

**FARKLI BÖLGE BUĞDAY UNLARINDAN ÜRETİLEN
EKŞİ HAMURLARDAN İZOLE EDİLEN ENDOJEN
MAYALARIN BAZI TEKNOLOJİK VE İMMÜNOJENİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF SOME TECHNOLOGICAL AND
IMMUNOGENIC PROPERTIES OF ENDOGENOUS
YEASTS ISOLATED FROM SOURDOUGHS PRODUCED
FROM DIFFERENT REGIONS' WHEAT FLOURS**

ECE KONURALP

PROF. DR. SAİT AYKUT AYTAÇ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

ÖZET

FARKLI BÖLGE BUĞDAY UNLARINDAN ÜRETİLEN EKŞİ HAMURLARDAN İZOLE EDİLEN ENDOJEN MAYALARIN BAZI TEKNOLOJİK VE İMMÜNOJENİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Ece KONURALP

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

Aralık 2020, 108 sayfa

Bu çalışmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan buğday unlarından ekşi hamurlar hazırlanarak bunlardan ve hazır 1 adet ekşi hamurdan maya kolonileri izole edilmiştir. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi'yle tanımlaması yapılan izolatların 37°C'de ve yüksek şeker konsantrasyonunda gelişmeleri incelenmiştir. MALDI-TOF MS ile yapılan ön tanımlamaya göre 12 maya izolatının 10 tanesi *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Sadece E1 kodlu izolat yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilmiştir. 37°C'de GPY agarda Bi1, Bi5, Bi7; GPY sıvı besiyerinde ise sadece Bi1 kodlu izolat gelişmemiştir. İzolatların ekmekçilik açısından önemli olabilecek özellikleri (optik yoğunluğa dayalı gelişme hızı, glukoz-şeker fermantasyonu, çeşitli tuz derişimlerinde gelişme, düşük pH değerlerinde gelişme, killer aktivite, duyarlılık, proteolitik aktivite) araştırılarak uygun izolatların sekans analizi yaptırılmıştır. Tüm izolatlar glukozu fermente edebilmiştir. Ch1 kodlu izolat sakarozu; Bi1, Bi5, Bi7 kodlu izolatlar ise fruktozu 24 saatte fermente etmiştir. Bi5

kodlu izolat glukoz fermantasyonu besiyerinde; PeC, Bi1, Bi5 kodlu izolatlar ise şeker fermantasyonu besiyerinde 24 saat içerisinde glukozu tamamen fermente etmiştir. Tüm izolatlar pH 2.5-3.5-4.5-6.57'de ve % 2-3-4-5 (w/v) tuz konsantrasyonlarında gelişmiştir. İzolatların hiçbiri killer özellik ve proteolitik aktivite göstermemiştir. PeC ve PeA1 kodlu izolatlar hariç tüm izolatlar K1 ve K2 killer toksinlerine duyarlı bulunmuştur. Optik yoğunluğa dayalı gelişme hızı testinde *Saccharomyces cerevisiae* izolatlarından en yüksek sayıya 24. saatin sonunda M2 kodlu izolat ulaşırken *Saccharomyces uvarum*/*Saccharomyces bayanus* izolatlarından Bi5 ulaşmıştır. Sekans analiziyle 6 izolatın (C1, Ch1, E1, M2, PeF, PeA2) *Saccharomyces cerevisiae* olduğu doğrulanmıştır. MTT testiyle bazı izolatların sitotoksitesinin araştırılması için Caco-2 (İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı) ve THP-1 (İnsan monositik hücre hattı) hücreleri kullanılmıştır. MTT testine göre BY1-1, E1, M2, PeA2, PeF ve Ch1 kodlu izolatlar THP-1 ve Caco-2 hücrelerinin çoğalmasına neden olmuştur. Maya izolatlarının immüne regülasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla THP-1 hücreleri PMA uygulamasıyla makrofaja dönüştürülerek inaktif maya izolatlarıyla etkileştirilmiştir. Hücrelerden TNF- α , IL-4, IL-5 ve IL-10 sekresyonu hücre kültürü süpernatantlarından ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. İzolatların sitokin seviyeleri negatif kontrol ile kıyaslanarak t-testi ve çift yönlü ANOVA yapılmıştır. İzolatlar arasındaki fark tek yönlü ANOVA'yla değerlendirilmiştir. PeF, C1, BY1-1 ve M2 kodlu izolatlar makrofajlardan önemli düzeyde TNF- α salgılamasına neden olmuştur ($p < 0.05$). TNF- α salgılaması bakımından izolatlar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Bi5 ve Ch1 kodlu izolatların IL-4 seviyesi negatif kontrol değerinden düşük olup, makrofajlardan IL-4 salgılamasını azaltmışlardır. IL-4 salgılaması bakımından izolatlar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). En fazla IL-5 salgılaması C1 kodlu izolatta olup negatif kontrolden farkı anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bi5, Bi7, Ch1, PeA2 ve PeA1 kodlu izolatların IL-5 düzeyleri negatif kontrol değerinden düşük olup aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). IL-5 salgılaması bakımından izolatlar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). M2, Bi7, C1, PeF, BY1-1, PeC ve PeA1 kodlu izolatların makrofajlardan IL-10 salgılamasını arttırmış ve bu anlamda izolatlar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna göre PeF ve M2 kodlu izolatlar teknolojik özellikleri bakımından ekmek üretiminde maya starteri olarak kullanılma potansiyeline sahip olup, Türkiye'ye özgü endemik suş olup olmadıkları hususunda ve ticarileştirilebilmeleri için daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır. Maya izolatlarının THP-1 ve Caco-2 kanser hücre hatlarına etkisinin yanı sıra makrofajlarla etkileşimleriyle

açıĝa çıkan TNF- α , IL-4, IL-5 ve IL-10 sitokinlerinin seviyeleri ortaya konularak mayaların insan saĝlıĝı üzerinde olası etkilerine ilişkin yapılabilecek çalışmalar için projeksiyon tutulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ekşi maya, *Saccharomyces cerevisiae*, ekşi hamur, Caco-2, THP-1, sitokin

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME TECHNOLOGICAL AND IMMUNOGENIC PROPERTIES OF ENDOGENOUS YEASTS ISOLATED FROM SOURDOUGHS PRODUCED FROM DIFFERENT REGIONS' WHEAT FLOURS

Ece KONURALP

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

December 2020, 108 pages

In this study, yeast colonies were isolated from sourdoughs that were prepared with wheat flours which were collected from Turkey's different areas meanwhile one of them was readymade sourdough. The isolates that were identified by MALDI-TOF Mass Spectrometry were analysed for their growth at 37°C and in high sugar concentration. 10 of 12 isolates were *Saccharomyces cerevisiae* according to the pre-identification which was done by MALDI-TOF MS. Only E1 (coded isolate) could grow in high sugar concentration. Bi1, Bi5, Bi7 couldn't grow in GPY agar at 37°C. Only Bi1 couldn't grow in GPY broth at 37°C. The properties which can be important for bread making (optical density dependant growth rate, glucose-sugar fermentation, growth in several salt concentrations, growth at low pH values, killer activity, sensivity, proteolytic activity) of the yeast isolates were investigated and the convenient isolates' sequence analysis was performed. All of the yeast isolates could ferment glucose. Ch1 could ferment saccharose

within 24 hours. Bi1, Bi5, Bi7 could ferment fructose within 24 hours. Bi5 fermented glucose in glucose fermentation medium within 24 hours. PeC, Bi1, Bi5 fermented glucose in sugar fermentation medium within 24 hours. All of the isolates were grown at pH 2.5-3.5-4.5-6.57 values and at 2-3-4-5 % (w/v) salt concentrations. Neither of the isolates showed killer and proteolytic activity. All of the isolates were found sensitive to K1 and K2 killer toxins except PeC and PeA1. While M2 reached the highest number at the end of 24 hours among the *Saccharomyces cerevisiae* isolates, Bi5 reached the highest number at the end of 24 hours among the *Saccharomyces uvarum*/*Saccharomyces bayanus* isolates in the optical density dependant growth rate experiment. 6 of the isolates (C1, Ch1, E1, M2, PeF, PeA2) verified as *Saccharomyces cerevisiae* with sequence analysis. Caco-2 (Human colon adenocarcinoma cell line) and THP-1 (Human monocytic cell line) cells were used to investigate cytotoxicity of the some isolates with MTT Assay. BY1-1, E1, M2, PeA2, PeF and Ch1 caused growth of THP-1 and Caco-2 cells according to MTT Assay. THP-1 cells were differentiated to macrophages by applying PMA and were interacted with the inactive yeast isolates to determine effect of the yeast isolates to immune regulation. TNF- α , IL-4, IL-5 and IL-10 secretion from the cells was measured from the cell culture supernatants with ELISA method. t- Test and two way ANOVA were implemented by comparing the isolates' cytokine levels with the negative control. Differences between the isolates were evaluated by using one way ANOVA. PeF, C1, BY1-1 and M2 caused significant amounts of TNF- α release from macrophages ($p < 0.05$). The difference between the isolates was found significant in terms of TNF- α release level ($p < 0.05$). IL-4 levels of Bi5 and Ch1 were lower than the negative control value and they decreased IL-4 release from macrophages. The difference between the isolates was not determined significant in terms of IL-4 release ($p > 0.05$). The highest IL-5 release was in C1 and its difference from the negative control was found significant ($p < 0.05$). IL-5 levels of Bi5, Bi7, Ch1, PeA2 and PeA1 were lower than the negative control value and the difference between them was found significant ($p < 0.05$). The difference between the isolates in terms of IL-5 release level was found significant ($p < 0.05$). M2, Bi7, C1, PeF, BY1-1, PeC and PeA1 increased IL-10 release from macrophages and the difference between the isolates was found significant in this respect ($p < 0.05$). PeF and M2 have a potential to be used as yeast starter for bread making in terms of their technological properties accordingly. More extensive studies should be performed about whether they are endemic strains indigenous to Turkey or not and to commercialize them. The subject

was lighted up for the studies that will be able to done about possible effects of yeasts to human health by presenting the effects of the yeast isolates to THP-1 and Caco-2 cancer cell lines as well as presenting levels of TNF- α , IL-4, IL-5 and IL-10 cytokines which come out with the interaction between the yeasts and macrophages.

Keywords: Sour yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, sourdough, Caco-2, THP-1, cytokine

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her türlü desteğiyle bana yardım eden ve yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ'a,

Yüksek lisans tezimi hazırlamamda bilgi ve katkılarıyla beni yönlendiren ve destek olan değerli hocam Prof. Dr. Dilek Sivri ÖZAY'a,

Tez çalışmalarımın yürütülmesi sürecinde 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı (2210-C) kapsamında beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a,

Tez çalışmalarımı katkı ve yönlendirmeleriyle zenginleştiren Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e,

Her zaman beni destekleyip yanımda olan ve bana inanan annem Hülya KONURALP ve babam Hüseyin KONURALP'e,

Tüm bu süreçte yardımları ve varlıklarıyla yanımda olan Dilek KELGÖKMEN, Çiğdem ESMERTAŞ, Şilan TÜLLÜK, Kamil URGUN, Gizem KEZER ve Ekin Oya ŞENER'e

İçtenlikle teşekkür ederim...

Ece KONURALP

Aralık 2020, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ekmek.....	4
2.1.1. Ekmek Üretiminde Kullanılan Katkı Maddeleri	5
2.1.2. Mayaların Fermantasyon Mekanizması	6
2.1.3. Ekmek Mayasının Çalışmasını ve Fermantasyonunu Etkileyen Faktörler	6
2.2. Ekşi Hamur.....	7
2.3. MALDI-TOF MS (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi)	12
2.4. Killer Aktivite	12
2.5. Sekans Analizi.....	13
2.6. MTT (3-(4,5-dimetil tiyazol 2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum-bromür) Testi	14
2.7. Caco-2 ve THP-1 Hücreleri.....	15
2.8. Sitokinler	16
2.9. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)	17
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Ekşi Hamur Örnekleri	19
3.1.2. Maya Suşları.....	19
3.1.3. Besiyerleri ve Dilüsyon Sıvıları	20
3.1.4. Tampon, Boya ve Diğer Çözeltiler	21

3.1.5. MALDI-TOF MS İle Ön Tanımlamada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	21
3.1.6. Optik Yoğunluğa Dayalı Gelişme Hızının Ölçümünde Kullanılan Cihazlar	23
3.1.7. Sekans Analizi İçin Kullanılan Cihazlar.....	23
3.1.8. MTT Testi İçin Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Cihazlar	23
3.1.9. Sitokin Analizleri İçin Kullanılan Cihazlar ve Kitler	24
3.2. Metot	25
3.2.1. Ekşi Hamurların Hazırlanması.....	25
3.2.2. Ekşi Hamurlardan Maya İzolasyonu.....	25
3.2.3. MALDI-TOF MS İle Ön Tanımlama	26
3.2.4. Maya İzolatlarının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	27
3.2.5. Mayaların Ekmekçilik Teknolojisi Açısından Önemli Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi.....	27
3.2.6. Sekans Analizi	30
3.2.7. MTT (3-(4,5-Dimetil tiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) Testi İle Maya İzolatlarının Hücre Proliferasyonuna Etkisinin ve Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi	31
3.2.8. Makrofajlardan Çeşitli Sitokinlerin Salınım Seviyelerinin ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Metoduyla Ölçümü.....	32
3.2.9. İstatistiksel Analizler	33
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Ekşi Hamurlardan Mayaların İzolasyonu	34
4.2. MALDI-TOF MS Sonuçları	34
4.3. Maya İzolatlarının Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişebilme Özelliğine İlişkin Sonuçlar	35
4.4. Mayaların 37°C’de Gelişebilme Özelliklerine İlişkin Sonuçlar	36
4.5. Maya İzolatlarının Ekmekçilik Teknolojisi Açısından Önemli Bazı Özelliklerine İlişkin Sonuçlar	37
4.5.1. Maya İzolatlarının Çeşitli Tuz Derişimlerinde Gelişebilme Özelliklerine İlişkin Sonuçlar.....	37
4.5.2. Maya İzolatlarının Glukoz Fermantasyonu Sonuçları	38
4.5.3. Maya İzolatlarının Şeker Fermantasyonu Özelliklerine İlişkin Sonuçlar.....	39

