA örnekleri

(1. Paralel) ile gerçekleştirilen RT-qPCR çalışmasında inhibisyon oluşmamıştır [126, 127].

4.3.2.3. *Metschnikowia pulcherrima* Suşlarının RT-qPCR ile Gen İfade Analizi

Metschnikowia pulcherrima suşlarının ters transkripsiyonu sonucunda elde edilen nükleik asit miktarları ve saflık değerleri uygun olan cDNA örnekleri kullanılarak RT-qPCR ile *ADH2* ve *ADH5* gen ifade analizi gerçekleştirilmiştir.

Metschnikowia pulcherrima suşlarının RT-qPCR ile *ARO8* ve *ARO9* gen ifade analizleri yapılmamıştır. Bunun nedeni ön çalışma olarak yapılan RT-qPCR ile gen ifadesi çalışmalarında *ARO8* ve *ARO9* primerleri *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının cDNAsı ile eşleşmemesi ve negatif sonuç vermesidir. Dolayısıyla *ARO8* ve *ARO9* gen ifade sonuçlarını *Saccharomyces cerevisiae* ile ilişkilendirebiliriz.

Tez çalışmasında *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının fermantasyon ortamında bulunmasının *Saccharomyces cerevisiae* maya transkriptomuna etkisi incelenmektedir. Bu yüzden *Saccharomyces cerevisiae* suş seçimi sırasında gen ifade analiz sonuçlarına dikkat edilirken *Metschnikowia pulcherrima* suş seçimi sırasında ise suşların teknolojik özelliklerine dikkat edilmiştir.

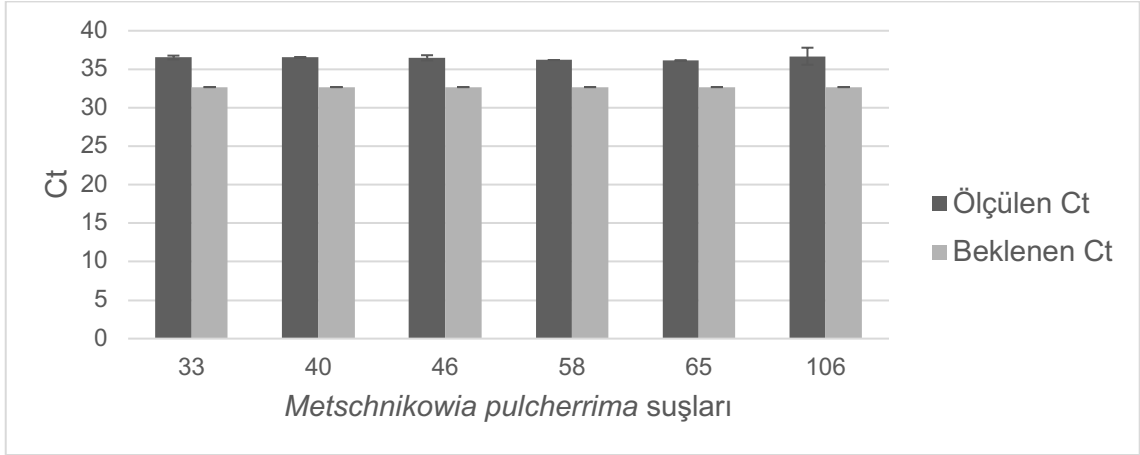
Metschnikowia pulcherrima suşlarının RT-qPCR ile gen ifade analizi yapılırken *ADH2* geni için daha önce *Saccharomyces cerevisiae* referans suşu kullanılarak elde edilen standart eğrinin denklemi (Çizelge 4.12.), *ADH5* geni için ise aynı suş kullanılarak elde edilen standart eğrinin denklemi (Çizelge 4.15.) kullanılmıştır.

ADH2

Çizelge 4.20'de RT-qPCR ile *ADH2* gen ifadesinde *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının aynı cDNA konsantrasyonundaki (35 ng/µl) Ct sonuçları ile Çizelge

4.12'de verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerleri karşılaştırılmıştır. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının Ct sonuçları referans suşa göre normalleştirilmiştir ve her suş 3 paralel olarak analiz edilmiştir.

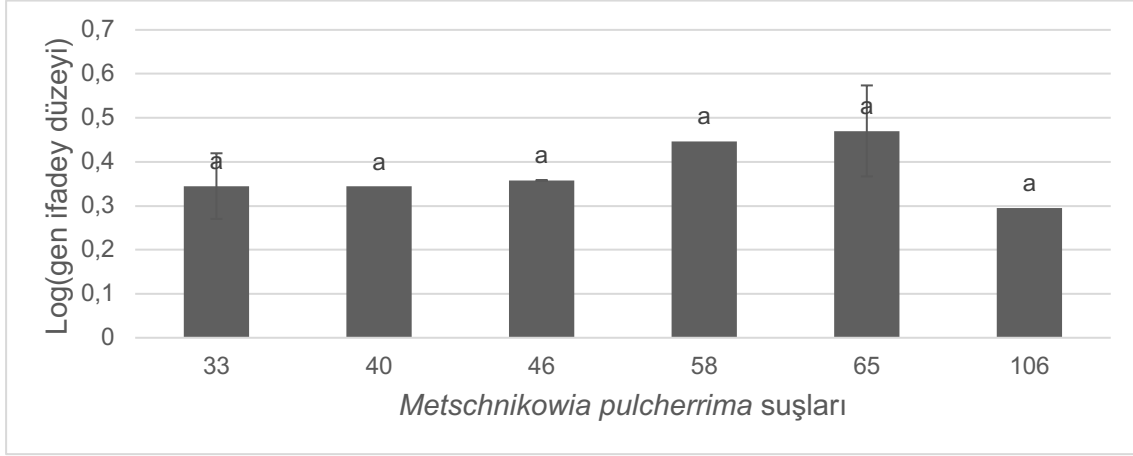
Çizelge 4.20. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının *ADH2* geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması



Çizelge 4.20'ye göre *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının Ct değerleri birbirine yakındır ve hepsi Çizelge 4.12'de verilen denkleme göre hesaplanan beklenen Ct değerinden daha yüksektir.

Çizelge 4.21'de RT-qPCR ile *ADH2* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.12'de verilen standart eğri denklemini kullanılarak hesaplanan *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının gen ifade düzeyinin logaritması verilmiştir.

Çizelge 4.21. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının logaritmik *ADH2* gen ifade düzeyi



Sütunların üzerindeki küçük harfler (a) *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ADH2* geni için $m = -3.2114$, $b = 37.634$ 'dür [126].

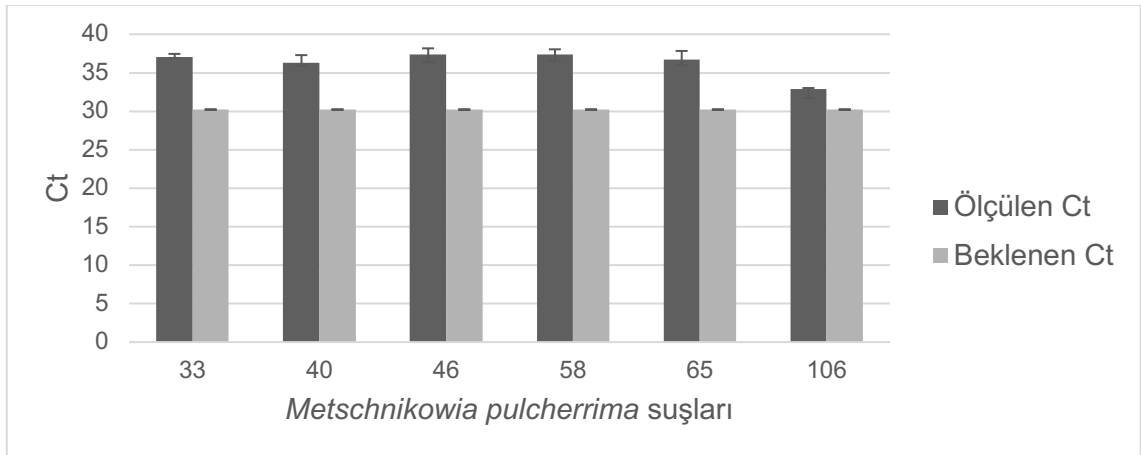
Çizelge 4.21'e göre *Metschnikowia pulcherrima* mayası için yapılan RT-qPCR ile *ADH2* gen ifade düzeyi analizi sonucunda bütün suşların logaritmik gen ifade düzeylerinin 1'den küçük olduğu tespit edilmiştir. En yüksek logaritmik gen ifade düzeyine sahip suş 65 (0.47) (a) numaralı *Metschnikowia pulcherrima* mayasıdır. 58 (0.45) (a) numaralı *Metschnikowia pulcherrima* suşunun gen ifade düzeyi ise 65 numaraya yakındır. En düşük gen ifade düzeyine sahip suş ise 106 (0.30) (a) numaralı suştur. İstatistiksel olarak incelendiğinde *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının *ADH2* gen ifade düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

Genel olarak *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *ADH2* gen ifade düzeyleri ile karşılaştırıldığında *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının *ADH2* gen ifade düzeyleri oldukça düşüktür.

ADH5

Çizelge 4.22'de RT-qPCR ile *ADH5* gen ifadesinde *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının aynı cDNA konsantrasyonundaki (35 ng/µl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.15'te verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerleri karşılaştırılmıştır. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının Ct sonuçları referans suşa göre normalleştirilmiştir. Her suş 3 paralel olarak analiz edilmiştir.

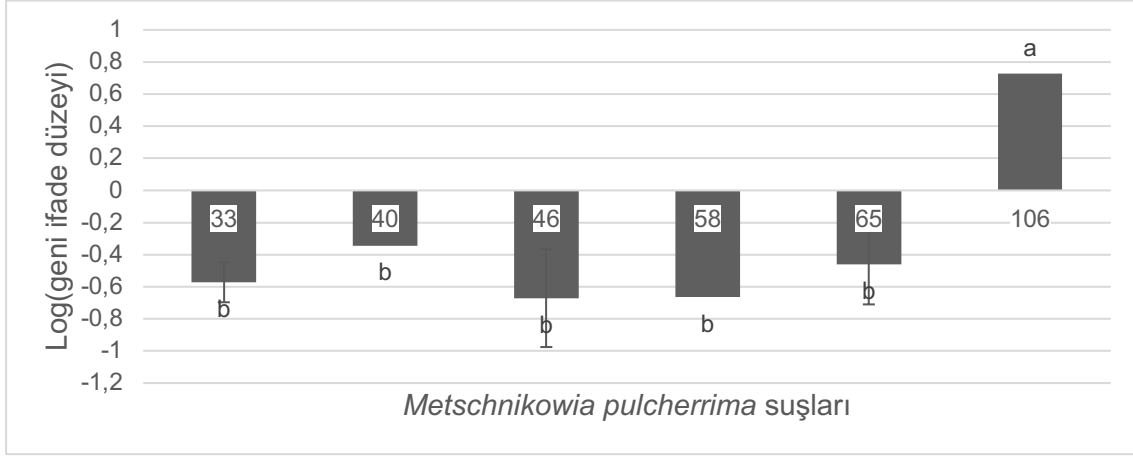
Çizelge 4.22. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının *ADH5* geni için ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması



Çizelge 4.22'ye göre 106 numaralı *Metschnikowia pulcherrima* suşu dışında diğer suşların Ct değerleri birbirlerine yakındır ve Çizelge 4.15'te verilen denkleme göre hesaplanan beklenen Ct değerinden daha yüksektir. 106 numaralı *Metschnikowia pulcherrima* suşunun Ct değeri beklenen Ct değerine yakındır.

Çizelge 4.23'te RT-qPCR ile *ADH5* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.15'te verilen standart eğri denklemini kullanılarak hesaplanan *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının gen ifade düzeyinin logaritması verilmiştir.

Çizelge 4.23. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının logaritmik *ADH5* gen ifade düzeyi



Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-b) *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ADH5* geni için $m = -3.2309$, $b = 35.197$ 'dir [126].

Çizelge 4.23'e göre *Metschnikowia pulcherrima* mayası için yapılan RT-qPCR ile *ADH5* gen ifade düzeyi analizinde 106 numaralı suş dışında bütün suşların gen ifade düzeylerinin logaritması negatiftir. 106 (0.73) (a) numaralı suşun logaritmik gen ifade düzeyi diğer suşlardan 1.5-2 kat fazladır. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının *ADH5* gen ifade düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde 106 numaralı suş ile diğer suşlar arasında anlamlı bir farklılık vardır.

Genel olarak *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının logaritmik *ADH5* gen ifade düzeyleri pozitifken, *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının logaritmik *ADH5* gen ifade düzeyleri negatiftir.

RT-qPCR ile gen ifade analizi sonucunda *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5* gen ifade düzeyleri ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının *ADH2*, *ADH5* gen ifade seviyeleri belirlenmiştir.

Saccharomyces cerevisiae suşlarının Ehrlich yolağında transaminasyon aşamasında katalizör olarak rol alan aromatik aminotransferaz I ve aromatik aminotransferaz II enzimlerini kodlayan *ARO8* ve *ARO9* genlerin ifade düzeyleri birbiri ile benzerlik göstermiştir. Her iki gen için de en yüksek gen ifade seviyesine sahip suşlar 25, 57 ve 59'dur.

Çizelge 3.3'te verilen 16 adet *Saccharomyces cerevisiae* suşunun, Ehrlich yolağının indirgenme basamağında yer alan alkol dehidrojenaz enzimini kodlayan *ADH2*, *ADH5* genlerinin ifade düzeyleri incelendiğinde HUF16M1C0004 (22 numara (referans)) ve HUF16M2K10004 izolasyon kodlu (25 numara) suşların yüksek gen ifade düzeyine, HUF16M3G11088 (57 numara) ve HUF16M3H11101 (59 numara) izolasyon kodlu suşların ise düşük gen ifade seviyesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasındaki *ADH2*, *ADH5* genlerinin ifade düzeyleri farklılıkları daha iyi tespit edebilmek için *ARO8* ve *ARO9* gen ifade seviyesi yüksek 25, 57, 59 numaralı *Saccharomyces cerevisiae* suşları seçilmiştir.

RT-qPCR ile gen ifade analizi sonucunda 6 adet *Metschnikowia pulcherrima* suşunun *ADH2*, *ADH5* gen ifade seviyeleri belirlenmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi 106 numaralı suş dışında *Metschnikowia a pulcherrima* suşlarının *ADH2*, *ADH5* gen ifade düzeylerinde bariz bir farklılık tespit edilememiştir. Sıralı karışık kültür fermantasyonunda kullanılacak *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının seçimi ve seçilen *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının fermantasyon özelliklerini anlamak amacı ile teknolojik özelliklerin belirlenmesi analizi gerçekleştirilmiştir.

4.3.3 Teknolojik Özelliklerin Belirlenmesi

RT-qPCR analizi sonucunda, gen ifade düzeylerine göre seçilmiş 22 (referans), 25, 57, 59 numaralı 4 *Saccharomyces cerevisiae* ve 6 *Metschnikowia pulcherrima* suşunun (33, 40, 46, 58, 65, 106 numaralı suşlar) fermantasyon hızlarını, farklı koşullardaki gelişim özelliklerini incelemek ve fermantasyonda kullanılacak *Metschnikowia pulcherrima* suşlarını belirlemek amacıyla teknolojik özelliklerin belirlenmesi analizi yapılmıştır.

Çizelge 4.24'te RT-qPCR ile gen ifade analizi sonuçlarına göre seçilen *Saccharomyces cerevisiae* suşları ile *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının yüksek sıcaklıkta gelişim, farklı pH derecelerinde gelişim, fermantasyon hızı (şeker tüketimi, alkol üretimi, köpük oluşumu, pH ve sıcaklık değişimi) özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.24. *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ve *Metschnikowia pulcherrima* (Mp) suşlarının teknolojik özellikleri

Suş No	Kontrol (pH 3.3)	Yüksek Sıcaklıkta Gelişim		Farklı pH'da Gelişim		Fermantasyon Hızı					Maksimum Köpük Oluşumu (cm)
		37 °C	42 °C	pH 4	pH 7	7. Gün %Brik s	7. Gün % Alkol	Alkol Ürettiği Gün	Ortalama pH	Ortalama Sıcaklık (°C)	
Sc											
22	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	5.50	6.00	5.	3.13	24.27	1.50 – 2.00
25	Çok iyi	Çok iyi	İyi	Çok iyi	Çok iyi	5.50	5.50	5.	3.07	24.23	1.00
57	Çok iyi	Çok iyi	Zayıf	Çok iyi	Çok iyi	6.00	4.00	5.	3.09	24.00	1.00
59	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	5.50	6.00	4.	3.09	24.21	1.00
Mp											
33	Çok iyi	Çok iyi	İyi	Çok iyi	Çok iyi	13.00	-	11.*	3.11	24.19	0.50
40	Çok iyi	Çok iyi	İyi	Çok iyi	Çok iyi	13.50	-	11.*	3.17	24.23	0 – 0.50
46	Çok iyi	İyi	İyi	Çok iyi	Çok iyi	14.00	-	12.*	3.14	24.11	0 – 0.50
58	Çok iyi	Çok iyi	İyi	Çok iyi	Çok iyi	13.00	-	11.*	3.11	24.21	0 – 0.50
65	Çok iyi	Çok iyi	İyi	Çok iyi	Çok iyi	14.00	-	11.*	3.18	24.10	1.50 – 2.00
106	Çok iyi	Çok iyi	İyi	Çok iyi	Çok iyi	15.00	-	-	3.16	24.29	1.50 – 2.00

*: Kültürlerin alkol ürettiği günü tespit edebilmek için 7 günlük fermantasyon süresi 14 güne uzatılmıştır.

Yüksek sıcaklıkta gelişme

Çizelge 4.24'te *Metschnikowia pulcherrima* ve seçilen *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının 7 günlük 37 °C ve 42 °C'deki gelişim özellikleri verilmiştir. Mayaların 37 °C ve 42 °C'deki gelişim özellikleri, 28 °C'de gelişen aynı suşlardan oluşan kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. 37 °C'de 46 numaralı *Metschnikowia pulcherrima* suşun gelişimi diğer suşlardan zayıf olmuştur.

42 °C'de ise mayaların üzüm suyundaki gelişimi genel olarak zayıflasa da 22 numaralı referans ve 59 numaralı *Saccharomyces cerevisiae* suşları sıcaklık artışından en az etkilenen suşlardır. 57 numaralı *Saccharomyces cerevisiae* suşu en az gelişim gösteren suştur.

Düşük pH değerinde gelişme

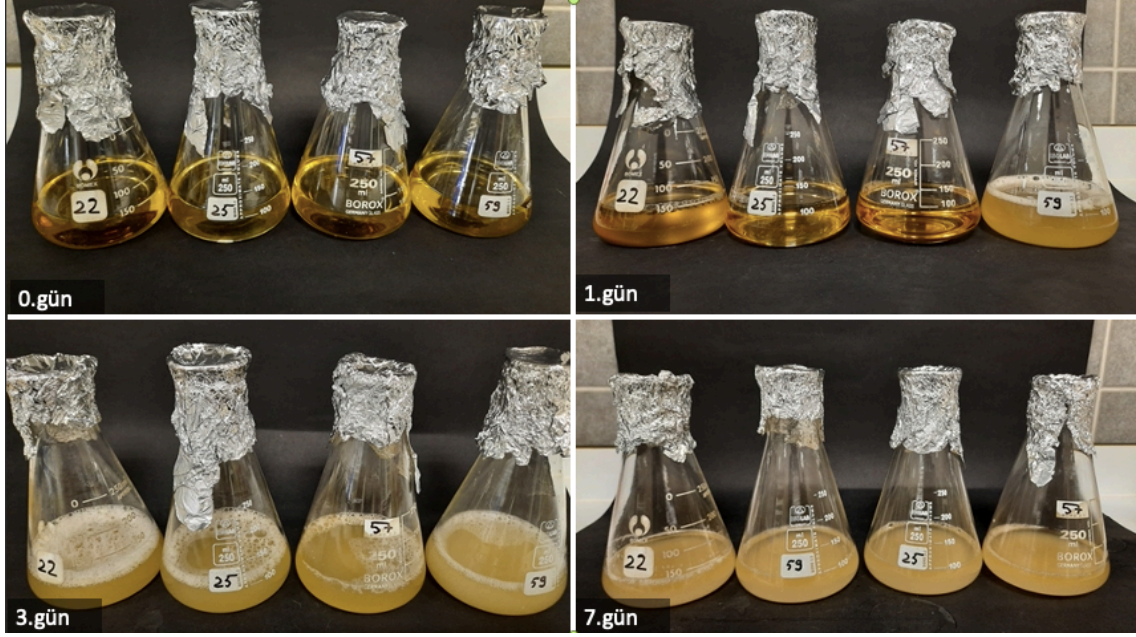
Saccharomyces cerevisiae ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının farklı pH değerlerindeki gelişimini incelemek için 3.3 pH değerine sahip üzüm sularının pH'ı 1M NaOH çözeltisini kullanılarak 4.0 ve 7.0'a ayarlanmıştır. Mayaların 3 farklı pH değerine (3.3, 4.0, 7.0) sahip üzüm sularındaki gelişim sonuçları Çizelge 4.24'te verilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının hepsi 3.3 pH değerine sahip üzüm suyunda çok iyi gelişim göstermişlerdir ancak pH arttıkça maya suşlarının gelişimi artmıştır. Ayrıca 4.0 ve 7.0 pH değerinde 3. gün'den itibaren *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının pulcherrimin adlı pigment üretimindeki artıştan dolayı kültürün üst kısmında kırmızılık oluşmuştur. 7.0 pH değerinde gelişen *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının pigment üretimi 4.0 pH değerinde gelişenlere kıyasla daha fazla olmuştur.

Fermantasyon hızı

Saccharomyces cerevisiae ve *Metschnikowia pulcherrima* mayalarının fermantasyon hızını incelemek amacıyla 100 mL üzüm suyunda $\sim 10^7$ kob/mL başlangıç yükü ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* saf

kültürleri geliştirilmiştir. Kültürlerin 7 günlük fermantasyonu boyunca alkol üretimi, şeker tüketimi (% briks), pH, sıcaklık değişimi, köpük oluşumu incelenmiştir.

Şekil 4.6'da fermantasyon hızı izlenen *Saccharomyces cerevisiae* kültürlerinin fermantasyonun 0. (inokülasyon günü), 1., 3. ve 7. günlerindeki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.6. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının fermantasyon takibi

Alkol ölçümü

Çizelge 4.24'te verilen sonuçlara göre alkol üretimi konusunda *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* arasında büyük bir farklılık vardır. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının alkol üretimi genellikle fermantasyonun 5. günü (59 numaralı suş 4. gün) tespit edilirken, 7 günlük fermantasyon boyunca *Metschnikowia pulcherrima* suşları alkol üretmemiştir. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının alkol ürettiği günü tespit etmek amacıyla fermantasyon uzatıldığında 46 ve 106 numaralı suşlar hariç, *Metschnikowia pulcherrima* suşlarında fermantasyonun 11. günü alkol miktarı ölçülebilmıştır. 46 numaralı *Metschnikowia pulcherrima* suşunda alkol üretimi 12. gün gerçekleşirken 106 numaralı suşun 14 günlük fermantasyon boyunca alkol üretimi tespit edilememiştir.

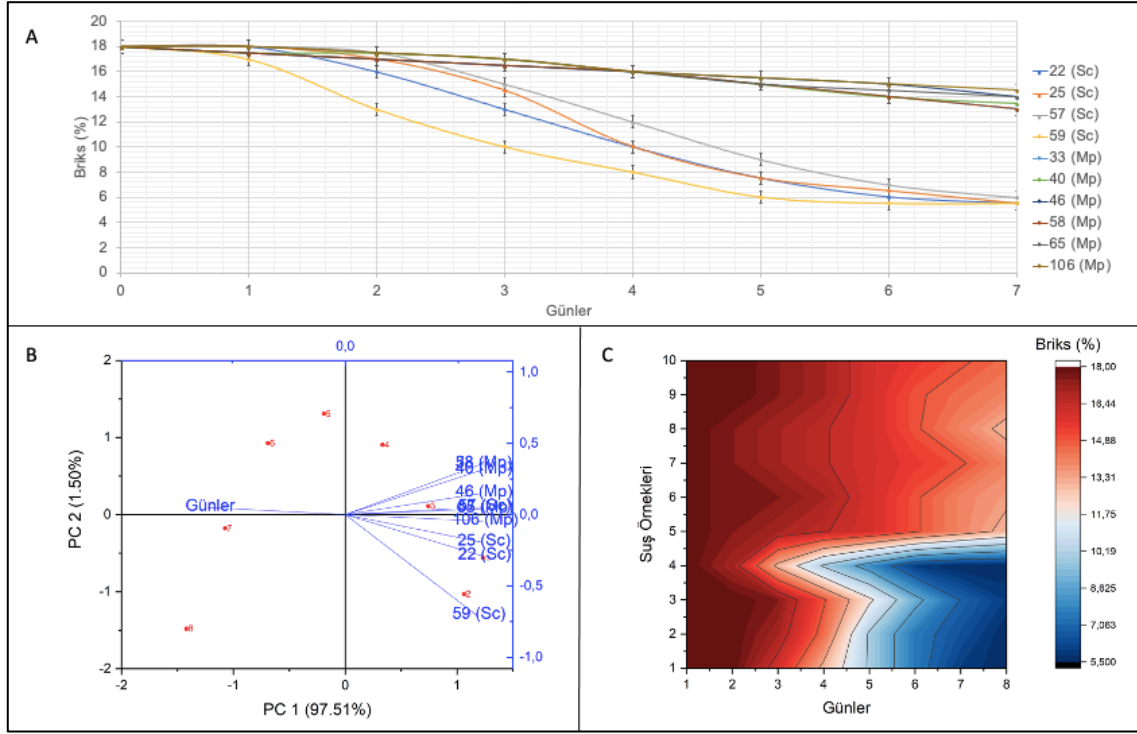
7 günlük fermantasyon sonucunda *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının ürettiği ortalama alkol miktarı %5.38'dir. En fazla alkol üreten *Saccharomyces cerevisiae* suşları 22 (referans) ve 59 numaralı suşlar (%6) iken en az alkolü 57 numaralı suş (%4) üretmiştir. Alkol üretimi başlayınca maya hücrelerinin çöktüğü gözlemlenmiştir.

Briks ölçümü

Saccharomyces cerevisiae ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının teknolojik özelliklerini incelemek ve fermantasyon kapasitelerini anlamak amacıyla fermantasyon sırasında her gün briks değerleri ölçülmüştür.

Çizelge 4.25'te *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının saf kültür fermantasyonu sırasındaki şeker tüketimini incelemek amacıyla günlük olarak ölçülen % briks miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. Fermantasyon sırasında *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının % briks değişimi*



*A: *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının 7 gün boyunca ölçülen yüzde briks değerlerinin çizgi grafiği

B: *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının 8 günlük fermantasyonları sırasında değişen briks değerlerinin temel bileşen analizi (PCA).

C: *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının 8 günlük fermantasyonları sırasında değişen briks değerlerinin ısı haritası. Suş örneklerinin grafikteki isim karşılığı ise, 22(Sc): 1, 25(Sc): 2, 57(Sc): 3, 59(Sc): 4, 33(Mp): 5, 40(Mp): 6, 46(Mp): 7, 58(Mp): 8, 65(Mp): 9, 106(Mp): 10 şeklindedir.

Çizelge 4.24 ve Çizelge 4.25'e göre fermantasyon sırasında şeker tüketimi açısından *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının arasında belirgin bir fark vardır. Çizelge 4.25'te çizgi grafiğindeki eğrilerin doğru denklemlerinin eğimleri incelendiğinde *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının eğimleri (-2.11) ve (-1.99) arasında değişirken *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının eğimleri (-0.68) ve (-0.54) arasındadır (EK 3). Çizelge 4.24'teki sonuçlara göre 7 günlük fermantasyon sonunda *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının ortalama briks değeri %5.6 iken *Metschnikowia pulcherrima* suşlarında

bu değer % 13.75'te kalmıştır. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarından en çok şeker tüketimi 33 ve 58 numaralı suşlarda olmuştur. 106 numaralı suş ise fermantasyon sonunda en az şeker tüketimini yapan suş olmuştur.

pH ölçümü

Fermantasyon boyunca her gün pH ve sıcaklık ölçümü yapılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının 7 günlük fermantasyonlarındaki ortalama pH ve sıcaklıkları izelge 4.24'te verilmiştir. Sonuçlara göre *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının pH değerleri benzerlik göstermektedir. 7 günlük fermantasyon boyunca ortalama pH değeri 3.13, sıcaklık ise 24.18 °C'dir.

Köpük oluşturma

Saccharomyces cerevisiae ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının 7 günlük fermantasyonlarındaki oluşturdukları köpük seviyesi her gün ölçülmüştür. Fermantasyon sonucunda suşların oluşturdukları en yüksek köpük seviyesi izelge 4.24'te verilmiştir. Sonuçlara göre en çok köpük oluşturan suşlar 22, 65 ve 106 iken en az köpük oluşturanlar 40, 46 ve 58 numaralı suşlardır. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarında pigment üretiminden dolayı fermantasyonun 3. gününden sonra yüzeyde kırmızılık gözlemlenmiştir. Fermantasyon sonunda *Metschnikowia pulcherrima* kültürlerinin *Saccharomyces cerevisiae* kültürlerine kıyasla daha kırmızı renge sahip olduğu gözlemlenmiştir.

RT-qPCR ile gen ifade analizinde yüksek *ARO8* ve *ARO9* gen ifadesine sahip olduğu için seçilen *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının (25, 57, 59 numaralı suşlar) teknolojik özellikleri incelendikten sonra fermantasyon aşaması için uygun bulunmuşlardır.

Metschnikowia pulcherrima suşlarının sıralı karışık kültür fermantasyon ortamında bulunma amacı fermantasyon koşullarını *Saccharomyces cerevisiae* suşuna uygun hale getirmek ve fermantasyon sırasında *Saccharomyces*

cerevisiae mayasına katkı sağlamaktır. RT-qPCR ile gen ifade analizinde bariz bir farklılık gözlenemediği için *Metschnikowia pulcherrima* suş seçimi teknolojik özelliklerin analizine göre yapılmıştır. *Metschnikowia pulcherrima* genelde benzer teknolojik özellikler gösterse de şeker tüketimi ve alkol üretimi açısından farklılıklar vardır (Çizelge 4.24). Fermantasyon aşamasında kullanılmak üzere, aralarında farkı anlayabilmek ve genel bir fikir elde etmek için şeker tüketimi hızlı olan bir suş (HUF16M3G11089, 58 numara) ile yavaş olan bir suş (HUF17M3H21175, 106 numara) seçilmiştir. Ayrıca RT-qPCR ile *ADH2* gen ifade analizinde en yüksek gen ifade seviyesine sahip suşlardan biri 58 numaralı suştur (Çizelge 4.21). RT-qPCR ile *ADH5* gen ifade analizinde ise bütün *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının gen ekspresyon seviyesi azalırken 106 numaralı suşun gen ekspresyon seviyesi artmıştır (Çizelge 4.23).

4.4. Fermantasyon Aşaması için Seçilen Suşlar

RT-qPCR ile gen ifade analiz sonuçları ve teknolojik özellikleri incelenerek fermantasyon aşaması için seçilen suşlar; suş numaraları, fermantasyon kodları, izolasyon kodları, izole edildikleri bölgeler ve ITS, RPB2, Malditof karşılaştırma tür analiz sonuçları ile Çizelge 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.26. Fermantasyon aşaması için seçilen suşlar

No	Fermantasyon Kodu	İzolasyon Kodu	Kaynağı	Tür ITS	Tür RPB2	Malditof
22	SC0	HUF16M1C0004	Şarapçılık (Chr. Hansen)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
25	SC1	HUF16M2K10004	Hacettepe Üniversitesi	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
57	SC2	HUF16M3G11088	Eskişehir Üzüm	<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
59	SC3	HUF16M3H1101	Çankırı Üzüm	<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
58	MP1	HUF16M3G11089	Eskişehir Üzüm	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Candida pulcherrima</i>
106	MP2	HUF17M3H21175	Çankırı1 Üzüm	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia rubicola</i>	<i>Candida pulcherrima</i>

4.5. Fermantasyon

Fermantasyon aşaması *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarını içermektedir.

Sıralı karışık kültür fermantasyonu, canlandırılan kültürlerden fermantasyonun - 2. günü *Metschnikowia pulcherrima* ($\sim 6 \times 10^6$ kob/mL) kültürü daha sonra fermantasyonun 0. günü *Saccharomyces cerevisiae* ($\sim 2 \times 10^7$ kob/mL) kültürü 250 mL Erlenmeyerlerdeki 200 mL pastörize üzüm suyuna 3:1 oranında inoküle edilerek sıralı fermantasyon olarak gerçekleştirilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae saf kültür fermantasyonu ise canlandırılan *Saccharomyces cerevisiae* kültürü ($\sim 2 \times 10^7$ kob/ mL) fermantasyonun 0. Günü, 250 mL Erlenmeyerlerdeki 200 mL steril üzüm suyuna inoküle edilerek gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon sürecinin transkriptomik analizlerini gerçekleştirmek için fermantasyonun 1. 3. 5. ve 7. günlerinde örnekler alınmıştır. Örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR ile gen ifade analizleri yapılarak fermantasyon süreci transkriptomik olarak izlenmiştir.

Ayrıca, toplamda 17 gün süren fermantasyon sırasında yapılan günlük briks, alkol, pH ölçümleri ile fermantasyon takibi gerçekleştirilmiştir. Bu sayede fermantasyon süreci biyokimyasal olarak da izlenmiştir.

4.5.1. Fermantasyon Sürecinin Transkriptomik Analizi

4.5.1.1. Fermantasyon Kültürlerinin RNA İzolasyonu

Fermantasyon kültürlerinin RNA izolasyonu Şekil 3.5'teki protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon kültürlerinden alınan örneklerin RNA izolasyonları sonucunda elde RNA konsantrasyonlarının nükleik asit miktarı

(ng/ μ l) ve 260 ila 280 nm'deki OD oranı ($A_{260/280}$) Nanodrop 2000c spektrofotometre ile ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.27'de verilmiştir. RNA izolasyonu iki teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.27'de *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasında alınan örneklerin izolasyon günü, RNA izolasyonu öncesi elde edilen yaş hücre pellet ağırlığı, RNA izolasyonu sonucunda elde edilen nükleik asit konsantrasyonları ve saflık değerleri ($A_{260/280}$) verilmiştir.

Çizelge 4.27. RNA izolasyon sonuçları

Fermantasyon Örneği	Fermantasyon	Yaş hücre ağırlığı (mg)		Nükleik Asit (ng/ul)		Absorbans (260/280)	
		1. Paralel	2. Paralel	1. Paralel	2. Paralel	1. Paralel	2. Paralel
SC0	1. GÜN	42.00	45.00	573.30	629.60	2.00	1.97
	3. GÜN	67.00	68.00	516.10	-	1.88	-
	5. GÜN	70.00	90.00	556.90	389.40	1.99	1.96
	7. GÜN	70.00	74.00	161.30	164.90	1.95	1.93
SC1	1. GÜN	38.00	40.00	642.80	595.30	1.95	1.95
	3. GÜN	76.00	90.00	2041.70	-	1.99	-
	5. GÜN	90.00	80.00	1202.30	702.80	2.00	1.97
	7. GÜN	77.00	69.00	269.00	255.20	1.95	1.93
SC2	1. GÜN	50.00	48.00	1371.50	616.20	2.00	1.93
	3. GÜN	76.00	82.00	850.40	1685.10	2.01	2.06
	5. GÜN	90.00	90.00	842.90	785.00	2.03	2.06
	7. GÜN	100.00	87.00	885.00	515.70	2.09	2.01
SC3	1. GÜN	37.00	56.00	1001.50	583.70	1.98	1.95
	3. GÜN	84.00	86.00	1514.10	529.60	2.04	1.94
	5. GÜN	90.00	70.00	873.20	947.40	2.00	2.01
	7. GÜN	109.00	84.00	1231.70	671.70	2.05	2.05
SC0xMP1	1. GÜN	23.00	22.00	842.50	830.70	1.96	1.93
	3. GÜN	78.00	71.00	519.10	-	1.93	-
	5. GÜN	80.00	80.00	665.20	596.40	1.99	1.98
	7. GÜN	91.00	88.00	543.60	451.90	2.00	1.95
SC0xMP2	1. GÜN	15.00	38.00	483.30	502.00	1.90	1.88
	3. GÜN	61.00	65.00	2046.80	583.90	2.03	1.87
	5. GÜN	70.00	90.00	626.10	597.70	1.98	1.92
	7. GÜN	74.00	73.00	518.40	524.80	1.91	1.90
SC1xMP1	1. GÜN	28.00	44.00	696.30	466.10	1.94	1.88
	3. GÜN	59.00	87.00	3452.80	534.70	2.02	1.88
	5. GÜN	90.00	90.00	1298.60	677.70	1.98	1.95
	7. GÜN	64.00	91.00	699.50	532.00	1.95	1.89
SC1xMP2	1. GÜN	18.00	24.00	456.80	485.20	1.89	1.87
	3. GÜN	47.00	67.00	2366.80	635.40	2.01	1.88
	5. GÜN	70.00	110.00	1129.80	936.80	1.96	1.93
	7. GÜN	88.00	79.00	1284.80	714.90	2.00	1.91
SC2xMP1	1. GÜN	17.00	26.00	661.40	539.00	1.94	1.88
	3. GÜN	65.00	55.00	1888.60	534.40	2.04	1.87
	5. GÜN	70.00	80.00	556.00	509.30	1.93	1.91
	7. GÜN	75.00	67.00	716.30	699.70	1.99	1.97
SC2xMP2	1. GÜN	26.00	31.00	460.20	525.00	1.90	1.86
	3. GÜN	51.00	47.00	1746.80	747.90	1.97	1.96
	5. GÜN	70.00	100.00	976.80	842.80	1.99	1.97
	7. GÜN	63.00	72.00	696.40	635.90	1.97	1.96
SC3xMP1	1. GÜN	16.00	21.00	603.30	535.30	1.90	1.87
	3. GÜN	46.00	45.00	2433.10	922.10	1.98	2.01
	5. GÜN	90.00	60.00	1044.40	721.70	1.99	1.98
	7. GÜN	69.00	72.00	685.50	530.20	1.97	1.91
SC3xMP2	1. GÜN	25.00	44.00	659.20	503.10	1.91	1.86
	3. GÜN	48.00	54.00	2653.90	822.30	1.99	1.99
	5. GÜN	70.00	60.00	1072.90	906.30	2.00	1.98
	7. GÜN	82.00	69.00	763.80	901.90	1.97	1.94
Ortalama nükleik asit = 847.33 ng/ul							
Standart sapma = ±548.97							
Varyasyon kat sayısı = 64.79							

RNA izolasyonuna başlamadan önce, fermantasyon sırasında gelişen maya hücrelerinin yaş hücre ağırlığı ölçülmüştür. Elde edilen RNA örneklerinin yaş hücre ağırlığı ortalaması 64.05 mg'dır. Fermantasyon sırasında alınan örneklerin yaş hücre ağırlığı genellikle fermantasyon ilerledikçe artmıştır.

İki teknik tekrar ile gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonucunda, elde edilen örneklerin nükleik asit konsantrasyonlarının ortalaması 847.33 ng/µl'dir. Çalışmada elde edilen en yüksek nükleik asit konsantrasyonu 3452.80 ng/µl iken en düşük nükleik asit konsantrasyonu 161.30 ng/µl'dir. Standart sapma ise ± 548.97 'dir. *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının RNA izolasyonu sonucunda elde edilen nükleik asit konsantrasyonları ileriki çalışmalar için (cDNA sentezi ve RT-qPCR ile gen ifade analizi) yeterlidir. Fermantasyon kültürlerinin RNA izolasyonunun varyasyon katsayısı 64.79'dur.

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarından izole edilen RNA örneklerinin 260/280 absorbans oranı, saflık değerleri 1.8-2.0 değerlerinin arasında olması çalışmada elde edilen RNA'nın saf olduğu anlamına gelmektedir. RNA izolasyonu sonucunda aynı suş için elde edilen 2 teknik tekrardan saflık değeri 1.8-2.0 aralığında ya da bu değerlere daha yakın olan örnek ileri çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen örneklerin RNA izolasyon sonuçları Çizelge 4.27'de 1. Paralel olarak verilmiştir [126, 127].

4.5.1.2. Fermantasyon Kültürlerinin Ters transkripsiyonu (cDNA Sentezi)

Seçilen RNA örneklerinden, RT-qPCR deneylerinde kullanılmak üzere, cDNA sentezi EURx smART First Strand cDNA sentez (katalog numarası: E0804-02) kiti ile, ilgili protokol izlenerek (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6) iki teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.28'de Çizelge 4.27'de 1. Paralel olarak belirtilen fermantasyon kültürlerinin RNA'ları kullanılarak elde edilen cDNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflık değerleri (260/280) verilmiştir.

Çizelge 4.28. Fermantasyon kültürlerinin ters transkripsiyon sonuçları

Fermantasyon Örneği	Fermantasyon	Nükleik Asit (ng/µl)		Absorbans (260/280)	
		1. Paralel	2. Paralel	1. Paralel	2. Paralel
SC0	1. GÜN	2014.80	1500.90	1.75	1.74
	3. GÜN	1154.20	1042.70	1.63	1.63
	5. GÜN	1252.20	622.40	1.66	1.50
	7. GÜN	3409.70	2752.40	1.73	1.71
SC1	1. GÜN	1833.70	2113.70	1.74	1.72
	3. GÜN	1569.20	1580.90	1.81	1.72
	5. GÜN	1302.70	690.60	1.69	1.57
	7. GÜN	2928.50	2152.90	1.70	1.68
SC2	1. GÜN	1976.90	2116.00	1.77	1.75
	3. GÜN	1397.80	1154.30	1.66	1.61
	5. GÜN	1312.90	700.20	1.70	1.62
	7. GÜN	2819.30	2275.40	1.75	1.70
SC3	1. GÜN	2122.50	1858.80	1.75	1.75
	3. GÜN	1468.10	1428.20	1.71	1.70
	5. GÜN	1351.60	727.50	1.71	1.62
	7. GÜN	2998.50	2914.50	1.76	1.74
SC0xMP1	1. GÜN	1769.00	1823.10	1.74	1.71
	3. GÜN	1188.00	1108.60	1.68	1.60
	5. GÜN	1052.90	734.50	1.62	1.57
	7. GÜN	2274.30	2089.20	1.70	1.66
SC0xMP2	1. GÜN	1560.70	1992.10	1.73	1.71
	3. GÜN	1648.80	1539.90	1.76	1.72
	5. GÜN	1087.10	645.30	1.65	1.53
	7. GÜN	2248.10	1864.10	1.67	1.68
SC1xMP1	1. GÜN	1507.30	1539.70	1.74	1.72
	3. GÜN	1594.20	1656.10	1.77	1.75
	5. GÜN	1507.20	871.30	1.69	1.66
	7. GÜN	2714.10	2207.00	1.73	1.71
SC1xMP2	1. GÜN	1527.30	1293.30	1.71	1.70
	3. GÜN	1651.90	1928.40	1.75	1.73
	5. GÜN	1564.70	820.00	1.70	1.64
	7. GÜN	3349.90	2885.90	1.74	1.75
SC2xMP1	1. GÜN	1516.10	1551.40	1.73	1.71
	3. GÜN	1329.80	1505.40	1.79	1.73
	5. GÜN	3178.70	2690.10	1.76	1.68
	7. GÜN	2801.90	2272.60	1.72	1.70
SC2xMP2	1. GÜN	1419.60	1262.70	1.73	1.70
	3. GÜN	1481.10	1242.00	1.73	1.70
	5. GÜN	3899.20	3371.40	1.75	1.75
	7. GÜN	2643.80	2244.60	1.72	1.69
SC3xMP1	1. GÜN	934.00	1044.70	1.72	1.68
	3. GÜN	1388.30	1278.20	1.78	1.78
	5. GÜN	4428.40	2861.00	1.75	1.73
	7. GÜN	2230.20	2202.80	1.70	1.69
SC3xMP2	1. GÜN	1173.10	1185.80	1.68	1.62
	3. GÜN	1332.60	1724.60	1.82	1.80
	5. GÜN	3284.50	2994.80	1.76	1.75
	7. GÜN	2795.90	2706.80	1.73	1.72
Ortalama nükleik asit = 1851.71 ng/µl					
Standart sapma = ±786.36 ng/µl					
Varyasyon kat sayısı = 42.47					

Çizelge 4.28'de fermantasyon kültür numarası verilen *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının cDNA sentezi sonucunda elde edilen cDNA konsantrasyonlarının ortalaması 1851.71 ng/µl'dir.

Çalışmada elde edilen en yüksek cDNA konsantrasyonu 4428.40 ng/µl iken en düşük cDNA konsantrasyonu 622.40 ng/µl'dir. Standart sapma ise ± 786.36 ng/µl'dir. Fermantasyon kültürlerinin cDNA sentezinin varyasyon katsayısı 42.47'dir.

cDNA sentezi sonucunda aynı suş için elde edilen iki teknik tekrardan saflık değeri 1.8-2.0 aralığında ya da bu değerlere daha yakın olan örnek ileri çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen cDNA örnekleri Çizelge 4.28'de 1. Paralel olarak verilmiştir.

Çizelge 4.27'de verilen RNA örneklerinin saflık değerleri Çizelge 4.28'deki cDNA örneklerinin saflık değerleri ile karşılaştırıldığında genel olarak cDNA sentezi sonrasında örneklerin saflık değerlerinde düşüş olduğu görülmektedir. Saflık değerleri 1.8 değerinden düşük olan örneklerde protein, fenol veya diğer kirletici kontaminasyon varlığı düşünülebilir. DNase uygulaması ile cDNA örneklerinin saflık değerleri arttırılabilir. Ancak fermantasyon kültürlerinin ters transkripsiyonu sonucunda elde edilen cDNA miktarları ve saflık değerleri RT-qPCR ile gen ifade analizi için yeterlidir. Çizelge 4.28'de belirtilen cDNA örnekleri ile gerçekleştirilen RT-qPCR çalışmalarında inhibisyon oluşmamıştır [126, 127].

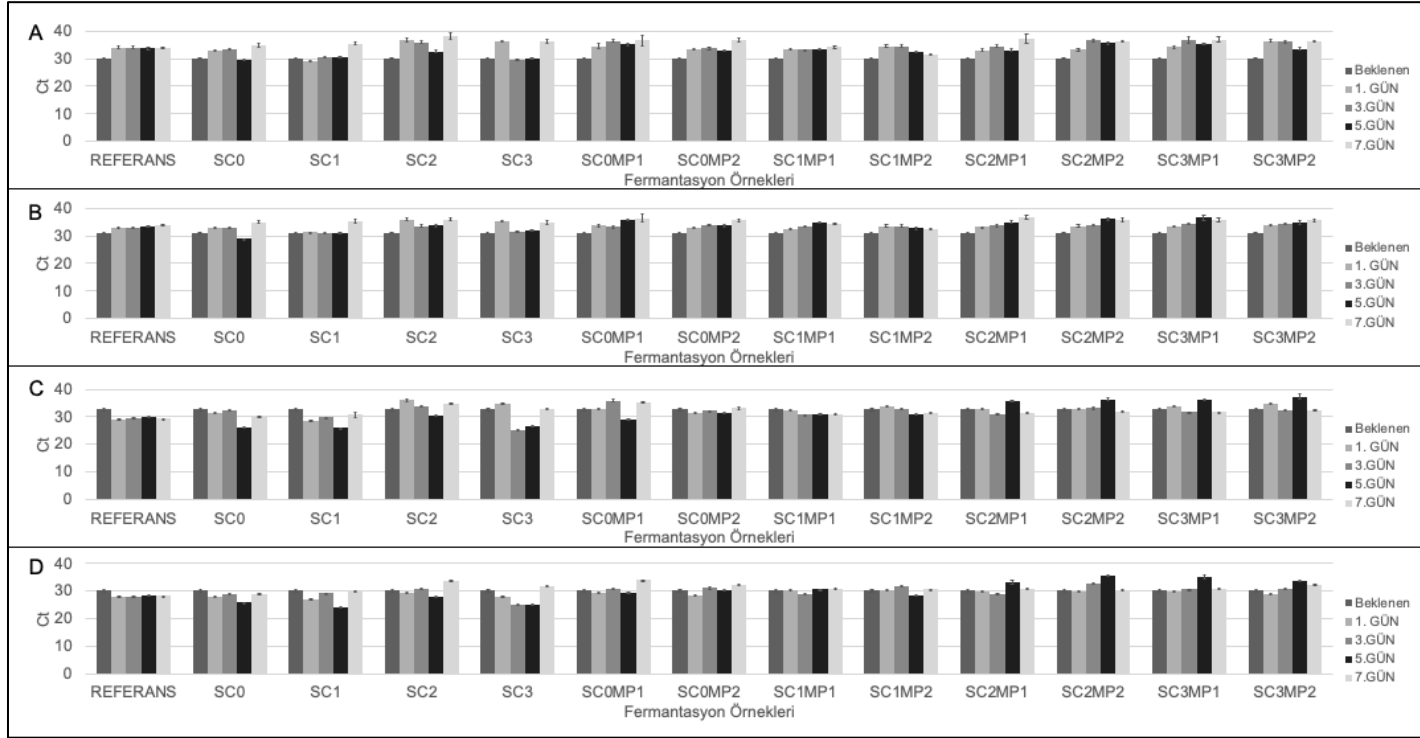
4.5.1.3. Fermantasyon Kültürlerinin RT-qPCR ile Gen İfade Analizi

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarından izole edilen RNA örneklerinin ters transkripsiyonu sonucunda elde edilen miktarları ve saflık değerleri uygun olan (Çizelge 4.28) cDNA örnekleri kullanılarak RT-qPCR ile *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen ifade analizi gerçekleştirilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarından fermantasyon boyunca elde edilen cDNA rnekleri RT-qPCR ile gen ifade analizi öncesi aynı konsantrasyonda olmaları için seyreltilmiştir (*ARO8* ve *ARO9* için 25 ng/μl, *ADH2* ve *ADH5* için 35 ng/μl). Aynı konsantrasyondaki cDNA rneklerinin RT-qPCR ile *ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5* gen ifade analizleri yapılmıştır.

Çizelge 4.29'da RT-qPCR ile gen ifadesi sonucunda elde edilen Ct değerleri ile her gene ait daha önce elde edilen standart eğri denklemine göre hesaplanmış beklenen Ct değerleri karşılaştırılmıştır. Fermantasyon kültürlerinin Ct sonuçları referans suşa göre normalleştirilmiştir ve her fermantasyon rneği 3 paralel olarak analiz edilmiştir.

Çizelge 4.29. Fermantasyon kültürlerinin *ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5* genleri için fermantasyon sırasında ölçülen ve beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması*



*A: RT-qPCR ile *ARO8* gen ifadesinde fermantasyon sırasında kültürlerden alınan aynı cDNA konsantrasyonundaki (25 ng/μl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.6'da verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması.

B: RT-qPCR ile *ARO9* gen ifadesinde fermantasyon sırasında kültürlerden alınan aynı cDNA konsantrasyonundaki (25 ng/μl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.9'da verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması.

C: RT-qPCR ile *ADH2* gen ifadesinde fermantasyon sırasında kültürlerden alınan aynı cDNA konsantrasyonundaki (35 ng/μl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.12'de verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması.

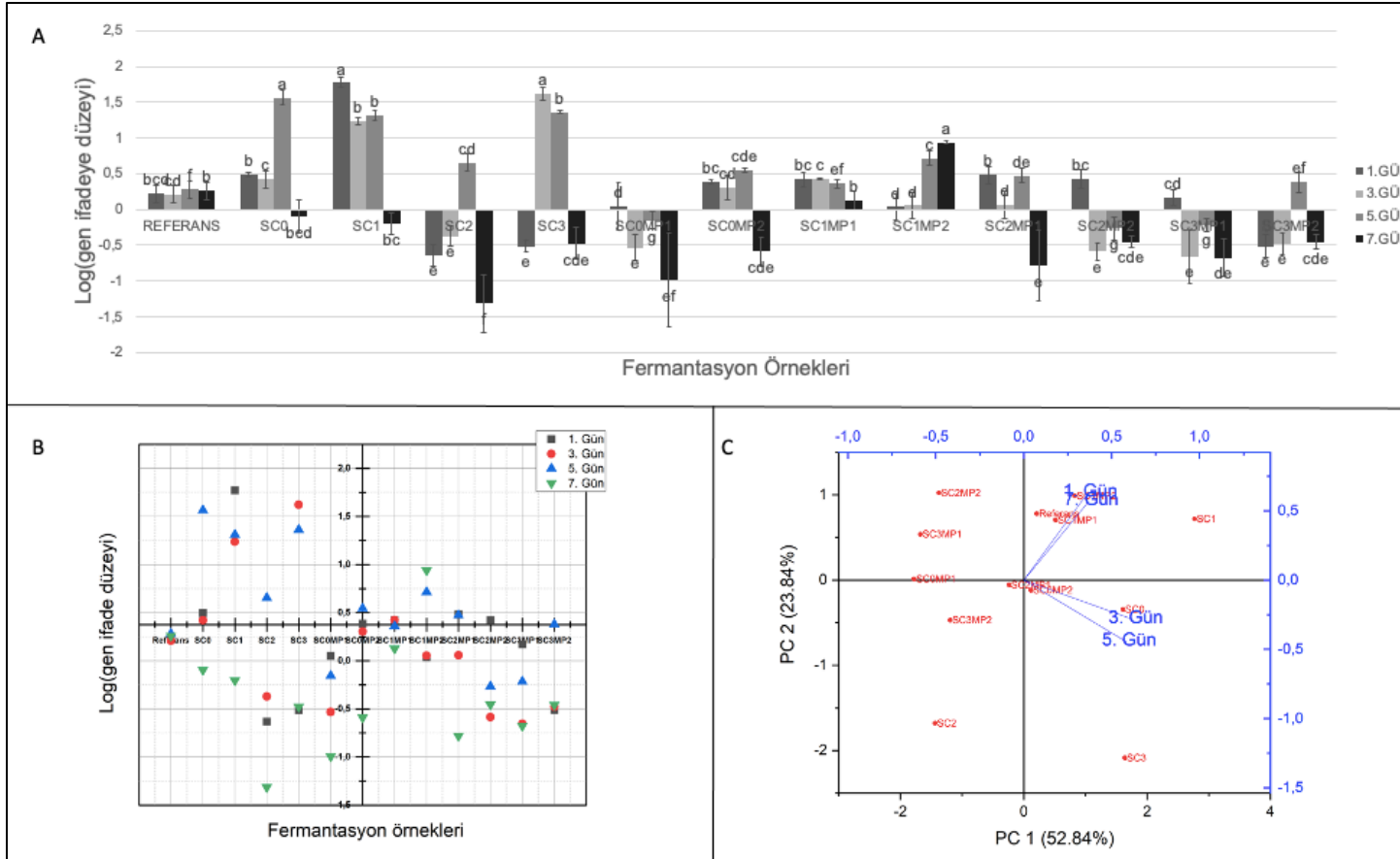
D: RT-qPCR ile *ADH5* gen ifadesinde fermantasyon sırasında kültürlerden alınan aynı cDNA konsantrasyonundaki (35 ng/μl) Ct sonuçları ile Çizelge 4.15'te verilen standart eğri denklemine göre beklenen Ct değerlerinin karşılaştırılması.

Çizelge 4.29'a göre *ARO8* ve *ARO9* gen ifadesi analizinde *Saccharomyces cerevisiae* saf ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültürlerinin Ct değerleri genellikle, aynı konsantrasyonun beklenen Ct değerlerinden daha büyüktür. *ADH2* ve *ADH5* gen ifadesi analizinde ise özellikle *Saccharomyces cerevisiae* saf kültürlerinin Ct değerleri, aynı konsantrasyonun beklenen Ct değerlerinden küçüktür.

ARO8

Çizelge 4.30'da RT-qPCR ile *ARO8* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.6'da verilen standart eğri denklemi kullanılarak hesaplanan fermantasyon sırasındaki *ARO8* gen ifade düzeyinin logaritmik değişimi farklı analizler kullanılarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.30. Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ARO8* gen ifade düzeyindeki değişimi*



*A: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin logaritmik *ARO8* gen ifade düzeyindeki değişiminin sütun grafiği. Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-g) fermantasyon sırasında alınan örneklerin kendi grupları içindeki (1.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün) gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

B: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ARO8* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin dağılım grafiği.

C: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ARO8* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin temel bileşen analizi (PCA).

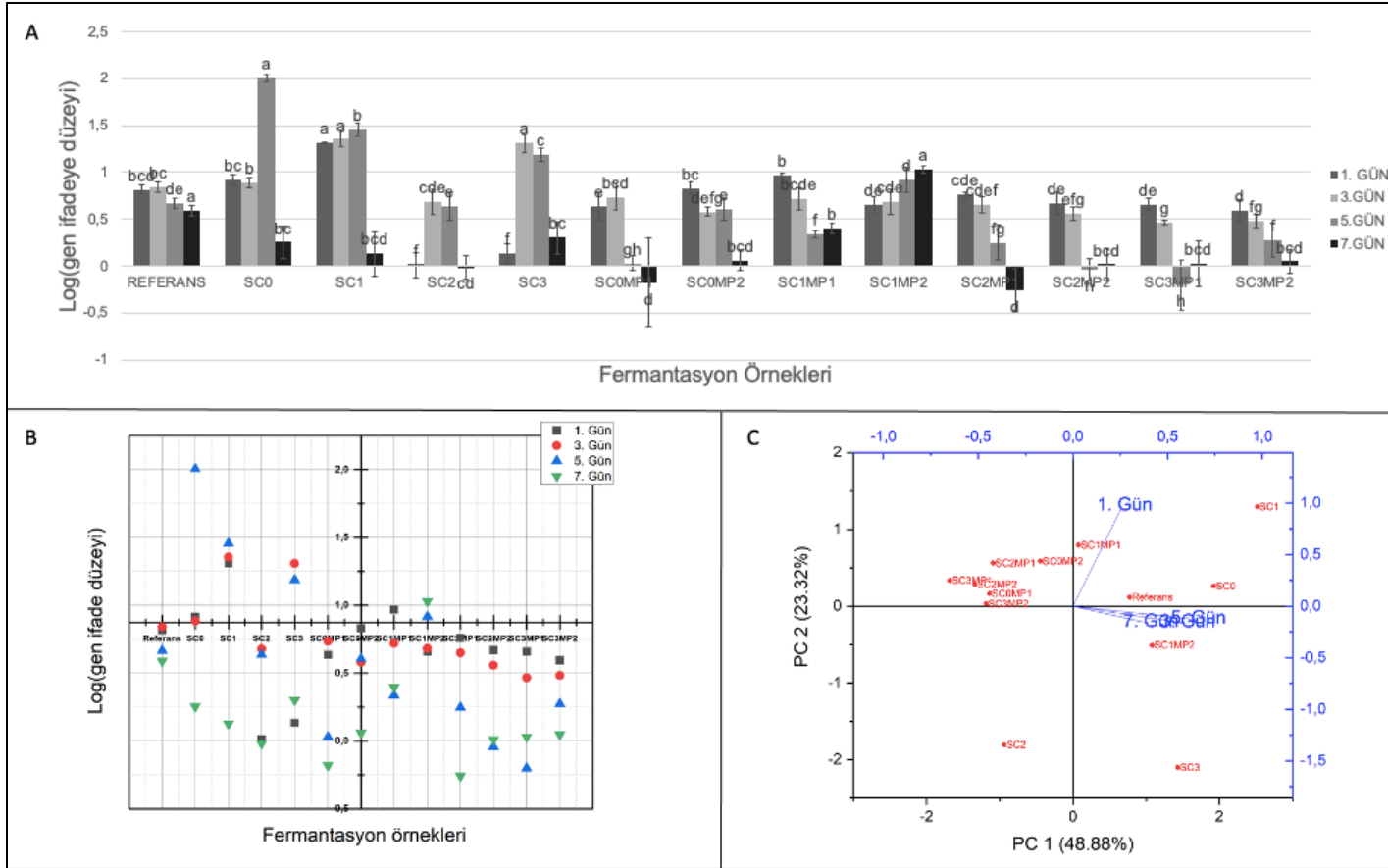
Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ARO8* geni için $m = -3.2649$, $b = 34.758$ 'dir [126].

Çizelge 4.30'a göre fermantasyonun 1. günü en yüksek *ARO8* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1 (a) (1.77) iken en düşük gen ifadesi SC2 (e)'e (-0.63) aittir. Fermantasyonun 3. günü en yüksek *ARO8* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC3 (a) (1.62) iken en düşük gen ifadesi SC3MP1 (e)'e (-0.65) aittir. Fermantasyonun 5. günü en yüksek *ARO8* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC0 (a) (1.57) iken en düşük gen ifadesi SC2MP2 (g)'e (-0.26) aittir. Fermantasyonun 7. günü en yüksek *ARO8* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1MP2 (a) (0.94) iken en düşük gen ifadesi SC2 (f)'e (-1.31) aittir.

ARO9

Çizelge 4.31'de RT-qPCR ile *ARO9* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.9'da verilen standart eğri denklemi kullanılarak hesaplanan fermantasyon sırasındaki *ARO9* gen ifade düzeyinin logaritmik değişimi farklı analizler kullanılarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.31. Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ARO9* gen ifade düzeyindeki değişimi*



*A: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin logaritmik *ARO9* gen ifade düzeyindeki değişiminin sütun grafiği. Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-h) fermantasyon sırasında alınan örneklerin kendi grupları içindeki (1.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün) gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

B: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ARO9* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin dağılım grafiği.

C: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ARO9* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin temel bileşen analizi (PCA).

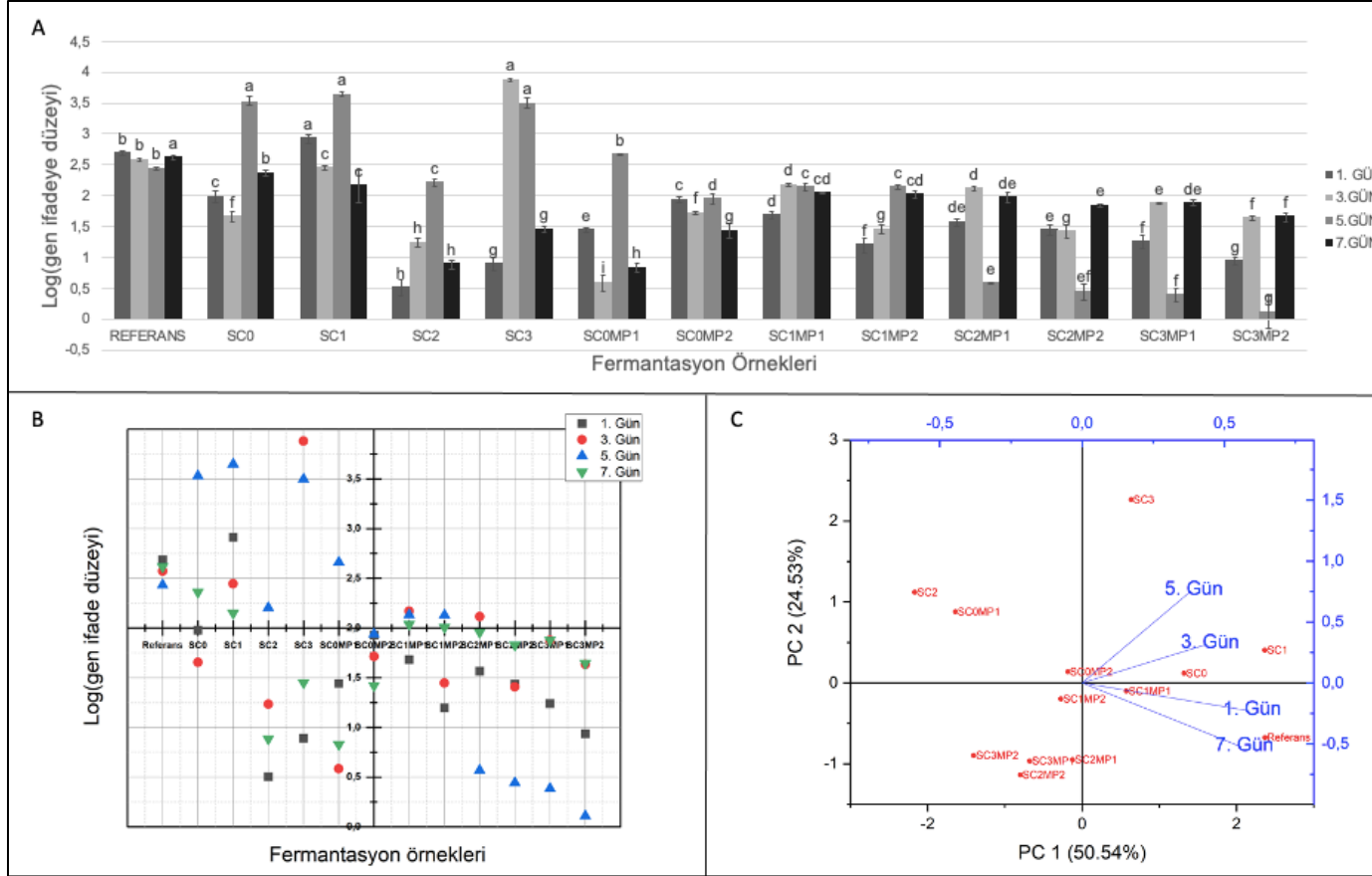
Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ARO9* geni için $m = -3.4708$, $b = 35.945$ 'dir [126].

Çizelge 4.31'e göre fermantasyonun 1. günü en yüksek *ARO9* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1 (a) (1.31) iken en düşük gen ifadesi SC2'e (f) (0.01) aittir. Fermantasyonun 3. günü en yüksek *ARO9* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1 (a) (1.35) iken en düşük gen ifadesi SC3MP1'e (g) (0.47) aittir. Fermantasyonun 5. günü en yüksek *ARO9* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC0 (a) (2.01) iken en düşük gen ifadesi SC3MP1'e (h) (-0.20) aittir. Fermantasyonun 7. günü en yüksek *ARO9* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1MP2 (a) (1.03) iken en düşük gen ifadesi SC2MP1'e (d) (-0.26) aittir.

ADH2

Çizelge 4.32'de RT-qPCR ile *ADH2* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.12'de verilen standart eğri denklemi kullanılarak hesaplanan fermantasyon sırasındaki *ADH2* gen ifade düzeyinin logaritmik değişimi farklı analizler kullanılarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.32. Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ADH2* gen ifade düzeyindeki değişimi*



*A: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin logaritmik *ADH2* gen ifade düzeyindeki değişiminin sütun grafiği. Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-i) fermantasyon sırasında alınan örneklerin kendi grupları içindeki (1.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün) gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

B: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ADH2* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin dağılım grafiği.

C: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ADH2* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin temel bileşen analizi (PCA).

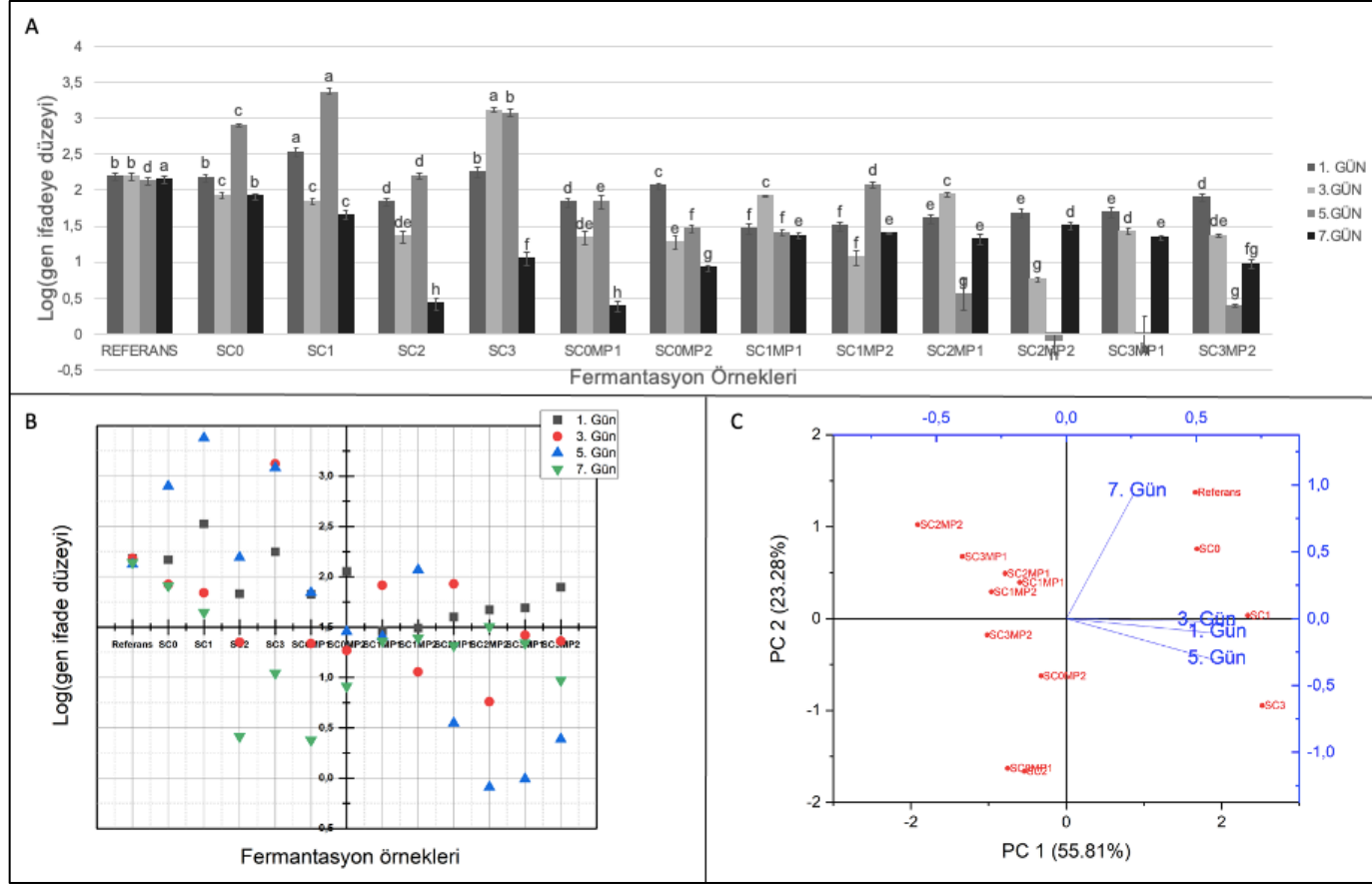
Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ADH2* geni için $m = -3.2114$, $b = 37.634$ 'dür [126].

Çizelge 4.31'e göre fermantasyonun 1. günü en yüksek *ADH2* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1 (a) (2.91) iken en düşük gen ifadesi SC2'e (h) (0.50) aittir. Fermantasyonun 3. günü en yüksek *ADH2* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC3 (a) (3.88) iken en düşük gen ifadesi SC0MP1'e (i) (0.59) aittir. Fermantasyonun 5. günü en yüksek *ADH2* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1 (a) (3.65) iken en düşük gen ifadesi SC3MP2'e (g) (0.11) aittir. Fermantasyonun 7. günü en yüksek *ADH2* gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC0 (b) (2.36) iken en düşük gen ifadesi SC0MP1'e (h) (0.83) aittir.

ADH5

Çizelge 4.33'te RT-qPCR ile *ADH5* gen ifade analizi sonucunda Çizelge 4.15'te verilen standart eğri denklemi kullanılarak hesaplanan fermantasyon sırasındaki *ADH5* gen ifade düzeyinin logaritmik değişimi farklı analizler kullanılarak verilmiştir.

Çizelge 4.33. Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ADH5* gen ifade düzeyindeki değişimi*



*A: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin logaritmik *ADH5* gen ifade düzeyindeki değişiminin sütun grafiği. Sütunların üzerindeki küçük harfler (a-h) fermantasyon sırasında alınan örneklerin kendi grupları içindeki (1.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün) gen ifade düzeyleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$). Üç paralelli olarak yapılan ölçümler tek yönlü varyans analizi ile araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılığı analiz etmek için Duncan testi uygulanmıştır.

B: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ADH5* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin dağılım grafiği.

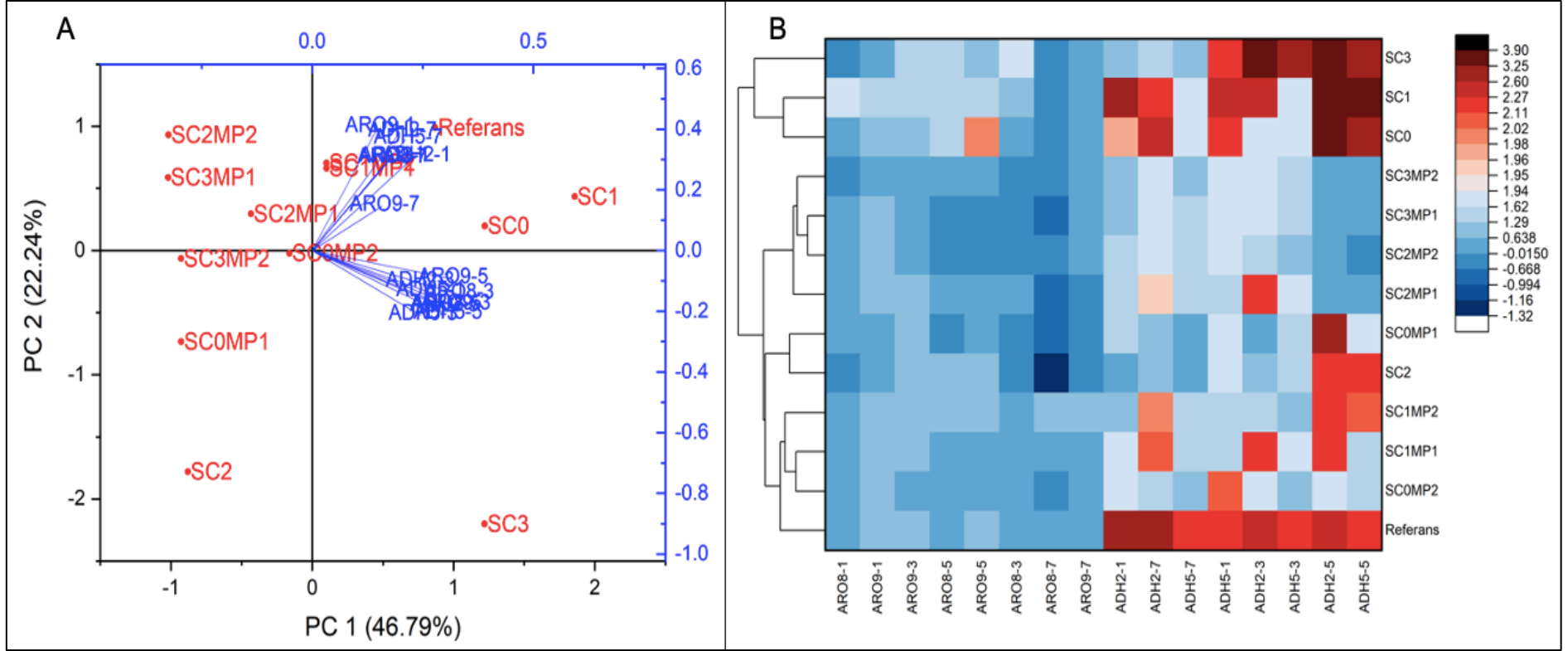
C: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ADH5* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin temel bileşen analizi (PCA).