4.5.4. Maya İzolatlarının Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme Özelliklerine İlişkin Sonuçlar	42
4.5.5. Maya İzolatlarının Optik Yoğunluğa Dayalı Gelişme Hızına İlişkin Sonuçlar	43
4.5.6. Maya İzolatlarının Killer Aktivite ve Duyarlılık Testi Sonuçları	48
4.5.7. Maya İzolatlarının Proteolitik Aktivitelerine İlişkin Sonuçlar	49
4.6. Sekans Analizi Sonuçları	51
4.7. MTT (3-(4,5-Dimetil tiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) Testi Sonuçları	52
4.8. Makrofajlardan Çeşitli Sitokinlerin Salınım Seviyelerinin ELISA Metoduyla Ölçümüne İlişkin Sonuçlar	55
4.8.1. TNF- α Salınımı	55
4.8.2. IL-4 Salınımı	56
4.8.3. IL-5 Salınımı	58
4.8.4. IL-10 Salınımı	60
5. YORUM	63
6. KAYNAKLAR	67
EKLER	78
EK 1 – Araştırmada Kullanılan Besiyerleri	78
EK 2 – Araştırmada Kullanılan Tampon, Boya ve Çözeltiler	82
EK 3 – Mayaların 37°C’de Gelişmesine İlişkin Görseller	83
EK 4- Mayaların Killer Aktivite Testleri ve Duyarlılık Testlerine İlişkin Görseller ..	85
EK 5- Mayaların Fermantasyon Testlerine İlişkin Görseller	90
EK 6- Mayaların Proteolitik Aktivite Testine İlişkin Görseller	94
EK 7 – Sekans Analizi Sonuçları	97
EK 8 – THP-1 Hücreleri Morfolojik Görünümleri	106
EK 9 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	107
ÖZGEÇMİŞ	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. MALDI-TOF MS ile tanımlamada işlem basamakları.....	12
Şekil 2.2. ELISA yöntemi çeşitleri.	18
Şekil 3.1. MALDI-TOF MS cihazı (Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi). 22	
Şekil 3.2. MALDI-TOF MS cihazı target'ı (Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi).....	22
Şekil 3.3. MALDI-TOF MS cihazı target haznesi (Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi).....	23
Şekil 3.4. Kit mikropalakasına ilişkin görsel.....	24
Şekil 3.5. BMG LABTECH Spectrostar Nano mikropalaka okuyucu UV-VIS spektrofotometre.....	25
Şekil 4.1. E1 kodlu maya izolatının regresyon doğrusu.	43
Şekil 4.2. <i>S. cerevisiae</i> türü maya izolatlarının optik yoğunluğuna dayalı gelişme hızları.	44
Şekil 4.3. <i>S. cerevisiae</i> türü maya izolatlarının optik yoğunluğuna dayalı gelişme hızları (sütun grafiği gösterimi).....	44
Şekil 4.4. <i>S. cerevisiae</i> türü maya izolatlarının logaritmik olarak gelişme hızları grafiği.	45
Şekil 4.5. B1 kodlu maya izolatının regresyon doğrusu.	46
Şekil 4.6. <i>S. uvarum</i> / <i>S. bayanus</i> türü maya izolatlarının optik yoğunluğuna dayalı gelişme hızları grafiği.....	47
Şekil 4.7. <i>S. uvarum</i> / <i>S. bayanus</i> türü maya izolatlarının optik yoğunluğuna dayalı gelişme hızları (sütun grafiği gösterimi).....	47
Şekil 4.8. <i>S. uvarum</i> / <i>S. bayanus</i> türü maya izolatlarının logaritmik olarak gelişme hızları grafiği.....	48
Şekil 4.9. TNF- α ELISA kiti standart eğrisi.	55
Şekil 4.10. IL-4 ELISA kiti standart eğrisi.	56
Şekil 4.11. IL-5 ELISA kiti standart eğrisi.	58
Şekil 4.12. IL-10 ELISA kiti standart eğrisi.	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ekşi hamurdan izole edilen mayalar	10
Çizelge 3.1. Ekşi hamurların hazırlandığı un örnekleri kaynak bilgisi.....	19
Çizelge 4.1. Ekşi hamurlardan izole edilen olası mayalara ilişkin bilgiler.....	34
Çizelge 4.2. MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları.	34
Çizelge 4.3. Yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilme kabiliyetine ilişkin sonuçlar.	35
Çizelge 4.4. 37°C’de gelişebilme özelliğine ilişkin sonuçlar.....	36
Çizelge 4.5. Çeşitli tuz derişimlerinde gelişebilme özelliklerine ilişkin sonuçlar.	37
Çizelge 4.6. Fermantasyonu sonuçları.	39
Çizelge 4.7. Düşük pH değerlerinde gelişebilme özelliklerine ilişkin sonuçlar.	42
Çizelge 4.8. <i>S. cerevisiae</i> türü maya izolatlarının zamana göre sayı değerleri.	43
Çizelge 4.9. <i>S. uvarum/ S. bayanus</i> türü maya izolatlarının zamana göre sayı değerleri.	46
Çizelge 4.10. İzolatların killer aktivite ve duyarlılık özellikleri.	49
Çizelge 4.11. Proteolitik aktiviteye ilişkin sonuçlar.	49
Çizelge 4.12. Sekans analizi sonuçları.	51
Çizelge 4.13. Caco-2 hücreleri ile etkileşim sonucu maya izolatlarının absorbans değerleri (570 nm).....	52
Çizelge 4.14. Caco-2 hücreleri için % canlılık sonuçları.....	52
Çizelge 4.15. Caco-2 hücreleri için ortalama % canlılık ve güven aralığı.....	53
Çizelge 4.16. THP-1 hücreleri ile etkileşim sonucu maya izolatlarının absorbans değerleri (570 nm).....	53
Çizelge 4.17. THP-1 hücreleri için % canlılık sonuçları.....	53
Çizelge 4.18. THP-1 hücreleri için ortalama % canlılık ve güven aralığı.	54
Çizelge 4.19. Negatif kontrolün TNF- α salınımı bakımından her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri ve izolatların varyans değerleri.	55

Çizelge 4.20. Negatif kontrolün IL-4 salınımı bakımından her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri ve izolatların varyans değerleri.....	57
Çizelge 4.21. Negatif kontrolün IL-5 salınımı bakımından her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri ve izolatların varyans değerleri.....	58
Çizelge 4.22. Negatif kontrolün IL-10 salınımı bakımından her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri ve izolatların varyans değerleri.	60
Çizelge 4.23. Maya izolatlarının THP-1 makrofaj hücreleriyle etkileşimi sonucunda açığa çıkan % sitokin miktarı.....	61
Çizelge 4.24. Maya izolatlarının THP-1 makrofaj hücreleriyle etkileşimi sonucunda açığa çıkan % sitokin miktarı (devam).	62
Çizelge 4.25. Maya izolatlarının THP-1 makrofaj hücrelerinden sitokin salınım düzeylerine ilişkin ortalama değerlerinin Tukey testi sonuçları.	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µL	Mikro Litre
∞	Sonsuz
d	Yoğunluk
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
M	Molar
m/m	Ağırlık/Ağırlık
mg	Miligram
mL	Mililitre
mol	Mol
N	Normal
nm	Nanometre
p	Anlamlılık Düzeyi
pg	Pikogram
ppm	Milyonda Bir
rpm	Dakikada Devir Sayısı
sn	Saniye

uL	Mikro Litre
V	Volt
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim
α	Alfa
γ	Gama

Kısaltmalar

A	Adenin
ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
C	Sitozin
Caco-2	İnsan Kolon Adenokarsinoma Hücre Hattı
CO ₂	Karbondioksit
DATA	Diasetiltartarik Asit
DATEM	Diasetiltartarik Ester Mono ve Digliseridleri
dATP	Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	Deoksisitidin Trifosfat
ddATP	Dideoksiadenozin Trifosfat
ddCTP	Dideoksisitidin Trifosfat
ddGTP	Dideoksiguanozin Trifosfat
ddH ₂ O	Çift Distile Su
ddNTP	Dideoksiribonükleozid Trifosfat
ddTTP	Dideoksitimidin Trifosfat
DGMS	Distile Monogliserit

dGTP	Deoksiguanozin Trifosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozid Trifosfat
dTTP	Dideoksitimidin Trifosfat
ED	Entner – Doudoroff
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
EMP	Embden Meyerhof ve Parnas
FCS	Fetal Sığır Serumumu
G	Guanin
GMS	Gliserol Monostearat
HCl	Hidroklorik Asit
HMP	Hegzos Mono Fosfat
IFN- γ	İnterferon Gama
IL	İnterlökin
LAB	Laktik Asit Bakterisi
LPS	Lipopolisakkarit
MALDI-TOF MS	Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi
MTT	3-(4,5-Dimetil tiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit + Hidrojen

NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat + Hidrojen
NCYC	Maya Kültürlerinin Ulusal Koleksiyonu
NO	Nitrik Oksit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMA	Forbol-12-Miristat-13-Asetat
PO ₄	Fosfat
PPC	Pentoz Fosfat Döngüsü
rDNA	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
SE	Standart Hata
SSL	Sodyum Stearol Laktilat
T	Timin
TCA	Trikarboksilik Asit
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
VD3	1,25-Dihidroksivitamin D3

1. GİRİŞ

Ekmek tüm ülkelerde en çok tüketilen ürünlerden birisi olup ülkemizde de gerek ucuz gerek doyurucu özellikte olmasından dolayı vazgeçilmez gıdalarımızdandır [1]. Dünyada ilk mayalı ekmek üretiminin M.Ö 1800 yıllarında eski Mısır'da hamurun kendi haline bırakılmasıyla tesadüf sonucu gerçekleştiği bildirilmektedir [2]. Ekmek, Türk Gıda Kodeksi Ekmek ve Ekmek Çeşitleri Tebliği'ne göre buğday ununa tuz, su, maya (*Saccharomyces cerevisiae*), ihtiyaç halinde şeker, enzimler, enzim kaynağı olarak malt unu, vital gluten ve izin verilen katkı maddeleri ilave edilip bu karışımın tekniğine uygun olarak yoğrulması, şekillendirilmesi, fermantasyona bırakılması ve pişirilmesi ile üretilen bir ürün olarak tanımlanmaktadır [3].

Beslenmemizde günde aldığımız kalorinin önemli bir kısmını sağlayan bir gıda maddesi olarak ekmek değerli enerji kaynaklarımızdandır. Bu nedenle gıda tüketiminde yerinin önemli olduğu bilinmektedir. Gün geçtikçe geleneksel ürünlere gösterilen talebin artmasının tüketicileri koruyucusuz, uzun raf ömürlü, daha besleyici ve daha lezzetli ürün çeşitleri arayışına yönelttiği; bunun sonucunda da ekşi hamur ekmeklerine olan ilginin arttığı belirtilmektedir [4].

19. yy'a kadar ekmek üretiminde mayalama sırasında ekşi hamur kullanılırken, 19. yy'dan itibaren fırıncılık mayası kullanılmaya başlandığı, ekşi hamur kullanımının küçük fırınlar ve çavdar ekmeği üretimine indirildiği belirtilmektedir [5]. Günümüzde ekşi hamurun dünya genelinde farklı ürünlerde (ekmek, kek, kraker) kullanımında artış görülmekte olup buğday unundan hazırlanan ekşi hamur 200 farklı türde ekşi hamur ekmeğinde ve İtalyan fırıncılık ürünlerinin % 30'unda kullanılmaktadır [5-7]. Yıllık 3 milyon tondan fazla üründe ekşi hamur kullanıldığı göz önüne alındığında endüstriyel ölçekte önemini hala koruduğu bildirilmektedir [8].

Yaşadığımız dönemde ekmek üretiminde hamur hazırlanması esnasında maya oranının % 2-3'den % 5-6'ya yükseltilmesi ile ekşi maya kullanımı yerine fermantasyon sürelerini kısaltan uygulamalar sonucunda geleneksel ekmek lezzetinden farklı, sünger yapısında ürünler üretildiği belirtilmektedir [1]. Daha iyi reolojik ve duyuşal özelliklere sahip ürün

elde etmek, besin kalitesi daha yüksek ürün üretimini sağlamak aynı zamanda doğal üretim yöntemleriyle üretilmiş ürünleri tüketmek isteyen tüketicilerin ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla araştırmaların son yıllarda ekşi hamur üretimi üzerine yoğunlaştığı bildirilmektedir [9].

Ekşi hamurda mayalar ve genellikle heterofermantatif laktobasiller birlikte bulunmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* ekşi hamurda bulunan tipik maya türlerindedir. Ekmeğin besin öğelerince zengin olması, ekmeğin gastronomik kalitesi, tahıl matriksinin endojen enzimatik modifikasyonu ve/ya bazı laktik asit bakterilerinin spesifik aktiviteleri sonucu sağlık üzerine olumlu etkilerinin ekşi hamur kullanımının başarısını desteklediği belirtilmektedir [10].

Ekşi hamurdan izole edilen mayaların hücre proliferasyonu üzerinde etkisi ve sitotoksitenin araştırılmasında Caco-2 ve THP-1 hücre hatları kullanılmıştır. Caco-2, insan kolon adenokarsinomundan türetilmiş hücre hattıdır ve barsak epitelyumu geçirgenliği üzerine yapılan çalışmalarda in-vitro model olarak kullanılabilenliği önerilmiştir [11]. Kültüre edilmiş hücrelerin kullanımının diğer hücre tiplerinden etkilenmeksizin sadece barsak epitel hücrelerinin fonksiyonunun araştırılmasına olanak sağlaması gibi bir avantajı bulunduğu belirtilmiştir [12]. THP-1, insan monosit benzeri hücre hattıdır [13]. Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ve 1,25-dihidroksivitamin D3 (VD3)'ün, monositik hücrelerde makrofaj farklılaşmasını indüklemek için kullanılan uyaranlar olduğu bildirilmektedir [14].

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan buğday unları kullanılarak Hacettepe Üniversitesi laboratuvarlarında hazırlanan ekşi hamur örneklerinden ve hazır olarak temin edilmiş olan bir adet ekşi hamurdan mayalar izole edilmiştir. Ekşi hamurda doğal olarak bulunduğu düşünülen ve izole edilen bu mayaların MALDI-TOF MS ile ön tanımlamaları yapılmış, daha sonrasında ekmek yapım teknolojisi açısından önemli olabilecek çeşitli özellikleri araştırılmıştır. Yapılan testler sonucunda uygun olduğu düşünülen izolatların sekans analizleri hizmet alımı şeklinde yapılarak izolatlar tanımlanmıştır. Bazı izolatların aynı zamanda Caco-2 ve THP-1 hücre hatları kullanılarak hücre proliferasyonu üzerine etkileri ve sitotoksiteleri MTT testi ile incelenmiştir. Ayrıca maya izolatlarının immün sistem yanıtları açısından incelenmesi

amacıyla hizmet alımı yapılarak THP-1 monositer hücreleri PMA uygulaması ile makrofaja dönüştürülmüştür. Sonrasında hücrelerden TNF- α , IL-4, IL-5 ve IL-10 sitokinlerinin sekresyonu ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. İnsan sağlığına zararlı etki göstermeyen ve ekmekçilik teknolojisi açısından iyi özelliklere sahip doğal *Saccharomyces cerevisiae* maya suşlarının bulunması ve starter kültür olarak kullanımlarının önerilebilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ekmek

Ekmek yapımında kullanılan temel bileşenler un, su, tuz ve maya olup unun kaynağı buğdayın endospermidir [2]. Undaki ayrı ayrı halde bulunan gluten proteinleri suyla karıştırma sırasında etkileşime girmekte ve bir yapı oluşturmaktadır. Bu yapı fermantasyon sırasında gerilmekte ve ekmeğin yapısını oluşturmak için pişirme sırasında koagüle olmaktadır [15].

Unun kalitesi genelde un ve hamurun fiziksel, kimyasal ve teknolojik özelliklerine göre belirlenmektedir [2]. Ekmek yapımında sert buğdaylardan elde edilen kuvvetli yapıdaki unlar tercih edilmektedir [15]. Bir unun kuvvetli olmasının ekmekçilikte protein miktarı ve kalitesiyle ilişkili olduğu bilinmekte olup unların kalitesini gösteren kriterler; renk, protein miktarı, protein kalitesi, üniformite, su absorpsiyon kabiliyeti, yoğurma ve fermantasyon toleransı ve hamurun gaz oluşturma kabiliyetidir [2].

Su, hamurda diğer bileşenlerin karışmasını sağlayan ve fermantasyon için gerekli olan, aynı zamanda istenilen visko-elastik yapının oluşmasını sağlayarak son ürün kalitesini etkileyen önemli bir bileşendir [2]. Diğer taraftan, pişirme sırasında nişastanın jelatinizasyonu için de su gerekli olup protein miktarı ve kalitesine göre gereken su miktarı değişiklik göstermektedir [15]. Hamur kütesinin yaklaşık olarak % 40'ını su oluşturmakta ve ekmek yapımında orta sertlikte sular (50-100 ppm) tercih edilmektedir [2].

Ekmekçilikte kullanılan NaCl tuzunun ekmeğe lezzet kazandırmanın yanısıra proteolitik enzimleri inhibe ederek gluteni kuvvetlendirici etkisi de bulunmaktadır. Tuz ile un proteinleri arasındaki interaksiyonun glutenin su bağlama kapasitesini azalttığı bildirilmiştir [2].

Ekmekçilikte kullanılan mayanın birincil görevi karbondioksit üreterek hamurun kabarmasını sağlamaktır [15]. Genellikle, fırıncılıkta ekmek mayası olarak *S. cerevisiae* kullanıldığı belirtilmektedir [16]. *S. cerevisiae*'nın yanısıra ekmek üretiminde *Kluyveromyces marxianus*'un kullanımının da uygun olabileceği önerilmiştir [17].

Saccharomyces cerevisiae türleri basit şekerleri fermente ederek CO₂ oluşturmakta böylece hamurun kabarmasını sağlamaktadır. Oluşan diğer fermantasyon ürünleriyle de hamurun olgunlaşmasını ve aroma oluşumunu sağlamaktadır. Mayalar tarafından üretilen redüktaz enziminin hamurun olgunlaşmasını hızlandırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir [2].

Mayalar ayrıca fermantasyon sırasında glutene etki ederek elastisiteyi artırırken hamurun viskoz akışını azaltmaktadırlar [15]. Mayaların fermantasyonu sonucu oluşan CO₂'in bir kısmı hamurun sıvı fazında çözünerek karbonik asit oluşmakta ve maya faaliyetleri sonucu düşen ortam pH'ı glutenin hidrasyonunu, şişmesini ve ortamdaki enzimatik ve kimyasal diğer reaksiyonları etkilemektedir [2].

2.1.1. Ekmek Üretiminde Kullanılan Katkı Maddeleri

α -amilaz, proteaz ve lipooksigenaz ekmek üretiminde katkı maddesi olarak kullanılan enzimler arasındadır [18]. Amilaz enzimlerinin zedelenmiş nişastayı ve jelatinize olmuş nişastayı parçaladığı bilinmektedir [2]. Buğday ve pirinç unları % 0.5- 1 oranında fermente olabilen şeker içerdiğinden dolayı formülasyona yeteri kadar şeker eklenmemesi halinde maya gelişmesi için nişastanın maltoza enzimatik yolla parçalanması çok önemli olup eğer unun α -amilaz aktivitesi yetersizse maltoz içeriği çok düşük kalmakta ve sonuç olarak hamur az kabarmaktadır [18].

Proteaz enzimleri proteinlerin disülfid bağlarını parçalamamakta, dolayısıyla üç boyutlu gluten ağı yapısı zarar görmemektedir. Bu sebeple unda doğal olarak bulunan proteazların ekmek kalitesine etkisi düşük iken, gluten proteinlerini hidrolize edebilen proteazların pişirme kalitesine etkisi çok büyüktür [2],[18].

Şekerler fermantasyon hızını, gaz oluşumunu dolayısıyla ekmek hacmini etkilerken aynı zamanda ekmekte kabuk rengi ve aroma maddelerinin oluşmasını sağlamaktadır [19]. Şeker oranı, un ağırlığının % 10' unu geçmesi halinde maya hücrelerindeki çözünmemiş halde bulunan çözüngenin etkisiyle oluşan ozmotik basınç sonucu fermantasyonun geciktiği bildirilmektedir [15].

Lipooksigenazlar, C vitamini, yağlar ve emülgatörler ekmek için kullanılan diğer katkı maddelerindedir [18],[19],[20]. En sık kullanılan emülgatörler: Monogliseritlerin

diasetiltartarik asit (DATA) esterleri (DATEM), Sodyum stearol laktilat (SSL), Distile monogliserit (DGMS), Gliserol monostearat (GMS) ve Lesitindir [20].

2.1.2. Mayaların Fermantasyon Mekanizması

Fermantasyon mekanizması glukozdan başlayıp etil alkol oluşumuyla son bulan bir çeşit reaksiyonlar dizisi olup mikroorganizmalar glukozu başlıca 3 yolla fermente etmektedirler: Glukozun heksozdifosfat yoluyla parçalanması (EMP yolu), heksozun oksidatif pentozfosfat yoluyla parçalanması (HMP yolu), glukozun Entner - Doudoroff yoluyla parçalanması (ED yolu). Hayvan dokularında, maya ve bakterilerde heksozların anaerobik olarak parçalanmasında EMP yolunun (Embden Meyerhof ve Parnas Yolu) önem taşıdığı belirtilmektedir. EMP yolu; glukozun mayalar tarafından etil alkol fermantasyonu ile etil alkol ve CO₂'ye, kas hücreleri tarafından ise kaslarda laktik aside çevrimini göstermektedir. Laktik asit bakterileri gibi bazı mikroorganizmaların sahip olduğu laktatdehidrogenaz enzimi ile pirüvik asit indirgenerek, laktik asite dönüşmektedir. Bu olaylar anaerobik koşullarda meydana gelmektedir [21].

Glukozdan laktik asit oluşumuna kadar gerçekleşen reaksiyonlar dizisi glikolizis olarak adlandırılmaktadır. Glikoliz ve fermantasyon olaylarında sonuçta bağ enerjileri yüksek ürünler oluşmaktadır, çünkü tam olmayan bir parçalanma gerçekleşmektedir ve bu nedenle net enerji kazancı az olmaktadır (2 ATP). Diğer monosakkaritler uygun enzimler aracılığıyla dönüşüm geçirerek EMP yoluna girmektedir [21].

Fermantasyonun yan ürünleri olarak metil alkol, asetaldehit, yüksek alkoller, gliserin, organik asit ve esterler oluşmaktadır [22].

2.1.3. Ekmek Mayasının Çalışmasını ve Fermantasyonunu Etkileyen Faktörler

Ekmek üretiminde kullanılan maya miktarı fermantasyonu ve dolayısıyla ekmek yapısını etkilemektedir. Maya miktarının fermantasyon süresine göre belirlendiği; sabit oranlarda tuz, yağ ve şeker kullanılarak maya miktarının az (% 0.5), normal (% 3) ve çok (% 5) miktarda ayarlanması ile maya etkisinin test edildiği bir çalışmada iki saat süresince fermantasyon uygulanmıştır. Buna göre düşük miktarda maya kullanıldığında az miktarda gaz üretimi gerçekleşmiş ve buna bağlı olarak düzgün olmayan, gelişmemiş bir yapı oluşmuştur. Tam aksine çok miktarda maya kullanımında ise aşırı gaz üretimi ve yüksek hacim meydana gelmiştir, dolayısıyla çok gevşek bir hamur oluşmuştur [23,24].

Fermantasyonu etkileyen bir diğerk faktör sıcaklık olup mayaların çalışmasının en hızlı 30-36 °C arasında olduğu, 20 °C'nin altında ve 40 °C'nin üzerinde gelişimin durduğu belirtilmektedir [2]. Hamur sıcaklığı yükseldikçe optimum sıcaklığa (yaklaşık 40 °C) ulaşana kadar gaz üretim hızının arttığı bildirilmiştir [24,25]. Bu sıcaklık üzerine çıktıkça yaklaşık 50 °C'ye kadar hücre ölümünün gerçekleştiğı ve gaz üretiminde kademeli bir azalma olduğu, hamur sıcaklığı azaldıkça ise gaz üretim hızının azaldığı ve 4 °C civarında ise neredeyse tamamen durduğu ortaya konulmuştur [24,25].

Mayaların optimum olarak pH 4.5-5 arasında faaliyet gösterdiği, pH'ın maya faaliyeti açısından olduğu kadar hamurdaki diğerk mikrobiyolojik ve enzimatik faaliyetleri etkilemesi açısından da önemli olduğu bilinmektedir [2].

Şeker, hamurda maya için en önemli besin kaynağı olup unda yaklaşık % 1.5 oranında doğal halde fermente olabilir şeker bulunmaktadır [24,25]. Daha fazla şeker eldesi ise undaki amilaz enzimleri zedelenmiş nişastaya etki ettiğinde maltoz üretimi gerçekleşmesiyle sağlanmaktadır [24,25]. Fermantasyon için ortamda bulunan şeker miktarının % 5'in altında olması gerektiğı aksi halde maya fermantasyonunu veya solunumunu inhibe edeceği belirtilmektedir [2].

Ortamdaki tuz miktarının artması maya faaliyetini olumsuz yönde etkilemektedir [2]. Hamurdaki ortamın ozmotik basıncındaki artış bu ortamda bulunan maya hücrelerinden suyun dışarıya çıkmasına neden olmakta, sonuçta maya hücresi içindeki çözünmüş katı maddenin konsantrasyonu artmakta ve gaz üretimi azalmaktadır [24,25]. Şekerin ozmotik basınçtaki değişimi daha az etkilediğı ifade edilmiştir [24,25].

2.2. Ekşi Hamur

Ekşi hamur ekmeğı Türk Gıda Kodeksi Ekmek ve Ekmek Çeşitleri Tebliğı'ne göre tahıl unlarına su, tuz, maya, geleneksel veya endüstriyel yöntemlerle elde edilen ekşi veya ekşi hamur ilavesiyle hazırlanan hamurun tekniğine uygun olarak yoğrulması, şekillendirilmesi, fermantasyona bırakılması ve pişirilmesi ile üretilen ekmek ve ekmek çeşitleri olarak tanımlanmaktadır [3].

Ekşi hamur, mayaların ve genellikle heterofermantatif laktobasillerin birlikte bulunduğu özel ve stresli bir ekosistemdir [10]. Ekşi hamur, buğday ya da çavdar unu ve suyun

oluşturduğu karışımın Laktik Asit Bakterileri (LAB) ve mayalarla fermantasyonuyla hazırlanmaktadır [26]. Mikroorganizmaların genellikle undan, fırından ya da bazen hamura eklenen meyve, sirke, şıra gibi maddelerden bulaştığı; bunun sonucu oluşan floranın oldukça karmaşık bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir [27]. Fermantasyonda ekmeğin mayasının yanı sıra homofermantatif ve heterofermantatif laktik asit bakterisi kültürlerinin ilavesinin ve fermantasyon sürecinin uzun tutulmasının hem ekmeğin özelliklerini hem de aromayı olumlu etkilediği belirtilmektedir [1].

Homofermantatif LAB'lar şekeri kullanarak laktik asit oluşturmaktadır; heterofermantatifler ise laktik asidin yanı sıra CO₂, etil alkol, asetik asit ve bazı uçucu bileşikler de üretmektedir [1]. Ekşi hamur mikrobiyotasının ana metabolik aktiviteleri: Laktik asit bakterilerinin neden olduğu asit oluşumu, hem maya hem de laktik asit bakterilerinin etkin olduğu aroma oluşumu ve maya-heterofermantatif laktik asit bakterilerince hamurun kabartılması şeklinde ifade edilmektedir [10]. Ekşi hamur ne kadar düşük hamur verimi değerine sahipse, o kadar çok asetik asit üretilmekte ve laktik asit üretimi o kadar daha az olmaktadır [9].

Ekşi hamurun; hamurun işlenmesi, ekmeğin tekstürü, aroması ve raf ömrü üzerine bazı teknolojik avantajlar sağladığı belirtilmektedir [10]. Ekşi hamur ekmeği; arzu edilen hacim ve ekmeğin içi yapısı, kuvvetli aroması, daha uzun raf ömrüne sahip olması nedeniyle ekmeğin tercih sebebidir [1,28–30].

Ekmeğin ve unla hazırlanan diğer ürünlerde karşılaşılan başlıca mikrobiyolojik bozulmalar sünme (rope) hastalığı ve küflenmedir. Mikrobiyolojik bozulmaların sebepleri ise uygun hammadde kullanılmaması, hijyenik şartlarda üretim gerçekleştirilmemesi, üretimden tüketime kadar geçen süre içerisinde bir bulaşımın olmasıdır. Mikrobiyolojik bozulmaların önüne geçilmesinde kimyasal koruyucular ve laktik starter kültürlerinin kullanımının rağbet gördüğü bildirilmektedir [31].

Ekşi hamurlar Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 olmak üzere 3 tipe sınıflandırılmaktadırlar. Tip 1 önceki fermantasyondan bir parçanın kullanılmasıyla hazırlanan ekşi hamurlardır, bunlara geleneksel ekşi hamur da denilmektedir. Tip 2 endüstriyel tip bir ekşi hamur olup, fermantasyonu başlatmak için uyarlanmış suşlar kullanılmaktadır. Bu ekşi hamurlar sıvı olabilmektedir bu da hamurun kolay pompalanabilmesine olanak sağlamaktadır. Tip 3

kurutulabilen bir ekşi hamur tipi olup genelde endüstriyel fırıncılıkta kullanılmaktadır çünkü kalite sabittir, taze üretilen ekşi hamur kaynaklı son ürün varyasyonları olmamaktadır [9,32].

Geleneksel buğday ve çavdar ekşi hamuru üretiminde fermantasyon süresinin 3-48 saat olduğu belirtilmektedir [33–35]. Trabzon Vakfikebir ekmeğinin hamuru tip 1 ekşi hamur olup sert kabuklu, iri gözenekli, aromatik, işleme toleransı yüksek, yüksek hacimli ve gramajlı ayrıca işlem süresi yaklaşık 24 saat uzunlukta olan bir ekmektir [36].

Ekşi hamur fermente olabilir karbonhidratlar açısından zengin olup başlangıçtaki pH değeri 5.0-6.2 arasındadır; bu düşük pH, uygulanan ekşi hamur hazırlama teknolojisi ve unun hazırlanış biçimine bağlı olarak tahıllar/unlardan gelen laktik asit bakterilerinin spontane şekilde gelişmesine olanak sağlamaktadır [35]. Karbonhidratça zengin ve düşük asitli hamurların spontane fermantasyonları genelde birbirini takip eden veya eş zamanda gerçekleşen laktik asit bakterileri ve mayaların gelişimi ile karakterize olmaktadır [37]. Spontane hamur fermantasyonları starter kültür ya da önceden hazırlanmış ekşi hamurdan (ana hamurdan) bir porsiyon kullanılmaksızın unun suyla karıştırılmasıyla başlamakta olup hamurun mikroflorası; kullanılan un, tahıl, su vs. gibi ham bileşenlerin mikroflorasına ve genel hijyenik şartlara bağlı olmakta ayrıca unun saklama koşulları, türü, orijini kadar uygulanan fermantasyon prosesinin teknolojik parametrelerine göre de değişkenlik göstermektedir [37].

Geleneksel ekşi hamur proseslerinin genelde tesadüfi floraya dayanmadığı, ana hamurların kullanımına dayandığı belirtilmektedir. Bu ana hamurlar belirli ve tipik hazırlama döngüsüne göre uzun zaman periyotlarında devamlı olarak muhafaza edilen hamurlardır. Ana hamurun sonraki hamurlar için doğal maya olarak kullanılabilirdiği ve bu durumda spontane ekşi hamur fermantasyonundaki mikroflora yani homofermantatif laktobasillerin domine ettiği bir mikrofloraya rastlanabildiği fakat esas olarak burada heterofermantatif laktobasillerin bulunduğu belirtilmektedir [35].

Ekşi hamurdaki maya florasının bakterilere kıyasla daha homojen olduğu bildirilmektedir [16]. Ekşi hamurda bulunan tipik laktik asit bakterisi türleri: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus sanfranciscensis*'dir [10]. Ekşi hamurdaki tipik maya türleri ise: başta *Saccharomyces*

cerevisiae, *Candida humilis*, *Kazachstania exigua*’dır [10]. Stabil ekşi hamurlarda en sık rastlanan maya türleri *S. cerevisiae*, *Candida humilis*, *Pichia kudriavzevii*, *Kazachstania exigua*, *Torulospira delbrueckii* ve anamorf hali *Candida colliculosa*, *Wickerhamomyces anomalus* ‘dur [38]. Bir takım iç ve dış faktörler ekşi hamur mikrobiyotasının kompozisyonunu etkileyebilmektedir; örneğin unun tipi ve kalite durumu, sıcaklık, pH, hamur verimi, “backslopping” uygulamaları vs. [10]. *Lb. sanfranciscensis* ‘in ekşi hamur fermantasyonunda bulunması özel çevresel ve teknolojik faktörlere bağlıdır [10].

Çizelge 2.1. Ekşi hamurdan izole edilen mayalar [37].

A	B
<i>Candida boidinii</i>	<i>Candida holmii</i> ^b
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i> ^c
<i>Candida stellata</i>	<i>Candida milleri</i> ^d
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Pichia saitoi</i>
<i>Pichia polymorpha</i>	<i>Torulopsis holmii</i> ^e
<i>Hansenula anomala</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i> ^a
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	
<i>Hansenula tropicalis</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Saccharomyces dairensis</i>	
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	
<i>Saccharomyces inusitatus</i>	
<i>Saccharomyces fructuum</i>	

A ve B sütunları buğday ve çavdar ekşi hamurlarından izole edilmiş mayaları göstermektedir. B: Tipik ekşi hamur mayalarını göstermektedir.

^a : Önceki adı *Torulospira delbrueckii*.

^b : *Torulopsis holmii* var. *holmii* syn. *Saccharomyces exiguus* ‘un aseksüel formu.

^c : *Issatchenkia orientalis*’in aseksüel formu.

^d : *Torulopsis holmii* var. *acidi lactici* syn. *Saccharomyces exiguus*’un aseksüel formu.

^e : Syn. *Saccharomyces exiguus* ve *Candida holmii*’nin seksüel formu.

S. cerevisiae’ nın maltoz pozitif olduğu, belirli bir dereceye kadar düşük pH ve yüksek ozmotik basınca dayanıklı olduğu bilinmektedir [10]. *S. cerevisiae* maltozu enerji kaynağı

olarak tercih etmekte iken *C. humilis* ve *K. exigua* gibi ekşi hamura özel mayalar maltoz negatiftir, sükröz ve glukofruktanları hidrolize ederek glukozu tüketmekte ve aminoasit sağlayarak tam heterofermantatif *L. sanfranciscensis* ile beslenimsel ilişki kurmaktadır [39–41].

Ekmek yapım prosesinde bulunan mikroflora içi ilişkilerin araştırıldığı bir çalışmada ekmek hamurundan izole edilen farklı mikrobiyel cinslerin fermantasyon kabiliyeti normal hamurdakine uyumlu bir oranda yaşayan hücrelerin önceden sterilize edilmiş ekmek hamuruna ilave edilmesiyle bir fermento-manometrenin içinde gaz üretimi bakımından karşılaştırılarak ölçülmüştür. Farklı bakteri ve maya cinsleri ticari *Saccharomyces cerevisiae* kültürü ilavesiyle standart koşullarda değerlendirilmiştir. Buna göre Gram-pozitif bakteriler fermantasyonda uyarıcı bir etkiye sahipken Gram-negatif bakterilerin fermantasyonu inhibe ettiği görülmüştür. *Lactobacillus spp.* ve *Saccharomyces* cinsine ait yabancı türlerin ilavesi CO₂ üretim performansında en önemli artışa sebep olmuştur [42].