Gen ifade düzeyi hesaplanırken $10^{(Ct-b)/m}$ denklemi kullanılmıştır. *ADH5* geni için $m = -3.2309$, $b = 35.197$ 'dir [126].

Çizelge 4.31'e göre fermantasyonun 1. günü *ADH5* için en yüksek gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1 (a) (2.53) iken en düşük gen ifadesi SC1MP1'e (f) (1.46) aittir. Fermantasyonun 3. günü *ADH5* için en yüksek gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC3 (b) (3.12) iken en düşük gen ifadesi SC2MP2'e (g) (0.76) aittir. Fermantasyonun 5. günü *ADH5* için en yüksek gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC1 (a) (3.38) iken en düşük gen ifadesi SC2MP2'e (h) (-0.08) aittir. Fermantasyonun 7. günü *ADH5* için en yüksek gen ifadesine sahip fermantasyon örneği, SC0 (b) (1.91) iken en düşük gen ifadesi SC0MP1'e (h) (0.38) aittir.

Çizelge 4.34'te fermantasyon sırasında alınan örneklerin RT-qPCR analizi ile saptanan *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen ifade düzeylerindeki değişim aynı çizelgede birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.34. Fermantasyon sırasında alınan örneklerin *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen ifade düzeylerindeki değişimi*



*A: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin temel bileşen analizi (PCA).

B: Fermantasyon sırasında alınan örneklerinin *ARO8*, *ARO9*, *ADH2* ve *ADH5* gen ifade düzeyindeki logaritmik değişiminin ısı haritası.

ARO8-1, *ARO9*-1, *ADH2*-1, *ADH5*-1: fermantasyonun 1. günü alınan örneklerin logaritmik gen ifade düzeyi.

ARO8-3, *ARO9*-3, *ADH2*-3, *ADH5*-3: fermantasyonun 3. günü alınan örneklerin logaritmik gen ifade düzeyi.

ARO8-5, *ARO9*-5, *ADH2*-5, *ADH5*-5: fermantasyonun 5. günü alınan örneklerin logaritmik gen ifade düzeyi.

ARO8-7, *ARO9*-7, *ADH2*-7, *ADH5*-7: fermantasyonun 7. günü alınan örneklerin logaritmik gen ifade düzeyi.

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarındaki aromatik aminotransferaz enzim genlerinin (*ARO8*, *ARO9*) fermantasyon sırasındaki transkriptomik değişimi incelendiğinde fermantasyonun başlarında *Saccharomyces cerevisiae* saf kültürlerinin daha yüksek gen ifade düzeyine sahip olduğu saptanmıştır. Fermantasyonun 7. günü ise en yüksek gen ifade düzeyi SC1 suşunun karışık kültürlerine, en yüksek gen ifade düzeyi ise SC1MP2 karışık kültürüne ait olduğu tespit edilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarındaki alkol dehidrojenaz enzim genlerinin (*ADH2*, *ADH5*) fermantasyon sırasındaki transkriptomik değişimi incelendiğinde ise genel olarak *Saccharomyces cerevisiae* saf kültürlerinde yüksek gen ifade düzeyi gözlemlenmiştir (Çizelge 4.34). En düşük *ADH2*, *ADH5* gen ifade düzeyi ise SC2 ve SC3 *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının karışık kültürlerinde (SC2MP1, SC2MP2, SC3MP1, SC3MP2) gözlemlenmiştir. Fermantasyonun 7. günü SC0, SC1, SC1MP1, SC1MP2 kültürleri yüksek gen ifade düzeyine sahipken SC2, SC0MP1 kültürleri düşük gen ifadesine sahiptir.

4.5.2. Fermantasyon Takibi

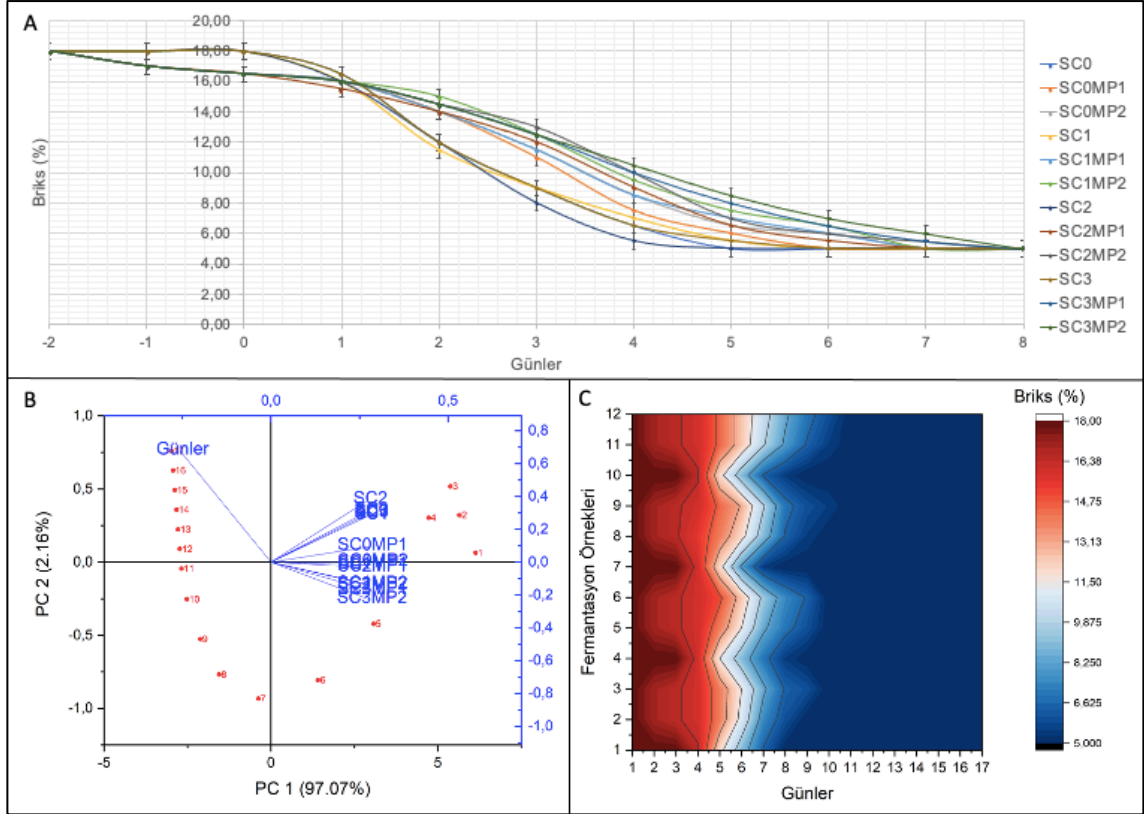
Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarını izlemek amacıyla *Metschnikowia pulcherrima* kültür fermantasyonunun gerçekleştiği fermantasyonun -2., -1., 0. günleri dahil sonraki 14 gün boyunca toplamda 17 gün briks, alkol ve pH ölçümü yapılmıştır.

Şeker tüketimi

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının briks derecesi, fermantasyon boyunca ATC (0-90% Brix) refraktometresi kullanılarak

her gün aynı saatte ölçülmüştür. Çizelge 4.35'te *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonları sırasındaki şeker tüketimini incelemek amacıyla fermantasyon boyunca günlük ölçülen briks miktarlarındaki değişim verilmiştir.

Çizelge 4.35. Fermantasyon sırasındaki şeker tüketimi*



*A: *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının -2., -1., 0., 1., ..., 8. günlerindeki briks değerlerinin çizgi grafiği

B: *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür örneklerinin fermantasyonları sırasında değişen briks değerlerinin temel bileşen analizi (PCA).

C: *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonu sırasında değişen briks değerlerinin ısı haritası. Fermantasyonun -2. Günü 1 olarak, 14. gün ise 17 olarak gösterilmiştir. Fermantasyon örneklerinin karşılığı ise SC0: 1, SC0MP1: 2, SC0MP2: 3, SC1: 4, SC1MP1: 5, SC1MP2: 6, SC2: 7, SC2MP1: 8, SC2MP2: 9, SC3: 10, SC3MP1: 11, SC3MP2: 12 şeklindedir.

Çizelge 4.35'e göre genel olarak *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonlarının şeker tüketimi *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının şeker tüketiminden daha hızlı olmuştur. Çizelge 4.35'te çizgi grafiğindeki eğrilerin doğru denklemlerinin eğimleri incelendiğinde *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonlarının eğimleri (-1.65) ve (-1.68) arasında değişirken *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının eğimleri (-1.42) ve (-1.58) arasındadır (EK 3). Sıralı karışık kültürlerde *Saccharomyces cerevisiae* inokülasyonunun gerçekleştirildiği fermantasyonun 0. gününden sonra, şeker tüketimi hızlanmıştır. Fermantasyonun sonuna doğru bütün fermantasyon örneklerinin yüzde briks miktarı %5'te sabitlenmiştir.

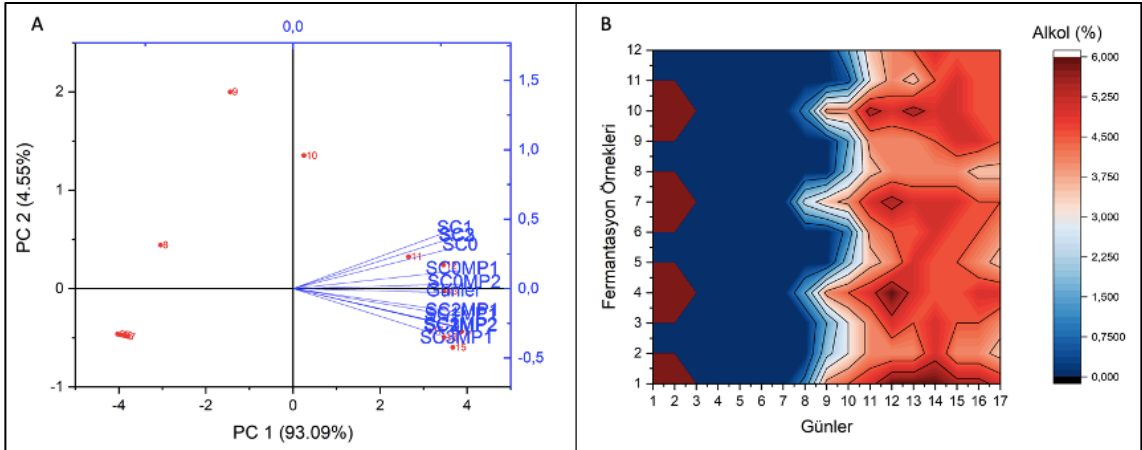
Çizelge 4.35'teki sonuçlara göre en hızlı şeker tüketimi SC2 *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonunda gerçekleşirken, en yavaş şeker tüketimi SC3MP2 *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonunda gerçekleşmiştir.

Alkol üretimi

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının alkol miktarları, fermantasyon boyunca 0-40 ölçekli AEK-Tech alkolmetresi kullanılarak 24 ° C'de her gün aynı saatte ölçülmüştür.

Çizelge 4.36'da *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonları sırasındaki alkol üretimini incelemek amacıyla fermantasyon boyunca günlük ölçülen alkol miktarındaki (%) değişim verilmiştir.

Çizelge 4.36. Fermantasyon sırasındaki alkol üretimi*



*A: *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür örneklerinin fermantasyonları sırasında gerçekleşen alkol üretiminin temel bileşen analizi (PCA).

B: *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür örneklerinin fermantasyonları sırasında üretilen alkol miktarının ısı haritası. Fermantasyonun -2. Günü 1 olarak, 14. gün ise 17 olarak gösterilmiştir. Fermantasyon örneklerinin karşılığı ise SC0: 1, SC0MP1: 2, SC0MP2: 3, SC1: 4, SC1MP1: 5, SC1MP2: 6, SC2: 7, SC2MP1: 8, SC2MP2: 9, SC3: 10, SC3MP1: 11, SC3MP2: 12 şeklindedir.

Çizelge 4.36'a göre genel olarak *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonlarının alkol üretimi *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının alkol üretiminden daha hızlı ve daha fazla olmuştur. *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür örnekleri fermantasyonun 5. günü alkol üretirken *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonları SC0MP1, SC0MP2 örnekleri hariç (fermantasyonun 6. günü alkol üretmişlerdir) fermantasyonun 7. günü alkol üretmişlerdir.

Fermantasyon takibi sonucunda *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının alkol seviyesinin *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonlarından daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon takibi sırasında ölçülen en yüksek alkol seviyesi (%6) SC0 ve SC1 *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonlarına aittir.

SC2 ve SC3 *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonlarının alkol seviyesi ise en fazla %5.5 olarak ölçülmüştür. *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonları incelendiğinde ise, SC2 ve SC3 suşlarının karışık kültür fermantasyonlarının (SC2MP1, SC2MP2, SC3MP1, SC3MP2) ürettikleri alkol seviyesinin (~%4), SC0 ve SC1 suşlarının karışık kültür fermantasyonlarının (SC0MP1, SC0MP2, SC1MP1, SC1MP2) ürettikleri alkol seviyesinden (~%5) düşük olduğu tespit edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonlarının alkol seviyesi 14 günlük ortalama %3.03, *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonları 14 günlük ortalama alkol seviyesi %2.13 olduğundan dolayı sıralı karışık kültür kullanımı ile alkol oranında %29.70 düşüş tespit edilmiştir.

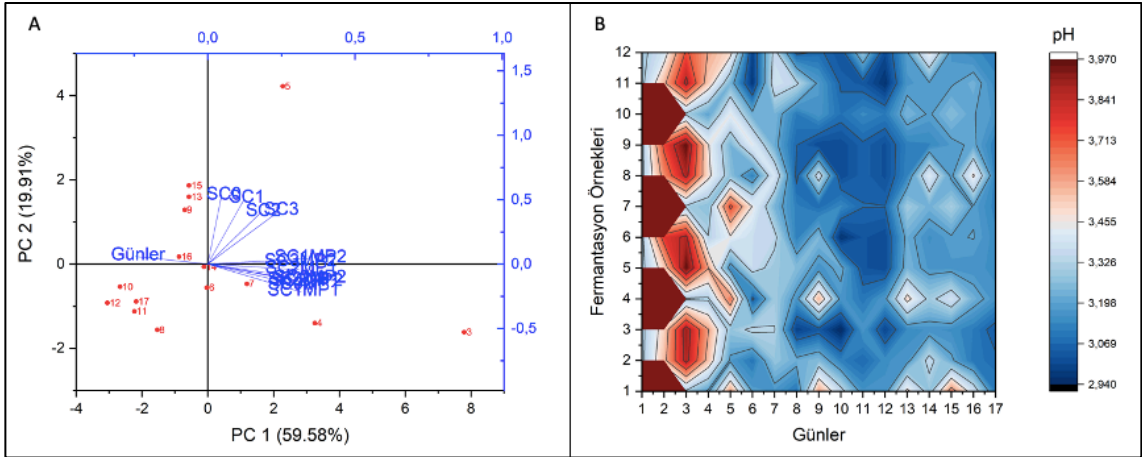
Metschnikowia pulcherrima + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarında ise genelde MP1 suşunun bulunduğu karışık kültürlerdeki alkol üretimi MP2 suşunun bulunduğu karışık kültürlerdeki alkol üretiminden az olmuştur.

pH ölçümü

Saccharomyces cerevisiae saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonları sırasında her gün aynı saatte pH ve sıcaklık ölçümü yapılmıştır. Fermantasyon örneklerinin pH ölçümü Adwa Ad12 pH metresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.37'de *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonları sırasındaki günlük pH değişimi verilmiştir.

Çizelge 4.37. Fermantasyon sırasındaki pH değişimi*



*A: *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür örneklerinin fermantasyonları sırasında gerçekleşen pH değişiminin temel bileşen analizi (PCA).

B: *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür örneklerinin fermantasyonları sırasında değişen pH ısı haritası. Fermantasyonun -2. Günü 1 olarak, 14. gün ise 17 olarak gösterilmiştir. Fermantasyon örneklerinin karşılığı ise SC0: 1, SC0MP1: 2, SC0MP2: 3, SC1: 4, SC1MP1: 5, SC1MP2: 6, SC2: 7, SC2MP1: 8, SC2MP2: 9, SC3: 10, SC3MP1: 11, SC3MP2: 12 şeklindedir.

Çizelge 4.37'e göre *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının inokülasyonunun gerçekleştirildiği fermantasyonun 0. günü, 2 gün boyunca fermente edilmiş olan *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının bulunduğu fermantasyon örneklerinin (SC0MP1, SC0MP2, SC1MP1, SC1MP2, SC2MP1, SC2MP2, SC3MP1, SC3MP2) pH seviyesi ortalama olarak 3.88'e yükselmiştir. Fermantasyonun ilerleyen günlerinde *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültürlerinin pH değerleri arasında bariz bir farklılık gözlenmemiştir.

5. YORUM

Fermantasyon sanayisinde karşılaşılan güncel sorunlardan biri küresel ısınma ve çevresel koşulların değişmesinden dolayı nihai üründeki yüksek alkol seviyesidir. Ayrıca fermantasyon sanayisi, başlangıç (starter) kültür kombinasyonu, suş değişimi gibi minimum değişikliklerle nihai üründe ulusal ve uluslararası pazarda fark yaratma arayışındadır.

Bu çalışma, sıralı karışık kültür fermantasyonunda *Metschnikowia pulcherrima*'nın kullanılmasına ilişkin yeni bilgiler sunmaktadır. Ayrıca çalışma, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının sıralı fermantasyonu ile aromatik bileşik sentez gen ifadesi yüksek, düşük alkollü ürün elde edilebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının sıralı fermantasyonunda meydana gelen etkileşimlerin transkriptomik seviyede incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma iki kısımdan oluşacak şekilde planlanmıştır. Birinci kısım, ısı stresinin Ehrlich yolağında yer alan aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin ekspresyon profili üzerindeki etkilerini anlamayı hedeflemiştir. Bu hedef doğrultusunda, açık kaynaklı mikrodizi verisi kullanılarak ısı stresine karşı yerel maya suşundaki aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin (Ehrlich yolak genleri) ekspresyon profili ilk kez bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise sıralı karışık başlangıç kültürü (*Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae*) kullanılan alkol fermantasyonu sırasında aromatik bileşik sentezinde yer alan seçilen *ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5* genlerinin transkripsiyonel yanıtının izlenmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda fermantasyon aşamasında kullanılmak üzere *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşları *ARO8*, *ARO9*, *ADH2*, *ADH5* gen ifade düzeyleri ve teknolojik özelliklerine göre seçilmiştir. Seçilen suşlarla gerçekleştirilen *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia*

pulcherrima + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonları sırasında alınan örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR ile gen ifade analizi yapılarak fermantasyon süreci transkriptomik olarak incelenmiştir.

Çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir;

1. Mikrodizi verisi kullanılarak, *Sacchromyces cerevisiae* genomunun ısı şoku ve sıcaklık değişim stresleri altında genel gen ekspresyon profilinin belirlenmesine ek olarak, önemli farklılık gösteren prob setlerine karşılık gelen gen listeleri üzerinden ısı stresine karşı orijinal/yerel maya suşundaki aromatik bileşik sentezi ile ilgili genlerin (Ehrlich yolak genleri) ekspresyon profili ilk defa incelenmiştir. Isı şoku ve sıcaklık değişim stresleri altında *Sacchromyces cerevisiae* suşundaki Ehrlich yolak genlerinden *ADH2* ve *ADH5* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimin diğer genlerden fazla olduğu tespit edilmiştir.

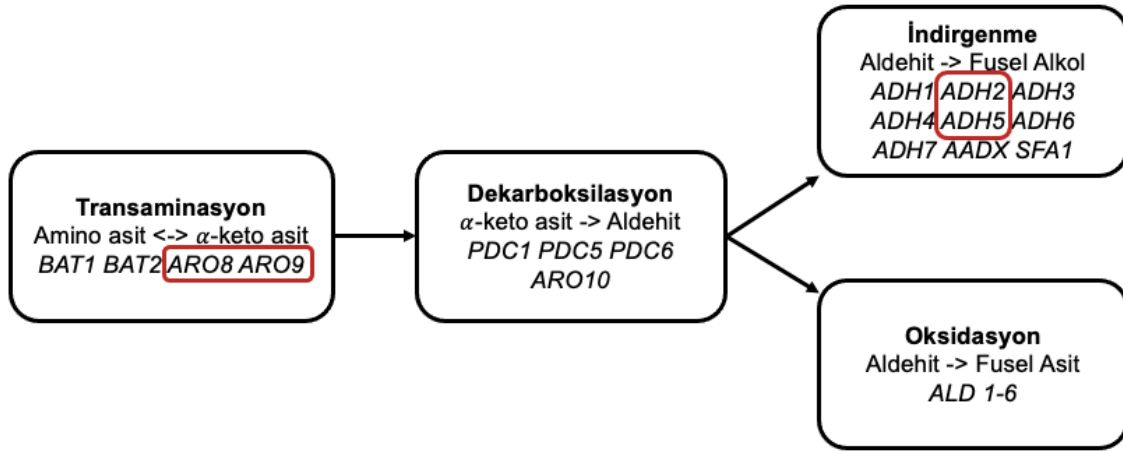
2. Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Araştırma Laboratuvarı Kültür Bankası'nda bulunan suşların canlandırılması ve tanımlamanın doğrulanması aşamasından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde suşların spesifik özellikleri ile örtüştüğü saptanmıştır.

3. Çalışmada gerçekleştirilen tüm RNA izolasyonu ve cDNA sentezlerinde RT-qPCR ile gen ifade analizi için yeterli miktar ve kalitede nükleik asit elde edilmiştir.

4. Fermantasyon aşaması için suş seçiminde, RT-qPCR ile gen ifade analizi sonucunda genellikle *Sacchromyces cerevisiae* suşların gen ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilirken bir suş dışında *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının gen ifade düzeyleri benzerdir.

5. Fermantasyon aşaması için suş seçiminde, teknolojik özelliklerin belirlenmesi analizinde *Sacchromyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının kendi türleri arasındaki ve iki tür arasındaki farklılıklar belirlenmiştir. Bu çalışma

kapsamında, *Sacchomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının çoğunluğunun yüksek sıcaklıkta (37 °C ve 42 °C), düşük pH (3.3) seviyesinde gelişebildiği tespit edilmiştir. Fermantasyon sırasında şeker tüketimi ve alkol üretimi, açısından *Sacchomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının arasında farklılık bulunmaktadır. Fermantasyon sırasındaki pH seviyeleri ölçüldüğünde suşların kendi aralarında benzer pH seviyelerine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Köpük oluşturma analizi sonrasında elde edilen verilere göre *Sacchomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının arasında ayırt edici bir farklılık tespit edilmemiştir.



Şekil 5.1. Maya metabolizmasındaki Ehrlich yolağının transkripsiyonel düzeyde izlenmesi

6. Bu çalışmada, *M. pulcherrima* ve *S. cerevisiae* maya-maya etkileşimine transkripsiyonel düzeyde bir yanıt vermek için aromatik bileşik sentezinde rol alan Ehrlich yolak genleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında seçilen genlerden *ARO8* ve *ARO9* genleri Ehrlich yolağının transaminasyon, *ADH2* ve *ADH5* ise indirgenme aşamasında yer aldığı için Ehrlich yolağının iki farklı aşaması da izlenebilmiştir (Şekil 5.1). Çalışma kapsamında gerçekleştirilen, fermantasyon örneklerinin RT-qPCR ile gen ifade analizi sonucunda, *S. cerevisiae* saf kültür fermantasyonu ile karşılaştırılan *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının aromatik bileşik sentezinde rol alan Ehrlich yolak genlerinin gen ekspresyon seviyelerinin değiştiği tespit

edilmiştir. Ayrıca farklı *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür kombinasyonlarının kullanılması gen ifade düzeylerinde farklılıklara neden olmuştur. *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarında meydana gelen maya-maya etkileşiminin bir diğer sonucu ise düşük alkol seviyeli ürün eldesidir. RT-qPCR ile gen ifade analizleri ve fermantasyon takibi sonucunda, *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık ve *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonları karşılaştırıldığında sıralı karışık kültür fermantasyonlarında alkol üretiminin daha düşük olduğu gösterilmiştir.

Tez çalışmasının sonucunda, fermantasyon ortamında *Metschnikowia pulcherrima* bulunduğu *Saccharomyces cerevisiae*'nin aromatik bileşik sentez genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış meydana getiren ve düşük alkollü ürün üretimini sağlayan orijinal/yerel *Saccharomyces cerevisiae* (HUF16M2K10004) ve *Metschnikowia pulcherrima* (HUF17M3H21175) suşlarının kombinasyonu (SC1MP2) fermantasyon sanayisinde kullanılmak üzere, başlangıç (starter) kültür kombinasyonu olarak önerilmiştir.

İleri çalışmalarda *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür genotiplerinde metabolomik çalışmaların yapılması ve GC-MS ile aroma maddelerinin profilleri analizi sonrası elde edilecek sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] S. Alp, Hititlerde sarki, müzik ve dans: Hitit çağında Anadolu'da üzüm ve sarap, 67, **1999**.
- [2] C. Corti In Wine and Vineyards in the Hittite Kingdom: a Case Study of Northern Anatolia and the Southern Black Sea Coast, Of Vines and Wines: the Production and Consumption of Wine in Anatolian Civilizations through the Ages. Proceedings of the International Symposium Held at Koç University, RCAC, ANESS, **2017**, pp 41-60.
- [3] İ. Koç, Hititler. Book İ. Koç, (eds: Vol.Number, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş. Yayınları, Place, Chapter Number, **2006**.
- [4] H. Feldmann, Yeast: molecular and cell biology. Book H. Feldmanns, (eds: Vol.Number, John Wiley & Sons, Place, Chapter Number, **2011**.
- [5] L. Alba-Lois, C. Segal-Kischinevzky, Yeast fermentation and the making of beer and wine, 3, **2010**, 17.
- [6] U. E. Donalies, H. T. Nguyen, U. Stahl, E. Nevoigt, Improvement of Saccharomyces yeast strains used in brewing, wine making and baking, **2008**, 67-98.
- [7] K. Manchester, Louis Pasteur, fermentation, and a rival: history of science, 103, **2007**, 377-380.
- [8] W. Szybalski, My road to Øjvind Winge, the father of yeast genetics, 158, **2001**, 1-6.
- [9] C. Lindegren, The yeast cell, its genetics and cytology, **1949**.
- [10] S. R. Engel, F. S. Dietrich, D. G. Fisk, G. Binkley, R. Balakrishnan, M. C. Costanzo, S. S. Dwight, B. C. Hitz, K. Karra, R. S. Nash, The reference genome sequence of Saccharomyces cerevisiae: then and now, 4, **2014**, 389-398.
- [11] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, Life with 6000 genes, 274, **1996**, 546-567.
- [12] Anonim, The Universal Protein Resource (UniProt), <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000002311> (Erişim tarihi: **3 Nisan 2022**).
- [13] G. M. Walker, N. A. White, Introduction to fungal physiology, **2017**, 1-35.
- [14] K. Kavanagh, Fungi: biology and applications. Book K. Kavanaghs, (eds: Vol.Number, John Wiley & Sons, Place, Chapter Number, **2017**.
- [15] F. Sherman, Getting started with yeast. *Methods in enzymology*, (eds: Elsevier, Place, Published, 3-41, **2002**.
- [16] G. M. Walker, Yeast physiology and biotechnology. Book G. M. Walkers, (eds: Vol.Number, John Wiley & Sons, Place, Chapter Number, **1998**.

- [17] M. K. Balasubramanian, E. Bi, M. Glotzer, Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells, 14, **2004**, R806-R818.
- [18] C. Charoenchai, G. H. Fleet, P. A. Henschke, Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts, 49, **1998**, 283-288.
- [19] M. J. Torija, N. Rozes, M. Poblet, J. M. Guillamón, A. Mas, Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*, 80, **2003**, 47-53.
- [20] R. P. Jones, P. F. Greenfield, Role of water activity in ethanol fermentations, 28, **1986**, 29-40.
- [21] A. Brown, Microbial water stress physiology. Book A. Browns, (eds: Vol.Number, Wiley, Place, Chapter Number, **1990**).
- [22] J. Israelachvili, H. Wennerström, Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions, 379, **1996**, 219-225.
- [23] N. V. Narendranath, R. Power, Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production, 71, **2005**, 2239-2243.
- [24] A. Hranilovic, J. M. Gambetta, D. W. Jeffery, P. R. Grbin, V. Jiranek, Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing, 329, **2020**, 108651.
- [25] Anonim, UCDAVIS Viticulture & Enology-*Metschnikowia pulcherrima*, <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/metschnikowia-pulcherrima> (Erişim tarihi: **20 Şubat 2022**).
- [26] R. Tofalo, G. Suzzi, Yeasts, **2016**.
- [27] A. Morata, I. Loira, C. Escott, J. M. del Fresno, M. A. Bañuelos, J. A. Suárez-Lepe, Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology, 5, **2019**, 63.
- [28] M. Fernández, J. Ubeda, A. Briones, Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making, 59, **2000**, 29-36.
- [29] P. González-Pombo, G. Pérez, F. Carrau, J. M. Guisán, F. Batista-Viera, B. M. Brena, One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*, 30, **2008**, 1469-1475.
- [30] E. González-Royo, O. Pascual, N. Kontoudakis, M. Esteruelas, B. Esteve-Zaroso, A. Mas, J. M. Canals, F. Zamora, Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production, 240, **2015**, 999-1012.
- [31] L. Oro, M. Ciani, F. Comitini, Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts, 116, **2014**, 1209-1217.

- [32] L. Cocolin, D. A. Mills, Wine yeast inhibition by sulfur dioxide: a comparison of culture-dependent and independent methods, 54, **2003**, 125-130.
- [33] Anonim, UCDAVIS Viticulture & Enology-Saccharomyces cerevisiae, <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/saccharomyces-cerevisiae> (Erişim tarihi: **20 Şubat 2022**).
- [34] A. Kántor, J. Hutková, J. Petrová, L. Hleba, M. Kačániová, Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by Metschnikowia pulcherrima against various yeast species, 2021, **2021**, 282-285.
- [35] W. Janisiewicz, T. Tworowski, C. Kurtzman, Biocontrol potential of Metschnikowia pulcherrima strains against blue mold of apple, 91, **2001**, 1098-1108.
- [36] S. Türkel, B. Ener, Isolation and characterization of new Metschnikowia pulcherrima strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin, 64, **2009**, 405-410.
- [37] S. Maicas, The role of yeasts in fermentation processes. In Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 2020; Vol. 8, p 1142.
- [38] L. A. Hazelwood, J.-M. Daran, A. J. Van Maris, J. T. Pronk, J. R. Dickinson, The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on Saccharomyces cerevisiae metabolism, 74, **2008**, 2259-2266.
- [39] A. G. Cordente, S. Schmidt, G. Beltran, M. J. Torija, C. D. Curtin, Harnessing yeast metabolism of aromatic amino acids for fermented beverage bioflavouring and bioproduction, 103, **2019**, 4325-4336.
- [40] A. Vilela, Modulating wine pleasantness throughout wine-yeast co-inoculation or sequential inoculation, 6, **2020**, 22.
- [41] G. H. Fleet, Wine microbiology and biotechnology. Book G. H. Fleets, (eds: Vol. Number, CRC Press, Place, Chapter Number, **1993**).
- [42] I. Iraqui, S. Vissers, M. Cartiaux, A. Urrestarazu, Characterisation of Saccharomyces cerevisiae ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily, 257, **1998**, 238-48.
- [43] E. G. ter Schure, M. T. Flikweert, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, C. T. Verrips, Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by Saccharomyces cerevisiae, 64, **1998**, 1303-7.
- [44] Z. Vuralhan, M. A. Morais, S.-L. Tai, M. D. Piper, J. T. Pronk, Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in Saccharomyces cerevisiae, 69, **2003**, 4534-4541.
- [45] J. R. Dickinson, L. E. J. Salgado, M. J. Hewlins, The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in Saccharomyces cerevisiae, 278, **2003**, 8028-8034.
- [46] F. Giorello, M. J. Valera, V. Martin, A. Parada, V. Salzman, L. Camesasca, L. Fariña, E. Boido, K. Medina, E. Dellacassa, Genomic and transcriptomic

basis of *Hanseniaspora vineae*'s impact on flavor diversity and wine quality, 85, **2019**, e01959-18.

- [47] E. J. Pires, J. A. Teixeira, T. Brányik, A. A. Vicente, Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast, 98, **2014**, 1937-1949.
- [48] J. Bennetzen, B. Hall, The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase, 257, **1982**, 3018-3025.
- [49] V. Sadineni, N. Kondapalli, V. S. R. Obulam, Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine, 62, **2012**, 1353-1360.
- [50] A. Mas, J. M. Guillamon, M. J. Torija, G. Beltran, A. B. Cerezo, A. M. Troncoso, M. C. Garcia-Parrilla, Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation, 2014, **2014**.
- [51] Anonim, The *Saccharomyces* Genome Database (SGD)-*Saccharomyces cerevisiae* Pathway: tryptophan degradation, <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY3O-214> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [52] Anonim, The *Saccharomyces* Genome Database (SGD)-*Saccharomyces cerevisiae* Pathway: L-tyrosine degradation III, <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY3O-4108> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [53] Anonim, The *Saccharomyces* Genome Database (SGD)-*Saccharomyces cerevisiae* Pathway: phenylalanine degradation, <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY3O-4115> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [54] Anonim, The *Saccharomyces* Genome Database (SGD)-*Saccharomyces cerevisiae* Pathway: tyrosine biosynthesis, <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY3O-4120> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [55] Anonim, The *Saccharomyces* Genome Database (SGD)-*Saccharomyces cerevisiae* Pathway: phenylalanine biosynthesis, <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY3O-4153> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [56] Anonim, The *Saccharomyces* Genome Database (SGD)-*Saccharomyces cerevisiae* Pathway: methionine salvage pathway, <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY3O-64> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).

- [57] Anonim, The Saccharomyces Genome Database (SGD)-Saccharomyces cerevisiae Pathway: ethanol degradation, <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/new-image?type=PATHWAY&object=PWY3O-4300&detail-level=2> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [58] Anonim, The Saccharomyces Genome Database (SGD)-Saccharomyces cerevisiae Pathway: superpathway of glucose fermentation, <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/new-image?type=PATHWAY&object=GLUCFERMEN-PWY&detail-level=2> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [59] Anonim, The Universal Protein Resource (UniProt)-UniProtKB - P53090 (ARO8_YEAST), <https://www.uniprot.org/uniprot/P53090> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [60] Anonim, The Universal Protein Resource (UniProt)-UniProtKB - P38840 (ARO9_YEAST), <https://www.uniprot.org/uniprot/P38840> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [61] Anonim, The Universal Protein Resource (UniProt)-UniProtKB - P00331 (ADH2_YEAST), <https://www.uniprot.org/uniprot/P00331> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [62] Anonim, The Universal Protein Resource (UniProt)-UniProtKB - P38113 (ADH5_YEAST), <https://www.uniprot.org/uniprot/P38113> (Erişim tarihi: **5 Nisan 2022**).
- [63] H. R. Schultz, G. V. Jones, Climate induced historic and future changes in viticulture, 21, **2010**, 137-145.
- [64] J. M. Alston, K. B. Fuller, J. T. Lapsley, G. Soleas, K. P. Tumber, The high and rising alcohol content of wine. *Wine Economics*, (eds: Springer, Place, Published, 350-364, **2013**).
- [65] L. Canonico, M. Solomon, F. Comitini, M. Ciani, C. Varela, Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-Saccharomyces yeasts under different aeration conditions, 84, **2019**, 103247.
- [66] P. Malacrino, E. Tosi, G. Caramia, R. Prisco, G. Zapparoli, The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of Saccharomyces cerevisiae strains under high sugar stress, 40, **2005**, 466-472.
- [67] K. M. Sumby, P. R. Grbin, V. Jiranek, Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine, 98, **2014**, 8111-8132.
- [68] E. S. King, R. L. Dunn, H. Heymann, The influence of alcohol on the sensory perception of red wines, 28, **2013**, 235-243.
- [69] E. S. King, H. Heymann, The effect of reduced alcohol on the sensory profiles and consumer preferences of white wine, 29, **2014**, 33-42.
- [70] C. Yılmaz, V. Gökmen, Formation of amino acid derivatives in white and red wines during fermentation: Effects of non-Saccharomyces yeasts and Oenococcus oeni, 343, **2021**, 128415.