Farklı mikrobiyel interaksiyonlar ve teknolojilerin ekşi hamur ürünlerinin tat ve aromasına katkıda bulunan uçucu bileşenlerin sentezine etki ettiği bilinmektedir [35]. Buğday ekmeği hamuruna ekşi hamur ilave edilerek aroma bileşenleri oluşumunun araştırıldığı bir çalışmada ekşi hamurlar sadece laktik asit bakterisi kültürleri ve hem laktik asit bakterisi hem de ekşi hamurda bulunan mayaları içeren karışım starter kültürlerle fermente edilmiştir. Sonuç olarak ekşi hamursuz kontrol örneğine göre % 5-20 ekşi hamur ilave edilen ekmek somunlarının hacmi önemli oranda artmıştır. Ekşi hamur ekmeğinde asetik asit, 2-metilpropanoik asit ve 3- metilbütanoik asit miktarı genel olarak daha yüksek olarak saptanmıştır; *Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii* veya *L. sanfrancisco* ile fermente edilen ekşi hamur eklenen somunların daha yüksek miktarda 2- veya 3-metil-1-butanol içermekte olduğu görülmüştür. Ekşi hamur mayaları ve starter kültürler arasında interaksiyonlar gözlenmiştir; kullanılan starter kültür ve ekşi hamur mayasına bağlı olarak etanol, 2-metilpropanol, 2/3-metil-1-butanol, 2-feniletanol, benzil alkol, asetik asit, 2-metilpropanoik asit ve 3- metilpropanoik asit bileşenlerinin miktarının arttığı belirlenmiştir [43].

2.3. MALDI-TOF MS (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi)

MALDI-TOF MS, mikroorganizmaların protein yapılarının iyonize edildiği, daha sonrasında bir elektrik alandan geçirilerek protein profillerinin çıkarıldığı bir tanımlama yöntemidir. Bu protein profilleri sistemin kütüphanesinde bulunan yüklü veriler ile karşılaştırılarak uygun tanımlama cihaz tarafından yapılmaktadır. Tanımlamada kullanılan mikroorganizma proteinlerinin, çevresel koşullardan az etkilendiği için esas olarak ribozomal proteinler olduğu belirtilmektedir [44].



Şekil 2.1. MALDI-TOF MS ile tanımlamada işlem basamakları [45].

2.4. Killer Aktivite

Killer toksinler bazı endüstriyel maya türlerinde bulunan protein yapılarıdır [46]. Killer mayalarla kontaminasyonun fırıncılık, biracılık ve şarap üretimi gibi sektörlerde fermantasyon prosesleri açısından endüstri için bir problem olduğu belirtilmiştir [46].

Mayalar killer özellikleri bakımından dört fenotipte sınıflandırılmaktadır: killer, duyarlı, nötral, hem killer hem duyarlı [47]. Fermantasyon proseslerinde kullanılan mayalar normalde killer özellik göstermemekte, bazı gerekli durumlarda sonradan killer özellik kazandırılmasına gidilebilmektedir [48].

Saccharomyces cerevisiae suşlarında, sitoplazmada bulunan virüs benzeri çift sarmallı RNA partiküllerinin killer sistem olduğu bilinmektedir. Killer toksinlerin, hücre içi veya dışı kaynaklı olabildiği belirtilmiştir. K1 killer suşlarınca üretilen K1 toksininin hücre dışı kaynaklı toksinlerden olduğu, küçük monomerik bir protein yapısında olduğu ve ısıya karşı stabil özellik gösterdiği bilinmektedir. K1 toksinin, eksponensiyel büyüme fazında hücreden ayrıldığı ve toksine duyarlı hücrelerde glukanlara bağlanarak hücre membranı geçirgenliğini bozduğu bildirilmektedir [46,49].

Killer toksin özelliklerine göre killer mayalar, K1'den K11'e kadar 11 grupta sınıflandırılmakta olup K1, K2 ve K3 killer toksinleri *S. cerevisiae*'ye özgü toksinlerdir. K1 toksininin stabilitesi ve üretimi açısından optimum pH değeri 4.6-4.8 arasındadır. K2 toksini ise pH 2.8-4.8 arasında stabil özelliktedir [50–52]. Fermente gıdalarda toksin üretimini etkileyen önemli faktörlerden birinin de tuz olduğu düşünülmektedir [53–55].

2.5. Sekans Analizi

Mayaların tanımlanmasında kullanılan bazı moleküler yöntemler: DNA hibridizasyon tekniği, elektroforetik karyotiplendirme, RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), mitokondriyal ve ribozomal DNA sekans (dizi) analizidir. Funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik farklılıkların belirlenmesinde, rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizilerinin kullanımının yaygın olduğu bilinmektedir. Funguslarda rRNA gen kümesi yani çekirdek rDNA'nın her genomda yüzlerce kopyası olmakla birlikte, ardışık şekilde tekrarlanan rDNA birimleri şeklinde bulunduğu belirtilmiştir [56].

DNA dizileme metotları arasında Sanger metodu, Maxam & Gilbert metodu, True single molecule sequencing, Strand sequencing gibi metotlar bulunmaktadır. Sanger metodunun enzimatik bir metot olmasıyla birlikte, ddNTP'lerin rastgele DNA zincirine bağlanmasına dayandığı bildirilmiştir [57].

Sanger metodunda spesifik zincir terminatörleri olarak 4 tür 2,-3-dideoksinukleotid (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) kontrollü miktarlarda ve sürelerde kullanılmaktadır. ddNTP'lerin deoksiribozlarında 2. ve 3. pozisyonlardaki OH moleküllerinde oksijen bulunmamakta yani sadece H bulunmaktadır. Bu durumun da sentez sırasında bu maddelerin sıraya girmesi halinde polimerizasyonun durmasını sağladığı bildirilmiştir. Bunun nedeni yandaki moleküllerle fosfodiester bağları kurulamaması olduğu belirtilmektedir [58].

Sanger dizi analiz yönteminde teknik olarak 3 basamak bulunmaktadır: 1-polimeraz zincir reaksiyonu, 2-dizileme reaksiyonu, 3-jel elektroforezi ve bilgisayarda değerlendirme [59]. Bu yöntemde 4 tür ddNTP, DNA polimeraz I (klenow fragmenti), 4 tür dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP: polimerizasyon için gerekmektedir), baz sırası tayin edilecek kısa tek iplikçik DNA segmenti (kalıp sekans) ve bunun 3'-ucundaki DNA bazlarına komplementer olan ve 32P ile 5'-uçlarından işaretlenmiş kısa primer DNA segmentleri ortamda bulunmakta olup primer DNA fragmentleri, polimeraz I enziminin sentez işleminde gerekmektedir [58].

2.6. MTT (3-(4,5-dimetil tiyazol 2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum-bromür) Testi

In vitro sitotoksosite testleri ile ilaç niteliğine sahip veya toksik olup olmadığı incelenen çeşitli maddelerin hücre kültüründe yapılan ölçümlerle değerlendirildiği belirtilmektedir [60]. Sitotoksosite testlerinden olan MTT, tetrazolyum testleri içerisinde yer almaktadır [60]. Tetrazolyum tuzları elektron aldıklarında indirgenerek formazan yapısına dönüşmektedirler ve renk değişiklikleri oluşmaktadır [61]. Tetrazolyum halkasının kırılması için canlı hücreler olması gerektiği bilinmektedir, çünkü sadece aktif mitokondri sayesinde bu halka kırılabilmektedir [61]. Sonuç olarak renk reaksiyonunun gerçekleşmesi için canlı hücre olmasının şart olduğu bildirilmiştir [61].

Tetrazolyum bileşikleri kullanılarak yapılan canlılık testlerinde üç aşama bulunduğu belirtilmiştir [60–62]. Buna göre:

1. Aşama: Önce hücrelere belirli bir süre toksik madde uygulanır
2. Aşama: Toksik madde uzaklaştırılır ve tetrazolyum bileşiği ortama eklenir yaklaşık 1-4 saat süreyle inkübasyona bırakılır. İnkübasyon esnasında canlı hücreler ilgili bileşikler indirgeyip formazana dönüştürür ve renk değişimi gerçekleşir.

3. Aşama: Renkteki değişim spektrofotometreyle ölçülür, böylece canlı/ölü hücre sayısı elde edilir.

2.7. Caco-2 ve THP-1 Hücreleri

Mikroorganizmaların konağa en sık mukozal bölgelerden girdikleri bilinmektedir [63]. Patojen konak ortamına girdiğinde karşılaştığı yapı ve mekanizmalar: Epitel hücrelerin oluşturduğu fiziksel bariyer, doğal savunma mekanizmaları ve doğal sistemce uyarılan kazanılmış immün yanıtıdır [63]. Epitel hücrelerinin öneminin patojenlere karşı ilk tepki gösteren, aktivasyon faktörleri veya kofaktörler salınımı yoluyla veya direkt hücre-hücre etkileşimiyle makrofajları aktive edebilen ve doğal immün/inflamatuvar yanıtta rol oynayan hücreler olmasından ileri geldiği belirtilmektedir [63]. Barsak epitel hücreleri çözünebilir faktörler aracılığıyla barsak epitelyumunda bulunan immün hücreleri ile etkileşime girmektedir [64]. Bakteri ve interferon- γ (IFN- γ) veya yüksek miktarda lipopolisakkarid (LPS) ile uyarılmış olan makrofajların yüksek miktarda nitrik oksit (NO) ürettiği ve yabancı hücrelerde (bakteri, parazit, tümör hücreleri gibi) sitostatik ve/veya sitotoksik etki oluşturduğu bildirilmiştir [63]. Barsak epitel hücreleri, fonksiyonlarının araştırıldığı çalışmaların ortaya koyduğu üzere; su, iyonlar ve lümeninde bulunan besinlerin absorpsiyonunu sağlamak, lümendeki içeriği barsak ve vasküler sıvılarından ayıran bir bariyer oluşturmak gibi önemli fonksiyonlara sahiptirler [12]. Caco-2 hücreleri insan kolon epidermal adenokarsinoma hücreleridir [63]. Normal enterositlere benzer morfolojik karakteristiği olan kültüre edilmiş hücre hatlarının, barsak epitel hücrelerinin fonksiyonel analizleri için kullanıldığı bilinmektedir [12].

THP-1, akut monositik lösemi bir erkek çocuğun periferik kanından türetilmiş insan monosit benzeri hücre hattıdır [13]. Memelilerdeki monositlerin Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarına karşı bir koruma sağladığı bilinmektedir [65]. Dolaşımdaki monositlerin doku makrofajlarına farklılaşma potansiyeli bulunduğu böylece embriyonik olarak türeyen makrofajlara katkı sağladığı ve istilacı patojenlerin fagositozuna yardımcı olduğu belirtilmiştir [66]. THP-1 hücrelerinin, monosit yapısı ve fonksiyonlarını hastalık ve sağlık durumlarında araştırmada kullanıldığı bilinmektedir ancak monositlerin THP-1 hücrelerine kıyasla LPS'ye daha duyarlı olduğu bildirilmiştir [65].

2.8. Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasında mediyatör olarak görev alan, antikör olmayan proteinlerdir. Sitokinlerin başlangıçta mediyatör olarak davranan ve bağışıklık süreçlerini düzenleyen immün sistem hücrelerinin ürünleri olduğu bildirilse de artık birçok sitokinin immün sistem harici hücreler tarafından da üretildiği ve immün sistem dışı hücreleri de etkileyebileceği anlaşılmıştır. Farklı hücreler, hücre tarafından alınan diğer sinyallere göre aynı sitokine farklı yanıtlar verebilmektedir. Sitokin sinyalizasyonunun hem koruyucu hem de hasar verici tepkilere neden olabileceği bilinmektedir. Bir sitokin genellikle diğer sitokinlerin davranışını ve sentezini etkileyebilmektedir [67].

İnflamatuvar mediyatörlerden olan TNF- α 'nın, tek çekirdekli hücreler (monosit, makrofaj, lenfosit) tarafından salgılandığı ve proinflamatuvar sitokin olarak rol üstlendiği bilinmektedir [68]. TNF- α doğal bağışıklık mediyatörlerindedir [67]. TNF- α 'nın çeşitli otoimmün hastalıkların gelişimi ile ilişkisi bulunduğu bildirilmiştir [69]. Makrofajların TNF- α 'nın başlıca üreticileri olduğu bilinmektedir ve buna yüksek oranda duyarlı oldukları ifade edilmektedir [70]. Anormal TNF- α üretimi ve TNF reseptör sinyalizasyonu, çeşitli hastalıkların patogeneziyle ilişkilendirilmektedir [70].

İnterlökinler (IL), lökositler arasında mediyatör olarak davranan sitokinlerdir [67]. IL-4'ün immünmodülatör bir sitokin olduğu; aktive olmuş T-lenfositleri, bazofiller ve mast hücreleri tarafından salgılandığı belirtilmektedir [71]. IL-4 'ün anti-inflamatuvar bir sitokin olduğu ve kazanılmış bağışıklık sisteminde rol oynadığı bilinmektedir [67],[72]. IL-4'ün B-lenfositleri, monositler, dendritik hücreler ve fibroblastlar üzerinde immünregulatuvar ve biyolojik fonksiyonları bulunduğu ifade edilmektedir [73].

IL-5 kazanılmış immünitinin sitokinlerinden olup anti-inflamatuvar bir sitokindir [67],[72]. Homodimerik bir glikoprotein yapısında olup B hücreleri ve eozinofillerin büyüme ve farklılaşmasını desteklediği bilinmektedir [74]. Bu glikoprotein; T hücreleri, mast hücreleri, eozinofiller gibi kan yenileyici hücreler ve epitelyal hücreler ile doğal helper hücreleri dahil kan yenileyici özellikte olmayan hücreler tarafından üretilmektedir [74].

IL-10, aktive edilmiş makrofajlar ve Th2 hücreleri tarafından üretilen doğal bağışıklığın mediyatörlerindedir [67]. IL-10'un pleiyotropik bir mediyatör olduğu, makrofajlar

tarafından sitokin üretimini önlediği ve makrofajların antijen sunma fonksiyonunu azalttığı bu yüzden de immün tepkileri baskılayıcı bir görev üstlendiği belirtilmektedir [75]. IL-10'un, IL-1'in proinflamatuvar etkilerine ters bir şekilde hareket ettiği ve endotel hücrelerine lökositik hücrelerin adezyonunu düzenlediği bildirilmektedir [75].

Satsu ve ark.'nın [64] yapmış olduğu in-vitro modelleme bir çalışmada barsak epitel hücreleri, insan barsak epiteli benzeri Caco-2 tek katlı hücre tabakası ve aktive edilmiş makrofaj benzeri THP-1 hücreleri üzerine makrofajların etkisi birlikte kültürleme yöntemiyle araştırılmıştır. THP-1 hücreleri ile birlikte kültürleme sonucu Caco-2 hücrelerinden laktat dehidrojenaz salımı artmış, tek katmanların transepitelyal elektriksel direnci düşmüştür. Bu sonuca göre THP-1 hücreleriyle birlikte kültürlemenin Caco-2 hücrelerinde hücre hasarına sebep olduğu ifade edilmiştir. Bu durumu baskılamada anti TNF- α antikoru ve etanerseptler etkili olmuştur. Bu bilgiler ışığında THP-1'den salgılanan TNF- α 'nın Caco-2 tek katlı hücre tabakasına hücre hasarı verdiği söylenebilmektedir.

Marc ve ark.'ın [14] yapmış olduğu bir çalışmada promonositik THP-1 hücrelerinin VD3 ve PMA kullanarak uygulanan farklılaşma protokollerinden sonra fenotipini, primer insan monositleri veya monositlerden türeyen makrofajlarla kıyaslamışlardır. Elde ettikleri bulgular sonucunda bir modifiye edilmiş PMA farklılaşma protokolünün, THP-1 hücrelerinin makrofaj farklılaşmasını arttırabileceğini önermektedirler.

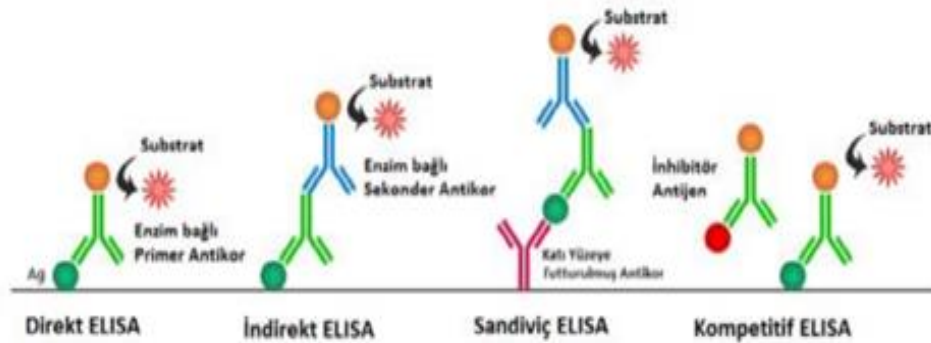
2.9. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Antijen-antikor ilişkisini, antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izleyerek araştırmaya dayanmaktadır. Kullanılan başlıca enzimler: Peroksidaz, alkalen fosfataz ve betagalaktozidaz olup bu enzimler spesifik substratları renkli ürünlere çevirmektedirler. Bu yöntemle özgül antikorlar ile örnekteki antijen miktarı ya da özgül antijenlerle örnekteki antikor miktarı ölçülebilmektedir [76].

ELISA yönteminde katı faz (matriks) genellikle 96 kuyucuklu, kuyucuklarına antijen veya antikor bağlanmış mikroplyetlerdir. Direkt ELISA testinde konjugat (enzim ile işaretlenmiş antikor) antijene karşı, indirekt ELISA testinde ise primer antikora karşı spesifiktir. Substrat ilave edildiğinde konjugatın yapısındaki enzim ile reaksiyona girmekte, antijen-antikor kompleksi oluşumunu ortaya koymaktadır. Enzimlerin

kromojenik substratlarıyla birleşmesiyle oluşan reaksiyon sonucunda renk değişimi görülmektedir. ELISA yönteminde her bir aşama arasında fosfatlı tampon solusyonu (PBS, wash buffer) ile yıkama yapılmasıyla özgül olmayan bağlanmaları gidermektedir. ELISA'nın son aşaması yani "reaksiyonun durdurulması" 'nda asidik/bazik çözeltiler ile enzim-substrat reaksiyonu istenilen sürede durdurulmaktadır. Reaksiyon sonunda oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir [76].

Direkt ELISA yönteminde ELISA tabletine kaplanmış olan şüpheli antijene karşı spesifik antikordardan yararlanarak antijenin varlığının tespiti amaçlanırken, indirekt ELISA yönteminde şüpheli serumdaki antikörlerin saptanması ve titrelerinin ölçümü amaçlanmaktadır [77]. İndirekt ELISA yönteminde öncelikle numune içindeki antijenler kuyu yüzeyine bağlanmakta ve işaretli primer antikörler kuyulara eklenmektedir [76]. Belirli sürelerde inkübasyondan sonra yıkama yapılarak bağlanmamış primer antikörler uzaklaştırılmakta; diğer aşamada primer antikörlere özgül, enzim ile işaretlenmiş sekonder antikör kuyulara eklenmektedir [76]. Belirli sürelerde inkübasyondan sonra yıkama yapılarak bağlanmayan işaretli sekonder antikörler ortamdaki uzaklaştırılmaktadır [76]. En son, enzimin substratı kuyulara eklenmekte ve oluşan renk değişimiyle antikörler belirlenmektedir [76]. Sandviç ELISA, bilinmeyen örneklerin antijen miktarını tespit etmekte kullanılmaktadır ve direkt-indirekt yöntemleri bulunmaktadır [76]. Kompetitif ELISA yönteminde immobilize haldeki antijen veya antikora bağlanmak için işaretli ligand ile enzim ile işaretlenmiş ligandın yarışması söz konusu olmaktadır [76].



Şekil 2.2. ELISA yöntemi çeşitleri [76].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Ekşi Hamur Örnekleri

Çizelge 3.1. Ekşi hamurların hazırlandığı un örnekleri kaynak bilgisi.

Un Kaynağı	Bölge	Örnek Kodu
Tam buğday	Ankara	Pe*
Buğday	İzmir	İz
Tam buğday	Bolu	E
Tam buğday	Kaynaşlı	Ch
Buğday	Edincik	BY
Tam buğday	Ereğli	M
Siyez tam buğday	Kastamonu	Es

*: Ekşi hamur halinde temin edilmiştir.

Pe kodlu ekşi hamur örneği hazır ekşi hamur olarak temin edilmiştir. İz kodlu örnek İzmir yöresinden getirilen beyaz undan, E kodlu örnek Bolu bölgesindeki buğdaylar kullanılarak üretilen tam buğday unundan, Ch kodlu örnek Kaynaşlı bölgesindeki buğdaylar kullanılarak üretilen tam buğday unundan, BY kodlu örnek Edincik bölgesinden getirilen buğday unundan, M kodlu örnek Ereğli bölgesindeki buğdaylar kullanılarak üretilen tam buğday unundan Hacettepe Üniversitesi laboratuvarında hazırlanmıştır.

Hacettepe Üniversitesi laboratuvarlarında hazırlanan ekşi hamurların tamamı danışmanlığı Prof. Dr. Dilek Sivri Özey tarafından yapılmakta olan “Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin ve Mayaların İzolasyonu ve Ekmek Kalitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi” adlı yüksek lisans tezi kapsamında hazırlanmıştır.

3.1.2. Maya Suşları

Bu tez çalışmasında kapsamında yapılan killer aktivite ve duyarlılık testlerinde kontrol kültürleri olarak kullanılan *S. cerevisiae* NCYC 232 (killer suş, K1), *S. cerevisiae* NCYC 738 (killer suş, K2) ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 (duyarlı suş) Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Filiz Özçelik'ten temin edilmiştir.

Hazır olarak satılan yaş hamur mayasından izole edilen ticari *Saccharomyces cerevisiae* suşu (T kodu ile analizlerde yer almaktadır), ekşi hamurlardan izole edilen diğer maya izolatları ile çeşitli özellikler bakımından karşılaştırılması amacıyla bazı analizlerde kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyerleri ve Dilüsyon Sıvıları

Çalışmada ekşi hamur örneklerinden dilüsyonların hazırlanması amacıyla % 0.85 (w/v) derişiminde serum fizyolojik kullanılmıştır. Dilüsyonlardan YEA (Yeast Extract Agar) (Merck) besiyerine ekim yapılmıştır. İncelenen kolonilerin geliştirilmesi amacıyla MEB (Malt Extract Broth) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Saf kolonilerin -70°C’de saklanması amacıyla ise gliserol içeren MEB (Merck) besiyeri kullanılmıştır.

MALDI-TOF MS cihazında mayaların tanımlanması için gliserollü MEB (Merck)’de saklanan stok kültürlerin canlandırılması ve tek koloniye düşürülmesi amacıyla sırasıyla MEB (Merck) ve YEA (Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

Maya izolatlarının 37°C’de gelişme özelliklerinin incelenmesi amacıyla GPY (Glucose Peptone Yeast Extract) broth ve GPY agar besiyerleri kullanılmıştır [78]. Mayaların yüksek şeker konsantrasyonunda gelişme özelliklerini test etmek için % 50 (w/v) glukoz içeren MY50G (Malt Extract Yeast Extract 50 % Glucose) agar besiyeri kullanılmıştır [78],[79].

Mayaların ekmekçilik teknolojisi açısından önemli özelliklerinin incelenmesinde farklı birçok besiyerinden yararlanılmıştır. Optik yoğunluğa bağlı gelişme hızının belirlenmesi amacıyla YPG (Yeast Extract Peptone Glucose) broth ve pH: 4.5 olan YPG broth kullanılmıştır [80]. Glukoz fermantasyonu özelliğinin incelenmesi amacıyla % 2 (w/v) yeast extract, % 0.5 pepton ve % 2 (w/v) glukoz içeren Durham tüplü glukoz fermantasyonu besiyeri kullanılmıştır [81]. Çeşitli şekerleri fermente etme özelliklerinin incelenmesi amacıyla % 2 (w/v) oranında şeker içeren Durham’lı şeker fermantasyonu besiyeri kullanılmıştır [81],[78]. Mayaların çeşitli tuz derişimlerinde gelişebilme özelliklerinin test edilmesi için % 2-3-4-5 (w/v) oranlarında NaCl içeren YM (Yeast Extract Malt Extract) broth besiyerleri kullanılmıştır [82]. Maya izolatlarının düşük pH değerlerinde gelişebilme özelliklerinin incelenmesi için pH ayarlaması yapılarak pH’ları 2.5, 3.5 ve 4.5’e ayarlanan YM broth besiyerleri kullanılmıştır [82]. Killer aktivite

özelliğinin ve killer toksinlere karşı duyarlılığın test edilmesi için YEPD-MB (Yeast Extract Peptone Dextrose- Methylene Blue) agar besiyeri kullanılmıştır [52]. Killer aktivite testinde kültür koleksiyonundan temin edilmiş olan duyarlı suştan (*Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006) sayım yapılması amacıyla Maximum Recovery Diluent (Merck) kullanılarak dilüsyonları hazırlanmıştır. Mayaların proteolitik aktivite gösterip göstermediğinin belirlenmesi için % 10 rekonstitüye yağsız süt içeren Milk agar besiyeri kullanılmıştır [83],[84].

3.1.4. Tampon, Boya ve Diğer Çözeltiler

Optik yoğunluğa bağlı gelişme hızının belirlenmesi sırasında YPG sıvı besiyerinin pH: 4.5'e 1 N HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Aynı şekilde YM broth besiyerlerinin pH'ı da 2.5, 3.5 ve 4.5'e 1 N HCl kullanılarak ayarlanmış ve düşük pH değerlerinde mayaların gelişme özellikleri araştırılmıştır [80].

Killer aktivite testinde YEPD-MB agar besiyerinin pH değeri 4.5 olacak şekilde 0.1 M sitrat-fosfat tamponu ile ayarlanmıştır. Bu besiyerinde kullanılan metilen mavisi % 1 (w/v) oranında hazırlanmıştır ve besiyerine % 0.003 (w/v) oranında olacak şekilde katılmıştır [52],[85].

3.1.5. MALDI-TOF MS İle Ön Tanımlamada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Merkez Laboratuvarı' nda yapılan tanımlamalarda MALDI-TOF MS Bruker Microflex (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Flex Control 3.0 yazılımı) kullanılmıştır.

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yapılan tanımlamalarda Bruker Microflex marka MALDI-TOF MS kullanılmıştır.

Etanol ve asetonitril mayaların hücre duvarını çözmek amacıyla kullanılmıştır. Matriks çözeltisi ilave edilerek MALDI-TOF MS'de okuma yapılmıştır.



Şekil 3.1. MALDI-TOF MS cihazı (Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi).



Şekil 3.2. MALDI-TOF MS cihazı target'ı (Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi).



Şekil 3.3. MALDI-TOF MS cihazı target haznesi (Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi).

3.1.6. Optik Yoğunluğa Dayalı Gelişme Hızının Ölçümünde Kullanılan Cihazlar

Ölçümler Thermo Scientific, Genesis 10S UV-VIS Spectrophotometer kullanılarak gerçekleştirilmiştir. VISIONlite programı 4.0 versiyonu kullanılmıştır.

3.1.7. Sekans Analizi İçin Kullanılan Cihazlar

Öncelikle Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler 3130xl Genetic Analyzer cihazına yüklenmiştir. Sonuçlar Finch TV programında açılmıştır.

3.1.8. MTT Testi İçin Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Cihazlar

Besiyeri içerisinde inaktif halde maya izolatu içeren Eppendorflar, Hettich (Almanya) markalı Mikro 200 santrifüj kullanılarak santrifüj edilmiştir.

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) testi ile maya izolatlarının hücre proliferasyonu üzerinde etkisi ve sitotoksitenin araştırılmasında Caco-2 hücreleri (ATCC® HTB-37) % 10 FCS (Fetal Sığır Serum) (Sigma) içeren

EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) (Sigma) besiyerinde, THP-1 hücreleri (ATCC® TIB-202) % 10 FCS içeren RPMI-1640 besiyerinde kültüre edilmiştir [86].

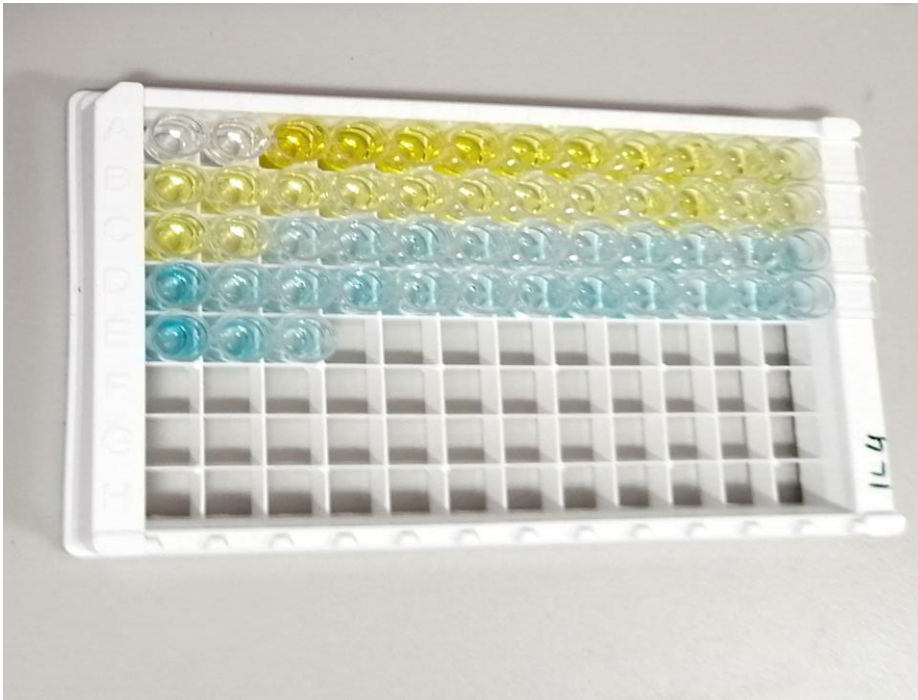
MTT çözeltisi (5 mg/mL) ve 0.08 M HCl içeren isopropanol-HCl çözeltisi kuyucuklara pipetle aktarılmıştır. Pozitif kontrol olarak 1:10 DMSO (v/v) (Dimetil Sülfoksit) (Sigma) içeren çözelti kullanılmıştır [86].

Plakların absorbanslarının okunmasında BMG LABTECH Spectrostar Nano mikropilaka okuyucu UV-VIS spektrofotometre kullanılmıştır.

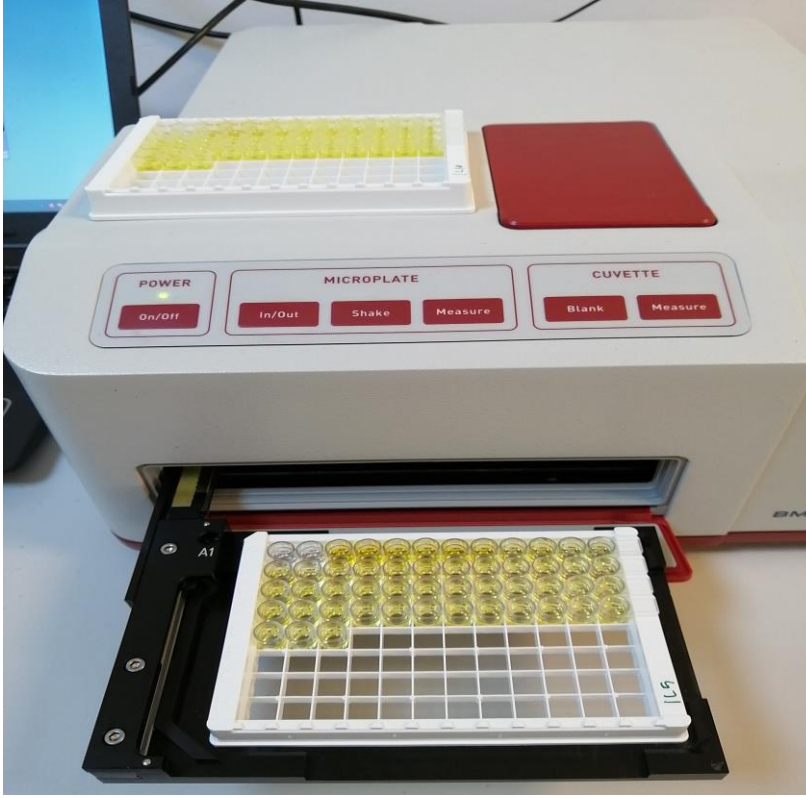
3.1.9. Sitokin Analizleri İçin Kullanılan Cihazlar ve Kitler

Çalışmada Coon Koon Biotech Co., Ltd (Shanghai) markalı Human TNF- α ELISA KIT (CK-bio-13850), Human IL-4 ELISA KIT (CK-bio-12133), Human IL-5 ELISA KIT (CK-bio-12134) ve Human IL-10 ELISA KIT (CK-bio-12085) kullanılmıştır.

BMG LABTECH Spectrostar Nano mikropilaka okuyucu UV-VIS spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. MARS Data Analysis programı kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Kit mikropilakasına ilişkin görsel.



Şekil 3.5. BMG LABTECH Spectrostar Nano mikrolaka okuyucu UV-VIS spektrofotometre.