- [71] M. Grønbaek, The positive and negative health effects of alcohol-and the public health implications, 265, **2009**, 407-420.
- [72] M. Gil, S. Estévez, N. Kontoudakis, F. Fort, J. Canals, F. Zamora, Influence of partial dealcoholization by reverse osmosis on red wine composition and sensory characteristics, 237, **2013**, 481-488.
- [73] Anonim, Gelir İdaresi Başkanlığı-4760 sayılı Özel Tüketim Vergisi Kanununun (12/3) maddesi uyarınca güncellenen liste, https://www.gib.gov.tr/fileadmin/mevzuatek/otv_oranlari_tum/040120_21_III_sayili_liste.pdf (Erişim tarihi: **17 Mart 2021**).
- [74] M. Ciani, P. Morales, F. Comitini, J. Tronchoni, L. Canonico, J. A. Curiel, L. Oro, A. J. Rodrigues, R. Gonzalez, Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines, 7, **2016**, 642.
- [75] N. García-Martín, S. Perez-Magariño, M. Ortega-Heras, C. González-Huerta, M. Mihnea, M. L. González-Sanjosé, L. Palacio, P. Prádanos, A. Hernández, Sugar reduction in musts with nanofiltration membranes to obtain low alcohol-content wines, 76, **2010**, 158-170.
- [76] R. Gonzalez, M. Quirós, P. Morales, Yeast respiration of sugars by non-Saccharomyces yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines, 29, **2013**, 55-61.
- [77] R. Longo, J. W. Blackman, P. J. Torley, S. Y. Rogiers, L. M. Schmidtke, Changes in volatile composition and sensory attributes of wines during alcohol content reduction, 97, **2017**, 8-16.
- [78] S. Poni, The impact of leaf removal and the management of crop load on fruit quality-a European insight, 29, **2014**.
- [79] L. M. Schmidtke, J. W. Blackman, S. O. Agboola, Production technologies for reduced alcoholic wines, 77, **2012**, R25-R41.
- [80] C. Varela, P. Dry, D. Kutyna, I. Francis, P. Henschke, C. Curtin, P. Chambers, Strategies for reducing alcohol concentration in wine, 21, **2015**, 670-679.
- [81] D. R. Kutyna, C. Varela, P. A. Henschke, P. J. Chambers, G. A. Stanley, Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine, 21, **2010**, 293-302.
- [82] M. Ciani, F. Comitini, Yeast interactions in multi-starter wine fermentation, 1, **2015**, 1-6.
- [83] N. Sun, Z. Gao, S. Li, X. Chen, J. Guo, Assessment of chemical constitution and aroma properties of kiwi wines obtained from pure and mixed fermentation with *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae*, 102, **2022**, 175-184.
- [84] G. H. Fleet, Yeast interactions and wine flavour, 86, **2003**, 11-22.
- [85] L. F. Bisson, Stuck and sluggish fermentations, 50, **1999**, 107-119.
- [86] G. H. Fleet, Wine yeasts for the future, 8, **2008**, 979-995.

- [87] B. Padilla, J. V. Gil, P. Manzanares, Past and future of non-Saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity, 7, **2016**, 411.
- [88] I. S. Pretorius, Tasting the terroir of wine yeast innovation, 20, **2020**, foz084.
- [89] P. Romano, C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso, A. Capece, Function of yeast species and strains in wine flavour, 86, **2003**, 169-180.
- [90] Y. Xu, G. Zhao, L. Wang, Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species, 33, **2006**, 192-196.
- [91] P.-R. Lee, Y.-L. Ong, B. Yu, P. Curran, S.-Q. Liu, Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*, 27, **2010**, 853-861.
- [92] I. Iraqui, S. Vissers, B. André, A. Urrestarazu, Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*, 19, **1999**, 3360-3371.
- [93] M. García, B. Esteve-Zarzoso, J. Crespo, J. M. Cabellos, T. Arroyo, Yeast monitoring of wine mixed or sequential fermentations made by native strains from DO "Vinos de Madrid" using real-time quantitative PCR, 8, **2017**, 2520.
- [94] M. E. Rodríguez, C. A. Lopes, R. J. Barbagelata, N. B. Barda, A. C. Caballero, Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma, 138, **2010**, 19-25.
- [95] B. Kara, W. Simpson, J. Hammond, Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test, 94, **1988**, 153-158.
- [96] A. Zuzuarregui, M. del Olmo, Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection, 85, **2004**, 271-280.
- [97] M. Yoshida, S. Kato, S. Fukuda, S. Izawa, Acquired Resistance to Severe Ethanol Stress in *Saccharomyces cerevisiae* Protein Quality Control, 87, **2021**, e02353-20.
- [98] H. Takagi, Molecular mechanisms and highly functional development for stress tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 85, **2021**, 1017-1037.
- [99] G. Bettlej, E. Bator, B. Oklejewicz, L. Potocki, A. Górka, M. Slowik-Borowiec, W. Czarny, W. Domka, A. Kwiatkowska, Long-term adaption to high osmotic stress as a tool for improving enological characteristics in industrial wine yeast, 11, **2020**, 576.
- [100] L. V. Schwarz, A. R. Marcon, A. P. L. Delamare, F. Agostini, S. Moura, S. Echeverrigaray, Selection of low nitrogen demand yeast strains and their impact on the physicochemical and volatile composition of mead, 57, **2020**, 2840-2851.

- [101] C. Nadai, L. Treu, S. Campanaro, A. Giacomini, V. Corich, Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts, 100, **2016**, 797-813.
- [102] C. Ivorra, J. E. Pérez-Ortín, M. I. del Olmo, An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study, 64, **1999**, 698-708.
- [103] G. R. Anapi, R. P. M. Aba, A. A. Gabriel, Screening for heat-resistant reference yeast isolate in orange juice, 94, **2021**, 103639.
- [104] W. Magliani, S. Conti, M. Gerloni, D. Bertolotti, L. Polonelli, Yeast killer systems, 10, **1997**, 369-400.
- [105] R. Gonzalez, P. Morales, Wine secondary aroma: Understanding yeast production of higher alcohols, 10, **2017**, 1449.
- [106] M. Mina, D. Tsaltas, Contribution of yeast in wine aroma and flavour, **2017**, 117-134.
- [107] V. D. Marks, S. J. Ho Sui, D. Erasmus, G. K. Van Der Merwe, J. Brumm, W. W. Wasserman, J. Bryan, H. J. Van Vuuren, Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response, 8, **2008**, 35-52.
- [108] R. Gonzalez, R. Munoz, A. V. Carrascosa, Production of wine starter cultures, **2011**, 279-302.
- [109] D. Varol, V. Purutçuoğlu, R. Yılmaz, Transcriptomic analysis of the heat stress response for a commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 40, **2018**, 137-150.
- [110] Anonim, *Saccharomyces* Genome Database (SGD)-Transcriptome Data in YeastMine <https://www.yeastgenome.org/blog/transcriptome-data-in-yeastmine> (Erişim tarihi: **2 Ocak 2022**).
- [111] N. Hierro, B. Esteve-Zarzoso, Á. González, A. Mas, J. M. Guillamón, Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine, 72, **2006**, 7148-7155.
- [112] V. E. Velculescu, L. Zhang, W. Zhou, J. Vogelstein, M. A. Basrai, D. E. Bassett Jr, P. Hieter, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, Characterization of the yeast transcriptome, 88, **1997**, 243-251.
- [113] H. Mewes, K. Albermann, M. Bähr, D. Frishman, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maierl, S. Oliver, Overview of the yeast genome, 387, **1997**, 7-8.
- [114] A. J. Brown, R. J. Planta, F. Restuhadi, D. A. Bailey, P. R. Butler, J. L. Cadahia, M. E. Cerdan, M. De Jonge, D. C. Gardner, M. E. Gent, Transcript analysis of 1003 novel yeast genes using high-throughput northern hybridizations, 20, **2001**, 3177-3186.
- [115] A. Lesk, Introduction to bioinformatics. Book A. Lesks, (eds: Vol.Number, Oxford university press, Place, Chapter Number, **2019**).
- [116] M. T. Öz, R. Yılmaz, F. Eyidoğan, L. De Graaff, M. Yücel, H. A. Öktem, Microarray analysis of late response to boron toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves, 33, **2009**, 191-202.

- [117] C. Varela, S. A. Schmidt, A. R. Borneman, C. N. I. Pang, J. O. Krömerx, A. Khan, X. Song, M. P. Hodson, M. Solomon, C. M. Mayr, Systems-based approaches enable identification of gene targets which improve the flavour profile of low-ethanol wine yeast strains, 49, **2018**, 178-191.
- [118] R. Yilmaz, M. Yucel, H. Oktem, Quality assessment of gene expression data for an affymetrix platform with the two sample t-tests statistical analysis, 4, **2008**, 101-109.
- [119] G. Liti, The Natural History of Model Organisms: The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*, 4, **2015**, e05835.
- [120] M. Kurban, *Saccharomyces cerevisiae* DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Veri Tabanının Oluşturulması. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2019**.
- [121] Y.-P. Wang, Z.-g. Sun, X.-Q. Wei, X.-W. Guo, D.-G. Xiao, Identification of Core Regulatory Genes and Metabolic Pathways for the n-Propanol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, 69, **2021**, 1637-1646.
- [122] F. Özçelik, Y. Denli, Şarap mayalarının teknolojik özellikleri, 24, **1999**.
- [123] E. Nikolaou, E. H. Soufleros, E. Bouloumpasi, N. Tzanetakis, Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results, 23, **2006**, 205-211.
- [124] S. Bağder, *Türkiye’de Değişik Şarap Bölgelerinden İzole Edilmiş Şarap Mayalarının Teknolojik Özellikleri*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [125] C. Nurgel, H. Erten, A. Canbaş, T. Cabaroğlu, S. Selli, Emir ve Kalecik Karası üzümlerinden fermantasyon sırasında izole edilen bazı mayaların teknolojik özellikleri, 9, **2003**, 83-89.
- [126] Anonim, illumina-Absolute Quantification of Gene Expression using SYBR Green in the Eco™ Real-Time PCR System, https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_eco_absolute_quantification_using_sybrgreen.pdf (Erişim tarihi: **22 Nisan 2022**).
- [127] Anonim, Thermo Scientific-260/280 and 260/230 Ratios https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf (Erişim tarihi: **22 Nisan 2022**).
- [128] Anonim, Agilent-QPCR Standard Curve Slope to Efficiency Calculator, <https://www.agilent.com/store/biocalculators/calcSlopeEfficiency.jsp?requestid=512443> (Erişim tarihi: **4 Mart 2022**).

EKLER

EK 1 - Açık kaynaklı mikrodizi verileri

Açık kaynaklı mikrodizi verilerinin analizi sonucunda elde edilen ısı şok uygulaması öncesinde gen ifade düzeylerinde iki kat ve üzeri değişim gösteren tüm genler

C6h-HS1h				
Probe Set ID	Putative Annotaion	Gene Symbol	Fold Change	Regulation
molecular_function	binding 454			
1770632_at	H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV3	2,8662124	up
1779425_at	Cytochrome c heme lyase (holocytochrome c synthase	CYC3	3,4979033	up
1776134_at	transcriptional coactivator SKIP, can activate transcription of	PRP45	2,0869455	up
1779165_s_at	Gag-Pol protein		4,6707025	up
1775180_s_at	TyA Gag protein; the main structural constituent of virus-like particles		10,7304	up
1780029_at	Protein kinase of the Mitotic Exit Network that is localized to t	CDC15	2,1083727	up
1778223_at	Outer carnitine acetyltransferase, mitochondrial	YAT1	3,7117503	up
1779158_at	heat-inducible cytosolic member of the 70 kDa heat shock pro	SSA3	5,775982	up
1776193_at	Amino acid transport protein for valine, leucine, isoleucine, ar	TAT1	2,8523953	up
1779157_at	Zn-finger protein	TBS1	3,3150287	up
1775252_at	Mitochondrial integral membrane protein involved in mitoch	FZO1	4,211949	up
1778280_at	negative growth regulatory protein	NGR1	5,801924	up
1772959_at	Bifunctional dehydrogenase and ferredoxin, involved in th	MET8	3,3213212	up
1777758_at	metal homeostasis protein; putative membrane protein	BSD2	2,0431514	up
1775610_s_at	Silenced copy of A2, encoding a protein of with similarity to Al	HMLALPHA2	2,7293897	up
1778479_at	catabolism of hydroxy amino acids	CHA1	6,8594213	up
1779004_at	17 kDa phosphatidylglycerolphosphate synthase	PGS1	2,1472595	up
1779623_at	Lipase, required for intravacuolar lysis of autophagic bodies	ATG15	4,4479785	up
1776196_at	component of the yeast ADA acetyltransferase	AHC2	2,074676	up
1770900_at	Putative serine/threonine protein kinase most similar to cycli	KIN82	2,559848	up
1769986_at	Substrate of the Hub1p ubiquitin-like protein that localizes to	HBT1	9,652356	up
1774699_at	Protein kinase with a possible role in MAP kinase signaling in th	PRR2	3,2933502	up
1773758_at	glucose sensor	SNF3	3,263893	up
1779716_at	Non-ATPase, homolog of mammalian proteasomal subunit S9	RPN6	2,1202147	up
1769959_at	NADH dehydrogenase activity	NDE2	6,561315	up
1772258_at	bromodomain protein, homolog of BDF1	BDF2	4,286045	up
1775757_at	Protein involved in the repair of double-strand breaks in DNA c	RAD59	2,1998067	up
1780095_at	Ring finger protein involved in the DNA damage response with	SLX5	2,6535017	up
1778677_at	ranscriptional regulator involved in activation of the GAL gene	GAL3	2,1498482	up
1776596_at	T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV1	4,6421795	up
1770080_at	Chaperone that specifically facilitates the assembly of cytochr	PET100	3,405711	up
1774126_at	dihydropyridyl transsuccinylase component of alpha-ketoglutar	KGD2	2,7621505	up
1773413_at	Protein required for nuclear migration, localizes to the mother	NUM1	3,4276958	up
1772220_at	Yeast succinate dehydrogenase (SDH) is a tetramer of non-equiv	SDH4	4,327778	up
1776183_at	Controls the expression of ADH2, peroxisomal protein genes, a	ADR1	7,759847	up
1773159_s_at	TyB Gag-Pol protein; proteolytically processed to make the Gag, RT, PR		4,615139	up
1772049_s_at	TyB Gag-Pol protein; proteolytically processed to make the Gag, RT, PR		6,5471053	up
1774052_at	Bypass of Stop Codon transcript encoded by this ORF shows a h	BSC2	2,6886578	up
1778165_at	Involved in mitochondrial homologous DNA recombination. B	MHR1	3,0993786	up
1773597_at	Phosphatidylinositol(3)-phosphate binding	PIB1	2,9440005	up
1770799_at	Protein associated with mitochondrial ATP synthase	TIM11	2,6347237	up
1772978_at	Cytosolic metalloprotease; computational analysis of large-sca	CYM1	2,6585772	up
1777321_at	ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase subunit 7 (14 kDa)	QCR7	5,754445	up
1770402_at	Diadenosine 5',5''-P1,P4-tetraphosphate phosphorylase II (AP4	APA2	2,544941	up
1774696_at	haperone and cysteine protease with similarity to E. coli Hsp3	HSP31	3,7947054	up
1772541_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	RML2	3,8327706	up
1780036_at	Ubiquitin-conjugating enzyme that negatively regulates glucor	UBC8	7,069158	up
1771802_at	Glc7-interacting protein; shares homology with PIG2	GIP2	3,8081753	up
1779267_at	Sporulation-specific activator of Chs3p (chitin synthase III), rec	SHC1	4,4401255	up
1770191_at	3-methyladenine DNA glycosylase	MAG1	4,5963116	up
1774767_at	cytoplasm	OTU1	9,742353	up
1773321_at	Multicopper oxidase, integral membrane protein with similar	FET5	2,6734242	up
1770767_at	Alanine : glyoxylate aminotransferase, catalyzes the synthesis o	AGX1	15,862163	up
1779754_at	induced by heat shock, entry into stationary phase, depletion o	HSP12	6,33299	up
1776136_at	Member of a family of proteins, including Sip1p and Gal83p, th	SIP2	3,01196	up
1779702_at	mRNA N6-adenosine methyltransferase that is required for IME	IME4	2,01569	up
1772233_at	Mitochondrial rRNA Methyltransferase; methylates the 21S (m	MRM2	2,3834188	up

1771915_at	converts pyruvate to oxaloacetate	PYC1	9,04437	up
1779272_at	localizes to spindle pole body	SDS23	3,38334	up
1771509_at	Fatty acid desaturase, required for monounsaturated fatty acid	OLE1	5,90275	up
1774010_at	gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase (4-aminobutyrate	UGA1	2,3548517	up
1772112_at	40 kDa putative membrane-spanning ATPase	MSP1	2,6335144	up
1773780_at	Catalytic subunit of 1,3-beta-glucan synthase, has similarity to	GSC2	4,7214227	up
1774026_at	high affinity methionine permease	MUP1	2,2116587	up
1777536_at	similarity to Adr1p DNA-binding domain /		4,0309525	up
1769955_at	Cytosolic catalase T, has a role in protection from oxidative da	CTT1	3,1832886	up
1778290_at	beta subunit of succinyl-CoA ligase (synthetase; ATP-forming),	LSC2	2,2340155	up
1772100_at	TFIID subunit (145 kDa), involved in RNA polymerase II transcri	TAF1	2,11806	up
1769845_at	Glycerol kinase, converts glycerol to glycerol-3-phosphate	GUT1	4,30224	up
1773993_at	Manganese-containing superoxide dismutase	SOD2	4,310949	up
1771103_at	Subunit VI of cytochrome c oxidase, which is the terminal men	COX6	5,0816345	up
1778666_at	Hexose transporter with moderate affinity for glucose, may fur	HXT5	5,95162	up
1780115_at	TRA1 is the homolog of the human protein TRRAP which we ha	TRA1	2,04019	up
1769462_at	alpha-ketoglutarate dehydrogenase	KGD1	3,40499	up
1777918_at	Promoter of Growth; weak similarity to human transcription a	POG1	2,19356	up
1773792_at	required for survival upon exposure to K1 killer toxin; involved	FYV10	4,30129	up
1777336_at	Mitochondrial outer membrane protein involved in membran	FIS1	2,9867363	up
1777278_at	Maintenance of Mitochondrial Function	MMF1	2,57445	up
1776174_at	cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex	PCL7	5,51025	up
1773244_at	Member of the DEAH family of helicases, functions in an error-f	MPH1	2,61607	up
1772227_at	self-glucosylating initiator of glycogen synthesis; similar to ma	GLG2	5,18080	up
1774960_at	With NCA2, regulates proper expression of subunits 6 (Atp6p)	NCA3	4,29421	up
1780101_at	Serine/threonine protein kinase involved in activation of meio	IME2	2,0506396	up
1774326_at	mitochondrial elongation factor G-like protein	MEF2	5,10823	up
1777080_at	Gamma glutamylcysteine synthetase, catalyzes the first step in	GSH1	2,89612	up
1770592_at	Possibly involved in Snf1p regulated transcriptional activation	SIP4	8,78980	up
1772974_at	serine/threonine kinase	IKS1	2,80474	up
1774072_at	Mitochondrial succinate-fumarate transporter, transports suc	SFC1	6,14651	up
1774896_at	Cu, Zn superoxide dismutase	SOD1	3,42196	up
1777018_at	Xanthine Phosphoribosyl Transferase	XPT1	2,10788	up
1777334_at	Yeast succinate dehydrogenase (SDH)	SDH3	2,27912	up
1775441_at	Subunit of the heme-activated, glucose-repressed Hap2p/3p/4	HAP4	5,7603574	up
1770748_at	Mitochondrial Distribution and Morphology	MDM35	3,3795176	up
1778312_at	protein similar to StuA of Aspergillus nidulans	PHD1	4,38048	up
1779755_at	transcriptional repressor and activator	RGT1	3,73200	up
1775851_at	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induced	GPX1	4,20628	up
1769308_at	Multifunctional enzyme of the peroxisomal fatty acid beta-oxi	FOX2	2,63900	up
1776013_at	rab5-like GTPase involved in vacuolar protein sorting and endo	YPT52	2,88623	up
1779155_at	histone deacetylase complex	SET3	2,1471093	up
1772694_at	Glycerol-3-phosphate acyltransferase located in both lipid par	GPT2	2,6968439	up
1769992_at	RNA helicase in the DEAH-box family involved in the second ca	PRP16	2,18647	up
1778233_at	S-MethylMethionine Permease	MMMP1	7,08730	up
1777010_at	Yeast succinate dehydrogenase (SDH) is a tetramer of non-equi	SDH2	4,47179	up
1774833_at	Copper metallochaperone that shuttles copper from the cytos	COX17	4,4464293	up
1776248_at	Homolog of E. coli DnaJ, closely related to Ydj1p	XDJ1	3,485466	up
1771040_at	Udp-glycosyltransferase	ATG26	2,203437	up
1779774_at	helicase activity	IRC20	3,0811384	up
1770532_at	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase, required fo	MET17	2,2392578	up
1774665_at	Peroxisomal integral membrane protein, involved in negative	PEX30	2,084706	up
1776768_at	Fructose-1,6-bisphosphatase, required for glucose metabolism	FBP1	41,50529	up
1773919_at	Subunit VIII of cytochrome c oxidase	COX8	4,04208	up
1776217_at	Subunit of the mitochondrial F1F0 ATP synthase, which is a lar	ATP18	3,25136	up
1771143_at	Expression is repressed by glucose and anaerobic conditions, is	CYB2	7,19537	up
1774377_at	Carnitine O-acetyltransferase, peroxisomal and mitochondrial	CAT2	4,00793	up
1775433_at	Mitochondrial inner membrane ADP/ATP translocator, exchan	AAC1	4,78379	up
1773106_at	vacuolar protein sorting	VPS20	2,0153308	up
1773134_at	Component, with Afg3p, of the mitochondrial inner membran	YTA12	2,974282	up
1769958_at	involved in proteasome-dependent catabolite inactivation of	GID8	3,099879	up
1777444_at	Cytoplasmic inhibitor of proteinase Pep4p	PAI3	25,62268	up
1774548_at	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	MRP517	3,76848	up
1777463_at	Protein required for survival at high temperature during statio	SPG5	3,74717	up
1779649_at	Protein that recognizes and binds damaged DNA during nucle	RAD14	2,93475	up
1773823_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL24	2,5847123	up
1774495_at	Glutamate decarboxylase, converts glutamate into gamma-am	GAD1	4,76215	up
1776419_at	Subunit VII of cytochrome c oxidase	COX7	4,32994	up
1775431_at	protein possibly involved in protein synthesis	TMA23	3,34281	up
1770483_at	CAT8 controls the key enzymes of gluconeogenesis in S. cerevis	CAT8	11,14720	up
1778109_at	Vacuolar carboxypeptidase Y (proteinase C), involved in protei	PRC1	3,54118	up
1774644_at	Integral inner mitochondrial membrane protein with similarit	YME2	2,85012	up
1774693_at	KRRI-Interacting protein 1	KRI1	2,49709	up
1777106_at	Putative hydroxyisocaproate dehydrogenase	GOR1	2,75663	up
1776536_at	leucine-rich nuclear export signal (NES) sequence that fits the	SWT21	2,22872	up
1775599_at	Protein kinase that stabilizes several plasma membrane amino	NPR1	2,40810	up
1775729_at	carbon-catabolite sensitive malate synthase	MLS1	11,24265	up
1775713_at	Lecine-zipper transcriptional activator, responsible for the reg	MET4	3,18275	up
1769891_at	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel), oute	POR1	3,74579	up
1778884_at	Translational elongation factor EF-3; paralog of YEF3 and mem	HEF3	22,71368	up

1778706_at	transmembrane protein, involved in ammonia production; me	ATO2	5,01080	up
1774804_at	Protein involved in autophagocytosis during starvation	ATG3	2,61796	up
1778951_at	Component of a membrane-bound complex containing the To	AVO1	2,14953	up
1776968_at	Cytochrome c1	CYT1	3,80505	up
1779720_at	essential in yeast; plays a role in cell cycle progression	RIO1	2,36429	up
1778781_at	GTP binding protein (mammalian Ranp homolog) involved in t	GSP2	3,74079	up
1778183_at	ABC transporter highly similar to Pdr5p	PDR10	5,33760	up
1774122_at	NAD(+)-dependent formate dehydrogenase, may protect cells f	FDH1 /// FDH2	53,72343	up
1776285_at	proline-specific permease (also capable of transporting alanine	PUT4	7,316518	up
1779399_at	S-adenosylMethionine Permease	SAM3	16,27931	up
1769333_at	Hydrophilin of unknown function; stress induced (osmotic, io	GRE1	35,24453	up
1779057_at	Ulp1 Interacting Protein 4	UIP4	2,52101	up
1774709_at	DNA polymerase zeta, which is unique in its ability to bypass th	REV3	2,48031	up
1774838_at	Mutl Homolog	MLH3	3,14849	up
1776366_at	Pxa1p and Pxa2p appear to be subunits of a peroxisomal ATP-h	PXA1	2,25051	up
1771612_at	ubunit of the COMPASS complex, which methylates histone H3	SPP1	2,88330	up
1770623_at	Mitochondrial inner membrane transporter, exports 2-oxoadi	ODC1	3,53264	up
1775542_at	Regulator of drug sensitivity	RDS2	2,1264014	up
1769977_at	Subunit b of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP syntha	ATP4	3,074246	up
1776686_at	Mitochondrial isoleucyl-tRNA synthetase	ISM1	2,85527	up
1771419_at	protein serine/threonine kinase activity	SKS1	3,3541477	up
1775005_at	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	MRPS16	3,114109	up
1772812_at	A transmembrane glycoprotein	NCR1	2,302672	up
1777053_at	Vacuolar acid trehalase, required for trehalose utilization	ATH1	5,151008	up
1774390_at	Synergistic to prp19 (NineTeen) mutation. Essential for mRNA	SNT309	9,018329	up
1775734_at	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, med	CTR1	5,342314	up
1771645_at	protein secretion	SUE1	8,94983	up
1771633_at	0 kDa ubiquinol cytochrome-c reductase core protein 2	QCR2	3,6353877	up
1770785_at	Tetrameric histone acetyltransferase with similarity to Gcn5p,	HPA2	7,1532187	up
1771566_at	Protein that forms a heterotrimeric complex with Erp2p, Emp24p, and Erv25p; membe		3,4670331	down
1771711_at	tRNA-intron endonuclease activity	SEN34	2,852537	down
1774134_at	N-succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide (SAICAR	ADE1	3,1400485	down
1778878_s_at	IMD1 is a probable pseudogene that is located close to the tele	IMD1 /// IMD2	4,0805707	down
1775992_at	Kynurenine 3-mono oxygenase, required for biosynthesis of ni	BNA4	3,0709393	down
1779139_at	Cytoplasmic isoleucine-tRNA synthetase, target of the G1-spec	ILS1	3,807844	down
1775235_at	Histone H2A (HTA1 and HTA2) code for nearly identical protein	HTA2	4,189841	down
1778788_at	Ubiquitin-conjugating enzyme that mediates degradation of sh	UBC4	2,5379565	down
1778143_at	FC is a multisubunit DNA binding protein and ATPase that acts	RFC5	4,5286736	down
1774691_at	required for DNA replication	POL30	4,1906075	down
1779615_at	Acid phosphatase, nearly identical to Pho5p; glycosylated; tra	PHO3	5,158271	down
1772672_at	membrane protein, involved in phosphate transport;	PHO88	2,2544808	down
1779344_at	alcohol dehydrogenase isoenzyme V	ADH5	3,2401512	down
1776634_at	catalytic subunit of a mannosylinositol phosphorylceramide (I	CSH1	2,9704452	down
1778512_at	Protein that participates in secretory pathway	YSY6	2,7655976	down
1778857_at	Urea amidolyase, contains both urea carboxylase and allophan	DUR1,2	4,2786794	down
1774290_at	converts pyruvate to oxaloacetate	PYC2	3,1812308	down
1771246_at	dUTPase, catalyzes the hydrolysis of dUTP to dUMP	DUT1	7,1681027	down
1777613_at	Protein phosphatase with specificity for serine, threonine, and	PPS1	2,2010403	down
1779735_at	Third-largest subunit of DNA polymerase II (DNA polymerase ep	DPB3	2,4378145	down
1773972_at	S-phase checkpoint protein found at replication forks, required for DNA replication		2,360075	down
1775142_at	Ribosomal protein 59 (rp59) of the small (40S) ribosomal subu	RPS14A	2,0795364	down
1777477_at	Fatty acid elongase, involved in sphingolipid biosynthesis	FEN1	5,5470243	down
1774930_at	threonine synthase	THR4	2,88569	down
1770173_at	Stress-Seventy Subfamily B; involved in translation, perhaps by	SSB1	3,6930795	down
1776998_at	NAD(+)-dependent glutamate synthase (GOGAT), synthesizes gl	GLT1	3,894976	down
1776604_at	DNA ligase found in the nucleus and mitochondria, an essentia	CDC9	3,286524	down
1770514_at	Trna ribose methylase	TRM3	2,6404195	down
1769663_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS29B	2,90317	down
1773820_x_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS29B	2,6571834	down
1775495_at	Mitotic Chromosome Determinant; similar to S. pombe RAD2	MCD1	7,196782	down
1771282_at	Yeast Ran Binder #1; suppressor of FUS1	YRB1	3,4215174	down
1779020_at	RNA polymerase III subunit C11; mediates pol III RNA cleavage	RPC11	2,4954698	down
1775548_at	Protein required for mismatch repair in mitosis and meiosis	MSH6	4,418637	down
1775413_at	anaphase inhibitor that plays a critical role in control of anaph	PDS1	4,912674	down
1771051_at	homoaconitate hydratase activity	LYS4	2,9181175	down
1771591_at	hydroxylates ceramide-1 at C-4 to give ceramide-2	SUR2	5,415429	down
1774142_at	Gtpase-interacting component 2	GIC2	6,798484	down
1770583_at	Thioredoxin reductase	TRR1	2,4637623	down
1780083_at	Nuclear protein that binds to RNA and to Mex67p, required fo	YRA1	2,399704	down
1770082_at	Guanylate kinase, converts GMP to GDP; required for growth	GUK1	3,631406	down
1778004_at	Dynein intermediate chain, acts in the cytoplasmic dynein pat	PAC11	5,234196	down
1775448_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL37B	2,1171832	down
1775116_at	Growth inhibitory gene	GIN4	4,2007813	down
1780001_at	Guanosine diphosphatase located in the Golgi, involved in the	GDA1	2,7887046	down
1773300_at	part of small (ribosomal) subunit (SSU) processosome (contain	SNU13	2,9234343	down
1774627_at	catalyzes the interconversion of fructose-6-P and mannose-6-P	PMI40	4,8832593	down
1774327_at	Nuclear envelope protein, interacts with GDP-bound Gsp1p	NTF2	2,6876023	down
1774550_at	Inositol phosphosphingolipid phospholipase C, hydrolyzes inc	ISC1	2,4899156	down
1775500_at	Required for Meiotic nuclear Division; functions in DNA replic	GET2	2,5692265	down
1779336_at	Beta (small) subunit of cytoplasmic phenylalanyl-tRNA synthet	FRS2	2,5378659	down

1776370_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL2A	2,6671298	down
1776080_at	Glutamyl-tRNA synthetase (GluRS), forms a complex with meth	GUS1	2,436975	down
1778252_at	Bifunctional enzyme of the 'de novo' purine nucleotide biosyn	ADE5,7	5,565277	down
1777543_at	Integral membrane component of endoplasmic reticulum-deri	EMP24	3,024401	down
1777697_at	Oxidoreductase, catalyzes NADPH-dependent reduction of the bicyclic diketone bicycl		7,97293	down
1779233_s_at	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) r	RPL1A	2,0071187	down
1778947_at	Protein that binds tRNA and methionyl- and glutamyl-tRNA syn	ARC1	2,5742943	down
1777134_at	Ribosomal protein L29 of the large (60S) ribosomal subunit	RPL28	2,674186	down
1776299_at	NADH diphosphatase (pyrophosphatase), hydrolyzes the pyrop	NPY1	3,192709	down
1774231_at	Essential mitotic spindle protein required to maintain spindle	DUO1	4,5407434	down
1775263_at	Processing alpha glucosidase I, involved in assembly of cell wal	CWH41	4,953406	down
1779478_at	tryptophan synthetase	TRP5	2,1907725	down
1771287_at	C-24(28) sterol reductase, catalyzes the final step in ergosterol	ERG4	3,5942962	down
1778896_at	vacuolar H-ATPase 14 kDa subunit (subunit F) of the catalytic (V	VMA7	2,5229197	down
1770155_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS25A	2,18312	down
1780004_at	Formylglycinamide-ribonucleotide (FGAM)-synthetase, catal	ADE6	2,7648892	down
1777939_at	protein involved in vacuolar H-ATPase assembly or function. R	VMA21	2,3310406	down
1777207_at	role in DNA replication during S phase	CLB6	4,4294405	down
1777175_at	belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane prot	MEP1	2,677553	down
1777639_at	Protein serine/threonine phosphatase with similarity to huma	PPT1	3,5628006	down
1777945_at	Polyamine transport protein	TPO2	12,632346	down
1779114_at	Gtp-binding protein of the ras superfamily involved in bud site	RSR1	3,1708932	down
1774348_at	Golgi integral membrane protein; binds to the transport GTPa	YIP1	2,2630346	down
1776155_at	Ribonucleotide-diphosphate reductase (RNR), small subunit; t	RNR4	2,6371636	down
1771687_at	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1-tetrahydrofolate synthas	ADE3	2,3317685	down
1774886_at	Protein required for splicing of the COX1 intron A15 beta;	PET54	3,0979114	down
1778380_at	Mga1p shows similarity to heat shock transcription factor	MGA1	2,869912	down
1780075_at	Transporter of Nicotinic Acid	TNA1	4,964811	down
1778611_at	Cytosolic ribosome-associated chaperone, contains a DnaJ do	ZUO1	2,6858244	down
1776097_at	-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase, involve	PRS3	3,0888216	down
1777399_at	subunit of the major N alpha-acetyltransferase	ARD1	3,5326123	down
1779727_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit;	RPS27B	2,4114203	down
1779820_at	Subunit c" of the vacuolar ATPase, which functions in acidifica	PPA1	2,2675695	down
1776023_at	NADP-cytochrome P450 reductase	NCP1	4,2391214	down
1771405_at	ketopantoate reductase	PAN5	3,434138	down
1775237_at	Deoxyhypusine synthase, catalyzes formation of deoxyhypusin	DYS1	2,2658432	down
1772676_at	Protein component of the H/ACA snoRNP pseudouridylylase com	GAR1	3,1762958	down
1771108_at	,2-diaclyglycerol ethanolamine- and cholinephosphotranferas	EPT1	4,481396	down
1778791_at	dCMP deaminase	DCD1	5,563529	down
1777048_at	Widely conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mo	OYE2	3,182002	down
1775218_at	6-phosphogluconate dehydrogenase,	GND1	3,1986995	down
1776273_x_at	Inosine monophosphate dehydrogenase, catalyzes the first ste	IMD2	4,382994	down
1772712_at	Integral plasma membrane protein required for axial budding i	AXL2	2,723698	down
1780161_at	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) r	RPL16A	4,900133	down
1770440_at	homo-isocitrate dehydrogenase, an NAD-linked mitochondrial	LYS12	3,0625587	down
1774604_at	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	THS1	3,8955307	down
1770766_at	omponent of the telomerase holoenzyme, involved in telomer	EST3	2,6281781	down
1770205_at	nitrogen starvation-induced protein phosphatase	YVH1	3,9754665	down
1769885_at	Elongase I, medium-chain acyl elongase, catalyzes carboxy-terr	ELO1	4,9219804	down
1772968_at	Protein kinase that regulates the G2/M transition by inhibitor	SWE1	2,3130057	down
1769703_at	Protein required for cell viability	PHS1	3,3595665	down
1772514_at	required during cell division for faithful partitioning of the ER-	SCP160	3,493127	down
1773989_at	Protein involved in the inositol acylation of glucosaminyl pho	GWT1	2,6313336	down
1775384_at	Arylformamidase, involved in biosynthesis of nicotinic acid fro	BNA3	2,0821095	down
1774675_at	Ribonucleotide-diphosphate reductase (RNR), small subunit; t	RNR2	2,6176562	down
1778588_at	Alpha subunit of the oligosaccharyltransferase complex of the	OST1	2,512575	down
1771726_at	Homolog of the SPC12 subunit of mammalian signal peptidase	SPC1	4,1173644	down
1777819_at	delta DNA polymerase activity	POL32	3,5370772	down
1771778_at	Transfers mannose residues from dolichyl phosphate-D-manno	PMT4	4,4302626	down
1773375_at	involved in DNA repair; mutant is sensitive to the base analog,	HAM1	2,596772	down
1778550_at	Protein with similarity to heat shock transcription factors;	HMS2	2,5359135	down
1777971_at	phosphoglucomutase, minor isoform	PGM1	10,388634	down
1772718_at	42 kDa subunit of V1 sector	VMA5	2,3119764	down
1776342_at	-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase, involve	PRS1	2,4217246	down
1770765_at	Subunit of DNA primase, which is required for DNA synthesis at	PR12	3,214688	down
1774705_at	NAD-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogena	MTD1	2,5380075	down
1773853_at	Ceramide synthase component, involved in synthesis of ceram	LAC1	4,2027535	down
1772352_at	Alpha subunit of the translation initiation factor eIF2B, the gu	GCN3	2,7974188	down
1775754_at	Non-essential component of the HAT-B histone acetyltransfera	HIF1	6,345544	down
1769858_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL15A	3,0389497	down
1777610_at	signal peptidase subunit	SPC3	2,7186239	down
1776523_at	Cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase, homodimeric enzymet	DPS1	2,0774083	down
1771269_at	DNA replication initiation factor	CDC45	5,2599483	down
1778865_at	associated with 60S pre-ribosomes	MDN1	4,028275	down
1780186_at	Fusion protein that is cleaved to yield a ribosomal protein of t	RPS31	2,3998246	down
1771781_at	Methyltransferase required for dipthamide biosynthesis	DPH5	4,2674274	down
1774947_at	ranscription factor that binds to a number of promoter region	TOS4	12,64965	down
1770284_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit,	RPL37A	3,3709009	down
1769903_at	Gamma-tubulin, involved in nucleating microtubules from bo	TUB4	5,16875	down
1775417_at	Dual function protein involved in translation initiation as a su	HCR1	2,3798728	down