3.2. Metot

3.2.1. Ekşi Hamurların Hazırlanması

Hacettepe Üniversitesi laboratuvarlarında hazırlanan ekşi hamurlar, danışmanlığı Prof. Dr. Dilek Sivri Özay tarafından yapılmakta olan “Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin ve Mayaların İzolasyonu ve Ekmek Kalitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi” adlı yüksek lisans tezi kapsamında hazırlanmıştır.

3.2.2. Ekşi Hamurlardan Maya İzolasyonu

25 g ekşi hamur tartılarak bir Stomacher torbası içerisine alınmıştır, 225 mL steril serum fizyolojik eklenerek Stomacher cihazında (Seward, Laboratory Blender Stomacher 400) 60 sn boyunca normal modda karışımı sağlanmıştır. Daha sonra dilüsyonları 10^{-5} 'e kadar olacak şekilde steril serum fizyolojik içeren tüplerde hazırlanmıştır. Her dilüsyondan 100 µL alınıp YEA besiyerlerine aktarılarak sürme yapılmıştır. Petriyerler 26°C 'de 48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda farklı koloni tiplerine basit boyama yapılarak ön inceleme yapılmıştır. Mikroskobik morfolojilerine göre maya olduğu düşünülen koloniler

MEB besiyerine aktarılarak 26°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. Gelişme olan tüplerden YEA besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekim yapılarak 26°C’de 48 saat inkübasyon uygulanmıştır. Süre sonunda gelişen saf koloniler özeyle alınarak gliserollü MEB içeren Eppendorflara aktarılmış, -70°C’de saklanmıştır. Bu işlemler sırasıyla tüm farklı hamur örnekleri için uygulanmıştır.

3.2.3. MALDI-TOF MS İle Ön Tanımlama

-70°C’de gliserollü MEB içeren Eppendorflarda saklanan saf kültürlerin canlandırılması için Eppendorflar Vortex kullanılarak homojenize edilmiş, içerisinden 100 µL besiyeri otomatik pipetle çekilip MEB içeren tüplere aktarılarak 26°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İçerisinde mayaların gelişmiş olduğu bu tüplerden öze ile YEA besiyerine tek koloni düşürme yapıp 26°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. YEA besiyerinde gelişmiş olan aktif kültürler MALDI-TOF MS cihazında alt tür düzeyinde ön tanımlama yapılmıştır. MALDI-TOF tanımlamalarının bir kısmı (4 adet izolat) Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde yapılırken, diğer kısmı (8 adet izolat) T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Merkez Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde mayaların MALDI-TOF MS ile ön tanımlamasının yapılması için uygulanan protokol şu şekildedir:

İncelenecek olan maya kolonisi içerisine 300 µL deiyonize su bulunan Eppendorf tüpüne aktarılmıştır ve homojenize edilmiştir. Üzerine 900 µL etanol eklenilerek karıştırılmış ve yaklaşık 12000 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılarak pellet tekrar aynı şekilde santrifüjlenerek geri kalan etanol pipet yardımıyla alınmıştır. Kalan etanolün uçması için 2-3 dk oda sıcaklığında tutulmuştur. Pellet miktarına göre 1-80 µL arasında formik asit eklenmiş (Pellet miktarı çoğaldıkça gereken formik asit miktarı artmaktadır) ve homojenizasyon sağlanmıştır. Konulan formik asit miktarı kadar asetonitril ilave edilerek sonrasında yaklaşık 12000 rpm ‘de 2 dk santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 1 µL alınarak target’e (Şekil 3.2) aktarılmıştır ve kuruduktan sonra üzerine 1 µL matriks çözeltisi eklenmiştir. Bu çözelti de kuruduktan sonra target MALDI-TOF MS cihazına yerleştirilmiştir.

3.2.4. Maya İzolatlarının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.4.1. 37°C'de Gelişme

Maya izolatlarının 37°C'de gelişme özelliklerinin incelenmesi amacıyla MEB'de aktifleştirilmiş 24 saatlik maya izolatu kültürlerinden GPY sıvı ve katı besiyerine ekim yapılmıştır. GPY agar Petrileri 37°C'de 4 gün, GPY sıvı besiyerleri ise 7 gün inkübe edilmiştir. Gelişme gözlenen kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir [78].

3.2.4.2. Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişme

% 50 (w/v) glukoz içeren MY50G agar besiyerine 24 saatlik aktif maya kültürlerinden ekim yapılmıştır. 28 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir [78],[79]. Gelişme gözlenen Petrilerdeki kültürlerin yüksek şeker konsantrasyonundaki gelişimi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Mayaların Ekmekçilik Teknolojisi Açısından Önemli Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.5.1. Optik Yoğunluğa Bağlı Gelişme Hızının Belirlenmesi

Maya izolatlarının gelişme hızını analiz etmek amacıyla optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Öncelikle *Saccharomyces cerevisiae* olduğu bilinen bir maya izolatu (E1 kodlu izolat) MEB besiyerinde 28°C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır. Bu tüpten 20 µL alınarak YPG sıvı besiyerinde 28°C'de 24 saat aktifleştirilmiştir. Aktif kültürden tekrar 20 µL alınarak YPG sıvı besiyerine ekim yapılmıştır, 28°C'de 24 saat inkübasyon uygulanmıştır. Aktif kültürden 500 µL alınarak, 50 mL steril olarak hazırlanan YPG (pH: 4.5) sıvı besiyerine ekilmiştir (50 mL hacimdeki YPG sıvı besiyerinin pH'ı 4.5 değerine 1N HCl kullanılarak daha önceden ayarlanmıştır). 28 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra absorbens değeri 0.15-0.30A aralığında olacak şekilde 6 nokta belirlenmesi amacıyla gerekli seyreltmeler YPG (pH: 4.5) sıvı besiyeri kullanılarak yapılmıştır. UV-VIS Spektrofotometrede 600 nm'de okuma yapılmıştır. Okumada şahit olarak YPG (pH: 4.5) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Aynı zamanda YEA'da bu 24 saatlik kültürün dökme yöntemiyle sayımı yapılmıştır. Elde edilen absorbansa karşı maya sayısı grafiği ile regresyon denklemi belirlenmiştir [87],[80].

Analizin ikinci aşamasında, YPG sıvı besiyerinde 2 kez 28°C'de 24 saat aktifleştirilmiş maya izolatları kültürlerinden (*S. cerevisiae* türü) 500 µL alınarak 50 mL steril olarak hazırlanan YPG (pH: 4.5) sıvı besiyerlerine ekilerek 28 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 4., 8. ve 24. saatlerinde örneklerin spektrofotometrede 600 nm'de

absorbans değerleri okunmuştur. Absorbans okumasında şahit olarak ve izolatların absorbanslarını istenilen aralıktta (0.15-0.30A) okumak için yapılan seyreltmelerde YPG (pH: 4.5) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Okunan absorbans değerlerine göre seyreltme faktörleri göz önüne alınarak ve regresyon denklemi kullanılarak maya sayısına (adet/mL) dönüşüm gerçekleştirilmiştir. Bu dönüşüm sonrasında 4., 8. ve 24. saatlerdeki zamana karşı maya sayısı grafiği çizilmiştir. lm yaparken steril küvetler içerisinde kabarcık oluşmamasına dikkat edilmiştir. lm sırasında yaklaşık 2 cm kalınlığında şeffaf küvetler kullanılmıştır [80].

Bu işlemler Bi1 kodlu izolat kullanılarak *S. uvarum*/*S. bayanus* türü maya izolatları için de gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.2. Glukoz Fermantasyonu

İzole edilen mayaların glukoz fermantasyonları % 2 (w/v) yeast extract, % 0.5 pepton ve % 2 (w/v) glukoz içeren Durham tüplü glukoz fermantasyonu besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Besiyeri 4 mL hacimde olacak şekilde Durham'lı tüplere aktarılmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonrasında MEB besiyerinde 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilerek canlandırılan maya izolatlarından 100 µL alınarak Durham'lı besiyerlerine aktarılmış ve 28 °C'de 28 gün inkübasyon uygulanmıştır. Bu süre boyunca maya izolatlarının Durham tüpünde gaz oluşturma süreleri ve gaz oluşum oranı gözlemlenmiştir [81].

3.2.5.3. şeker Fermantasyonu

% 2 (w/v) oranında şeker içeren Durham tüplü şeker fermantasyonu besiyeri kullanılmıştır. Test sırasında şeker olarak glukoz, sakaroz ve fruktoz kullanılmıştır. Besiyeri 4 mL hacimde olacak şekilde Durham'lı tüplere aktarılmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonrasında MEB besiyerinde 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilerek canlandırılan maya izolatlarından 100 µL alınarak Durham'lı besiyerlerine aktarılmış ve 28 °C'de 28 gün inkübe edilerek süre boyunca maya izolatlarının Durham tüpünde gaz oluşturma süreleri ve tüplerdeki gaz miktarı gözlemlenmiştir [78],[81].

3.2.5.4. Çeşitli Tuz Derişimlerinde Gelişebilme

% 2-3-4-5 oranlarında NaCl (w/v) içeren YM sıvı besiyerleri hazırlanarak otoklavda sterilize edilmiştir. MEB besiyerinde 28°C'de 24 saat inkübasyonla aktifleştirilen maya

izolatları kültürlerinden bu besiyerlerine ekim yapılarak 28 °C’de 10 gün inkübasyon uygulanmıştır. Süre sonunda gelişme gözlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir [82].

3.2.5.5. Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme

YM sıvı besiyerlerinin pH’ı 2.5, 3.5 ve 4.5’e 1 N HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Gelişmeleri gözlemek için kontrol olarak ise pH’ı 6.57 olan YM broth besiyeri kullanılmıştır. MEB besiyerinde 28°C’de 24 saat süreyle aktifleştirilen maya izolatu kültürlerinden bu besiyerlerine ekim yapılarak 28°C’de 10 gün inkübasyon uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda gelişme gözlenen tüplerdeki maya izolatları, ilgili pH değerine dirençli olarak değerlendirilmiştir [82].

3.2.5.6. Killer Aktivite

İzole edilen maya suşlarının killer aktivitelerinin saptanmasında agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır [47]. Referans suşlar olarak *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 232 (K1, killer suş) ve *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 (K2, killer suş) suşları killer, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 suşu duyarlı suş olarak kullanılmıştır. Duyarlı ve killer suşlar MEB besiyerinde 28°C’de 24 saat aktifleştirilip YM agar besiyerine ekim yapılarak aktiflikleri test edilmiştir. Duyarlı suş kültüründen 20 µL alınarak MEB besiyerine aktarılmış ve 28°C’de 27 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda duyarlı suştan sayım yapılması amacıyla Maximum Recovery Diluent kullanılarak 10^{-7} ‘ye kadar dilüsyonları hazırlanmış, YM agarda dökme yöntemiyle sayımı yapılmıştır (28°C’de 48 saat inkübasyon uygulanmıştır).

-70°C’de gliserollü MEB içerisinde bulunan maya izolatlarından 100 µL, killer maya kültürlerinden 20µL alınarak MEB besiyerlerine aktarılmıştır ve 28°C’de 27 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu tamamlanmış olan bu tüplerden yatık olarak hazırlanmış YM agara özeyle sürme yapılarak 28°C’de 48 saat inkübasyon uygulanmıştır. 48 saat sonunda YM agarda gelişmiş olan koloniler alınarak 2.kez yatık YM agara öze ile aktarılmıştır, 28°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Duyarlı suş kültüründen MEB’e aktararak 28°C’de 27 saat inkübe edilmiştir. YEPD-MB agar besiyerinin pH değeri 4.5 olacak şekilde 0.1 M sitrat-fosfat tamponu ile ayarlanmıştır. Besiyerinde bulunan metilen mavisi oranı % 0.003 (w/v)’dir [52].

pH ayarlaması yapılan YEPD-MB besiyerine yaklaşık 3×10^5 kob/100 mL sayıda olacak şekilde duyarlı suş ilave edilerek besiyeri Petrilere dökülmüştür [88],[47]. Çizgi ekim yöntemi ile yaklaşık 1 cm uzunluğunda çizgiler halinde killer suşlar ve çalışmada kullanılan maya izolatları gelişmiş oldukları YM agardan alınarak pH'si ayarlanmış YEPD-MB agara paralel olarak ekimleri yapılmıştır. 20°C'de 72 saat inkübasyon sonucunda zon oluşumuna bakılmıştır. Zon oluşturan kültürler killer olarak değerlendirilmiştir [47].

Ayrıca çalışmada kullanılan maya izolatlarının K1 ve K2 killer toksinlerine duyarlılıklarının incelenmesi amacıyla benzer işlemler YEPD-MB besiyerine duyarlı suş yerine maya izolatları ayrı ayrı eklenerek uygulanmıştır. Maya izolatları YEPD-MB besiyerine yaklaşık olarak 9.6×10^5 kob/100 mL sayıda olacak şekilde eklenmiştir. Çizgi ekim yöntemi ile yaklaşık 1 cm uzunluğunda çizgiler halinde killer suşlar 2 paralelli olarak ekilmiştir. 20°C'de 72 saat inkübasyon sonucunda killer suşların çizgi ekimi yapıldığı alan etrafında zon oluşumu gözlenmesi halinde, duyarlılığı test edilen maya izolatının ilgili killer suşun toksinine duyarlı olduğu yorumunda bulunulmuştur [47].

3.2.5.7. Proteolitik Aktivite

YM sıvı besiyerinde 28°C'de 24 saat aktifleştirilen maya izolatları, % 10'luk Milk agar besiyerine paralel olarak çizgi ekim yöntemi kullanılarak yaklaşık 1 cm uzunluğunda çizgiler halinde ekilmiştir. Sonrasında 28 °C'de 14 gün inkübasyon uygulanmıştır. Süre sonunda gelişme gözlenen Petrilere maya kolonisi etrafındaki berrak zon oluşumları incelenmiştir. Zon oluşumu gözlenen Petrilere maya izolatları proteolitik özellikte olarak değerlendirilmiştir, herhangi bir zon oluşumu gözlenmemesi halinde maya izolatının proteolitik aktivite göstermediği şeklinde yorumlanmıştır [83,84].

3.2.6. Sekans Analizi

MALDI-TOF MS sonuçlarına göre *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanan maya izolatlarının doğrulanması amacıyla sekans analizleri yaptırılmıştır. Sekans analizi için maya izolatları MEB besiyerinde 26°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda MEB besiyerinde gelişmiş olan izolatlar özeyle alınarak YEA besiyeri içeren Petrilere agara çizme yapılmıştır, 26°C'de 48 saat inkübasyon uygulanmıştır. Maya izolatları öze

yardımıyla Petrilerden 1.5 mL'lik Eppendorf tüplere alınarak sekans analizine hazırlanmıştır. Sekans analizleri hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiş olup analizde Sanger metodu kullanılmıştır [58].

3.2.7. MTT (3-(4,5-Dimetil tiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) Testi İle Maya İzolatlarının Hücre Proliferasyonuna Etkisinin ve Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

6 adet *S. cerevisiae* olduğu bilinen maya izolatu stoklanmış oldukları yatık YEA'dan öze ile alınarak MEB besiyerinde 28°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. MEB'de gelişmiş olan maya izolarından 20 µL alınarak 6 mL YPG besiyeri içeren tüplerde 28°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. YPG'de gelişmiş olan izolatlardan tekrar 20 µL alınarak 6 mL YPG besiyeri içeren tüplere aktarılmış ve 28°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Her bir maya izolatu için bu YPG besiyerinde gelişmiş olan izolatlardan 50 µL alınarak 5 mL YPG içeren tüplere aktarılmıştır ve 28°C'de 24 saat inkübasyon uygulanmıştır. Her bir izolatu için 9 mL'lik SF içeren tüplerle 10⁻⁶'ya kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan YEA'da dökme yöntemiyle sayım yapılması amacıyla ekim gerçekleştirilmiştir. YEA'a ekimi yapılmış olan izolatlar 26°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kalan izolatu içeren 4 mL hacimdeki tüpler otoklavlanarak maya izolatları inaktif hale getirilmiştir. Eppendorflara 1'er mL hacimde dağıtıldıktan sonra 14000 rpm'de 1 dk süresince santrifüj edilmiştir. Besiyeri uzaklaştırılarak kalan pelletlere 1 mL SF ilave edilmiştir ve yapılan sayım sonucunda her bir izolata ait 1 adet Eppendorfta yaklaşık 10⁷ kob/mL sayıda maya hücresi bulunduğu tespit edilmiştir. Bölümümüz laboratuvarında hazırlanan maya izolatlarının MTT testi Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK) tarafından yapılmıştır.