1775614_at	GTP binding protein (mammalian Ranp homolog) involved in t	GSP1	3,272587	down
1772294_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subuni	RPS29A	2,721504	down
1772433_x_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subuni	RPS29A	2,5779943	down
1770154_at	Involved in DNA-replication-linked nucleosome assembly	CAC2	5,0840745	down
1780107_at	Prefoldin subunit 5; putative homolog of subunit 5 of bovine p	GIM5	2,428553	down
1777104_at	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) r	RPL6A	2,3341272	down
1772101_at	Mitochondrial glycosylase/lyase that specifically excises 7,8-di	OGG1	4,8506937	down
1776115_at	tRNA methyltransferase, required for methylation of wobble b	TRM9	3,9952946	down
1776558_at	High-affinity glucose transporter of the major facilitator super	HXT2	9,412965	down
1771500_at	Subunit of a complex with Ctf8p that shares some subunits wit	CTF18	4,428825	down
1778189_at	Enzyme of 'de novo' purine biosynthesis	ADE17	3,7585204	down
1771468_at	Pichia farinosa Killer toxin Resistance	PKR1	2,9744856	down
1770344_at	ligosaccharyl transferase glycoprotein complex	SWP1	2,9143465	down
1776857_at	Serine palmitoyltransferase catalyses the committed step in sp	LCB1	2,3395538	down
1770922_at	Protein required for cell viability	LIP1	2,2440073	down
1770754_at	NADPH-dependent alcohol dehydrogenase	ADH6	3,1426635	down
1776235_at	DNA polymerase II	POL2	5,6732545	down
1769484_at	Mitochondrial inner membrane transporter, exports mitocho	ATM1	2,8962314	down
1772797_at	Regulator of Ty1 Transposition - same phenotype as RTT101 - R	RTT106	3,4109488	down
1775109_at	alpha-tubulin foldin; protein implicated in folding of alpha tub	ALF1	5,146592	down
1774764_at	Nicotinamide riboside kinase, catalyzes the synthesis of nicotir	NRK1	4,810552	down
1776526_at	Catalytic subunit of the DNA polymerase alpha-primase compl	POL1	5,8614974	down
1774373_at	Cholinephosphotransferase, required for phosphatidylcholine	CPT1	4,071496	down
1775076_at	Ribonuclease H2 catalytic subunit, removes RNA primers durin	RNH201	8,278066	down
1772003_at	Seventh step in lysine biosynthesis pathway	LYS9	5,193293	down
1772407_at	Interacts with YPT proteins	YIP3	2,8055022	down
1778073_at	responsible for most, if not all, m(1)G(9) modification of tRNA	TRM10	3,475147	down
1770923_at	THI for thiamine metabolism	THI20	3,4328885	down
1776672_at	Calmodulin-dependent protein kinase	CMK2	4,8202605	down
1778886_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit;	RPS15	2,9887211	down
1772033_at	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalyzes a step i	ADE2	3,1179118	down
1772939_at	glutaminyl-tRNA synthetase /	GLN4	2,0823488	down
1776346_at	Ferrochelatase, a mitochondrial inner membrane protein, cata	HEM15	3,134369	down
1774801_at	phosphoserine transaminase	SER1	2,348708	down
1776003_at	Protein involved in protein import into ER	SEC63	3,3118856	down
1778686_at	Polyamine transport protein	TP04	2,4744203	down
1777691_at	binds to beta-tubulin and may participate in microtubule mor	RBL2	2,7147741	down
1770374_at	Transfers mannose residues from dolichyl phosphate-D-manno	PMT3	3,8254566	down
1776084_at	AdoMet-homocysteine methyltransferase	SAM4	2,596398	down
1776068_at	involved in vanadate resistance	SVS1	10,39578	down
1771463_at	RNA polymerase I subunit	RPA135	2,0577266	down
1778702_at	Nuclear gene that specifies two messages for cytoplasmic and r	HTS1	2,2479146	down
1771502_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL43A	2,2070224	down
1779536_at	N-acetyltransferase	MAK3	2,3139412	down
1777843_at	phosphatidylinositol synthase	PIS1	3,8746867	down
1774860_at	Dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man) synthase of the ER n	DPM1	2,739068	down
1779075_at	Oligopeptide transporter; member of the OPT family	OPT2	6,986946	down
molecular_function	protein binding 341			
molecular_function	catalytic activity 304			
1775303_at	Mitochondrial peroxiredoxin (1-Cys Prx) with thioredoxin per	PRX1	4,7786136	up
1770695_at	thiol-disulfide exchange intermediate activity	TRX3	3,2210605	up
1774025_at	Phorphobilinogen deaminase, catalyzes the conversion of 4-pc	HEM3	2,20766	up
1779115_at	high copy suppressor of imp1 mutation, may be required for ti	SOM1	2,3558154	up
1779905_at	Isocitrate lyase, catalyzes the formation of succinate and glyox	ICL1	4,4555473	up
1778093_at	Protein required for the hydroxylation of heme O to form hem	COX15	3,681114	up
1776150_at	Subunit VIa of cytochrome c oxidase, which is the terminal me	COX13	5,072972	up
1775069_at	cyclin catabolism	CDH1	2,1018596	up
1777556_at	Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase; expressi	GUT2	3,6757026	up
1774545_at	MAP kinase phosphatase activity	SDP1	4,977787	up
1778514_at	Subunit of nuclear RNase P, which cleaves tRNA precursors to	RPR2	2,8733542	up
1769659_at	Putative GPI-anchored aspartic protease	YPS6	5,611597	up
1770968_at	ubunit VIb of cytochrome c oxidase, which is the terminal mer	COX12	5,2063813	up
1779660_at	Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase, catalyzes ox	IDP2	15,808332	up
1770073_s_at	chaperone and cysteine protease with similarity to E. coli Hsp3	HSP32	10,5095415	up
1779413_at	L-homoserine-O-acetyltransferase, catalyzes the conversion of	MET2	4,074386	up
1770947_at	2-methylisocitrate lyase of the mitochondrial matrix, function	ICL2	6,4555182	up
1770518_at	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	QRI1	3,1920738	down
1775760_at	ER protein involved in very long chain fatty acid synthesis	TSC13	2,24922	down
1773272_at	Cytoplasmic arginyl-tRNA synthetase		4,5737877	down
1770575_at	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	URH1	4,2684693	down
1771840_at	fumarate reductase (NADH) activity		11,623962	down
1771863_at	involved in UDP-N-acetylglucosamine biosynthesis	GNA1	2,626522	down
1774050_at	Zeta subunit of the oligosaccharyltransferase complex of the E	OST5	3,134917	down
1771458_at	phosphoserine phosphatase	SER2	4,3248672	down
1770925_at	Serine hydrolase that localizes to both the nucleus and cytopla	FSH1	5,5048895	down
1779675_at	Phosphoribosyl-5-amino-1-phosphoribosyl-4-imidazolecarbo	HIS6	2,3026593	down
1773129_at	Regulator of Ty1 Transposition; Regulation of mitochondrial n	RTT109	7,12541	down
177580_at	Ribonuclease H2 subunit, required for RNase H2 activity	RNH203	2,7787519	down
1771057_at	Protease involved in ras and a-factor terminal proteolysis	RCE1	2,603679	down
1771817_at	hosphatidylserine decarboxylase of the mitochondrial inner m	PSD1	2,267582	down

1777356_at	Gene encodes a protein implicated in the last step of tRNA splicing	TPT1	4,02452	down
molecular_function	identical protein binding 68			
molecular_function	oxidoreductase activity 66			
cellular_component	mitochondrion 170			
1778053_at	Putative plasma membrane protein of unknown function, transmembrane	YRO2	4,448958	up
1774908_at	GTPase-activating protein that negatively regulates RAS	IRA1	2,0827563	up
1774898_at	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	IMG2	2,1849504	up
1771782_at	ATPase stabilizing factor	STF1	4,735816	up
1776216_at	Protein with a role in ubiquinone (Coenzyme Q) biosynthesis, transmembrane	COQ4	2,21853	up
1775708_at	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	RSM28	2,5037653	up
1773917_at	Protein of the mitochondrial intermembrane space, required for assembly of cytochrome c	ACN9	4,5113173	up
1777238_at	Essential for the expression and activity of ubiquinol-cytochrome c oxidase	CBP4	5,994497	up
1779759_at	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	RSM27	2,1456108	up
1776680_at	Protein required for survival at high temperature during stationary phase	SPG1	18,142437	up
1774485_at	mitochondrial membrane protein	MPM1	5,6060033	up
1774888_at	succinate dehydrogenase (ubiquinone) activity		15,572896	up
1776064_at	Repressed by glucose, induced by lactic acid; in high copy	JEN1	4,8044505	up
1776576_at	Involved in mitochondrial biogenesis	MBR1	8,25537	up
1779284_at	Specific translational activator for the COX1 mRNA, also involved in mitochondrial biogenesis	PET309	3,2330732	up
1773431_at	Mitochondrial membrane protein, required for assembly of cytochrome c	COX14	3,1840987	up
1778780_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL39	3,2306216	up
1778209_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL33	2,4202123	up
1776574_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL51	2,5572946	up
1779972_at	involved in secretion of proteins that lack classical secretory signal	NCE102	2,7021544	up
biological_process	small molecule metabolic process 115			
biological_process	single-organism metabolic process 188			
biological_process	organonitrogen compound metabolic process 100			
cellular_component	mitochondrial envelope 75			
cellular_component	mitochondrial inner membrane 43			
cellular_component	organelle inner membrane 44			
cellular_component	mitochondrial membrane 66			
cellular_component	organelle envelope 83			
cellular_component	envelope 83			
cellular_component	mitochondrial part 92			
biological_process	oxidation-reduction process 82			
biological_process	generation of precursor metabolites and energy 40			
cellular_component	mitochondrial membrane part 29			
biological_process	nucleoside phosphate metabolic process 41			
biological_process	nucleotide metabolic process 40			
biological_process	nucleobase-containing small molecule metabolic process 43			
biological_process	energy derivation by oxidation of organic compounds 35			
biological_process	aerobic respiration 23			
biological_process	cellular respiration 27			
biological_process	tricarboxylic acid cycle 13			

Açık kaynaklı mikrodizi verilerinin analizi sonucunda elde edilen ısı şok uygulaması sonrasında gen ifade düzeylerinde iki kat ve üzeri değişim gösteren tüm genler

HS6h-HS1h				
Probe Set ID	Putative Annotation	Gene Symbol	Fold Change	Regulation
molecular_function	binding 431			
1779425_at	Cytochrome c heme lyase (holocytochrome c synthase	CYC3	2,8281472	up
1780029_at	Protein kinase of the Mitotic Exit Network that is localized to t	CDC15	2,8180256	up
1778223_at	Outer carnitine acetyltransferase, mitochondrial	YAT1	4,207464	up
1779158_at	heat-inducible cytosolic member of the 70 kDa heat shock pro	SSA3	11,693929	up
1769467_at	Pre-mRNA splicing factor	ECM2	2,3466578	up
1776193_at	Amino acid transport protein for valine, leucine, isoleucine, ar	TAT1	4,290266	up
1779157_at	Zn-finger protein	TBS1	4,7963033	up
1775252_at	Mitochondrial integral membrane protein involved in mitoch	FZO1	4,1094885	up
1778280_at	negative growth regulatory protein	NGR1	6,252298	up
1772959_at	Bifunctional dehydrogenase and ferrochelataze, involved in th	MET8	2,9738998	up
1772087_at	required for normal growth rate at 15 degrees	MTC4	2,281221	up
1777758_at	metal homeostasis protein; putative membrane protein	BSD2	2,8099496	up
1775610_s_at	Silenced copy of A2, encoding a protein of with similarity to Al	HMLALPHA2	3,2814078	up
1778479_at	catabolism of hydroxy amino acids	CHA1	12,563792	up
1774204_at	Required for the post-transcriptional thio-modification of bot	NFS1	2,3478255	up
1779004_at	17 kDa phosphatidylglycerolphosphate synthase	PGS1	2,602027	up
1776597_at	Protein with similarity to Npr1p protein kinase	SAT4	2,5404296	up
1779623_at	Lipase, required for intravacuolar lysis of autophagic bodies	ATG15	4,41306	up
1776196_at	component of the yeast ADA acetyltransferase	AHC2	2,3668153	up
1770900_at	Putative serine/threonine protein kinase most similar to cyclid	KIN82	2,5865457	up
1769986_at	Substrate of the Hub1p ubiquitin-like protein that localizes to	HBT1	2,5882797	up
1774699_at	Protein kinase with a possible role in MAP kinase signaling in th	PRR2	3,9435036	up
1772342_at	6-O-methylguanine-DNA methylase	MGT1	4,225678	up
1773758_at	glucose sensor	SNF3	3,672819	up
1769952_at	Long-chain alcohol dehydrogenase (glutathione-dependent fo	SFA1	3,9900618	up
1769959_at	NADH dehydrogenase activity	NDE2	8,226276	up
1777258_at	bromodomain protein, homolog of BDF1	BDF2	4,759641	up
1780095_at	Ring finger protein involved in the DNA damage response with	SLX5	2,6387806	up
1770456_at	Neutral trehalase, degrades trehalose; required for thermotole	NTH1	2,4187381	up
1778677_at	ranscriptional regulator involved in activation of the GAL gene	GAL3	7,591651	up
1770080_at	Chaperone that specifically facilitates the assembly of cytochro	PET100	3,003574	up
1774126_at	dihyrolipoyl transsuccinylase component of alpha-ketogluta	KGD2	3,0696867	up
1773413_at	Protein required for nuclear migration, localizes to the mother	NUM1	3,6444244	up
1772220_at	Yeast succinate dehydrogenase (SDH) is a tetramer of non-equi	SDH4	4,0220532	up
1776183_at	Controls the expression of ADH2, peroxisomal protein genes, a	ADR1	7,517574	up
1774052_at	Bypass of Stop Codon transcript encoded by this ORF shows a H	BSC2	2,7571716	up
1773597_at	Phosphatidylinositol(3)-phosphate binding	PIB1	4,5215993	up
1770799_at	Protein associated with mitochondrial ATP synthase	TIM11	2,3558068	up
1770832_at	Pre-mRNA splicing factor	CDC40	2,5100584	up
1774308_at	Temperature dependent Organization in Mitotic nucleus	TOM1	2,495948	up
1777321_at	ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase subunit 7 (14 kDa)	QCR7	4,618533	up
1774696_at	chaperone and cysteine protease with similarity to E. coli Hsp3	HSP31	4,4029493	up
1772541_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	RML2	2,7041483	up
1780036_at	Ubiquitin-conjugating enzyme that negatively regulates glucor	UBC8	9,56179	up
1771802_at	Glc7-interacting protein; shares homology with PIG2	GIP2	4,748963	up
1779267_at	Sporulation-specific activator of Chs3p (chitin synthase III), rec	SHC1	3,9166613	up
1774296_at	Protein containing a RING finger domain that forms a complex	SLX8	2,8985207	up
1770191_at	3-methyladenine DNA glycosylase	MAG1	5,6260676	up
1773321_at	Multicopper oxidase, integral membrane protein with similar	FET5	3,3690636	up
1770767_at	Alanine : glyoxylate aminotransferase, catalyzes the synthesis o	AGX1	7,8658404	up
1776246_at	involved in protection against heat-induced protein aggregati	MDJ1	2,5071805	up
1779754_at	induced by heat shock, entry into stationary phase, depletion	HSP12	7,2240195	up
1776136_at	Member of a family of proteins, including Sip1p and Gal83p, th	SIP2	3,2760236	up
1779702_at	mRNA N6-adenosine methyltransferase that is required for IME	IME4	3,164126	up
1771602_at	Subunit of the Nsp1p-Nup57p-Nup49p-Nic96p subcomplex of	NUP49	2,7734907	up
1773393_at	heat shock transcription factor	HSF1	2,197542	up
1771915_at	converts pyruvate to oxaloacetate	PYC1	4,227517	up

1779272_at	localizes to spindle pole body	SDS23	3,2214751	up
1771509_at	Fatty acid desaturase, required for monounsaturated fatty acid	OLE1	4,7267704	up
1770424_at	general positive regulator of permeability genes	PDR1	2,538885	up
1774010_at	gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase (4-aminobutyrate	UGA1	3,8812428	up
1773780_at	Catalytic subunit of 1,3-beta-glucan synthase, has similarity to	GSC2	10,315618	up
1774840_at	First step in the methylation pathway for phosphatidylcholine	CHO2	3,1470628	up
1772100_at	TFIID subunit (145 kDa), involved in RNA polymerase II transcri	TAF1	2,7963705	up
1769845_at	Glycerol kinase, converts glycerol to glycerol-3-phosphate	GUT1	3,801922	up
1773993_at	Manganese-containing superoxide dismutase	SOD2	3,0947967	up
1771103_at	Subunit VI of cytochrome c oxidase, which is the terminal mem	COX6	5,4622445	up
1777405_at	Nucleolar protein involved in the assembly of the large ribosom	RPF1	2,5618935	up
1778666_at	Hexose transporter with moderate affinity for glucose, may fur	HXT5	10,020241	up
1780115_at	TRA1 is the homolog of the human protein TRRAP which we ha	TRA1	3,884711	up
1769462_at	alpha-ketoglutarate dehydrogenase	KGD1	4,048029	up
1777918_at	Promoter of Growth; weak similarity to human transcription a	POG1	2,5154095	up
1773792_at	required for survival upon exposure to K1 killer toxin; involve	FYV10	4,9197717	up
1777336_at	Mitochondrial outer membrane protein involved in membran	FIS1	4,091714	up
1777278_at	Maintenance of Mitochondrial Function	MMF1	2,8194644	up
1776174_at	cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex	PCL7	6,9818525	up
1773244_at	Member of the DEAH family of helicases, functions in an error-f	MPH1	5,247692	up
1772227_at	self-glucosylating initiator of glycogen synthesis; similar to ma	GLG2	6,7986546	up
1774960_at	With NCA2, regulates proper expression of subunits 6 (Atp6p)	NCA3	7,910563	up
1774326_at	mitochondrial elongation factor G-like protein	MEF2	7,356117	up
1777080_at	Gamma glutamylcysteine synthetase, catalyzes the first step in	GSH1	2,5313725	up
1770592_at	Possibly involved in Snf1p regulated transcriptional activation	SIP4	11,45001	up
1772974_at	serine/threonine kinase	IKS1	4,382835	up
1774072_at	Mitochondrial succinate-fumarate transporter, transports suc	SFC1	7,354025	up
1774896_at	Cu, Zn superoxide dismutase	SOD1	4,8881288	up
1777018_at	Xanthine Phosphoribosyl Transferase	XPT1	2,673551	up
1777334_at	Yeast succinate dehydrogenase (SDH)	SDH3	2,3884912	up
1775441_at	Subunit of the heme-activated, glucose-repressed Hap2p/3p/4	HAP4	3,3453906	up
1778312_at	protein similar to StuA of Aspergillus nidulans	PHD1	5,6796193	up
1779755_at	transcriptional repressor and activator	RGT1	4,537734	up
1775851_at	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induced	GPX1	4,546154	up
1779042_at	Ubiquitin-protein ligase (E3) that interacts with Rpt4p and Rpt	UFD4	2,5230892	up
1769308_at	Multifunctional enzyme of the peroxisomal fatty acid beta-oxid	FOX2	4,2860723	up
1776013_at	rab5-like GTPase involved in vacuolar protein sorting and endo	YPT52	2,4829466	up
1771265_at	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitoch	FMP46	7,1785836	up
1769992_at	RNA helicase in the DEAH-box family involved in the second ca	PRP16	2,47981	up
1778233_at	S-MethylMethionine Permease	MMP1	4,9628525	up
1777010_at	Yeast succinate dehydrogenase (SDH) is a tetramer of non-equi	SDH2	5,083426	up
1779660_at	Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase, catalyzes ox	IDP2	12,436349	up
1771040_at	Udp-glycosyltransferase	ATG26	2,8768568	up
1776768_at	Fructose-1,6-bisphosphatase, required for glucose metabolism	FBP1	40,850384	up
1773919_at	Subunit VIII of cytochrome c oxidase	COX8	2,46683	up
1776858_at	F-box receptor protein, subunit of the Skp1-Cdc53-F-box recep	UFO1	2,6425462	up
1776217_at	Subunit of the mitochondrial F1FO ATP synthase, which is a lar	ATP18	2,9110014	up
1771143_at	Expression is repressed by glucose and anaerobic conditions, is	CYB2	3,3551672	up
1774377_at	Carnitine O-acetyltransferase, peroxisomal and mitochondrial	CAT2	2,6505985	up
1775433_at	Mitochondrial inner membrane ADP/ATP translocator, exchan	AAC1	3,4202635	up
1777444_at	Cytoplasmic inhibitor of proteinase Pep4p	PAI3	19,88314	up
1774548_at	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	MRP517	2,8267627	up
1777463_at	Protein required for survival at high temperature during statio	SPG5	6,312983	up
1779649_at	Protein that recognizes and binds damaged DNA during nucleo	RAD14	4,623632	up
1774495_at	Glutamate decarboxylase, converts glutamate into gamma-am	GAD1	3,856351	up
1776419_at	Subunit VII of cytochrome c oxidase	COX7	5,037943	up
1775431_at	protein possibly involved in protein synthesis	TMA23	4,6544547	up
1770483_at	CAT8 controls the key enzymes of gluconeogenesis in S. cerevis	CAT8	18,356491	up
1778109_at	Vacuolar carboxypeptidase Y (proteinase C), involved in protei	PRC1	2,956245	up
1774644_at	Integral inner mitochondrial membrane protein with similarit	YME2	2,9407964	up
1774693_at	KRRI-Interacting protein 1	KRI1	2,4956977	up
1774556_at	Heat shock protein regulator that binds to Hsp90p and may sti	HCH1	2,759955	up
1777106_at	Putative hydroxyisocaproate dehydrogenase	GOR1	2,2500517	up
1776536_at	leucine-rich nuclear export signal (NES) sequence that fits the	SWT21	2,2737694	up
1775599_at	Protein kinase that stabilizes several plasma membrane amino	NPR1	2,1188064	up
1775729_at	carbon-catabolite sensitive malate synthase	MLS1	10,110079	up
1775713_at	Lecine-zipper transcriptional activator, responsible for the reg	MET4	3,2991188	up
1769891_at	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel), oute	POR1	3,9653304	up
1778884_at	Translational elongation factor EF-3; paralog of YEF3 and mem	HEF3	29,627579	up
1778706_at	transmembrane protein, involved in ammonia production; me	ATO2	5,2018394	up
1774804_at	Protein involved in autophagocytosis during starvation	ATG3	4,373678	up
1776371_at	Serine/threonine protein kinase with similarity to Ste20p and	SKM1	2,2114613	up
1778951_at	Component of a membrane-bound complex containing the To	AVO1	3,025672	up
1776968_at	Cytochrome c1	CYT1	3,0249343	up
1779720_at	essential in yeast; plays a role in cell cycle progression	RIO1	3,8813908	up
1778781_at	GTP binding protein (mammalian Ranp homolog) involved in t	GSP2	4,9830694	up
1778955_at	histone acetyltransferase catalytic subunit of the native multis	ESA1	2,7951367	up
1778183_at	ABC transporter highly similar to Pdr5p	PDR10	5,9932933	up
1774122_at	NAD(+)-dependent formate dehydrogenase, may protect cells fr	FDH1 /// FDH2	8,568362	up
1769333_at	Hydrophilin of unknown function; stress induced (osmotic, io	GRE1	22,297194	up

1779057_at	Ulp1 Interacting Protein 4	UIP4	3,3091495	up
1774709_at	DNA polymerase zeta, which is unique in its ability to bypass th	REV3	3,2454007	up
1774838_at	MutL Homolog	MLH3	6,861097	up
1771612_at	ubunit of the COMPASS complex, which methylates histone H3	SPP1	3,5407705	up
1770623_at	Mitochondrial inner membrane transporter, exports 2-oxoadi	ODC1	2,7276747	up
1777053_at	Vacuolar acid trehalase, required for trehalose utilization	ATH1	5,9433885	up
1777711_at	Peripheral membrane protein required for delivery of aminope	ATG11	3,6335196	up
1774390_at	Synergistic to prp19 (NineTeen) mutation. Essential for mRNA	SNT309	10,05351	up
1771633_at	0 kDa ubiquinol cytochrome-c reductase core protein 2	QCR2	3,4646075	up
1770785_at	Tetrameric histone acetyltransferase with similarity to Gcn5p,	HPA2	5,557062	up
1774134_at	N-succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide (SAICAR	ADE1	8,278828	down
1778878_s_at	IMD1 is a probable pseudogene that is located close to the tel	IMD1 /// IMD2	3,7081501	down
1775992_at	Kynurenine 3-mono oxygenase, required for biosynthesis of ni	BNA4	14,957313	down
1779139_at	Cytoplasmic isoleucine-tRNA synthetase, target of the G1-spec	ILS1	3,9265242	down
1775235_at	Histone H2A (HTA1 and HTA2 code for nearly identical protein	HTA2	6,32859	down
1778143_at	FC is a multisubunit DNA binding protein and ATPase that acts	RFC5	2,8140512	down
1774691_at	required for DNA replication	POL30	3,8904662	down
1779615_at	Acid phosphatase, nearly identical to Pho5p; glycosylated; tra	PHO3	6,9978786	down
1772672_at	membrane protein, involved in phosphate transport;	PHO88	2,5825467	down
1779344_at	alcohol dehydrogenase isoenzyme V	ADH5	4,238598	down
1778512_at	Protein that participates in secretory pathway	YSY6	2,495462	down
1778857_at	Urea amidolyase, contains both urea carboxylase and allophan	DUR1,2	5,5455303	down
1774290_at	converts pyruvate to oxaloacetate	PYC2	7,1688695	down
1771246_at	dUTPase, catalyzes the hydrolysis of dUTP to dUMP	DUT1	6,719507	down
1773972_at	S-phase checkpoint protein found at replication forks, required	for DNA replication	2,678263	down
1777477_at	Fatty acid elongase, involved in sphingolipid biosynthesis	FEN1	4,5180373	down
1774930_at	threonine synthase	THR4	3,3442075	down
1770173_at	Stress-Seventy Subfamily B; involved in translation, perhaps by	SSB1	3,771487	down
1775351_at	Zn-finger-containing protein that functions as ADP-ribosylatio	GCS1	2,3530655	down
1776998_at	NAD(+)-dependent glutamate synthase (GOGAT), synthesizes gl	GLT1	4,302968	down
1776604_at	DNA ligase found in the nucleus and mitochondria, an essentia	CDC9	2,8861232	down
1775495_at	Mitotic Chromosome Determinant; similar to S. pombe RAD2	MCD1	11,998494	down
1775473_at	Uroporphyrinogen decarboxylase, catalyzes the fifth step in th	HEM12	2,6468725	down
1775548_at	Protein required for mismatch repair in mitosis and meiosis	MSH6	2,5025089	down
1771591_at	hydroxylates ceramide-1 at C-4 to give ceramide-2	SUR2	3,577101	down
1774142_at	Gtpase-interacting component 2	GIC2	4,2847257	down
1770583_at	Thioredoxin reductase	TRR1	3,0695674	down
1780083_at	Nuclear protein that binds to RNA and to Mex67p, required for	YRA1	3,4751294	down
1770082_at	Guanylate kinase, converts GMP to GDP; required for growth	GUK1	2,7751052	down
1778004_at	Dynein intermediate chain, acts in the cytoplasmic dynein pat	PAC11	8,295613	down
1775448_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL37B	2,067286	down
1775116_at	Growth inhibitory gene	GIN4	3,6659145	down
1774627_at	catalyzes the interconversion of fructose-6-P and mannose-6-P	PMI40	3,2807784	down
1774327_at	Nuclear envelope protein, interacts with GDP-bound Gsp1p	NTF2	2,5021596	down
1774550_at	Inositol phosphosphingolipid phospholipase C, hydrolyzes inc	ISC1	3,6600149	down
1775500_at	Required for Meiotic nuclear Division; functions in DNA replic	GET2	2,2883654	down
1776370_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL2A	2,6964767	down
1777603_at	Quinolate phosphoribosyl transferase, required for biosynth	BNA6	5,9082956	down
1776080_at	Glutamyl-tRNA synthetase (GluRS), forms a complex with meth	GUS1	3,615633	down
1778252_at	Bifunctional enzyme of the 'de novo' purine nucleotide biosyn	ADE5,7	9,967788	down
1777543_at	Integral membrane component of endoplasmic reticulum-der	EMP24	2,6331701	down
1780151_at	Protein that interacts with Rab GTPases;	YIP5	2,5820615	down
1778947_at	Protein that binds tRNA and methionyl- and glutamyl-tRNA syn	ARC1	3,1004288	down
1777134_at	Ribosomal protein L29 of the large (60S) ribosomal subunit	RPL28	2,528087	down
1776299_at	NADH diphosphatase (pyrophosphatase), hydrolyzes the pyrop	NPY1	2,9823515	down
1775263_at	Processing alpha glucosidase I, involved in assembly of cell wal	CWH41	5,4633846	down
1779478_at	tryptophan synthetase	TRP5	3,5408547	down
1771287_at	C-24(28) sterol reductase, catalyzes the final step in ergosterol	ERG4	3,2494397	down
1770155_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS25A	2,101456	down
1780004_at	Formylglycinamide-ribonucleotide (FGAM)-synthetase, cata	ADE6	5,1453137	down
1777207_at	role in DNA replication during S phase	CLB6	4,127881	down
1777639_at	Protein serine/threonine phosphatase with similarity to huma	PPT1	2,165431	down
1777945_at	Polyamine transport protein	TPO2	11,529898	down
1779114_at	Gtp-binding protein of the ras superfamily involved in bud site	RSR1	3,1316948	down
1774348_at	Golgi integral membrane protein; binds to the transport GTPa	YIP1	2,7091973	down
1776155_at	Ribonucleotide-diphosphate reductase (RNR), small subunit; t	RNR4	2,4938927	down
1771687_at	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1-tetrahydrofolate synthas	ADE3	4,3752947	down
1774886_at	Protein required for splicing of the COX1 intron A15 beta;	PET54	3,1146386	down
1778380_at	Mga1p shows similarity to heat shock transcription factor	MGA1	3,18594	down
1780075_at	Transporter of Nicotinic Acid	TNA1	7,6355953	down
1776097_at	-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase, involve	PRS3	2,0464823	down
1777399_at	subunit of the major N alpha-acetyltransferase	ARD1	3,1358035	down
1776023_at	NADP-cytochrome P450 reductase	NCP1	3,2636352	down
1771405_at	ketopantoate reductase	PAN5	3,302265	down
1775237_at	Deoxyhypusine synthase, catalyzes formation of deoxyhypusin	DYS1	2,300538	down
1772676_at	Protein component of the H/ACA snoRNP pseudouridylation con	GAR1	3,1059992	down
1771108_at	,2-diacylglycerol ethanolamine- and cholinephosphotranferas	EPT1	3,3364198	down
1775402_at	Protein with similarity to cyclin-dependent kinase inhibitors	SPL2	3,4612179	down
1778791_at	dCMP deaminase	DCD1	4,0734296	down
1775218_at	6-phosphogluconate dehydrogenase,	GND1	3,5523536	down

1776273_x_at	Inosine monophosphate dehydrogenase, catalyzes the first step in the synthesis of purine nucleotides	IMD2	5,8231163	down
1772712_at	Integral plasma membrane protein required for axial budding	AXL2	3,854237	down
1780161_at	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL16A	2,0346785	down
1770440_at	homo-isocitrate dehydrogenase, an NAD-linked mitochondrial enzyme	LYS12	4,03372	down
1774604_at	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	THS1	2,804432	down
1773600_at	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in the synthesis of serine	SER33	3,403569	down
1777429_at	cytochrome b reductase	CBR1	2,0286326	down
1770766_at	component of the telomerase holoenzyme, involved in telomere maintenance	EST3	2,3620844	down
1770205_at	nitrogen starvation-induced protein phosphatase	YVH1	3,3299067	down
1769885_at	Elongase I, medium-chain acyl elongase, catalyzes carboxy-terminal elongation of fatty acids	ELO1	8,321539	down
1770075_at	Mitochondrial iron transporter of the mitochondrial carrier family	MRS3	2,876412	down
1769703_at	Protein required for cell viability	PHS1	3,888345	down
1772514_at	required during cell division for faithful partitioning of the ER	SCP160	4,6553864	down
1775384_at	Arylformamidase, involved in biosynthesis of nicotinic acid from tryptophan	BNA3	2,4716592	down
1777819_at	delta DNA polymerase activity	POL32	2,7395854	down
1771778_at	Transfers mannose residues from dolichyl phosphate-D-mannose to proteins	PMT4	3,9499526	down
1778550_at	Protein with similarity to heat shock transcription factors; involved in DNA replication	HMS2	4,7280016	down
1777971_at	phosphoglucomutase, minor isoform	PGM1	9,436879	down
1772718_at	42 kDa subunit of V1 sector	VMA5	3,3322759	down
1770765_at	Subunit of DNA primase, which is required for DNA synthesis at replication forks	PRI2	4,4656987	down
1774705_at	NAD-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	MTD1	4,1089764	down
1775754_at	Non-essential component of the HAT-B histone acetyltransferase complex	HIF1	3,5153382	down
1769858_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL15A	3,5903413	down
1777610_at	signal peptidase subunit	SPC3	3,2349496	down
1771269_at	DNA replication initiation factor	CDC45	3,4530709	down
1778865_at	associated with 60S pre-ribosomes	MDN1	3,5060947	down
1774947_at	transcription factor that binds to a number of promoter regions	TOS4	7,9731092	down
1770284_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, involved in protein synthesis	RPL37A	2,1312997	down
1769903_at	Gamma-tubulin, involved in nucleating microtubules from centrosomes	TUB4	5,889778	down
1769455_at	Endochitinase, required for cell separation after mitosis; transmits signals	CTS1	6,3283024	down
1771172_at	NAD(+) salvage pathway	NMA1	2,5927153	down
1770154_at	Involved in DNA-replication-linked nucleosome assembly	CAC2	2,1548388	down
1776558_at	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	HXT2	17,638191	down
1771500_at	Subunit of a complex with Ctf8p that shares some subunits with the other complex	CTF18	3,7288158	down
1778189_at	Enzyme of 'de novo' purine biosynthesis	ADE17	8,999213	down
1774255_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, involved in protein synthesis	RPL15B	2,1753647	down
1770344_at	ligosaccharyl transferase glycoprotein complex	SWP1	3,1838162	down
1770267_at	Mitochondrial inner membrane transporter, involved in iron transport	ATM1	2,9800446	down
1770754_at	NADPH-dependent alcohol dehydrogenase	ADH6	5,355168	down
1776235_at	DNA polymerase II	POL2	3,702954	down
1775109_at	alpha-tubulin foldin; protein implicated in folding of alpha-tubulin	ALF1	3,4804256	down
1774764_at	Nicotinamide riboside kinase, catalyzes the synthesis of nicotinamide riboside	NRK1	3,1297145	down
1776526_at	Catalytic subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex	POL1	7,1475053	down
1775076_at	Ribonuclease H2 catalytic subunit, removes RNA primers during DNA replication	RNH201	6,22107	down
1772003_at	Seventh step in lysine biosynthesis pathway	LYS9	6,149875	down
1770923_at	THI for thiamine metabolism	THI20	3,6310568	down
1776672_at	Calmodulin-dependent protein kinase	CMK2	7,2379484	down
1772033_at	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalyzes a step in the synthesis of purine nucleotides	ADE2	6,8552623	down
1776346_at	Ferrochelatase, a mitochondrial inner membrane protein, catalyzes the final step in heme synthesis	HEM15	5,05535	down
1774801_at	phosphoserine transaminase	SER1	7,557162	down
1779549_at	Dihydrofolate reductase, part of the dTTP biosynthetic pathway	DFR1	2,3918407	down
1776003_at	Protein involved in protein import into ER	SEC63	3,688024	down
1778686_at	Polyamine transport protein	TPO4	3,1344807	down
1776084_at	AdoMet-homocysteine methyltransferase	SAM4	4,8820224	down
1776068_at	involved in vanadate resistance	SVS1	12,868804	down
1777843_at	phosphatidylinositol synthase	PIS1	3,2288678	down
1774860_at	Dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man) synthase of the ER membrane	DPM1	2,8821785	down
1779075_at	Oligopeptide transporter; member of the OPT family	OPT2	13,3291855	down
molecular_function	protein binding 331			
molecular_function	catalytic activity 285			
molecular_function	identical protein binding 67			
cellular_component	mitochondrion 157			
1775303_at	Mitochondrial peroxiredoxin (1-Cys Prx) with thioredoxin peroxidase activity	PRX1	6,73167	up
1778053_at	Putative plasma membrane protein of unknown function, transmembrane protein	YRO2	2,523491	up
1774908_at	GTPase-activating protein that negatively regulates RAS	IRA1	2,696025	up
1772934_at	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitochondria	FMP21	4,1946435	up
1770695_at	thiol-disulfide exchange intermediate activity	TRX3	4,2411284	up
1771782_at	ATPase stabilizing factor	STF1	3,2254887	up
1775244_at	inositol/phosphatidylinositol kinase activity	OMS1	2,2765977	up
1772978_at	Cytosolic metalloprotease; computational analysis of large-scale proteomics	CYM1	2,2027996	up
1773917_at	Protein of the mitochondrial intermembrane space, required for mitochondrial import	ACN9	3,808902	up
1779115_at	high copy suppressor of imp1 mutation, may be required for transcription	SOM1	2,1620688	up
1778130_at	transcription is induced under conditions of zinc deficiency	ZRG8	3,7746427	up
1778093_at	Protein required for the hydroxylation of heme O to form heme b	COX15	2,8171842	up
1776150_at	Subunit VIa of cytochrome c oxidase, which is the terminal membrane protein of the cytochrome c oxidase complex	COX13	5,167373	up
1778638_at	, mRNA is targeted to the bud via the mRNA transport system in yeast	TAM41	2,3013613	up
1777238_at	Essential for the expression and activity of ubiquinol-cytochrome b	CBP4	4,4256463	up
1776680_at	Protein required for survival at high temperature during stationary phase	SPG1	30,172096	up
1777561_at	protein was localized to mitochondria	FMP43	3,2969573	up
1773454_at	ubiquitin-like conjugating enzyme activity	ATG7	2,1818056	up