Yöntemde Caco-2 hücreleri % 10 FCS içeren EMEM besiyerinde, THP-1 hücreleri ise %10 FCS içeren RPMI-1640 besiyerinde 37°C'de % 5 karbondioksitli inkübatörde kültüre edilmiştir. Caco-2 hücreleri 10x10³ hücre/mL konsantrasyonda, 100 µL hacimde 96 kuyucuklu plakaya ekilerek bir gece inkübe edilmiştir. Süre sonunda plaktaki besiyeri atılarak 100 µL taze besiyeri, 100 µL maya izolatları kuyucuklara aktarılarak plak 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra plaktaki besiyeri atılmış ve 100 µL hacimde MTT çözeltisi (5 mg/mL) kuyucuklara aktarılarak 4 saat boyunca plak inkübe edilmiştir. Plaktaki besiyeri atılmış ve 100 µL 0.08 M HCl içermekte olan isopropanol-HCl çözeltisi kuyucuklara aktarılarak plak 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir, UV-VIS

spektrofotometre kullanılarak 570 nm’de absorbansları okutulmuştur. Negatif kontrol olarak besiyeri+hücre, pozitif kontrol olarak 1:10 DMSO (v/v) içeren çözelti+hücre kullanılmıştır. Negatif kontrol absorbans ortalaması % 100 canlı kabul edilmiştir. Maya izolatları ile birlikte kültüre edilen hücrelerin % canlılıkları hesaplanırken negatif kontrol çalışması kullanılmıştır. Bu işlemler sekiz paralelli olarak gerçekleştirilmiştir [86],[89].

5×10^3 hücre/mL konsantrasyondaki THP-1 hücreleri, 50 µL hacimde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Kuyucuklara 100 µL maya kültürleri aktararak plak 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra plaktaki besiyeri üzerine 100 µL hacimde MTT çözeltisi (5mg/mL) aktarılmış ve 4 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklara 50 µL hacimde 0.08 M HCl içeren isopropanol-HCl çözeltisi aktarılmıştır. Plak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir, 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak besiyeri+hücre, pozitif kontrol olarak 1:10 DMSO (v/v) içeren çözelti+hücre kullanılmıştır. Negatif kontrol absorbans ortalaması % 100 canlı kabul edilmiştir. Maya izolatları ile birlikte kültüre edilen hücrelerin % canlılıklarının hesaplanırken negatif kontrol çalışması kullanılmıştır. Bu işlemler sekiz paralelli olarak gerçekleştirilmiştir [86],[89].

3.2.8. Makrofajlardan Çeşitli Sitokinlerin Salınım Seviyelerinin ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Metoduyla Ölçümü

THP-1 hücreleri 72 saat boyunca PMA (Forbol 12-miristat 13-asetat) uygulaması ile makrofaja dönüştürülmüştür. Bunun için 200 nM PMA, 2 µL/mL konsantrasyonda hücrelere aktarılmıştır. İçerisinde yaklaşık 10^5 sayıda makrofaja dönüştürülmüş hücre bulunan plaklara %10 FCS (Fetal Sığır Serum) ve DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ilave edilmiştir. Daha sonra 3.2.7’de belirtilen şekilde hazırlanan maya izolatlarından yaklaşık 2×10^5 kob/mL sayıda olacak şekilde 500 µL ilave edilerek % 5 CO₂ içeren 37°C’lik etüvde inkübe edilmiştir [90],[89]. Bu şekilde HÜNİTEK’te elde edilen hücre kültürü süpernatantları alınarak ELISA kitleriyle kit prosedürüne uygun olarak TNF-α, IL-4, IL-5 ve IL-10 sitokin seviyeleri mikropkala okuyucu UV-VIS Spektrofotometre kullanılarak 450 nm’de ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak besiyeri+makrofaja dönüştürülmüş hücre kullanılmıştır. Maya izolatları ve negatif kontrol 3 paralelli olarak çalışılmıştır. Negatif kontrolün sitokin düzeyi %100 kabul edilerek maya izolatlarının % sitokin seviyeleri hesaplanmıştır.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Maya izolatlarının ve negatif kontrol olarak kullanılan besiyerinin makrofaja dönüştürülmüş hücrelerden sitokin salınım düzeyleri bakımından karşılaştırılması için öncelikle Excel 2013 programı kullanılarak tanımlayıcı istatistik yapılmıştır. % 95 güven aralığına göre çalışılmıştır. Çift yönlü olarak varyans analizi (Two way ANOVA) yapılmıştır. F olasılık dağılımının tersi hesaplanarak F_{tablo} değeri bulunmuştur. Negatif kontrol ile maya izolatu varyansları kullanılarak F_{hesap} değeri hesaplanmıştır. Buna göre farklı ya da eşit varyanslar varsayarak çift kuyruklu t-Testi yapılmıştır. Analiz önemlilik düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca IBM SPSS Statistics 23 programı kullanılarak maya izolatlarının kendi aralarında sitokin seviyeleri bakımından önemli bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) yapılmıştır; örnekler arasında homojenlik olması durumunda Post Hoc testi (Tukey) uygulanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekşi Hamurlardan Mayaların İzolasyonu

Türkiye'nin farklı 6 bölgesinden toplanan buğday unlarından hazırlanmış olan ekşi hamurlardan ve Ankara'dan hazır ekşi hamur halinde temin edilmiş olan 1 adet ekşi hamurdan izole edilen mayalara ilişkin bilgiler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ekşi hamurlardan izole edilen olası mayalara ilişkin bilgiler.

Un Kaynağı	Bölge	İzolot Kodu
Tam buğday	Ankara	PeA1, PeA2, PeF, PeC
Buğday	İzmir	Bi1, Bi5, Bi7, C1
Tam buğday	Bolu	E1
Tam buğday	Kaynaşlı	Ch1
Buğday	Edincik	BY1-1
Tam buğday	Ereğli	M2
Siyez tam buğday	Kastamonu	-

-: İzolat elde edilememiştir.

Kastamonu bölgesinden getirilmiş olan siyez buğdayı unundan Hacettepe Üniversitesi laboratuvarında ekşi hamur hazırlanmıştır, fakat bu ekşi hamurdan maya izole edilememiştir.

4.2. MALDI-TOF MS Sonuçları

Çizelge 4.2. MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları.

KOD	Birincil Tanımlama
Ch1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^x
E1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^x
M2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^x
BY1-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^x
PeF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [*]
PeA2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [*]
PeC	<i>Pichia fermentans</i> [*]

Çizelge 4.2. MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları (devam).

KOD	Birincil Tanımlama
PeA1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> *
Bi1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
Bi5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
Bi7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
C1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *

*: Tanımlaması TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

ˆ: Tanımlaması Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yapılmıştır.

MALDI-TOF MS sonuçlarına göre 10 adet izolat *S. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır. 1 adet izolat *Pichia fermentans*, 1 adet izolat *Wickerhamomyces anomalus* olarak tanımlanmıştır. Bi1, Bi5, Bi7 ve C1 kodlu izolatlar güvenilir tanımlama sınırının altında (<1.700) skorlarla *S. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır. PeF, PeC, PeA1, PeA2 kodlu izolatlar olası cins bazında belirlenmiştir.

4.3. Maya İzolatlarının Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişebilme Özelliğine İlişkin Sonuçlar

Çoğu maya birçok bakteri türünün gelişmesini engelleyecek düzeyde yüksek şeker içeren ortamlarda gelişebilmektedir [78]. *S. cerevisiae* sakkarofilik özellikte olmakla birlikte yüksek şeker derişiminin oluşturduğu stres ortamının gelişme hızını düşürdüğü ifade edilmiştir [91]. Ekmek mayasının invertaz aktivitesi ile şeker toleransı arasında ters bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir [92,93]. Bazı *S. bayanus* suşları yüksek glukoz konsantrasyonunda gelişme gösterebilmektedirler [94].

Çizelge 4.3. Yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilme kabiliyetine ilişkin sonuçlar.

KOD	MY50G Agarda Gelişme
Ch1	-
E1	+

Çizelge 4.3. Yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilme kabiliyetine ilişkin sonuçlar
(devam).

KOD	MY50G Agarda Gelişme
M2	-
BY1-1	-
PeF	-
PeA2	-
PeC	-
PeA1	-
Bi1	-
Bi5	-
Bi7	-
C1	-

+: Gelişme var. -: Gelişme yok.

Sadece E1 kodlu maya izolatında MY50G Agarda gelişme gözlemlenmiştir ve izolatın gelişmesi zayıf olarak değerlendirilmiştir. Diğer *S. cerevisiae*, *Pichia fermentans*, *Wickerhamomyces anomalus* ve *S. uvarum*/*S. bayanus* izolatları yüksek oranda şeker içeren MY50G besiyerinde gelişme gösterememişlerdir.

4.4. Mayaların 37°C’de Gelişebilme Özelliklerine İlişkin Sonuçlar

Çizelge 4.4. 37°C’de gelişebilme özelliğine ilişkin sonuçlar.

Kod	37°C'de Gelişim (GPY Agar)	37°C'de Gelişim (GPY Broth)
Bi1	-	-
Bi5	-	+
Bi7	-	+
C1	+	+
PeA2	+	+

Çizelge 4.4. 37°C’de gelişebilme özelliğine ilişkin sonuçlar (devam).

Kod	37°C'de Gelişim (GPY Agar)	37°C'de Gelişim (GPY Broth)
PeF	+	+
BY1-1	+	+
PeC	+	+
PeA1	+	+
M2	+	+
E1	+	+
Ch1	+	+

+: Gelişme var. -: Gelişme yok.

Çoğu maya türünün suşları en iyi 20-28°C arasında gelişmektedir [78]. Farklı *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae* olmayan türlere ait 27 maya suşunun kullanıldığı bir çalışmada *S. cerevisiae* optimum 32.3°C’de ve maksimum 45.4°C’de gelişme göstermiştir [95]. *Saccharomyces bayanus*’un 37°C’de gelişme göstermediği bildirilmiştir [94]. Nitekim Çizelge 4.4’te görüldüğü gibi Bi1, Bi5, Bi7 kodlu izolatlar *Saccharomyces bayanus*/ *S. uvarum* türü olup 37°C’de GPY Agar besiyerinde bu izolatlarda gelişme gözlenmemiştir. GPY sıvı besiyerinde ise sadece Bi1 kodlu izolat gelişme gösterememiş, diğer tüm izolatlar gelişebilmiştir.

4.5. Maya İzolatlarının Ekmekçilik Teknolojisi Açısından Önemli Bazı Özelliklerine İlişkin Sonuçlar

4.5.1. Maya İzolatlarının Çeşitli Tuz Derişimlerinde Gelişebilme Özelliklerine İlişkin Sonuçlar

Maya izolatlarının çeşitli tuz derişimlerinde gelişebilme özelliklerine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.5’te yer almaktadır.

Çizelge 4.5. Çeşitli tuz derişimlerinde gelişebilme özelliklerine ilişkin sonuçlar.

Kod	% 2 (w/v) NaCl	% 3 (w/v) NaCl	% 4 (w/v) NaCl	% 5 (w/v) NaCl
Bi1	+	+	+	+
Bi5	+	+	+	+

Çizelge 4.5. Çeşitli tuz derişimlerinde gelişebilme özelliklerine ilişkin sonuçlar (devam).

Kod	% 2 (w/v) NaCl	% 3 (w/v) NaCl	% 4 (w/v) NaCl	% 5 (w/v) NaCl
Bi7	+	+	+	+
T	+	+	+	+
C1	+	+	+	+
PeA2	+	+	+	+
PeF	+	+	+	+
BY1-1	+	+	+	+
PeC	+	+	+	+
PeA1	+	+	+	+
M2	+	+	+	+
E1	+	+	+	+
Ch1	+	+	+	+

+: Gelişme var. -: Gelişme yok.

PeC kodlu izolatta % 4-5 (w/v) tuz derişimli ortamda zayıf gelişme gözlemlenmiştir. T kodlu ticari *S. cerevisiae* suşu % 2-3-4-5 (w/v) tuz konsantrasyonuna dirençli olup diğer 12 adet maya izolatının da bu konsantrasyonlarda gelişebildiği belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Ekmek ve Ekmek Çeşitleri Tebliği'ne göre tuz miktarı kuru maddede en çok % 1.5 (m/m) olabilmektedir [3]. Tuzun ekmekte gluteni kuvvetlendirici etkisi bulunmaktadır fakat ortamdaki tuz miktarının çok olması maya faaliyetine olumsuz etki etmektedir [2]. Bu sonuçlara göre ekşi hamurlardan izole edilmiş olan 12 maya izolatının da ekmekte günümüzde kullanılan tuz konsantrasyonundan olumsuz olarak etkilenmeyeceği ve gelişme gösterebileceği söylenebilmektedir.

4.5.2. Maya İzolatlarının Glukoz Fermantasyonu Sonuçları

Çizelge 4.6'da görüleceği gibi maya izolatlarının hepsi glukozu fermente edebilmektedir. T kodlu ticari *S. cerevisiae* suşu 24 saatte glukozu hızlı bir şekilde fermente ederek Durham tüpünün % 95'ini gaz ile doldurmuştur. Bi5 kodlu izolat ise glukozu 24 saatte tamamen fermente etmiştir. PeF, C1 ve Bi7 kodlu izolatlar da glukozu hızlı bir şekilde (48 saatte) fermente etmişlerdir. BY1-1 kodlu izolat, 72 saat sonunda Durham tüpü içerisinde % 90 oranında gaz oluşturarak diğer izolatlarla kıyasla glukozu en yavaş fermente eden izolattır. PeC kodlu izolat Durham tüpünde 72 saat sonunda tamamen gaz oluşturarak bir diğer fermantasyon hızı düşük izolat olarak tespit edilmiştir. Ekşi hamur ekmeği hazırlanma prosesi göz önüne alındığında mayalar için 24 saatte glukozu

fermente etme hızı oldukça önemli olup Bi5, PeF, C1 ve Bi7 kodlu izolatların bu bakımdan diğer izolatlardan daha üstün olduğu görülmüştür.

4.5.3. Maya İzolatlarının Şeker Fermantasyonu Özelliklerine İlişkin Sonuçlar

Çizelge 4.6. Fermantasyonu sonuçları.

KOD	Maya Türü	Gün	Gaz Oluşumu (%)			
			Glukoz Fermantasyonu	Şeker Fermantasyonu Testi		
				Glukoz	Fruktoz	Sakaroz
T	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	95	40	10	100
		2	100	100	100	
Ch1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	5	10	5	100
		2	100	100	100	
E1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	10	90	5	40
		2	100	100	100	100
M2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	10	70	-	40
		2	100	100	45	100
		3			100	
BY1-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	-	-	-	-
		2	5	20	100	100
		3	90	100		
		4	100			
PeF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	60	15	20	90
		2	100	100	100	100

Çizelge 4.6. Fermantasyonu sonuçları (devam).

KOD	Maya Türü	Gün	Gaz Oluşumu (%)			
			Glukoz Fermantasyonu	Şeker Fermantasyonu Testi		
				Glukoz	Fruktoz	Sakaroz
PeA2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	5	20	5	90
		2	100	100	100	100
C1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	50	95	10	5
		2	100	100	100	100
PeA1	<i>Wickerhamomyces anomalous</i>	1	-	-	-	-
		2	100	5	45	100
		3		100	100	
Bi1	<i>Saccharomyces uvarum/ Saccharomyces bayanus</i>	1	5	100	100	95
		2	100			100
Bi5	<i>Saccharomyces uvarum/ Saccharomyces bayanus</i>	1	100	100	100	95
		2				100
Bi7	<i>Saccharomyces uvarum/ Saccharomyces bayanus</i>	1	45	55	100	50
		2	100	100		100
PeC	<i>Pichia fermentans</i>	1	-	-	-	-
		2	5	100	50	-
		3	100		100	-
		15				-
		28				-

-: Gaz oluşumu gözlenmemiştir.

Ch1 kodlu izolat sakarozu 24 saat içerisinde tamamen fermente etmiştir. Bi1, Bi5 kodlu izolatların yer aldığı sakaroz içeren tüplerde 24 saat içerisinde Durham tüpünün yaklaşık % 95’inde gaz oluşumu gözlemlenmiştir. PeF ve PeA2 kodlu izolatların olduğu sakaroz içeren tüplerde 24 saat sonunda Durham tüpünde % 90’a yakın gaz oluşumu olmuştur. E1, M2, BY1-1, PeF, PeA2, PeA1, Bi1, Bi5, Bi7 ve C1 kodlu izolatların bulunduğu tüplerde 48 saat sonunda sakaroz fermente edilerek Durham tüpü içerisinde tamamen gaz oluşmuştur. PeC kodlu izolat ise sakarozu fermente edememiştir.

Bi1, Bi5, Bi7 kodlu izolatlar fruktozu 24 saat içerisinde fermente etmişlerdir. C1, PeA2, PeF, BY1-1, E1 ve Ch1 kodlu izolatların bulunduğu tüplerde 48 saat içerisinde fruktoz fermente olup Durham tüpünde tamamen gaz oluşmuştur. M2, PeC, PeA1 kodlu izolatlar fruktozu 72 saat içerisinde fermente ederek Durham tüpünde % 100 gaz oluşturmuşlardır.