1777556_at	Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase; expressed	GUT2	3,7716584	up
1774888_at	succinate dehydrogenase (ubiquinone) activity		18,276398	up
1775932_at	Mitochondrial inner membrane protein, required for assembly	COX16	2,3407454	up
1773329_at	Phospholipid methyltransferase (methylene-fatty-acyl-phosph	OPI3	3,4738443	up
1776064_at	Repressed by glucose, induced by lactic acid; in high copy	JEN1	2,7353346	up
1776576_at	Involved in mitochondrial biogenesis	MBR1	9,858804	up
1774833_at	Copper metallochaperone that shuttles copper from the cytosol	COX17	2,0668952	up
1770968_at	ubunit VIb of cytochrome c oxidase, which is the terminal mem	COX12	4,588261	up
1779284_at	Specific translational activator for the COX1 mRNA, also influ	PET309	3,3900864	up
1779688_at	homologous to TIM18p		6,721467	up
1779774_at	helicase activity	IRC20	5,190028	up
1773431_at	Mitochondrial membrane protein, required for assembly of cy	COX14	2,6516733	up
1778780_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL39	2,3270428	up
1773134_at	Component, with Afg3p, of the mitochondrial inner membran	YTA12	2,5864863	up
1778209_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subuni	MRPL33	2,521029	up
1769977_at	Subunit b of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP syntha	ATP4	2,08985	up
1776686_at	Mitochondrial isoleucyl-tRNA synthetase	ISM1	2,2868288	up
1770947_at	2-methylisocitrate lyase of the mitochondrial matrix, function	ICL2	3,4320767	up
1776574_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL51	2,1391008	up
1779972_at	involved in secretion of proteins that lack classical secretory si	NCE102	2,1605065	up
1771566_at	Protein that forms a heterotrimeric complex with Erp2p, Emp24p, and Erv25p; membe		2,3736792	down
1775760_at	ER protein involved in very long chain fatty acid synthesis	TSC13	2,898649	down
1771840_at	fumarate reductase (NADH) activity		5,895464	down
1778611_at	Cytosolic ribosome-associated chaperone, contains a DnaJ dom	ZUO1	2,5031087	down
1777048_at	Widely conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mo	OYE2	2,1904974	down
1769943_at	aconitate hydratase activity	ACO2	4,6800776	down
1769484_at	Mitochondrial inner membrane transporter, exports mitoch	ATM1	2,116201	down
1771817_at	hosphatidylserine decarboxylase of the mitochondrial inner m	PSD1	2,0353763	down
1770385_at	required for growth on glycerol as a carbon source	GDS1	2,0244951	down
cellular_component	mitochondrial envelope 72			
1774485_at	mitochondrial membrane protein	MPM1	4,6922555	up
1771645_at	protein secretion	SUE1	6,4499135	up
cellular_component	mitochondrial inner membrane 45			
1773702_at	<i>S. cerevisiae</i> YMR118C /GEN=SPC24		25,48618	up
cellular_component	organelle inner membrane 46			
cellular_component	mitochondrial membrane 65			
cellular_component	organelle envelope 81			
cellular_component	envelope 81			
cellular_component	mitochondrial part 84			
biological_process	small molecule metabolic process 112			
biological_process	single-organism metabolic process 179			
1779905_at	Isocitrate lyase, catalyzes the formation of succinate and glyox	ICL1	2,1921585	up
1779413_at	L-homoserine-O-acetyltransferase, catalyzes the conversion of	MET2	2,4016798	up
1771908_at	involved in cellular adaptations prior to stationary phase	YGP1	3,1936092	up
1776285_at	proline-specific permease (also capable of transporting alanine	PUT4	2,2113497	up
1770518_at	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	QRI1	2,7965024	down
1773272_at	Cytoplasmic arginyl-tRNA synthetase		3,713642	down
1770575_at	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	URH1	2,5517638	down
1780211_at	Proteolipid subunit of the vacuolar H(+)-ATPase V0 sector (sub	CUP5	2,391847	down
1771863_at	involved in UDP-N-acetylglucosamine biosynthesis	GNA1	3,2884402	down
1771458_at	phosphoserine phosphatase	SER2	5,1743255	down
1779820_at	Subunit c" of the vacuolar ATPase, which functions in acidifica	PPA1	2,2428684	down
1780155_at	pantothenate biosynthesis	PAN6	7,407995	down
1779675_at	Phosphoribosyl-5-amino-1-phosphoribosyl-4- imidazolecarbo	HIS6	2,0571496	down
1774675_at	Ribonucleotide-diphosphate reductase (RNR), small subunit; t	RNR2	2,111293	down
1773375_at	involved in DNA repair; mutant is sensitive to the base analog,	HAM1	2,5943694	down
1776523_at	Cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase, homodimeric enzyme t	DPS1	2,5194569	down
1773863_at	Transaldolase, enzyme in the pentose phosphate pathway	TAL1	2,3087494	down
1773614_at	Low-affinity phosphate transporter; deletion of pho84, pho87	PHO91	2,4135394	down
1772939_at	glutaminyl-tRNA synthetase /	GLN4	2,0248907	down
molecular_function	oxidoreductase activity 65			
biological_process	oxidation-reduction process 84			
biological_process	organonitrogen compound metabolic process 98			
biological_process	organophosphate metabolic process 54			
biological_process	generation of precursor metabolites and energy 40			
cellular_component	mitochondrial membrane part 29			
biological_process	nucleoside phosphate metabolic process 42			
biological_process	nucleotide metabolic process 41			
biological_process	nucleobase-containing small molecule metabolic process 45			
biological_process	energy derivation by oxidation of organic compounds 35			
biological_process	aerobic respiration 24			
biological_process	cellular respiration 28			
biological_process	tricarboxylic acid cycle 12			
cellular_component	respiratory chain 12			
biological_process	nucleotide biosynthetic process 30			
biological_process	nucleoside phosphate biosynthetic process 30			

Açık kaynaklı mikrodizi verilerinin analizi sonucunda elde edilen sıcaklık değişim uygulaması öncesinde gen ifade düzeylerinde iki kat ve üzeri değişim gösteren tüm genler

C6h-TC1h				
Probe Set ID	Putative Annotation	Gene Symbol	Fold Change	Regulation
molecular_function	binding 281			
1772915_at	acetate-CoA ligase activity	ACS1	2,338158	up
1770632_at	mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV3	5,542874	up
1779425_at	Cytochrome c heme lyase (holocytochrome c synthase),	CYC3	2,9639058	up
1778223_at	carnitine acetyltransferase, mitochondrial	YAT1	6,0343914	up
1776193_at	Amino acid transport protein for valine, leucine, isoleucine, ar	TAT1	2,9025805	up
1769852_at	Necessary for maintenance of dsRNA killer plasmids	MAK5	4,356275	up
1771650_at	Protein of unknown function involved in bud growth in the m	REI1	5,695601	up
1773972_at	S-phase checkpoint protein found at replication forks, require	MRC1	2,9128208	up
1779753_at	Protein kinase of the bud neck involved in the septin checkpoi	KCC4	3,839709	up
1774087_at	Protein required for spore wall formation	ADY3	2,7593255	up
1769986_at	Substrate of the Hub1p ubiquitin-like protein	HBT1	4,1449175	up
1771703_at	homocitrate synthase	LYS20	9,716696	up
1769959_at	mitochondrion	NDE2	4,0585895	up
1771012_at	Twenty S rRNA accumulation	TSR1	3,2675583	up
1776596_at	Tsubunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV1	7,89718	up
1776304_at	Catalase A, breaks down hydrogen peroxid	CTA1	2,2830966	up
1776262_at	Enzyme involved in de novo purine biosynthesis	HPT1	3,5543373	up
1778215_at	Purine-cytosine permease, mediates purine (adenine, guanine,	FCY2	5,392297	up
1779031_at	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in s	SER3	17,844112	up
1770767_at	Alanine : glyoxylate aminotransferase, catalyzes the synthesis d	AGX1	9,324904	up
1773281_at	DNA-dependent ATPase, stimulates strand exchange by modify	RAD54	2,9170675	up
1771915_at	converts pyruvate to oxaloacetate	PYC1	11,863408	up
1775820_at	vitamin H transporter	VHT1	4,3419104	up
1772508_at	Nucleolar protein involved in rRNA processing and 60S ribosom	NOP7	4,553193	up
1777405_at	Nucleolar protein involved in the assembly of the large ribosom	RPF1	2,5736773	up
1778666_at	Hexose transporter with moderate affinity for glucose, may fur	HXT5	9,56827	up
1769448_at	positive regulator of exit from mitosis	SPO12	6,158971	up
1770592_at	specific RNA polymerase II transcription factor activity	SIP4	8,4571	up
1770352_at	Ornithine carbamoyltransferase catalyzes the sixth step in the l	ARG3	5,037826	up
1774072_at	Mitochondrial succinate-fumarate transporter,	SFC1	7,71896	up
1778312_at	RNA polymerase II transcription factor activity	PHD1	3,5092905	up
1777196_at	phosphoenolpyruvate carboxylkinase	PCK1	12,910842	up
1779660_at	Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase, catalyzes ox	IDP2	22,03327	up
1771392_at	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bo	FRE1	6,30424	up
1776768_at	Fructose-1,6-bisphosphatase, required for glucose metabolism	FBP1	40,612705	up
1774377_at	Carnitine O-acetyltransferase	CAT2	3,513309	up
1772511_at	Snooze: stationary phase-induced gene family; involved in cell	SNZ1	18,437014	up
1779922_at	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV2	9,974674	up
1775736_at	Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase catalyzes first	ADE4	4,1486917	up
1774070_at	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II catalyzes activiti	ADH2	13,302064	up
1775729_at	carbon-catabolite sensitive malate synthase	MLS1	8,873544	up
1778884_at	Translational elongation factor EF-3	HEF3	13,075739	up
1772699_at	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression in	FRE7	16,28291	up
1771396_at	Essential nucleolar protein required for biogenesis of the 60S r	BRX1	3,281058	up
1779309_at	Arginosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argini	ARG1	4,3471904	up
1779097_at	Ribose-5-phosphate ketol-isomerase	RKI1	6,703914	up
1776285_at	proline-specific permease (also capable of transporting alanine	PUT4	7,1263003	up
1779399_at	S-adenosylMethionine Permease	SAM3	30,910746	up
1771419_at	protein serine/threonine kinase activity	SKS1	12,490306	up
1778788_at	Ubiquitin-conjugating enzyme that mediates degradation of sh	UBC4	4,72195	down
1779408_at	regulator of glucose influx into the cell & into glycolytic pathw	TPS1	3,1969562	down
1769643_at	HSP70 family member	SSE2	3,0150023	down
1769683_at	leucine biosynthesis	LEU2	9,799204	down
1778227_at	putative protein kinase with similarity to mammalian glycogen	MRK1	5,778707	down
1776528_at	Similar to GPM1 (phosphoglycerate mutase); converts 3-phosph	GPM2	6,5087357	down
1774376_at	Aspartic beta semi-aldehyde dehydrogenase, catalyzes the seco	HOM2	3,2118652	down
1776550_at	Similar to HSP26	HSP42	4,192537	down

C6h-TC1h				
Probe Set ID	Putative Annotation	Gene Symbol	Fold Change	Regulation
	binding 281			
1772915_at	acetate-CoA ligase activity	ACS1	2,338158	up
1770632_at	mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV3	5,542874	up
1779425_at	Cytochrome c heme lyase (holocytochrome c synthase),	CYC3	2,9639058	up
1778223_at	carnitine acetyltransferase, mitochondrial	YAT1	6,0343914	up
1776193_at	Amino acid transport protein for valine, leucine, isoleucine, ar	TAT1	2,9025805	up
1769852_at	Necessary for maintenance of dsRNA killer plasmids	MAK5	4,356275	up
1771650_at	Protein of unknown function involved in bud growth in the m	REI1	5,695601	up
1773972_at	S-phase checkpoint protein found at replication forks, require	MRC1	2,9128208	up
1779753_at	Protein kinase of the bud neck involved in the septin checkpoi	KCC4	3,839709	up
1774087_at	Protein required for spore wall formation	ADY3	2,7593255	up
1769986_at	Substrate of the Hub1p ubiquitin-like protein	HBT1	4,1449175	up
1771703_at	homocitrate synthase	LYS20	9,716696	up
1769959_at	mitochondrion	NDE2	4,0585895	up
1771012_at	Twenty S rRNA accumulation	TSR1	3,2675583	up
1776596_at	T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV1	7,89718	up
1776304_at	Catalase A, breaks down hydrogen peroxid	CTA1	2,2830966	up
1776262_at	Enzyme involved in de novo purine biosynthesis	HPT1	3,5543373	up
1778215_at	Purine-cytosine permease, mediates purine (adenine, guanine,	FCY2	5,392297	up
1779031_at	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in s	SER3	17,844112	up
1770767_at	Alanine: glyoxylate aminotransferase, catalyzes the synthesis o	AGX1	9,324904	up
1773281_at	DNA-dependent ATPase, stimulates strand exchange by modify	RAD54	2,9170675	up
1771915_at	converts pyruvate to oxaloacetate	PYC1	11,863408	up
1775820_at	vitamin H transporter	VHT1	4,3419104	up
1772508_at	Nucleolar protein involved in rRNA processing and 60S ribosom	NOP7	4,553193	up
1777405_at	Nucleolar protein involved in the assembly of the large ribosom	RPF1	2,5736773	up
1778666_at	Hexose transporter with moderate affinity for glucose, may fur	HXT5	9,56827	up
1769448_at	positive regulator of exit from mitosis	SPO12	6,158971	up
1770592_at	specific RNA polymerase II transcription factor activity	SIP4	8,4571	up
1770352_at	Ornithine carbamoyltransferase catalyzes the sixth step in the	ARG3	5,037826	up
1774072_at	Mitochondrial succinate-fumarate transporter,	SFC1	7,71896	up
1778312_at	RNA polymerase II transcription factor activity	PHD1	3,5092905	up
1777196_at	phosphoenolpyruvate carboxylkinase	PCK1	12,910842	up
1779660_at	Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase, catalyzes ox	IDP2	22,03327	up
1771392_at	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bo	FRE1	6,30424	up
1776768_at	Fructose-1,6-bisphosphatase, required for glucose metabolism	FBP1	40,612705	up
1774377_at	Carnitine O-acetyltransferase	CAT2	3,513309	up
1772511_at	Snooze: stationary phase-induced gene family; involved in cell	SNZ1	18,437014	up
1779922_at	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV2	9,974674	up
1775736_at	Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase catalyzes first	ADE4	4,1486917	up
1774070_at	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II catalyzes activiti	ADH2	13,302064	up
1775729_at	carbon-catabolite sensitive malate synthase	MLS1	8,873544	up
1778884_at	Translational elongation factor EF-3	HEF3	13,075739	up
1772699_at	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression in	FRE7	16,28291	up
1771396_at	Essential nucleolar protein required for biogenesis of the 60S r	BRX1	3,281058	up
1779309_at	Arginosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argini	ARG1	4,3471904	up
1779097_at	Ribose-5-phosphate ketol-isomerase	RKI1	6,703914	up
1776285_at	proline-specific permease (also capable of transporting alanine)	PUT4	7,1263003	up
1779399_at	S-adenosylMethionine Permease	SAM3	30,910746	up
1771419_at	protein serine/threonine kinase activity	SKS1	12,490306	up
1778788_at	Ubiquitin-conjugating enzyme that mediates degradation of sh	UBC4	4,72195	down
1779408_at	regulator of glucose influx into the cell & into glycolytic pathw	TPS1	3,1969562	down
1769643_at	HSP70 family member	SSE2	3,0150023	down
1769683_at	leucine biosynthesis	LEU2	9,799204	down
1778227_at	putative protein kinase with similarity to mammalian glycogen	MRK1	5,778707	down
1776528_at	Similar to GPM1 (phosphoglycerate mutase); converts 3-phosp	GPM2	6,5087357	down
1774376_at	Aspartic beta semi-aldehyde dehydrogenase, catalyzes the seco	HOM2	3,2118652	down
1776550_at	Similar to HSP26	HSP42	4,192537	down

biological_process	oxidation-reduction process 51			
molecular_function	identical protein binding 44			
1777517_at	serine-type peptidase activity	RRT12	5,130456	up
1776151_at	Mitochondrial Translation Optimization	MTO1	2,6256106	up
1777020_at	Core interacting component 1	CIC1	2,6754441	up
1772676_at	Protein component of the H/ACA snoRNP pseudouridylyase complex	GAR1	2,56795	up
1778040_at	cell wall organization and biogenesis	ECM4	2,7863474	up
1779813_at	RNA polymerase I subunit	RPA49	2,3046205	up
1773722_at	Ubiquitin-specific protease that deubiquitinates ubiquitin-proteasome substrates	UBP10	3,2148948	up
1775734_at	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, mediates copper homeostasis	CTR1	4,9420776	up
1773888_at	catalyzes one of the two reactions involved in the transsulfuration of methionine	CYS3	2,3206947	down
1770900_at	Putative serine/threonine protein kinase most similar to cyclin-dependent kinase 2	Putative serine/threonine kinase	2,8130968	down
1770797_at	YDR100W	TVP15	4,1716986	down
1772646_at	Protein of unknown function with a possible role in glutathione homeostasis	GTT3	2,150358	down
1769481_at	Twinfilin A is a member of a conserved family of actin monomer-binding proteins	TWF1	2,8491113	down
1772048_at	Involved in cytoskeletal organization and cellular growth	VRP1	2,6064575	down
1770139_at	Contains three calcium and lipid binding domains	TCB3	2,1880713	down
1775541_at	One of two identical histone H3 proteins	HHT2	3,7264504	down
1776953_at	homologous to RBD1	RBD2	3,1827195	down
biological_process	carbohydrate metabolic process 42			
1773594_at	Part of the complex locus MAL3	MAL31	2,359854	up
1769466_at	identical at amino acid level to Kre9p	KNH1	4,7082896	up
1775397_at	Mannosidase, GPI-anchored membrane protein required for cell wall assembly	DCW1	2,3993182	up
1776531_at	Trehalose-6-phosphate phosphatase	TPS2	3,8282893	down
1776708_at	involved in release from glucose repression	SNF4	3,0840144	down
1776944_at	Part of MAL1 complex locus; encodes funct. maltose permease	MAL11	6,116644	down
1770506_at	beta-fructofuranosidase activity	SUC2	4,7737055	down
1773766_at	Protein of unknown function, localizes to the cell wall	GAS3	10,369084	down
1770529_at	YOL032W	OPI10	7,94131	down
1780177_at	Protein of unknown function, localizes to the cell wall	GAS5	2,817653	down
1778597_at	cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex	PCL8	2,1569688	down
1774860_at	Dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man) synthase of the ER membrane		2,1734378	down
biological_process	disaccharide metabolic process 10			
biological_process	cellular carbohydrate metabolic process 23			
molecular_function	ATPase regulator activity 7			
1779107_at	Hsp70 (Ssa1p) nucleotide exchange factor	FES1	3,660151	down
1779214_at	HSP Seventy Required for efficient translocation of protein precursors	LHS1	2,3902414	down
biological_process	trehalose biosynthetic process 6			
biological_process	oligosaccharide biosynthetic process 6			
biological_process	disaccharide biosynthetic process 6			

Açık kaynaklı mikrodizi verilerinin analizi sonucunda elde edilen sıcaklık değişim uygulaması sonrasında gen ifade düzeylerinde iki kat ve üzeri değişim gösteren tüm genler

TC6h-TC1h				
Probe Set ID	Putative Annotation	Gene Symbol	Fold Change	Regulation
molecular_function	binding 306			
1772915_at	acetate-CoA ligase activity	ACS1	6,37424	up
1779425_at	Cytochrome c heme lyase (holocytochrome c synthase),	CYC3	2,2593064	up
1778223_at	carnitine acetyltransferase, mitochondrial	YAT1	22,402533	up
1776352_at	Alpha subunit of the F1 sector of mitochondrial F1FO ATP synt	ATP1	2,386406	up
1777840_at	Major ADP/ATP carrier of the mitochondrial inner membrane	PET9	2,7704282	up
1776193_at	Amino acid transport protein for valine, leucine, isoleucine, ar	TAT1	4,1410956	up
1769852_at	Necessary for maintenance of dsRNA killer plasmids	MAK5	3,4701254	up
1778029_at	Probable AMP-binding protei	PCS60	2,4493124	up
1771650_at	Protein of unknown function involved in bud growth in the m	REI1	6,1303988	up
1778479_at	catabolism of hydroxy amino acids	CHA1	2,405583	up
1773972_at	S-phase checkpoint protein found at replication forks, require	MRC1	2,8438137	up
1777517_at	serine-type peptidase activity	RRT12	3,5356174	up
1774087_at	Protein required for spore wall formation	ADY3	3,3726773	up
1769986_at	Substrate of the Hub1p ubiquitin-like protein	HBT1	14,5833645	up
1775468_at	small nuclear ribonucleoprotein complex	NHP2	3,6060927	up
1771703_at	homocitrate synthase	LYS20	14,295596	up
1779631_at	Cullin, structural protein of SCF complexes	CDC53	2,969416	up
1769959_at	mitochondrion	NDE2	6,807245	up
1772223_at	Mitochondrial NADP-specific isocitrate dehydrogenase	IDP1	2,55542	up
1771012_at	Twenty S rRNA accumulation	TSR1	2,882977	up
1776596_at	T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV1	2,04143	up
1775412_at	Suppressor of hydroxy-urea sensitivity	SHU2	3,1316812	up
1776226_at	Serine/threonine protein kinase	KIN1	2,1654615	up
1774084_at	Transcription factor required for derepression of inositol-cho	INO2	2,5764518	up
1776304_at	Catalase A, breaks down hydrogen peroxid	CTA1	4,233321	up
1774145_at	Suppressor of mar1-1 (sir2) mutation	SUM1	2,8272934	up
1770799_at	Protein associated with mitochondrial ATP synthase	TIM11	2,1179006	
1776262_at	Enzyme involved in de novo purine biosynthesis	HPT1	2,0082793	up
1772978_at	Cytosolic metalloprotease	CYM1	2,2059896	up
1771320_at	GTPase that associates with nuclear 60S pre-ribosomes	NUG1	2,788297	up
1778215_at	Purine-cytosine permease, mediates purine (adenine, guanine,	FCY2	3,1244638	up
1779031_at	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in s	SER3	7,267659	up
1775918_at	histone fold-containing protein homologous to one of the sub	BUR6	2,9884934	up
1770767_at	Alanine : glyoxylate aminotransferase, catalyzes the synthesis o	AGX1	13,408086	up
1776687_at	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabol	GAT1	2,102872	up
1776151_at	Mitochondrial Translation Optimization	MTO1	4,6974897	up
1776136_at	involved in the response to glucose starvation	SIP2	3,9076364	up
1774903_at	ATP-dependent RNA helicase CA3 of the DEAD/DEAH box family	DBP3	2,8615553	up
1771915_at	converts pyruvate to oxaloacetate	PYC1	14,284499	up
1779272_at	homolog of pombe SDS23; localizes to spindle pole body	SDS23	3,7277071	up
1775820_at	vitamin H transporter	VHT1	4,956753	up
1777536_at	has similarity to Adr1p DNA-binding domain		18,457842	up
1772508_at	Nucleolar protein involved in rRNA processing and 60S ribosom	NOP7	3,9654384	up
1771789_at	Essential protein with two zinc fingers, present in the nucleus	ZPR1	3,2536285	up
1769845_at	Glycerol kinase, converts glycerol to glycerol-3-phosphate	GUT1	2,3871958	up
1770321_at	Mrs5p in mitochondrial protein import or other related essen	TIM10	3,1052108	up
1777020_at	Core interacting component 1	CIC1	2,8716874	up
1770201_at	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	CPR2	2,0639112	up
1777405_at	Nucleolar protein involved in the assembly of the large ribosom	RPF1	4,45137743	up
1778666_at	Hexose transporter with moderate affinity for glucose, may fur	HXT5	15,675221	up
1769448_at	positive regulator of exit from mitosis	SPO12	3,9074087	up
1780128_at	Molecular chaperone, required for the assembly of alpha and b	ATP12	2,4924865	up
1773161_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL49	2,346827	up
1770592_at	specific RNA polymerase II transcription factor activity	SIP4	11,766579	up
1770352_at	Ornithine carbamoyltransferase catalyzes the sixth step in the	ARG3	9,582723	up
1774072_at	Mitochondrial succinate-fumarate transporter,	SFC1	37,601357	up
1779912_at	Putative serine/threonine protein kinase	PTK1	2,500543	up

1780009_at	ATP-dependent RNA helicase activity	SNU114	2,7089887	
1778312_at	RNA polymerase II transcription factor activity	PHD1	2,0020132	up
1772148_at	Phospholipase D, catalyzes the hydrolysis of phosphatidylcholin	SPO14	3,0210145	up
1772694_at	Glycerol-3-phosphate acyltransferase located in both lipid par	GPT2	2,818714	up
1778040_at	cell wall organization and biogenesis	ECM4	3,8100445	up
1777196_at	phosphoenolpyruvate carboxylkinase	PCK1	19,725775	up
1778233_at	S-MethylMethionine Permease	MMP1	2,4349394	up
1769935_at	Mitochondrial matrix protein involved in biogenesis of the iro	ISA1	2,19756	up
1774833_at	Copper metallochaperone that shuttles copper from the cytos	COX17	3,0021982	up
1775690_at	Ribosome Control Ric1p binds to Rgp1p, on the Golgi	RIC1	2,29276	up
1779660_at	Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase, catalyzes ox	IDP2	38,261665	up
1771392_at	Ferric reductase and cupric reductase, reduces siderophore-bo	FRE1	9,112154	up
1774453_at	Dead-Box Protein 9	DBP9	4,3860455	up
1776768_at	Fructose-1,6-bisphosphatase, required for glucose metabolism	FBP1	67,17215	up
1773919_at	Subunit VIII of cytochrome c oxidase	COX8	2,2048554	up
1774377_at	Carnitine O-acetyltransferase	CAT2	8,902264	up
1775433_at	Mitochondrial inner membrane ADP/ATP translocator	AAC1	3,0106049	up
1772511_at	Snooze: stationary phase-induced gene family; involved in cell	SNZ1	5,18069	up
1777997_at	Non-essential P-type ATPase that is a potential aminophospho	DNF3	3,124107	up
1779922_at	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	GCV2	2,172247	up
1774070_at	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II catalyzes activiti	ADH2	16,7568	up
1771893_at	RNA-binding protein that interacts with the C-terminal domain	NRD1	5,4480476	up
1773722_at	Ubiquitin-specific protease that deubiquitinates ubiquitin-pro	UBP10	2,819108	up
1775729_at	carbon-catabolite sensitive malate synthase	MLS1	16,86387	up
1778912_at	RNA m(5)C methyltransferase, essential for processing and ma	NOP2	3,9103217	up
1778884_at	Translational elongation factor EF-3	HEF3	13,840388	up
1772239_at	Significant sequence similarity to RPL7B	RLP7	2,748162	up
1778423_at	Protein required for cell viability	TRM112	2,5145555	up
1772699_at	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression in	FRE7	48,272675	up
1773182_at	ubunit of cleavage factor I, a five-subunit complex required for	HRP1	6,6365104	up
1778951_at				
1771396_at	Essential nucleolar protein required for biogenesis of the 60S r	BRX1	2,9844637	up
1779309_at	Arginosuccinate synthetase, catalyzes the formation of L-argini	ARG1	3,237943	up
1779097_at	Ribose-5-phosphate ketol-isomerase	RKI1	12,646449	up
1774778_at	Mitochondrial inner membrane carnitine transporter, require	CRC1	5,499494	up
1771629_at	Involved in silencing at telomeres	SAS5	2,480632	up
1778183_at	Putative ABC transporter highly similar to Pdr5p	PDR10	4,6914725	up
1776285_at	proline-specific permease (also capable of transporting alanine	PUT4	26,383305	up
1779399_at	S-adenosylMethionine Permease	SAM3	13,111797	up
1770087_at	Fumarase, converts fumaric acid to L-malic acid in the TCA cycl	FUM1	3,5074637	up
1774313_at	GTP-binding protein required for processing of 35S pre-rRNA	BMS1	3,4300315	up
1775150_at	Nip7p is required for 60S ribosome subunit biogenesis	NIP7	2,6666489	up
1770623_at	Mitochondrial inner membrane transporter, exports 2-oxoadi	ODC1	5,430443	up
1769977_at	Subunit b of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP syntha	ATP4	3,5723135	up
1771992_at	Nucleolar protein, essential for processing and maturation of 2	NOP4	4,3437953	up
1776686_at	Mitochondrial isoleucyl-tRNA synthetase	ISM1	2,9018795	up
1771419_at	protein serine/threonine kinase activity	SKS1	9,057989	up
1775005_at	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	MRPS16	3,6298473	up
1774757_at	Required for normal pre-rRNA Processing.	RRP12	3,2354639	up
1777889_at	Required for mitotic chromosome segregation	CHL1	2,5843859	up
1776887_at	Mitochondrial Distribution and Morphology	MDM36	3,8772097	up
1775734_at	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, med	CTR1	9,870892	up
1771401_at	Putative acyltransferase	TAZ1	3,8319523	up
1770538_at	Arsenate reductase required for arsenate resistance;	ARR2	5,1315446	up
1772848_at	Exhibits physical and genetic interactions with FRT1	FRT2	2,6914775	down
1773888_at	catalyzes one of the two reactions involved in the transsulfurat	CYS3	2,6467624	down
1777495_at	Peripheral membrane protein that interacts with the plasma m	AST1	2,7925656	down
1777647_s_at	Histone H2A	HTA1 /// HTA2	2,9818435	down
1778426_s_at	One of two identical histone H4 proteins	HHF1 /// HHF2	3,5234354	down
1773019_at	One of two identical histone H3 proteins	HHT1	2,1168964	down
1778788_at	Ubiquitin-conjugating enzyme that mediates degradation of sh	UBC4	4,086332	down
1778143_at	RFC is a multisubunit DNA binding protein and ATPase that act	RFC5	3,7473106	down
1773681_at	also involved in vacuolar protein targeting	VID24	8,69028	down
1779408_at	regulator of glucose influx into the cell & into glycolytic pathw	TPS1	3,1815894	down
1769643_at	HSP70 family member	SSE2	2,6075125	down
1772700_at	Diadenosine 5',5''-P1,P4-tetraphosphate phosphorylase I (AP4	APA1	3,9638338	down
1769683_at	leucine biosynthesis	LEU2	9,955535	down
1776959_at	omponent of the septin ring of the mother-bud neck that is rec	CDC10	2,0708556	down
1770900_at	Putative serine/threonine protein kinase most similar to cyclic	KIN82	2,5008333	down
1776814_at	Rho GDP dissociation inhibitor with activity toward Rho1p	RDI1	2,4759612	down
1778227_at	putative protein kinase with similarity to mammalian glycogen	MRK1	16,04792	down
1774780_at	fatty acyltransferase homologous to E. coli plcC gene	SLC1	2,6175654	down
1776528_at	Similar to GPM1 (phosphoglycerate mutase); converts 3-phosp	GPM2	6,0363164	down
1771282_at	Yeast Ran Binder	YRB1	2,3811479	down
1773253_at	Basic protein with putative coiled-coil regions that comprises	FIN1	2,3361957	down
1774376_at	Aspartic beta semi-aldehyde dehydrogenase, catalyzes the seco	HOM2	3,0209353	down
1778720_at	Activator of Heat Shock Protein 90 ATPase	AHA1	5,292714	down
1771292_at	Histone H2B	HTB1	3,4993222	down
1772920_at	Riboflavin kinase, phosphorylates riboflavin to form riboflavin	FMN1	2,3724887	down
1777917_at	Negative regulator of HXT gene expression	MTH1	2,2306812	down

1775578_s_at	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	HXT6 /// HXT7	4,7365823	down
1770583_at	Thioredoxin reductase	TRR1	2,8908083	down
1778973_at	ATP-binding cassette (ABC) protein and general stress response	PDR15	5,258318	down
1771624_at	thioredoxin peroxidase	TSA2	5,546312	down
1769562_at	targeting complex (TRAPP) component involved in ER to Golgi	TRS31	2,4945602	down
1770001_at	Non-essential protein of unknown function required for transcription	EMI2	9,768727	down
1779329_at	Golgi localized protein component of the spindle assembly checkpoint	GRH1	3,0218215	down
1773720_at	ubiquitin of the Hat1p-Hat2p histone acetyltransferase complex	HAT2	2,0112588	down
1771840_at	Fumarate Reductase Soluble		5,4971595	down
1774137_at	Cytochrome c isoform 2, expressed under hypoxic conditions	CYC7	5,253355	down
1772646_at	Protein of unknown function with a possible role in glutathione	GTT3	2,9517467	down
1774627_at	participates in the interconversion of fructose-6-P and mannose-6-P	PMI40	2,9747672	down
1779350_at	Spindle Pole Component of molecular weight	SPC25	2,0867631	down
1775859_at	Putative S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase with a probable	SAH1	2,751135	down
1775500_at	Required for Meiotic nuclear Division; functions in DNA replication	GET2	2,329332	down
1776246_at	involved in protection against heat-induced protein aggregation	MDJ1	2,1899517	down
1775392_at	Inhibitor of the type I protein phosphatase Glc7p, which is involved	YPI1	2,370256	down
1773444_at	Glycogen synthase with similarity to Gsy2p expression induced	GSY1	5,1463447	down
1780178_s_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL2A	2,0456069	down
1775976_at	Hexokinase isoenzyme 1 catalyzes phosphorylation of glucose	HXK1	9,561333	down
1778317_at	Alcohol dehydrogenase type IV transcription is induced in response	ADH4	6,7848053	down
1774971_at	Component of the ATP-dependent Isw2p-Itc1p chromatin remodeling	ITC1	2,4182317	down
1776708_at	involved in release from glucose repression	SNF4	2,41584	down
1771287_at	sterol reductase, catalyzes the final step in ergosterol biosynthesis	ERG4	2,1231375	down
1773292_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL26B	2,0820723	down
1769481_at	Twinfilin A is a member of a conserved family of actin monomer	TWF1	2,6007328	down
1770577_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL11B	2,2353158	down
1770612_at	Ribosomal protein L30 of the large (60S) ribosomal subunit,	RPL24B	2,151898	down
1778044_at	protein tyrosine phosphatase of the CDC25-like phosphatase family	YCH1	2,583215	down
1776467_at	Ribosomal protein L4 of the large (60S) ribosomal subunit	RPL8A	2,4280643	down
1773827_s_at	Ribosomal protein L4 of the large (60S) ribosomal subunit	RPL8A	2,384789	down
1770917_at	Major component of the proteasome	ECM29	2,0825377	down
1775832_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS20	2,331545	down
1770109_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL14B	2,3245897	down
1769972_at	Inositol monophosphatase, involved in biosynthesis of inositol	INM1	4,0867834	down
1779663_at	Enolase II, catalyzes the first common step of glycolysis and glucone	ENO2	3,7948346	down
1777048_at	Widely conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucle	OYE2	3,6679537	down
1771497_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS24B	2,8899992	down
1769885_at	Elongase I, medium-chain acyl elongase, catalyzes carboxy-terminal	ELO1	3,339823	down
1775186_at	Ribosomal protein 59 (rp59) of the small (40S) ribosomal subunit	RPS14B	3,0071375	down
1779682_at	Multifunctional carbamoylphosphate synthetase (CPSase)-aspartate	URA2	2,3308504	down
1774960_at	With NCA2, regulates proper expression of subunits 6 (Atp6p) and	NCA3	2,9688902	down
1773989_at	Protein involved in the inositol acylation of glucosaminyl phospholip	GWT1	2,8904705	down
1779018_at	Last step in pyrimidine biosynthesis pathway	URA8	2,4291673	down
1777559_at	Phospho MUTase homolog. Small region homologous to active site	PMU1	2,8819919	down
1778769_at	Suppressor of PI Four Kinase	SFK1	4,327151	down
1770744_at	UDP-glucose pyrophosphorylase or UTP-glucose-1-phosphate	UGP1	6,1601973	down
1773853_at	Ceramide synthase component, involved in synthesis of ceramide	LAC1	6,444453	down
1776344_at	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) ribosom	RPL14A	2,0290875	down
1779928_at	Cytoplasmic heavy chain dynein, microtubule motor protein	DYN1	2,2943308	down
1778532_at	Thiol-specific peroxidoredoxin, reduces hydroperoxides to protein	AHP1	2,3672385	down
1774937_at	pyruvate decarboxylase	PDC5	2,7989633	down
1770284_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL37A	2,277199	down
1776760_at	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin) binds to Hsp82	CPR6	6,872971	down
1779105_at	Glycogen synthase, similar to Gsy1p; expression induced by glucose	GSY2	4,501621	down
1770727_at	involved in sphingolipid biosynthesis	LCB5	3,7707126	down
1772048_at	Involved in cytoskeletal organization and cellular growth	VRP1	2,6480477	down
1772638_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL26A	2,16671	down
1775553_at	Karyopherin beta, forms a dimeric complex with Srp1p (Kap60) and	KAP95	2,472426	down
1772116_at	Coronin, cortical actin cytoskeletal component that associates with	CRN1	2,4417496	down
1776709_at	Glycoprotein required for oxidative protein folding in the endoplasmic	ERO1	2,793209	down
1770044_at	Alpha-tubulin; associates with beta-tubulin (Tub2p) to form tubulin	TUB3	2,9583519	down
1770154_at	Involved in DNA-replication-linked nucleosome assembly; homologous	CAC2	2,8917065	down
1772804_at	has a CUE domain that binds ubiquitin, which may facilitate in ubiquit	CUE4	2,7455037	down
1774756_at	regulatory subunit of trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase	TSL1	5,8322077	down
1773841_at	ER localized integral membrane protein that may promote secretion	GSF2	3,7315848	down
1779961_at	sterol desaturase, a cytochrome P450 enzyme that catalyzes the	ERG5	12,956695	down
1778907_at	Phosphoglucosyltransferase	PGM2	10,472943	down
1775624_at	constitutively expressed heat shock protein (NOTE=Hsc82p)	HSC82	4,3727345	down
1774621_at	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) ribosom	RPL36A	2,3238757	down
1779649_at	Protein that recognizes and binds damaged DNA during nucleosome	RAD14	2,730195	down
1773766_at	Protein of unknown function, localizes to the cell wall	GAS3	10,424798	down
1773683_at	regulatory subunit of trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase	TPS3	3,5629146	down
1773524_at	ER membrane protein involved in the second step of glycosylation	GPI12	3,788385	down
1770922_at	Protein required for cell viability	LIP1	2,2573314	down
1770754_at	NADPH-dependent alcohol dehydrogenase	ADH6	2,1620572	down
1773623_at	cell wall integrity and stress response component 2	WSC2	3,7951143	down
1774556_at	heat shock protein regulator that binds to Hsp90p and may stabilize	HCH1	9,102171	down
1777458_at	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) ribosom	RPL16B	2,9355106	down
1775541_at	One of two identical histone H3 proteins	HHT2	3,9863815	down

1775837_at	Component of RNA polymerase II holoenzyme, involved in RNA	SSN8	2,6313014	down
1771579_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL25	2,0985157	down
1776371_at	Serine/threonine protein kinase with similarity to Ste20p and	SKM1	3,4443226	down
1773230_at	Involved in glycerol production via conversion of glycerol-3-ph	GPD2	4,640584	down
1780177_at	Protein of unknown function, localizes to the cell wall	GAS5	4,000559	down
1777302_at	Heat shock protein also induced by canavanine and entry into	STI1	4,9773297	down
1770458_at	C2H2 zinc-finger protein with similarity to myc-family transcri	HMS1	2,9420063	down
1773612_at	82 kDa heat shock protein; homolog of mammalian Hsp90	HSP82	2,9282763	down
1778597_at	cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex	PCL8	2,2124302	down
1773434_at	HSP70 family member, highly homologous to Ssa1p and Sse2p	SSE1	3,0947585	down
1770298_at	protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS9A	3,2336924	down
1769541_at	mRNA binding protein	PUF2	3,5690458	down
1772408_at	Homologous to mammalian phosphotyrosine phosphatase	LTP1	4,2960906	down
1777528_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL11A	2,186996	down
1777843_at	phosphatidylinositol synthase	PIS1	11,945611	down
1779850_at	Releases glucose-1-phosphate from glycogen	GPH1	5,411589	down
molecular_function	protein binding 233			
1778141_at	Low-affinity amino acid permease with broad substrate range,	AGP1	2,719242	up
1777517_at	serine-type peptidase activity	RRT12	3,5356174	up
1771819_at	art of small (ribosomal) subunit (SSU) processosome (contains	PWP2	2,1281562	up
1778726_at	Translocase of the inner membrane	TIM13	2,0299428	up
1777020_at	Core interacting component 1	CIC1	2,8716874	up
1772676_at	Protein component of the H/ACA snoRNP pseudouridylylase con	GAR1	2,1273932	up
1770861_at	ucleolar protein, component of the small subunit (SSU) proces	UTP10	2,1129844	up
1773975_at	bypass requirement for protein kinase C homolog	BCK1	2,0588896	up
1777344_at	BAT1 highly expressed during logarithmic phase and is repress	BAT2	2,067583	up
1770748_at	Mitochondrial Distribution and Morphology	MDM35	2,1060753	up
1769958_at	involved in proteasome-dependent catabolite inactivation of	GID8	2,3016536	up
1776663_at	mitochondrion	RRG9	3,5529492	up
1773722_at	Ubiquitin-specific protease that deubiquitinates ubiquitin-pro	UBP10	2,819108	up
1773892_at	plays a role in invasive growth	NCS2	2,7316842	up
1774139_at	44 kDa phosphorylated integral peroxisomal membrane prote	PEX15	2,0191622	up
1775413_at	naphase inhibitor that plays a critical role in control of anaph	PDS1	2,059445	down
1775558_at	Putative membrane protein of unknown function involved in	CDC1	2,200051	down
1773173_at	coatomer (COPI) complex delta subunit	RET2	2,557221	down
1772035_at	Like Sm-B protein	LSM8	2,0795128	down
1779051_at	Component of the septin ring of the mother-bud neck that is re	CDC11	2,86622	down
1772468_at	Fusion protein, identical to Rpl40Ap, that is cleaved to yield u	RPL40B	2,3092718	down
1777242_at	Alpha (large) subunit of cytoplasmic phenylalanyl-tRNA synthe	FRS1	2,083685	down
1775614_at	GTP binding protein (mammalian Ranp homolog) involved in t	GSP1	2,105671	down
1776541_at	Remodels the Structure of Chromatin	RSC9	2,0728211	down
1779276_at	rotein with a putative role in sister chromatid segregation,	SRC1	2,2434578	down
1771426_at	Probable component of COPII coated vesicles that binds to Sec	SFB2	2,073665	down
1770399_at	Peripheral membrane protein of the plasma membrane that in	ZE01	2,0171137	down
1774504_at	orting nexin required to maintain late-Golgi resident enzymes	SNX3	2,4239485	down
biological_process	generation of precursor metabolites and energy 31			
1779905_at	Isocitrate lyase, catalyzes the formation of succinate and glyox	ICL1	10,873697	up
1775912_at	Subunit Vb of cytochrome c oxidase	COX5B	11,634212	down
biological_process	energy derivation by oxidation of organic compounds 24			
molecular_function	identical protein binding 43			
1775734_at	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, me	CTR1	9,870892	up
1773888_at	catalyzes one of the two reactions involved in the transsulfurat	CYS3	2,6467624	down
cellular_component	ribosome 53			
1770034_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL37	3,3008513	up
1771733_at	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	MRP13	2,003778	up
1771075_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRPL20	3,0110595	up
1773268_at	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	MRP51	2,4092894	up
1769765_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit,	RPL19A	2,0564244	up
1779787_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL21A	3,0469923	down
1776516_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL13A	2,5192802	down
1773510_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL27B	2,3283534	down
1770501_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS8B	2,2472548	down
1775167_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	RPS26B	2,7252638	down
1769929_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit,	RPL22B	2,186855	down
1780161_at	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) r	RPL16A	2,666814	down
1778731_at	ribosomal protein L4 of the large (60S) ribosomal subunit,	RPL8B	2,4832983	down
1775407_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit,	RPL38	2,060742	down
1778592_at	Ribosomal protein 10 (rp10) of the small (40S) subunit	RPS1A	2,2799988	down
1772366_at	Ribosomal protein 10 (rp10) of the small (40S) subunit	RPS1B	2,1911266	down
1770882_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL13B	2,3987944	down
1771911_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL20A	2,3444085	down
1778798_s_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL18A	2,4053037	down
1776278_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit,	RPS7B	3,0028315	down
1771085_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL18A	3,062088	down
1777990_at	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit;	RPS10A	2,1594977	down
1775457_at	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	RPL21B	2,2448876	down

cellular_component	large ribosomal subunit 33			
cellular_component	cytosolic large ribosomal subunit 30			
cellular_component	cytosolic ribosome 41			
cellular_component	ribonucleoprotein complex 68			
cellular_component	ribosomal subunit 46			
cellular_component	cytosolic part 42			
cellular_component	preribosome 20			
molecular_function	structural constituent of ribosome 45			
molecular_function	structural molecule activity 53			
1769935_at	Mitochondrial matrix protein involved in biogenesis of the iron	ISA1	2,19756	up
biological_process	disaccharide metabolic process 10			
1773594_at	Part of the complex locus MAL3	MAL31	2,6792278	up
1776531_at	Trehalose-6-phosphate phosphatase	TPS2	3,727845	down
1776944_at	Part of MAL1 complex locus; encodes funct. maltose permease	MAL11	2,8434196	down
1770506_at	beta-fructofuranosidase activity	SUC2	5,3783703	down
biological_process	cellular carbohydrate metabolic process 24			
1772223_at	Mitochondrial NADP-specific isocitrate dehydrogenase	IDP1	2,55542	up
1769466_at	identical at amino acid level to Kre9p	KNH1	5,072866	up
1770529_at	YOL032W	OPI10	2,8195128	down
biological_process	trehalose biosynthetic process 6			
biological_process	oligosaccharide biosynthetic process 6			
biological_process	disaccharide biosynthetic process6			

EK 2 - *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi Analizi

Saccharomyces cerevisiae suşlarının teknolojik özellikleri

SUŞLAR	GÜN	KONTROL(pH 3.3)	YÜKSEK SICAKLIKTA GELİŞİM		DÜŞÜK pH'DA GELİŞİM		FERMANTASYON HIZI				KÖPÜK OLUŞTURMA
			37°C	42°C	pH 4	pH 7	Briks	Alkol	pH	Sıcaklık	
22	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,31	21,60	(-)
	1.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	18%	(-)	3,20	24,00	dağınık köpük
	2.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	16%	(-)	2,91	24,50	1 cm
	3.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	13%	(-)	2,87	23,00	1,5 - 2 cm köpük
	4.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	10%	0	2,86	24,20	1,5 cm
	5.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	7,50%	4%	3,38	21,80	0,5 - 1 cm
	6.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	6%	5%	3,42	25,70	0 - 0,5 cm
	7.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	5,50%	6%	3,30	26,70	dağınık köpük
25	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,31	21,60	(-)
	1.	(++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	18%	(-)	3,20	25,60	dağınık köpük
	2.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	17%	(-)	3,06	24,60	0 - 0,5 cm
	3.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	14,50%	(-)	2,86	22,80	1 cm
	4.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	10%	0	2,98	23,60	0 - 0,5 cm
	5.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	7,50%	2%	3,11	22,80	0,5 cm
	6.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	6,50%	4%	3,21	25,40	dağınık köpük
	7.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	5,50%	6%	3,07	24,80	dağınık köpük
57	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,25	21,10	(-)
	1.	(++)	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	18%	(-)	3,19	25,00	dağınık köpük
	2.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	17,50%	(-)	3,16	24,20	dağınık köpük
	3.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	15%	(-)	3,08	22,60	0,5 cm
	4.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	12%	(-)	2,93	23,80	1 cm
	5.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	9%	2%	3,10	22,10	1 cm
	6.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	7%	3%	3,09	25,40	0 - 0,5 cm
	7.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	6%	4%	3,05	24,90	dağınık köpük
59	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,25	21,10	(-)
	1.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	17%	(-)	3,02	24,70	0,5cm
	2.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	13%	(-)	2,86	24,60	1 cm
	3.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	10%	0	2,97	23,40	0,5 cm
	4.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	8%	2%	2,98	24,10	0,5 cm
	5.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	6%	4%	3,38	22,90	0,5 cm
	6.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	5,50%	5%	3,00	25,10	0 - 0,5 cm
	7.	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	5,50%	6%	3,40	24,70	dağınık köpük

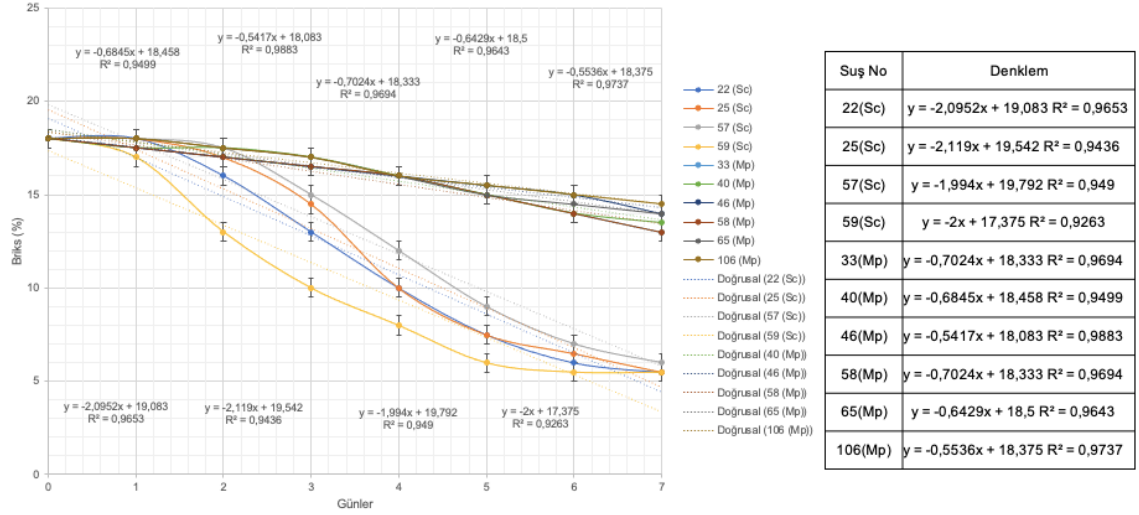
Metschnikowia pulcherrima suşlarının teknolojik özellikleri

SUŞLAR	GÜN	KONTROL(pH 3.3)	YÜKSEK SICAKLIKTAKİ GELİŞİM		DÜŞÜK pHDA GELİŞİM		FERMANTASYON HIZI				KÖPÜK OLUŞTURMA
			37°C	42°C	pH 4	pH 7	Briks	Alkol	pH	Sıcaklık	
33	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,29	21,10	(-)
	1.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	17,50%	(-)	3,24	25,60	dağınık köpük
	2.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	17,00%	(-)	3,12	24,50	0 - 0,5 cm
	3.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	16,50%	(-)	3,08	23,50	0 - 0,5 cm
	4.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	16%	(-)	3,13	24,10	0 - 0,5 cm
	5.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	15%	(-)	3,17	22,60	0 - 0,5 cm
	6.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	14%	(-)	3,00	24,50	0 - 0,5 cm
40	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,29	21,10	(-)
	1.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	17,50%	(-)	3,18	25,50	dağınık köpük
	2.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	17,50%	(-)	3,16	24,50	0 - 0,5 cm
	3.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	17%	(-)	3,14	23,00	0 - 0,5 cm
	4.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	16%	(-)	3,08	25,40	0 - 0,5 cm
	5.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	15%	(-)	3,36	22,80	0 - 0,5 cm
	6.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	14%	(-)	3,07	24,10	0 - 0,5 cm
46	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,30	21,70	(-)
	1.	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	17,50%	(-)	3,17	25,40	dağınık köpük
	2.	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	17%	(-)	3,09	24,50	0 - 0,5 cm
	3.	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	16,50%	(-)	3,10	23,50	0 - 0,5 cm
	4.	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	16%	(-)	3,13	24,60	0 - 0,5 cm
	5.	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	15,50%	(-)	3,24	22,50	0 - 0,5 cm
	6.	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	15%	(-)	3,09	24,30	0 - 0,5 cm
58	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,30	21,70	(-)
	1.	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	17,50%	(-)	3,18	25,30	dağınık köpük
	2.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	17%	(-)	3,10	24,50	dağınık köpük
	3.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	16,50%	(-)	3,08	23,70	dağınık köpük
	4.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	16%	(-)	3,05	24,70	0 - 0,5 cm
	5.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	15%	(-)	3,19	22,60	0 - 0,5 cm
	6.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	14%	(-)	3,03	24,50	0 - 0,5 cm
65	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,28	21,50	(-)
	1.	(++)	(++)	(-)	(+++)	(+++)	18%	(-)	3,22	25,50	dağınık köpük
	2.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	17,50%	(-)	3,17	24,70	dağınık köpük
	3.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	17%	(-)	3,20	23,50	0,5 cm
	4.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	16%	(-)	3,09	24,40	1 cm
	5.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	15%	(-)	3,19	22,40	1,5 - 2 cm
	6.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	14,50%	(-)	3,04	24,20	1 - 1,5 cm
106	0.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18%	(-)	3,28	21,50	(-)
	1.	(+++)	(++)	(+)	(+++)	(+++)	18%	(-)	3,19	25,80	dağınık köpük
	2.	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	17,50%	(-)	3,15	24,80	0,5 - 1 cm
	3.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	17%	(-)	3,20	23,50	0,5 cm
	4.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	16%	(-)	3,11	24,10	1 cm
	5.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	15,50%	(-)	3,16	23,50	2 cm
	6.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	15%	(-)	3,12	24,40	1 - 1,5 cm
7.	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	14,50%	(-)	3,20	23,90	1 cm	

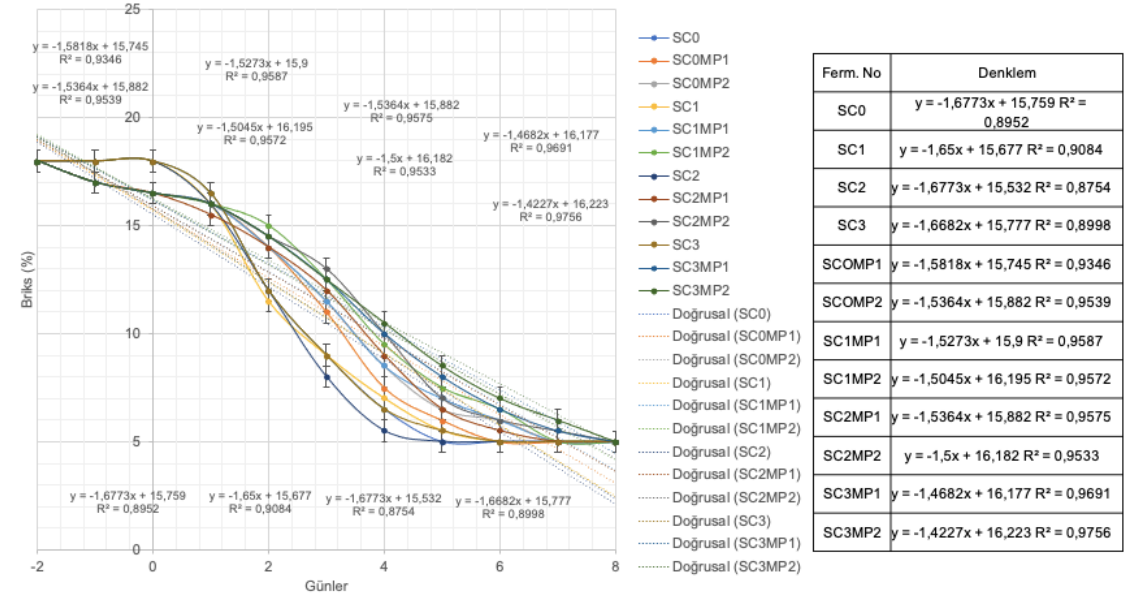
SUŞLAR 22	GÜN	FERMANTASYON HIZI				SUŞLAR 25	GÜN	FERMANTASYON HIZI			
		Briks(%)	Alkol (%)	pH	Sıcaklık			Briks(%)	Alkol (%)	pH	Sıcaklık
SC0	(0.gün)	18,00	0	3,31	23	SC1	(0.gün)	18	0,00	3,31	23
SC0	(1.gün)	16,5	0	3,18	23,2	SC1	(1.gün)	16	0,00	3,31	22,7
SC0	(2.gün)	12	0	3,6	23,2	SC1	(2.gün)	11,5	0,00	3,67	23,2
SC0	(3.gün)	9	0	3,19	23,4	SC1	(3.gün)	9	0,00	3,05	23,1
SC0	(4.gün)	6,5	0	3,17	22,8	SC1	(4.gün)	7	0,00	3,3	21,8
SC0	(5.gün)	5	1,00	3,1	24,3	SC1	(5.gün)	5,5	1,50	3,17	23,7
SC0	(6.gün)	5	4,00	3,59	22,1	SC1	(6.gün)	5	4,00	3,56	21,2
SC0	(7.gün)	5	4,50	3,36	23,8	SC1	(7.gün)	5	4,50	3,17	23,5
SC0	(8.gün)	5	5,00	3,16	24,3	SC1	(8.gün)	5	5,00	3,1	24,4
SC0	(9.gün)	5	6,00	3,16	21,5	SC1	(9.gün)	5	6,00	3,18	21,1
SC0	(10.gün)	5	6,00	3,48	21,5	SC1	(10.gün)	5	5,00	3,49	21,2
SC0	(11.gün)	5	6,00	3,28	21,2	SC1	(11.gün)	5	4,50	3,3	21,1
SC0	(12.gün)	5	5,50	3,64	22,7	SC1	(12.gün)	5	4,50	3,39	22,6
SC0	(13.gün)	5	5,50	3,39	22,6	SC1	(13.gün)	5	5,00	3,23	22,3
SC0	(14.gün)	5	5,00	3,11	23,9	SC1	(14.gün)	5	5,00	3,16	22,9
SC0 X MP1	(-2.gün)	18	0,00	3,3	24	SC1 X MP1	(-2.gün)	18	0,00	3,3	24
SC0 X MP1	(-1.gün)	17	0,00	3,55	25,40	SC1 X MP1	(-1.gün)	17	0,00	3,51	25,6
SC0 X MP1	(0.gün)	16,5	0,00	3,88	22,6	SC1 X MP1	(0.gün)	16,5	0,00	3,97	23
SC0 X MP1	(1.gün)	16	0,00	3,54	22,6	SC1 X MP1	(1.gün)	16	0,00	3,59	22,7
SC0 X MP1	(2.gün)	14	0,00	3,18	22,9	SC1 X MP1	(2.gün)	14	0,00	3,15	23,4
SC0 X MP1	(3.gün)	11	0,00	3,1	22,6	SC1 X MP1	(3.gün)	11,5	0,00	3,37	22,6
SC0 X MP1	(4.gün)	7,5	0,00	3,28	22,6	SC1 X MP1	(4.gün)	8,5	0,00	3,29	22,7
SC0 X MP1	(5.gün)	6	0,00	3,22	23,5	SC1 X MP1	(5.gün)	7	0,00	3,26	23,4
SC0 X MP1	(6.gün)	5	2,00	3,26	21,6	SC1 X MP1	(6.gün)	6	0,00	3,16	21,5
SC0 X MP1	(7.gün)	5	3,00	3,12	23,6	SC1 X MP1	(7.gün)	5	2,00	3,22	23,3
SC0 X MP1	(8.gün)	5	4,00	3,07	24,2	SC1 X MP1	(8.gün)	5	3,50	3,03	23,9
SC0 X MP1	(9.gün)	5	4,00	3,15	20,4	SC1 X MP1	(9.gün)	5	4,00	3,01	20,9
SC0 X MP1	(10.gün)	5	4,00	3,17	22,3	SC1 X MP1	(10.gün)	5	5,00	3,24	22,6
SC0 X MP1	(11.gün)	5	5,00	3,36	21,3	SC1 X MP1	(11.gün)	5	4,50	3,17	21,1
SC0 X MP1	(12.gün)	5	4,00	3,21	22,6	SC1 X MP1	(12.gün)	5	4,50	3,17	22,7
SC0 X MP1	(13.gün)	5	4,00	3,1	22,2	SC1 X MP1	(13.gün)	5	4,00	3,16	21,9
SC0 X MP1	(14.gün)	5	3,50	3,08	23,2	SC1 X MP1	(14.gün)	5	3,50	3,15	22,7
SC0 X MP2	(-2.gün)	18	0,00	3,3	24	SC1 X MP2	(-2.gün)	18	0,00	3,3	24
SC0 X MP2	(-1.gün)	17	0,00	3,51	25,6	SC1 X MP2	(-1.gün)	17	0,00	3,77	23,5
SC0 X MP2	(0.gün)	16,5	0,00	3,9	23,3	SC1 X MP2	(0.gün)	16,5	0,00	3,87	22,7
SC0 X MP2	(1.gün)	16	0,00	3,59	22,6	SC1 X MP2	(1.gün)	16	0,00	3,33	22,7
SC0 X MP2	(2.gün)	14	0,00	3,28	23,2	SC1 X MP2	(2.gün)	15	0,00	3,44	23,5
SC0 X MP2	(3.gün)	11,5	0,00	3,35	23	SC1 X MP2	(3.gün)	12,5	0,00	3,37	22,7
SC0 X MP2	(4.gün)	8,5	0,00	3,33	23	SC1 X MP2	(4.gün)	9,5	0,00	3,35	22,5
SC0 X MP2	(5.gün)	6,5	0,00	2,99	24	SC1 X MP2	(5.gün)	7,5	0,00	3,12	23,3
SC0 X MP2	(6.gün)	6	1,50	3,04	21,5	SC1 X MP2	(6.gün)	6,5	0,00	3,25	21,7
SC0 X MP2	(7.gün)	5	3,00	2,94	23,3	SC1 X MP2	(7.gün)	5	1,00	2,96	23,1
SC0 X MP2	(8.gün)	5	4,00	3,17	24,6	SC1 X MP2	(8.gün)	5	4,00	3,03	23,8
SC0 X MP2	(9.gün)	5	5,00	3	20,9	SC1 X MP2	(9.gün)	5	4,50	3,01	20,7
SC0 X MP2	(10.gün)	5	4,50	3,14	22,4	SC1 X MP2	(10.gün)	5	4,50	3,22	21,9
SC0 X MP2	(11.gün)	5	5,00	3,16	21,1	SC1 X MP2	(11.gün)	5	5,00	3,15	21,2
SC0 X MP2	(12.gün)	5	4,50	3,15	22,6	SC1 X MP2	(12.gün)	5	4,50	3,19	22,5
SC0 X MP2	(13.gün)	5	4,50	3,11	22,1	SC1 X MP2	(13.gün)	5	4,50	3,2	21,8
SC0 X MP2	(14.gün)	5	4,00	3,04	22,7	SC1 X MP2	(14.gün)	5	4,00	3,14	24

EK 3 - Briks ölçümü sonucu elde edilen çizgi grafiklerinin denklem ve eğim hesabı

Teknolojik özelliklerin analizi çalışmasında elde edilen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının % briks değişiminin çizgi grafiği ve doğrusal eğri denklemleri



Fermantasyon takibi sırasında elde edilen *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür ve *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* sıralı karışık kültür fermantasyonlarının % briks değişiminin çizgi grafiği ve doğrusal eğri denklemleri



EK 4 - *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının RT-qPCR ile *ARO8*, *ARO9* gen ifade analizi

Metschnikowia pulcherrima suşlarının ters transkripsiyonu sonucunda elde edilen nükleik asit miktarları ve saflık değerleri uygun olan cDNA örnekleri (Çizelge 4.19, tez çalışması kapsamında fermantasyon aşaması için seçilen 58 ve 106 numaralı suşlara ait cDNAlar) kullanılarak RT-qPCR ile *ARO8* ve *ARO9* gen ifade analizi gerçekleştirilmiştir.

RT-qPCR ile *ARO8* ve *ARO9* gen ifade analizinde pozitif kontrol olarak referans suş olan 22 numaralı *Sacchromyces cerevisiae* suşu kullanılmıştır. Pozitif kontrol ve örneklerin cDNA konsantrasyonu eşit ve 25 ng/µl'dir.

Metschnikowia pulcherrima suşlarının RT-qPCR ile *ARO8*, *ARO9* gen ifade analizi sonuçları

Color	Position	Sample Name	Gene ... ▲	Gene Type	Cq	Call
	A1	Mp	ARO8	N/A		- Negative
	A2	Mp	ARO8	N/A		- Negative
	A3	Mp	ARO8	N/A		- Negative
	A4	Mp	ARO8	N/A		- Negative
	A5	Mp	ARO8	N/A		- Negative
	A6	Mp	ARO8	N/A		- Negative
	A7	Positive control	ARO8	N/A	34.55	Positive
	A8	Negative control	ARO8	N/A		- Negative
	B1	Mp	ARO9	N/A		- Negative
	B2	Mp	ARO9	N/A		- Negative
	B3	Mp	ARO9	N/A		- Negative
	B4	Mp	ARO9	N/A		- Negative
	B5	Mp	ARO9	N/A		- Negative
	B6	Mp	ARO9	N/A		- Negative
	B7	Positive control	ARO9	N/A	33.66	Positive
	B9	Negative control	ARO9	N/A		- Negative

RT-qPCR ile gen ifade analizi sonucunda *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının *ARO8*, *ARO9* genlerinin aktif olmadığı tespit edilmiştir.

EK 5 - RT-qPCR ile gen ifade analizi sonuçları

Fermantasyon sırasında alınan örneklerin RT-qPCR analiz sonuçları, ARO8, ARO9 logaritmik gen ifade düzeyleri ve standart sapma değerleri

Ct AR08	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	Ct AR09	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
REFERANS	34,03000	34,07667	33,84000	33,91333	REFERANS	33,11	33,02333	33,63	33,9
SC0	33,13952	33,38061	29,64409	35,07036	SC0	32,76566	32,87109	28,9787	35,06671
SC1	28,97641	30,71678	30,47730	35,42234	SC1	31,39894	31,2424	30,88609	35,50286
SC2	36,82168	35,96543	32,61448	38,18941	SC2	35,89668	33,58983	33,73096	36,01534
SC3	36,43092	29,46388	30,31290	36,31524	SC3	35,47779	31,40173	31,81996	34,89952
SC0MP1	34,59360	36,49593	35,26354	36,61195	SC0MP1	33,73833	33,39156	35,84027	36,57144
SC0MP2	33,49646	33,76062	32,98064	36,68421	SC0MP2	33,05675	33,92973	33,83913	35,73548
SC1MP1	33,38750	33,37309	33,57846	34,34394	SC1MP1	32,57751	33,44467	34,7766	34,56513
SC1MP2	34,64620	34,58084	32,42019	31,68540	SC1MP2	33,66024	33,57921	32,76104	32,36983
SC2MP1	33,18836	34,56579	33,20482	37,30953	SC2MP1	33,30879	33,68897	35,08308	36,8404
SC2MP2	33,38750	36,66901	35,62223	36,52181	SC2MP2	33,62119	34,00762	36,09627	35,90267
SC3MP1	34,20284	36,89475	35,45783	36,96879	SC3MP1	33,65669	34,32628	36,63712	35,84088
SC3MP2	36,42717	36,31157	33,51494	36,25735	SC3MP2	33,88033	34,26255	34,98933	35,77909
AR08 std.sp	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	AR09 std.sp	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
REFERANS	0,393573	0,342101	0,390512	0,238607	REFERANS	0,180278	0,16773	0,105357	0,416773
SC0	0,098489	0,395854	0,352467	0,76173	SC0	0,20108	0,192873	0,115326	0,603241
SC1	0,240069	0,157162	0,252389	0,495715	SC1	0,040415	0,268576	0,254231	0,804301
SC2	0,489524	0,44441	0,410406	1,316359	SC2	0,466083	0,462637	0,522909	0,429302
SC3	0,275136	0,297153	0,058595	0,710657	SC3	0,347035	0,315647	0,265769	0,585007
SC0MP1	1,094212	0,594054	0,398873	2,124649	SC0MP1	0,51264	0,477598	0,251064	1,625208
SC0MP2	0,11547	0,576223	0,107858	0,655057	SC0MP2	0,238118	0,185562	0,405257	0,38397
SC1MP1	0,325115	0,040415	0,210317	0,444672	SC1MP1	0,08544	0,4	0,153948	0,177764
SC1MP2	0,600111	0,620833	0,335012	0,07	SC1MP2	0,300056	0,465224	0,480035	0,119304
SC2MP1	0,387599	0,616523	0,352326	1,614074	SC2MP1	0,107858	0,314325	0,649333	0,758705
SC2MP2	0,421545	0,386954	0,514684	0,25	SC2MP2	0,409512	0,255147	0,4	0,601443
SC3MP1	0,361156	1,207905	0,295353	0,861762	SC3MP1	0,197569	0,091652	0,929677	0,840714
SC3MP2	0,535288	0,486758	0,445758	0,324191	SC3MP2	0,415251	0,251197	0,63705	0,411987
AR08	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	AR09	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
REFERANS	0,222978	0,208684	0,281172	0,258711	REFERANS	0,816815	0,841785	0,666993	0,589201
SC0	0,495722	0,421878	1,566329	-0,095673	SC0	0,916025	0,88565	2,007117	0,253051
SC1	1,770832	1,237777	1,311128	-0,203479	SC1	1,309801	1,354903	1,457563	0,127388
SC2	-0,632082	-0,36982	0,656534	-1,313284	SC2	0,013922	0,678566	0,637905	-0,020267
SC3	-0,512397	1,621525	1,361482	-0,476965	SC3	0,134612	1,308998	1,188499	0,301222
SC0MP1	0,050355	-0,532308	-0,154842	-0,992331	SC0MP1	0,63578	0,735693	0,030175	-0,180488
SC0MP2	0,386394	0,305486	0,544383	-0,589976	SC0MP2	0,832156	0,580635	0,60674	0,060367
SC1MP1	0,419768	0,424183	0,36128	0,126821	SC1MP1	0,970233	0,720391	0,336637	0,397564
SC1MP2	0,034243	0,054263	0,716043	0,941102	SC1MP2	0,658282	0,681627	0,917357	1,030071
SC2MP1	0,480762	0,058872	0,47572	-0,781505	SC2MP1	0,759538	0,650003	0,248334	-0,257981
SC2MP2	0,419768	-0,585319	-0,264704	-0,453957	SC2MP2	0,669532	0,558193	-0,043584	0,012196
SC3MP1	0,17004	-0,654463	-0,214351	-0,677139	SC3MP1	0,659304	0,466382	-0,199413	0,029998
SC3MP2	-0,511246	-0,475841	0,380735	-0,459233	SC3MP2	0,594869	0,484744	0,275345	0,047801
AR08 std.sp	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	AR09 std.sp	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
REFERANS	0,120547	0,120547	0,120547	0,120547	REFERANS	0,051941	0,051941	0,051941	0,051941
SC0	0,030075	0,120958	0,106333	0,234157	SC0	0,057898	0,055555	0,032829	0,174285
SC1	0,072111	0,047544	0,076394	0,152545	SC1	0,011606	0,077124	0,07276	0,232604
SC2	0,151229	0,136938	0,125195	0,408202	SC2	0,134926	0,133426	0,150693	0,124295
SC3	0,084902	0,089418	0,017724	0,219227	SC3	0,100396	0,09067	0,076245	0,168952
SC0MP1	0,335761	0,183338	0,122704	0,655986	SC0MP1	0,147869	0,137694	0,072675	0,471104
SC0MP2	0,035304	0,176302	0,032943	0,202314	SC0MP2	0,068599	0,053548	0,116816	0,111102
SC1MP1	0,099363	0,012349	0,064364	0,136386	SC1MP1	0,024592	0,115332	0,044466	0,051299
SC1MP2	0,184177	0,19047	0,102128	0,021276	SC1MP2	0,086538	0,134169	0,13803	0,034239
SC2MP1	0,118378	0,189139	0,107691	0,499362	SC2MP1	0,031087	0,090667	0,187672	0,220052
SC2MP2	0,128834	0,119483	0,158497	0,077167	SC2MP2	0,118097	0,073637	0,115845	0,174091
SC3MP1	0,110681	0,373218	0,09091	0,266364	SC3MP1	0,05698	0,026465	0,269528	0,243317
SC3MP2	0,165179	0,150142	0,136388	0,100006	SC3MP2	0,119807	0,072528	0,184086	0,11922

Fermentasyon sırasında alınan örneklerin RT-qPCR analiz sonuçları, *ADH2*, *ADH5* gen ifade düzeyleri ve standart sapma değerleri

Ct ADH2	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	Ct ADH5	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
REFERANS	29,01	29,3766667	29,8233333	29,23	REFERANS	28,15	28,1433333	28,3333333	28,28
SC0	31,2825092	32,3191276	26,2916228	30,0498949	SC0	28,1810604	28,9755537	25,8229431	29,0226503
SC1	28,2761689	29,7841765	25,9174623	30,7326438	SC1	27,0349332	29,2457148	24,2816948	29,8713936
SC2	36,0139443	33,6734986	30,5534027	34,7963413	SC2	29,2805969	30,8356284	28,1082423	33,862359
SC3	34,7741248	25,172723	26,4072171	32,9746838	SC3	27,9325775	25,1094553	25,2352054	31,8247512
SCOMP1	33,004645	35,7529974	29,0871801	34,972246	SCOMP1	29,2992331	30,8822079	29,2430762	33,9746927
SCOMP2	31,445254	32,1303546	31,4021083	33,0671083	SCOMP2	28,5599967	31,0964736	30,4842032	32,2522432
SC1MP1	32,232347	30,6681134	30,7906752	31,0904162	SC1MP1	30,4733146	29,009712	30,6498952	30,7919056
SC1MP2	33,7887791	32,9843275	30,7967591	31,1888035	SC1MP2	30,3770275	31,7858502	28,5115304	30,6951738
SC2MP1	32,6051805	30,8419043	35,8040667	31,3498011	SC2MP1	30,0291515	28,9600272	33,4260179	30,9416838
SC2MP2	33,01944	33,1101761	36,2125235	31,7612393	SC2MP2	29,7961988	32,7453878	35,4830998	30,3332098
SC3MP1	33,6526652	31,6089817	36,1081732	31,6121675	SC3MP1	29,7371842	30,6058362	35,2173673	30,8574335
SC3MP2	34,626175	32,3850483	37,2768962	32,3515636	SC3MP2	29,0693865	30,7983648	33,9387252	32,0556593
ADH2 std.sq	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	ADH5 std.sq	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
REFERANS	0,08888194	0,09814955	0,2532456	0,13747727	REFERANS	0,16921387	0,13316656	0,13051181	0,15716234
SC0	0,33867388	0,2787472	0,21031722	0,13576941	SC0	0,15534907	0,12503333	0,09073772	0,12220202
SC1	0,23028967	0,12529964	0,13503086	0,87401373	SC1	0,19502137	0,1123981	0,10263203	0,19697716
SC2	0,42790186	0,23692474	0,16862186	0,24419937	SC2	0,16623277	0,25967929	0,1106044	0,26950572
SC3	0,32254199	0,07937254	0,25159491	0,13012814	SC3	0,21733231	0,09865766	0,15099669	0,31895663
SCOMP1	0,08888194	0,43714986	0,05131601	0,23811762	SCOMP1	0,22722969	0,32532035	0,30435725	0,21501938
SCOMP2	0,15502688	0,10440307	0,26652079	0,40632499	SCOMP2	0,14422205	0,30369941	0,1761628	0,11150486
SC1MP1	0,16643317	0,09814955	0,20840665	0,06244988	SC1MP1	0,25967929	0,05131601	0,13203535	0,1274101
SC1MP2	0,38214308	0,23065125	0,12529964	0,19	SC1MP2	0,19078784	0,34195516	0,14843629	0,03
SC2MP1	0,19924859	0,13796135	0,04	0,26907248	SC2MP1	0,18502252	0,10816654	0,6885734	0,24006943
SC2MP2	0,24846194	0,36345564	0,44500936	0,08660254	SC2MP2	0,19731531	0,11015141	0,27153882	0,18929694
SC3MP1	0,35679126	0,04582576	0,38135723	0,16165808	SC3MP1	0,22590558	0,1274101	0,82245567	0,09712535
SC3MP2	0,19553346	0,13796135	0,9050046	0,25059928	SC3MP2	0,18903263	0,08326664	0,08544004	0,23459184
ADH2	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	ADH5	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
REFERANS	2,68543314	2,57125657	2,43216873	2,6169272	REFERANS	2,181126	2,18318941	2,12438227	2,14088954
SC0	1,97779499	1,65500169	3,53191044	2,36161956	SC0	2,17151247	1,92560781	2,90137637	1,91103088
SC1	2,9139413	2,4443618	3,64842055	2,14901793	SC1	2,52625174	1,84198991	3,3784101	1,64833527
SC2	0,50447023	1,2332632	2,20483194	0,88362045	SC2	1,8311935	1,34989372	2,19405048	0,41308643
SC3	0,89053844	3,88032539	3,49591545	1,4508676	SC3	2,24842071	3,12220889	3,08328781	1,04374905
SCOMP1	1,44153795	0,58572666	2,66139999	0,82884536	SCOMP1	1,82542538	1,33547684	1,84280657	0,3783179
SCOMP2	1,92711777	1,71378383	1,94055293	1,42208746	SCOMP2	2,0542274	1,26915919	1,45866379	0,91143546
SC1MP1	1,68202435	2,16911211	2,13094749	2,03761096	SC1MP1	1,46203393	1,91503543	1,40738024	1,36342643
SC1MP2	1,19736592	1,44786464	2,12905302	2,00697405	SC1MP2	1,49183587	1,05578936	2,06922827	1,393366
SC2MP1	1,56592747	2,11499523	0,56982416	1,95684091	SC2MP1	1,59950741	1,93041344	0,54813895	1,31706838
SC2MP2	1,43693093	1,40867655	0,44263453	1,8287229	SC2MP2	1,67160889	0,75880162	-0,0885511	1,50539795
SC3MP1	1,2397505	1,87613449	0,38600266	1,87514247	SC3MP1	1,6898746	1,421017	-0,0063039	1,34314478
SC3MP2	0,93660863	1,6344746	0,1111988	1,6449014	SC3MP2	1,8965655	1,36142722	0,38945024	0,97228039
ADH2 std.sq	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	ADH5 std.sq	1. GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN
REFERANS	0,02767701	0,02767701	0,02767701	0,02767701	REFERANS	0,0523736	0,0523736	0,0523736	0,0523736
SC0	0,10449952	0,08591966	0,06634446	0,04214162	SC0	0,04807841	0,03861778	0,02826636	0,03775697
SC1	0,07194627	0,0389572	0,04266321	0,27059812	SC1	0,06054405	0,03469245	0,03212077	0,06074579
SC2	0,13004513	0,07273254	0,05238737	0,07463227	SC2	0,05130595	0,07986163	0,03425148	0,08248703
SC3	0,09837368	0,02518889	0,07932727	0,03998475	SC3	0,06730514	0,03080902	0,04711833	0,09797591
SCOMP1	0,02725962	0,13344817	0,01601816	0,07273796	SCOMP1	0,07012886	0,1000388	0,09400829	0,06579825
SCOMP2	0,04780556	0,03219983	0,08259433	0,12481631	SCOMP2	0,04459151	0,09334741	0,05427075	0,03422435
SC1MP1	0,05117847	0,03041881	0,06470118	0,01930996	SC1MP1	0,07992773	0,01584813	0,04066287	0,03921653
SC1MP2	0,11690412	0,07095004	0,03889937	0,05872888	SC1MP2	0,05873587	0,10495576	0,0459237	0,00923574
SC2MP1	0,06119059	0,0427316	0,01219142	0,08312326	SC2MP1	0,05700551	0,03340958	0,21099203	0,07387053
SC2MP2	0,07619821	0,11175963	0,13548825	0,02671592	SC2MP2	0,0608254	0,03374484	0,08293742	0,05832013
SC3MP1	0,10919569	0,01415729	0,11613989	0,04989504	SC3MP1	0,06964829	0,03920324	0,25130561	0,029891
SC3MP2	0,05966307	0,04251577	0,27480821	0,07715559	SC3MP2	0,05837263	0,02560984	0,02615849	0,07202982

EK 6 - Fermantasyon Takibi Sonuçları

SC0, SCOMP1, SCOMP2, SC1, SC1MP1, SC1MP2 örneklerinin fermantasyon takibi sonuçları

SUŞLAR 22	GÜN	FERMANTASYON HIZI				SUŞLAR 25	GÜN	FERMANTASYON HIZI			
		Briks(%)	Alkol (%)	pH	Sıcaklık			Briks(%)	Alkol (%)	pH	Sıcaklık
SC0	(0.gün)	18,00	0	3,31	23	SC1	(0.gün)	18	0,00	3,31	23
SC0	(1.gün)	16,5	0	3,18	23,2	SC1	(1.gün)	16	0,00	3,31	22,7
SC0	(2.gün)	12	0	3,6	23,2	SC1	(2.gün)	11,5	0,00	3,67	23,2
SC0	(3.gün)	9	0	3,19	23,4	SC1	(3.gün)	9	0,00	3,05	23,1
SC0	(4.gün)	6,5	0	3,17	22,8	SC1	(4.gün)	7	0,00	3,3	21,8
SC0	(5.gün)	5	1,00	3,1	24,3	SC1	(5.gün)	5,5	1,50	3,17	23,7
SC0	(6.gün)	5	4,00	3,59	22,1	SC1	(6.gün)	5	4,00	3,56	21,2
SC0	(7.gün)	5	4,50	3,36	23,8	SC1	(7.gün)	5	4,50	3,17	23,5
SC0	(8.gün)	5	5,00	3,16	24,3	SC1	(8.gün)	5	5,00	3,1	24,4
SC0	(9.gün)	5	6,00	3,16	21,5	SC1	(9.gün)	5	6,00	3,18	21,1
SC0	(10.gün)	5	6,00	3,48	21,5	SC1	(10.gün)	5	5,00	3,49	21,2
SC0	(11.gün)	5	6,00	3,28	21,2	SC1	(11.gün)	5	4,50	3,3	21,1
SC0	(12.gün)	5	5,50	3,64	22,7	SC1	(12.gün)	5	4,50	3,39	22,6
SC0	(13.gün)	5	5,50	3,39	22,6	SC1	(13.gün)	5	5,00	3,23	22,3
SC0	(14.gün)	5	5,00	3,11	23,9	SC1	(14.gün)	5	5,00	3,16	22,9
SC0 X MP1	(-2.gün)	18	0,00	3,3	24	SC1 X MP1	(-2.gün)	18	0,00	3,3	24
SC0 X MP1	(-1.gün)	17	0,00	3,55	25,40	SC1 X MP1	(-1.gün)	17	0,00	3,51	25,6
SC0 X MP1	(0.gün)	16,5	0,00	3,88	22,6	SC1 X MP1	(0.gün)	16,5	0,00	3,97	23
SC0 X MP1	(1.gün)	16	0,00	3,54	22,6	SC1 X MP1	(1.gün)	16	0,00	3,59	22,7
SC0 X MP1	(2.gün)	14	0,00	3,18	22,9	SC1 X MP1	(2.gün)	14	0,00	3,15	23,4
SC0 X MP1	(3.gün)	11	0,00	3,1	22,6	SC1 X MP1	(3.gün)	11,5	0,00	3,37	22,6
SC0 X MP1	(4.gün)	7,5	0,00	3,28	22,6	SC1 X MP1	(4.gün)	8,5	0,00	3,29	22,7
SC0 X MP1	(5.gün)	6	0,00	3,22	23,5	SC1 X MP1	(5.gün)	7	0,00	3,26	23,4
SC0 X MP1	(6.gün)	5	2,00	3,26	21,6	SC1 X MP1	(6.gün)	6	0,00	3,16	21,5
SC0 X MP1	(7.gün)	5	3,00	3,12	23,6	SC1 X MP1	(7.gün)	5	2,00	3,22	23,3
SC0 X MP1	(8.gün)	5	4,00	3,07	24,2	SC1 X MP1	(8.gün)	5	3,50	3,03	23,9
SC0 X MP1	(9.gün)	5	4,00	3,15	20,4	SC1 X MP1	(9.gün)	5	4,00	3,01	20,9
SC0 X MP1	(10.gün)	5	4,00	3,17	22,3	SC1 X MP1	(10.gün)	5	5,00	3,24	22,6
SC0 X MP1	(11.gün)	5	5,00	3,36	21,3	SC1 X MP1	(11.gün)	5	4,50	3,17	21,1
SC0 X MP1	(12.gün)	5	4,00	3,21	22,6	SC1 X MP1	(12.gün)	5	4,50	3,17	22,7
SC0 X MP1	(13.gün)	5	4,00	3,1	22,2	SC1 X MP1	(13.gün)	5	4,00	3,16	21,9
SC0 X MP1	(14.gün)	5	3,50	3,08	23,2	SC1 X MP1	(14.gün)	5	3,50	3,15	22,7
SC0 X MP2	(-2.gün)	18	0,00	3,3	24	SC1 X MP2	(-2.gün)	18	0,00	3,3	24
SC0 X MP2	(-1.gün)	17	0,00	3,51	25,6	SC1 X MP2	(-1.gün)	17	0,00	3,77	23,5
SC0 X MP2	(0.gün)	16,5	0,00	3,9	23,3	SC1 X MP2	(0.gün)	16,5	0,00	3,87	22,7
SC0 X MP2	(1.gün)	16	0,00	3,59	22,6	SC1 X MP2	(1.gün)	16	0,00	3,33	22,7
SC0 X MP2	(2.gün)	14	0,00	3,28	23,2	SC1 X MP2	(2.gün)	15	0,00	3,44	23,5
SC0 X MP2	(3.gün)	11,5	0,00	3,35	23	SC1 X MP2	(3.gün)	12,5	0,00	3,37	22,7
SC0 X MP2	(4.gün)	8,5	0,00	3,33	23	SC1 X MP2	(4.gün)	9,5	0,00	3,35	22,5
SC0 X MP2	(5.gün)	6,5	0,00	2,99	24	SC1 X MP2	(5.gün)	7,5	0,00	3,12	23,3
SC0 X MP2	(6.gün)	6	1,50	3,04	21,5	SC1 X MP2	(6.gün)	6,5	0,00	3,25	21,7
SC0 X MP2	(7.gün)	5	3,00	2,94	23,3	SC1 X MP2	(7.gün)	5	1,00	2,96	23,1
SC0 X MP2	(8.gün)	5	4,00	3,17	24,6	SC1 X MP2	(8.gün)	5	4,00	3,03	23,8
SC0 X MP2	(9.gün)	5	5,00	3	20,9	SC1 X MP2	(9.gün)	5	4,50	3,01	20,7
SC0 X MP2	(10.gün)	5	4,50	3,14	22,4	SC1 X MP2	(10.gün)	5	4,50	3,22	21,9
SC0 X MP2	(11.gün)	5	5,00	3,16	21,1	SC1 X MP2	(11.gün)	5	5,00	3,15	21,2
SC0 X MP2	(12.gün)	5	4,50	3,15	22,6	SC1 X MP2	(12.gün)	5	4,50	3,19	22,5
SC0 X MP2	(13.gün)	5	4,50	3,11	22,1	SC1 X MP2	(13.gün)	5	4,50	3,2	21,8
SC0 X MP2	(14.gün)	5	4,00	3,04	22,7	SC1 X MP2	(14.gün)	5	4,00	3,14	24

SC2, SC2MP1, SC2MP2, SC3, SC3MP1, SC3MP2 örneklerinin fermantasyon takibi sonuçları

SUŞLAR 57	GÜN	FERMANTASYON HIZI				SUŞLAR 59	GÜN	FERMANTASYON HIZI			
		Briks(%)	Alkol (%)	pH	Sıcaklık			Briks(%)	Alkol (%)	pH	Sıcaklık
SC2	(0.gün)	18	0,00	3,31	23	SC3	(0.gün)	18	0,00	3,31	23
SC2	(1.gün)	16	0,00	3,26	22,9	SC3	(1.gün)	16,5	0,00	3,2	22,9
SC2	(2.gün)	12	0,00	3,74	22,7	SC3	(2.gün)	12	0,00	3,44	22,9
SC2	(3.gün)	8	0,00	3,45	23,5	SC3	(3.gün)	9	0,00	3,22	22,8
SC2	(4.gün)	5,5	0,00	3,24	21,9	SC3	(4.gün)	6,5	0,00	3,24	22,2
SC2	(5.gün)	5	2,50	3,12	24,2	SC3	(5.gün)	5,5	1,00	3,11	23,5
SC2	(6.gün)	5	3,50	3,08	21,3	SC3	(6.gün)	5	4,00	3,17	21,8
SC2	(7.gün)	5	4,00	3,14	23,2	SC3	(7.gün)	5	4,00	3,09	23,2
SC2	(8.gün)	5	5,00	3,07	24	SC3	(8.gün)	5	5,50	3,14	24,6
SC2	(9.gün)	5	5,50	3,07	21,3	SC3	(9.gün)	5	5,00	3,11	21,1
SC2	(10.gün)	4	5,00	3,3	21,7	SC3	(10.gün)	5	5,50	3,24	22,2
SC2	(11.gün)	5	5,00	3,23	21,6	SC3	(11.gün)	5	5,00	3,19	20,9
SC2	(12.gün)	5	5,00	3,31	22,7	SC3	(12.gün)	5	5,00	3,26	22,5
SC2	(13.gün)	5	4,50	3,19	22,1	SC3	(13.gün)	5	4,50	3,2	22,2
SC2	(14.gün)	5	4,50	3,12	22,8	SC3	(14.gün)	5	4,50	3,17	22,4
SC2 X MP1	(-2.gün)	18	0,00	3,30	24	SC3 X MP1	(-2.gün)	18	0,00	3,30	24
SC2 X MP1	(-1.gün)	17	0,00	3,63	25,4	SC3 X MP1	(-1.gün)	17	0,00	3,56	25,2
SC2 X MP1	(0.gün)	16,5	0,00	3,87	22,5	SC3 X MP1	(0.gün)	16,5	0,00	3,87	22,6
SC2 X MP1	(1.gün)	15,5	0,00	3,48	22,5	SC3 X MP1	(1.gün)	16	0,00	3,52	23
SC2 X MP1	(2.gün)	14	0,00	3,27	24,5	SC3 X MP1	(2.gün)	14,5	0,00	3,24	22,8
SC2 X MP1	(3.gün)	12	0,00	3,12	23,2	SC3 X MP1	(3.gün)	12,5	0,00	2,97	23,1
SC2 X MP1	(4.gün)	9	0,00	3,41	22	SC3 X MP1	(4.gün)	10	0,00	3,39	22,6
SC2 X MP1	(5.gün)	6,5	0,00	3,05	23,3	SC3 X MP1	(5.gün)	8	0,00	3,34	24,3
SC2 X MP1	(6.gün)	5,5	0,00	3,38	22	SC3 X MP1	(6.gün)	6,5	0,00	3,18	21,8
SC2 X MP1	(7.gün)	5	2,00	3,01	23,6	SC3 X MP1	(7.gün)	5,5	0,50	3,06	23,6
SC2 X MP1	(8.gün)	5	3,50	3,06	23,6	SC3 X MP1	(8.gün)	5	3,00	3,04	23,6
SC2 X MP1	(9.gün)	5	4,00	3,02	20,1	SC3 X MP1	(9.gün)	5	4,00	2,96	20,4
SC2 X MP1	(10.gün)	5	4,00	3,13	23,3	SC3 X MP1	(10.gün)	5	3,50	3,17	23,1
SC2 X MP1	(11.gün)	5	4,00	3,43	21	SC3 X MP1	(11.gün)	5	4,50	3,19	20,8
SC2 X MP1	(12.gün)	5	4,00	3,18	22,5	SC3 X MP1	(12.gün)	5	5,00	3,19	22,4
SC2 X MP1	(13.gün)	5	3,50	3,47	21,6	SC3 X MP1	(13.gün)	5	4,50	3,23	21,7
SC2 X MP1	(14.gün)	5	3,50	3,11	23,1	SC3 X MP1	(14.gün)	5	4,50	3,14	22,6
SC2 X MP2	(-2.gün)	18	0,00	3,30	24	SC3 X MP2	(-2.gün)	18	0,00	3,30	24
SC2 X MP2	(-1.gün)	17	0,00	3,74	23	SC3 X MP2	(-1.gün)	17	0,00	3,4	24
SC2 X MP2	(0.gün)	16,5	0,00	3,97	22,6	SC3 X MP2	(0.gün)	16,5	0,00	3,73	22,6
SC2 X MP2	(1.gün)	16	0,00	3,46	22,5	SC3 X MP2	(1.gün)	16	0,00	3,58	22,7
SC2 X MP2	(2.gün)	14,5	0,00	3,24	22,9	SC3 X MP2	(2.gün)	14,5	0,00	3,49	23,6
SC2 X MP2	(3.gün)	13	0,00	3,44	23,2	SC3 X MP2	(3.gün)	12,5	0,00	2,99	22,8
SC2 X MP2	(4.gün)	10	0,00	3,22	23,1	SC3 X MP2	(4.gün)	10,5	0,00	3,36	22,8
SC2 X MP2	(5.gün)	7	0,00	3,07	23,3	SC3 X MP2	(5.gün)	8,5	0,00	3,05	23,6
SC2 X MP2	(6.gün)	6	0,00	3,01	21,6	SC3 X MP2	(6.gün)	7	0,00	3,08	21,8
SC2 X MP2	(7.gün)	5,5	1,50	3,01	23,4	SC3 X MP2	(7.gün)	6	1,50	3,03	23
SC2 X MP2	(8.gün)	5	4,00	3,06	23,8	SC3 X MP2	(8.gün)	5	3,50	3,28	23,9
SC2 X MP2	(9.gün)	5	4,00	3,02	20,9	SC3 X MP2	(9.gün)	5	4,00	3,01	20,7
SC2 X MP2	(10.gün)	5	4,00	3,12	22,8	SC3 X MP2	(10.gün)	5	4,50	3,19	22,9
SC2 X MP2	(11.gün)	5	4,50	3,13	20,7	SC3 X MP2	(11.gün)	5	5,00	3,46	20,5
SC2 X MP2	(12.gün)	5	5,00	3,18	22,6	SC3 X MP2	(12.gün)	5	4,50	3,17	21,8
SC2 X MP2	(13.gün)	5	5,00	3,21	21,5	SC3 X MP2	(13.gün)	5	4,50	3,14	21,6
SC2 X MP2	(14.gün)	5	4,50	3,11	23,7	SC3 X MP2	(14.gün)	5	4,50	3,12	23,4

EK 7 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

Uluslararası Katılımlı 20. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi- 'AROMATIC AMINO TRANSFERASE I GENE (ARO8) IN THE *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS'

başlıklı poster sunumu



AROMATIC AMINO TRANSFERASE I GENE (ARO8) IN THE *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS

Elif Bircan MUAYANLI, Remziye YILMAZ*

Hacettepe University, Food Engineering Department, 06800, Beytepe Campus, Ankara, TR

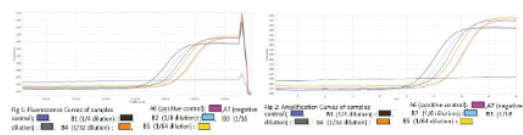
*remziye@hacettepe.edu.tr



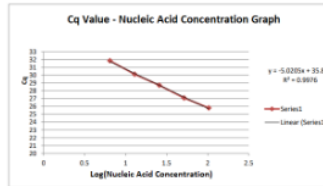
Abstract

Saccharomyces cerevisiae is a commonly used microorganism in the food industry as it produces the desired taste and aroma properties in brewing, winemaking and bread production. High alcohols formed by the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, esters, carbonyl compounds, sulfur-containing compounds, etc. Aroma ingredients give the desired sensory properties to the products. Aroma agents are formed by various metabolic pathways such as Ehrlich pathway. The activity of aromatic aminotransferase I catalyzing the transamination step, which is the initial step of the Ehrlich pathway, was investigated by real time polymerase chain reaction method for *Saccharomyces cerevisiae* HUF16M1C0004. *Saccharomyces cerevisiae* HUF16M1C0004 was grown at 25°C in YPD Broth medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose, pH 5.3) for 48 hours. Samples were taken at the end of the 4th, 8th, 24th and 48th hours of growth. Cell number of dilutions (10^1 - 10^2 - 10^3 - 10^4 - 10^5) which were prepared from sample were calculated by using Thoma chamber and spectrophotometer. Absorbance of dilutions measured at 640 nm with Spectrophotometer by using cell-free YPD broth as reference. Culture whose initial concentration is 1×10^7 cfu / ml were incubated at 25 °C for 24 hours. DNA extraction was performed with the Eurx GeneMATRIX Bacterial and Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURxLtd,Poland). At the end of the DNA extraction, nucleic acid amount of DNA templates and A260 / 280 values were obtained with NanoDrop Spectrophotometer. Primers were designed at Primer 3 software. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I was used for the RT-PCR analysis. Standard curve graph was formed by logarithm of nucleic acid concentrations and Cq values obtained by RT-PCR method. This method can be used to identify the activity of the ARO8 gene in other *Saccharomyces cerevisiae* strains for further studies.

Results

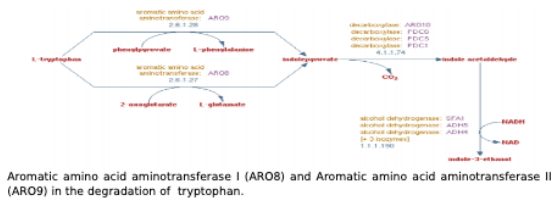


Color	Position	Sample	Cq	Call	Sample type	Standard	Cq Average	Cq Error
Green	A6	8	31.33	Positive	Positive control	-	31.33	0.00
Blue	A7	7	-	Negative	Negative control	-	-	0.00
Black	B1	13	25.82	Positive	Standard	-	25.82	0.00
Light Blue	B2	14	27.09	Positive	Standard	-	27.09	0.00
Dark Blue	B3	15	28.72	Positive	Standard	-	28.72	0.00
Orange	B4	16	30.13	Positive	Standard	-	30.13	0.00
Yellow	B5	17	31.86	Positive	Standard	-	31.86	0.00



Position	Nucleic acid concentration	Cq Value	Logarithm of nucleic acid concentration	Nucleic acid concentration
A4	Unknown	32,26	0,705179203	5,072 ng/µl
A5	Unknown	31,27	0,802390438	7,987 ng/µl

Introduction

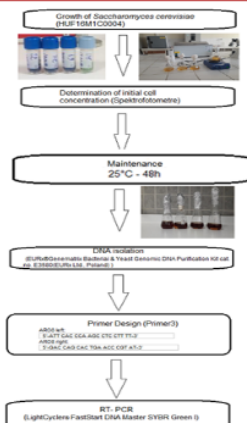


Aromatic amino acid aminotransferase I (ARO8) and Aromatic amino acid aminotransferase II (ARO9) in the degradation of tryptophan.



Aromatic amino acid aminotransferase I (ARO8) and Aromatic amino acid aminotransferase II (ARO9) in the tyrosine biosynthesis.

Methodology



Conclusion

The Cq value which are a fractional number of cycles, is threshold amount of fluorescence at the PCR kinetic curve. In this study, Cq values of dilutions (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) were determined by using RT-PCR. Standard curve graph was formed by logarithm of nucleic acid concentrations and Cq values obtained by RT-PCR method. Equation of standard curve graph was calculated as $y = -5.0205x + 35.808$ and R^2 value was found as 0.99. Nucleic acid concentration of unknown samples was calculated by using standard curve graph equation and Cq values. This method can be used to identify the activity of the ARO8 gene in other *Saccharomyces cerevisiae* strains for further studies.

Acknowledgement

The study was carried out with dear technical assistants Merve Ezeröglü, Fatma Kelkitli.

References

- *Ezeröglü, M., Kelkitli, F., Yılmaz, R., *Saccharomyces cerevisiae* Süplandna Aromatik Transferaz I Geninin Aktifliğini İncelenmesi, BİRME Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, 11-39, 2019.
- *Gorello F., Valera MJ., Martín V., Parada A., Salzman V., Camesasca L., Farina L., Boido E., Medina K., Dellacassa E., Bema L., Aguilar PS., Mas A., Gaggini C., Carras F., Genomic and Transcriptomic Basis of *Hanseniaspora vineae*'s Impact on Flavor Diversity and Wine Quality, Applied and Environmental Microbiology 13:85, 2018.
- *Hazelwood L. A., Daran JM., van Maris A. J., Pronk J. T., Dickinson J. R., The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism, Appl Environ Microbiol, Apr;74(8):2259-66,2008.
- * Primer3 web version 4.1.0, http://primer3.ut.ee/cgi-bin/primer3/primer3web_results.cgi (Mays, 2019).
- *The Saccharomyces Genome Database (SGD), <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/newimage?type=PATHWAY&object=PWY30-21&detail-level=2> (Mays, 2019).
- *The Saccharomyces Genome Database (SGD), <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/new-image?type=PATHWAY&object=PWY30-4120&detail-level=2> (Mays, 2019).
- * Wu Y., Zha M., Yin S., Yang H., Boutel J., Huet R., Wang C., Sun B., Novel Method for Methionine Production Catalyzed by the Aminotransferase ARO8 from *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61:16-6122, 2018.

Uluslararası Katılımlı 20. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi- 'DETECTION OF SUC2 GENE BY REAL TIME PCR IN *Saccharomyces cerevisiae*' başlıklı poster sunumu



DETECTION OF SUC2 GENE BY REAL TIME PCR IN *Saccharomyces cerevisiae*

Elif Bircan MUYANLI, Remziye YILMAZ*

Hacettepe University, Food Engineering Department, 06800, Beytepe Campus, Ankara, TR

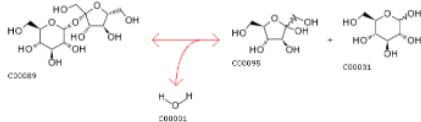
*remziye@hacettepe.edu.tr



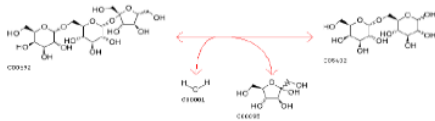
Abstract

Invertase hydrolyzes sucrose, a disaccharide, to glucose and fructose. This transformation is desired in the food industry. *Saccharomyces cerevisiae* is used which naturally secretes the enzyme. In this study, it is aimed to detection of SUC2, the gene responsible for the production of invertase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Saccharomyces cerevisiae* HUF16M1C0004 was grown at 25°C in YPD Broth medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose, pH 5.3) for 48 hours. Samples were taken at the end of the 4th, 8th, 24th and 48th hours of growth. Total DNA extractions from 24 hours growth *Saccharomyces cerevisiae* HUF16M1C0004 were performed using the Eurx GeneMATRIX Bacterial and Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURxLtd,Poland). Nucleic acid amount of DNA templates and A260 / 280 values were obtained with Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer. For detection of SUC2 gene, RT-PCR analysis was carried out using LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit according to the manufacturer's protocol with primers which were designed by using Primer 3 software. As a result of RT- PCR analysis, standard curve was created with log-concentration of dilution series versus known Cq values. In this study, it was determined that there was no cross-contamination, no primer-dimer or other non-specific substance was formed, and the DNA template contained the SUC2 gene due to amplification.

Introduction

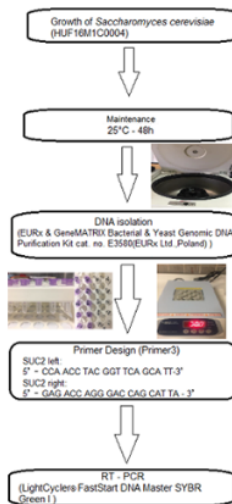


Sucroseglucosylase (EC 3.2.1.26):Hydrolysis of sucrose to D-glucose and D-fructose under the catalase of invertase enzyme.

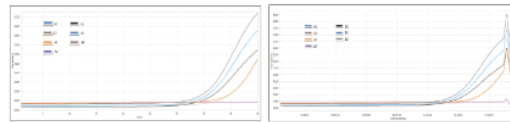


Raffinofruktohidrolaz (EC 3.2.1.26):Hydrolysis of raffinose to melibiose and D-fructose under the catalase of invertase enzyme.

Methodology



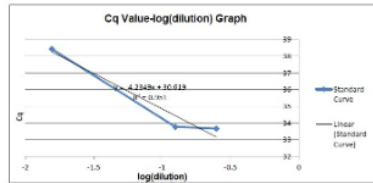
Results



Amplification curves and fluorescence curves were obtained from RT-PCR analysis

Color	Position	Sample type	Sample code	Cq	Result	Cq Hata
Blue	A1	Standard	24-HUF16M1C0004-1-1/4-1	33.60	+	0.00
Red	A2	Standard	24-HUF16M1C0004-1-1/8-1	33.75	+	0.00
Green	A3	Positive Control	PC	38.86	+	0.00
Black	A6	Negative Control	NC	-	-	0.00
Blue	B1	Standard	24-HUF16M1C0004-1-1/4-2	33.74	+	0.00
Red	B2	Standard	24-HUF16M1C0004-1-1/8-2	33.80	+	0.00
Green	B3	Positive control	PC	38.01	+	0.00

Position	Sample type	Nucleic acid concentration
A1	1/4 dilution	103.2ng/20µl
A2	1/8 dilution	51.51ng/20µl
B1	1/4 dilution	103.2ng/20µl
B2	1/8 dilution	51.51ng/20µl
A6	negative control	0ng/20µl
A3	positive control	6.44ng/20µl
B3	positive control	6.44ng/20µl



Standard curve used to determine the efficiency of RT-PCR analysis.

Conclusion

In this study, Cq values of 1/4 and 1/8 dilutions, positive, negative controls and technical repeats were determined by using RT-PCR. To evaluate the PCR efficiency, standard curve was created with log-concentration of dilution series versus known Cq values. The PCR efficiency was calculated by the equation Yield= (10^{1/slope}) x 100. When the slope obtained from the graph was replaced in the equation, the yield was found to be 72.25%. Primers with high stability melt at higher temperatures, increasing Cq values. Increased Cq values decrease the efficiency and decrease the reliability of the analysis as in the inhibition effect. As a result, when the results of the fluorescence curve, amplification curve and dissolution curve of the DNA template examined for the SUC2 gene in the context of RT-PCR analyses were evaluated together, it was determined that there was no cross-contamination, no primer-dimer or other non-specific substance was formed, and the DNA template contained the SUC2 gene due to amplification.

Acknowledgement

The study was carried out with dear technical assistants Büşra Bostan, Nilhan Beyza Erkeç.

References

*Anonim, https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?reaction+R00801+R00802+R02410+R03635+R03921+R06087+R06088+R06100+R06101+R06102 (10.05.2019)
 * Başoğlu N. E., Sakkaracın Invertaz ile Hidroliz Kinetiğinin Ve Invertaz Deaktivasyonunun İncelenmesi, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği , Anabilim Dalı, Ankara, 1985.
 *Bostan, B., Erkeç, N., Yılmaz, R., *Saccharomyces cerevisiae* Mayasında Invertaz Enzimi Üretiminden Sorumlu SUC2 Geninin RT-PCR Yöntemi ile Kalitatif Analizi, Bitirme Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, 4-36, 2019
 * Mohandesi N., et al., Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* SUC2 gene in yeast platform and characterization of recombinant enzyme biochemical properties, 3 Biotech(2): 129-129, 2016.
 * Primer3, <http://bioinformatics.org/pipermail/perl-bioinformatics/2004/0044.html> (3.06.2019)

Uluslararası Katılımlı 21. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi- ‘*Saccharomyces cerevisiae* Mayasındaki Aromatik Bileşik Sentez Yolakları ile İlişkili Genlerin Isı Stresine Tepkisi’ başlıklı sözlü sunum

***Saccharomyces cerevisiae* Mayasındaki Aromatik Bileşik Sentez Yolakları ile İlişkili Genlerin Isı Stresine Tepkisi**

Elif Bircan Muvanlı¹, Remziye Yılmaz¹

¹*Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Foodomics Laboratuvarı, Ankara*

remziye@hacettepe.edu.tr

Giriş

Küresel ısınma, ısı stres tepkisinin tanımlanmasının önemini arttırmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* (Sc.), değişen ortamları algılamak, yanıtlamak ve uyum sağlamak için karmaşık düzenleyici ağlara sahiptir. Fermantasyon, mayada aşırı koşullara uyum sağlamak için gerçekleşen metabolik yolların ve mekanizmaların düzenlenmesini anlamayı sağlar. Ehrlich yolağında; metiyonin kurtarma yolu, triptofan bozunması, fenilalanin bozunması, L-tirozin bozunması bulunmaktadır. Amaç, ısı streslerinin Ehrlich yolak genlerinin ekspresyon profilleri üzerindeki etkilerini araştırmak, mikroarray teknolojisi ve karşılaştırmalı istatistiksel veri analizi kullanarak mayada ısı stresi yanıtı için aromatik bileşik sentez yolakları ile ilişkili genleri incelemektir.

Gereçler ve Yöntemler

Sc. YPD besi yerinde (30°C) geliştirilmiştir. Pelet 10mL YPD ortamında yeniden süspansiyon edilmiş ve ardından bu stok kültürden her 1mL, 3 grup halinde (40 mLx3) YPD sıvı besi yerine inoküle edilerek 6 saat inkübe edilmiştir. Sc.'daki ısı stresini incelemek için oluşturulan bu gruplar; kontrol grubu (30°C), ısı şok grubu (25°C 6saat/37°C 1saat) ve sıcaklık değişim grubu (37°C 6saat/25°C 1saat) olarak belirlenmiştir. Bütün örneklerden toplam RNA izolasyonu, cRNA sentezi, biotin etiketleme, hibridizasyon ve tarama, Affymetrix GeneChip Ekspresyon Analizi yapılmıştır. Aromatik bileşik sentez yolakları ile ilişkili genleri saptamak için cut-off değeri 2.0 seçilmiştir. Sc.'daki gen ekspresyon profili, Affymetrix tarafından geliştirilen GeneChip metodolojisi kullanılarak incelenmiştir. Transkripsiyonel yanıt, RNA ile 6x2 hibridizasyonlu yüksek yoğunluklu oligonükleotid dizileri kullanılarak izlenmiştir. Çalışmadaki tüm hibridizasyonlardan ve dizi normalleştirilmeden elde edilen veriler, GeneSpringGX12.1 (Agilent) kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular

Sc. genomunun ısı şoku ve sıcaklık değişim stresleri altında genel gen ekspresyon profiline bakıldığında ısı şoku uygulaması altındaki 1244 prob setinin ekspresyon seviyelerinde kontrole göre en az 2 kat artış veya azalma, sıcaklık değişim uygulamasında 1317 prob setinin ekspresyon seviyelerinde en az 2 kat fark olduğu gözlemlenmiştir. Önemli ölçüde farklılık gösteren prob setlerine karşılık gelen gen listeleri aracılığıyla aromatik bileşik sentez yolakları ile ilişkili genlerinin değişim seviyeleri incelenmiştir. Ehrlich yolağında bulunan *ADH2,4,5*, *PCD5*, *SFA1*, *BAT2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde 2 kat ve üzeri artış veya azalış gözlemlenmiştir. Ehrlich yolağındaki diğer enzim genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim ise 2 kattan azdır.

Sonuç ve Tartışma

Isı stresi uygulaması sonucunda Ehrlich yolağında bulunan enzim genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Isı stresinin, Sc.'da aromatik bileşik sentez yolaklarındaki enzim genlerinin ekspresyon seviyesini etkilediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aromatik, Gen, Isı stresi, Ehrlich, *Saccharomyces cerevisiae*

Teşekkür:

EK 8 - Tez Çalışması Orjinallik Rapor