Bi1 ve Bi5 kodlu izolatlar 24 saat içerisinde glukozu tamamen fermente etmişlerdir. Bi7, C1, PeC, PeA2, PeF, M2, E1 ve Ch1 kodlu izolatlar 48 saat içerisinde glukozu %100 fermente etmişlerdir. Bu izolatlar arasından C1 kodlu izolat ilk 24 saatte Durham tüpünde % 95’e yakın, E1 kodlu izolat ise % 90’a yakın oranda glukozdan gaz oluşturmuştur. M2 kodlu izolatta ise glukoz fermantasyonu sonucu 24 saatte Durham tüpünde yaklaşık % 70 oranında gaz oluşumu saptanmıştır. BY1-1, PeA1 kodlu izolatlar glukoz fermantasyonu sonucu 72 saat içerisinde Durham tüpünde tamamen gaz oluşturarak glukozu en yavaş fermente eden izolatlar olarak belirlenmiştir.

Maya hücreleri maltaz enzimiyle amilolitik aktivite sonucu oluşan maltozu ve sükröz enzimiyle hamura eklenen sakarozu parçalamaktadırlar. Ekmeğe hiç sakaroz eklenmemesi halinde fermantasyonun yavaş başladığı çünkü mayanın substrat olarak kullandığı şekerlerin amilolitik aktivite sonucu oluştuğu belirtilmektedir [15]. T kodlu ticari *S. cerevisiae* suşu glukoz ve sakarozu hızlı bir şekilde fermente edebilmektedir. Ekşi hamur ekmeği yapım süreci göz önünde bulundurulduğunda ilk 24 saatteki fermantasyon oranları daha önemli olup; ekmek yapımında kullanılmak üzere glukoz fermantasyonu kabiliyeti açısından *S. cerevisiae* izolatları arasından C1, E1 ve M2 kodlu izolatların kullanımının daha avantajlı olabileceği düşünülmektedir. *S. cerevisiae* izolatlarından Ch1, PeF ve PeA2 kodlu izolatların sakarozu 24 saat içerisinde hızlı bir şekilde fermente ettiği, bu nedenle ekmek üretiminde sakaroz katkısı yapılması halinde hızlı bir şekilde fermantasyon yapabilecekleri öngörülmektedir. PeF ve C1 kodlu *S. cerevisiae*

izolatlarının fruktoz fermantasyonu kabiliyetinin hamura meyve, şıra gibi katkıların yapıldığı bazı özel durumlarda katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

4.5.4. Maya İzolatlarının Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme Özelliklerine İlişkin Sonuçlar

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi T kodlu ticari *S. cerevisiae* suşu ve bütün izolatlar pH 2.5-3.5-4.5-6.57 değerlerinde gelişme göstermiştir.

Çizelge 4.7. Düşük pH değerlerinde gelişebilme özelliklerine ilişkin sonuçlar.

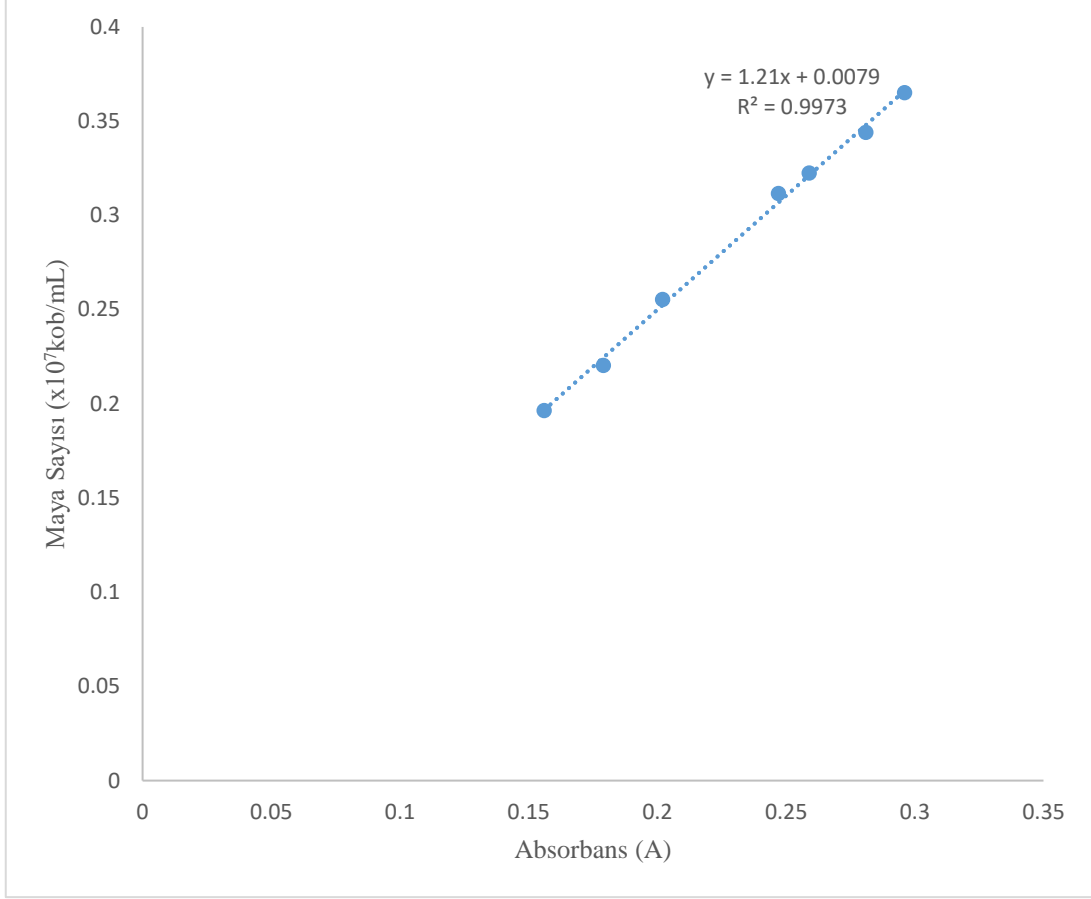
Kod	pH 6.57	pH 4.5	pH 3.5	pH 2.5
Bi1	+	+	+	+
Bi5	+	+	+	+
Bi7	+	+	+	+
C1	+	+	+	+
PeA2	+	+	+	+
PeF	+	+	+	+
BY1-1	+	+	+	+
PeC	+	+	+	+
PeA1	+	+	+	+
M2	+	+	+	+
E1	+	+	+	+
Ch1	+	+	+	+
T	+	+	+	+

+: Gelişme var. -: Gelişme yok.

Ekşi hamurda başlangıçtaki pH değerinin 5.0-6.2 olduğu ifade edilmiştir [35]. pH değeri 5.0-6.2 olan tahıl püreleri öncelikli olarak laktik asit bakterilerince pH 4’ün altına fermente edilmektedir ve bu noktanın altında aside dayanıklı mayaların fermantasyonda baskın olduğu belirtilmektedir [37]. Mikrobiyel asidifikasyon hamur pH’ını 3.5-4.0’a değiştirmektedir [96]. Karışık kültürlerde maya gelişiminin; LAB ve üretilen laktik asit, asetik asit gibi metabolitlerden kaynaklanan hızlı pH düşüşünden negatif olarak etkilendiği bildirilmiştir [97]. Maya izolatlarının düşük pH değerlerinde gelişebilmesi, ekşi hamurda bulunan LAB’leri ve ürettikleri metabolitlerden olumsuz etkilenmemeleri açısından önemli olup izolatların hepsi bu açıdan uygundur.

4.5.5. Maya İzolatlarının Optik Yoğunluğa Dayalı Gelişme Hızına İlişkin Sonuçlar

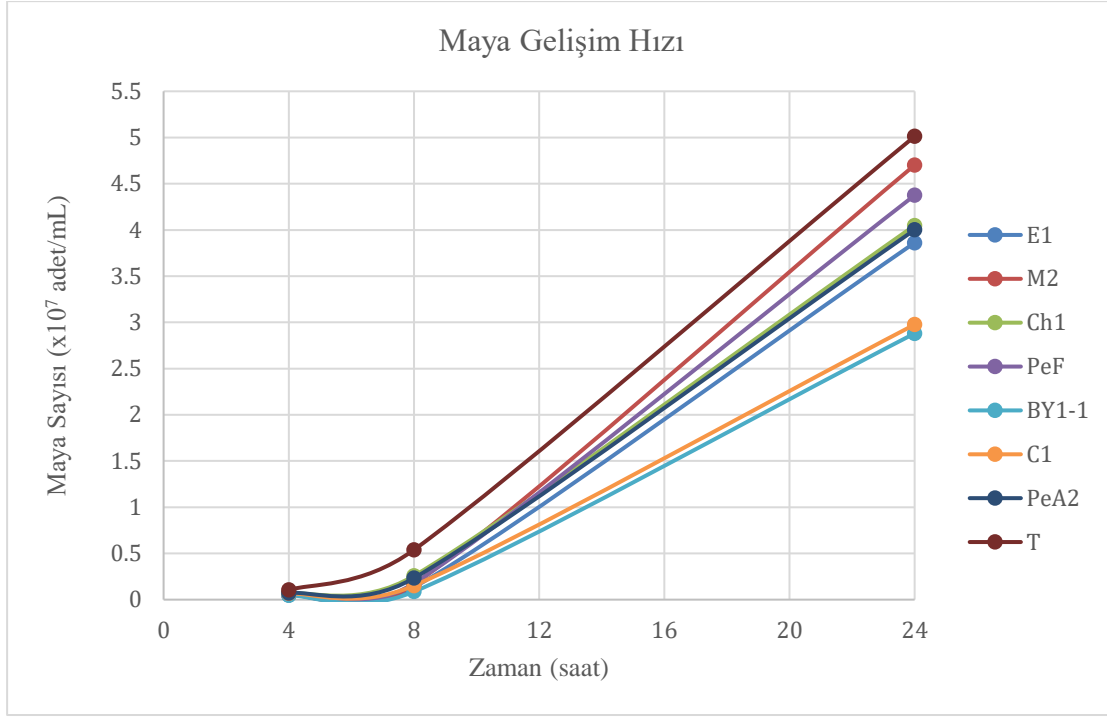
Regresyon doğrusunu oluşturmak amacıyla E1 kodlu izolata uygulanan kültürel sayımla 28°C’de 48 saat inkübasyon sonucunda sayının 2.59×10^7 kob/mL olduğu belirlenmiştir.



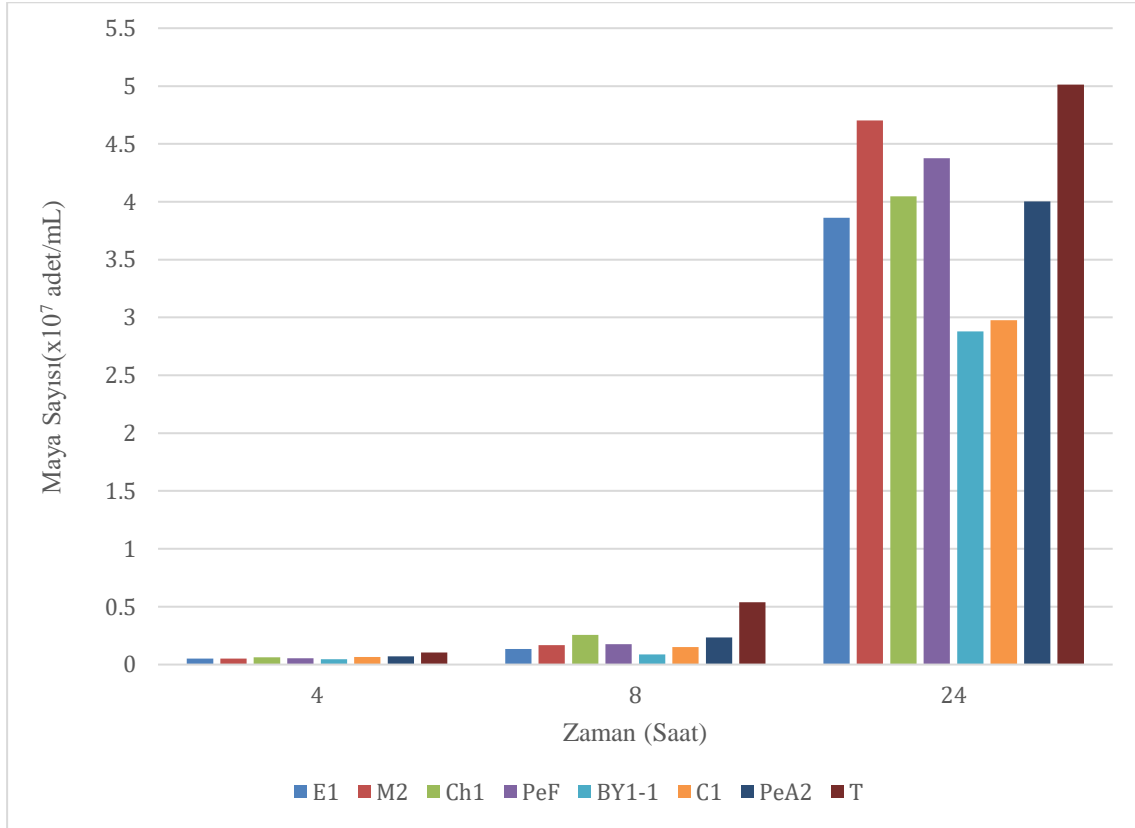
Şekil 4.1. E1 kodlu maya izolatının regresyon doğrusu.

Çizelge 4.8. *S. cerevisiae* türü maya izolatlarının zamana göre sayı değerleri.

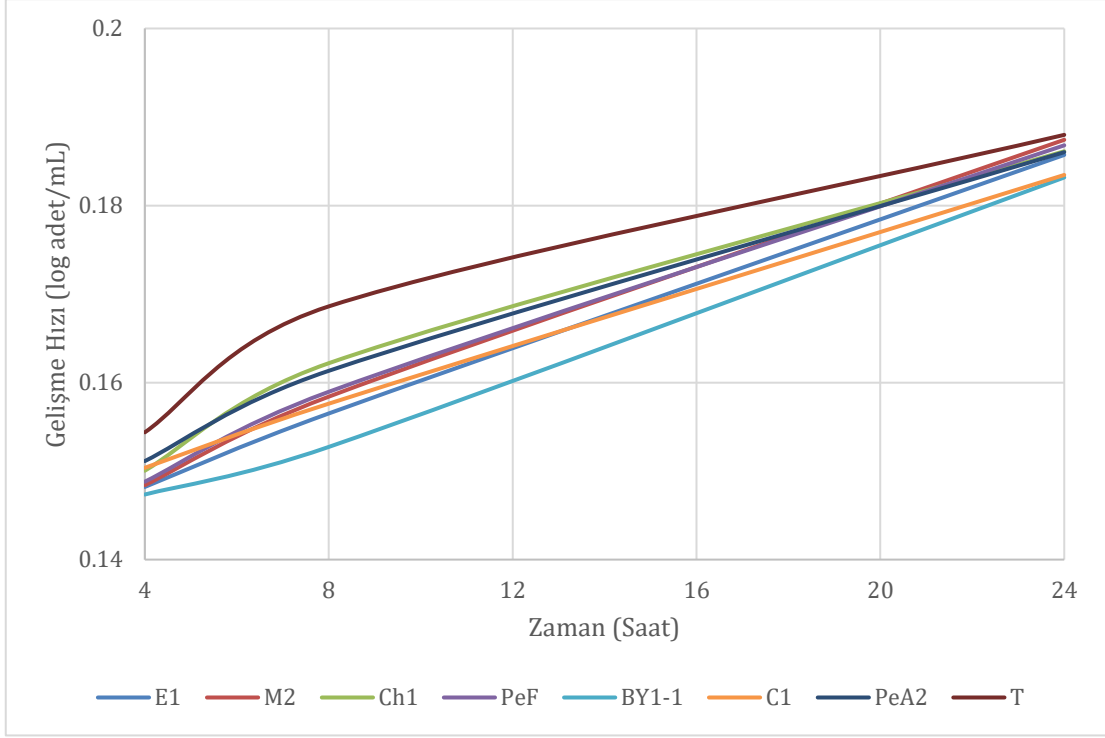
KOD	4.saat (x10 ⁷ adet/mL)	8.saat (x10 ⁷ adet/mL)	24.saat (x10 ⁷ adet/mL)
E1	0,0515	0,1337	3,8616
M2	0,0527	0,1664	4,7014
Ch1	0,0636	0,2572	4,0482
PeF	0,0551	0,1773	4,3748
BY1-1	0,0466	0,0866	2,8805
C1	0,0660	0,1519	2,9762
PeA2	0,0720	0,2330	4,0016
T	0,1047	0,5385	5,0124



Şekil 4.2. *S. cerevisiae* türü maya izolatlarının optik yoğunluğuna dayalı gelişme hızları.



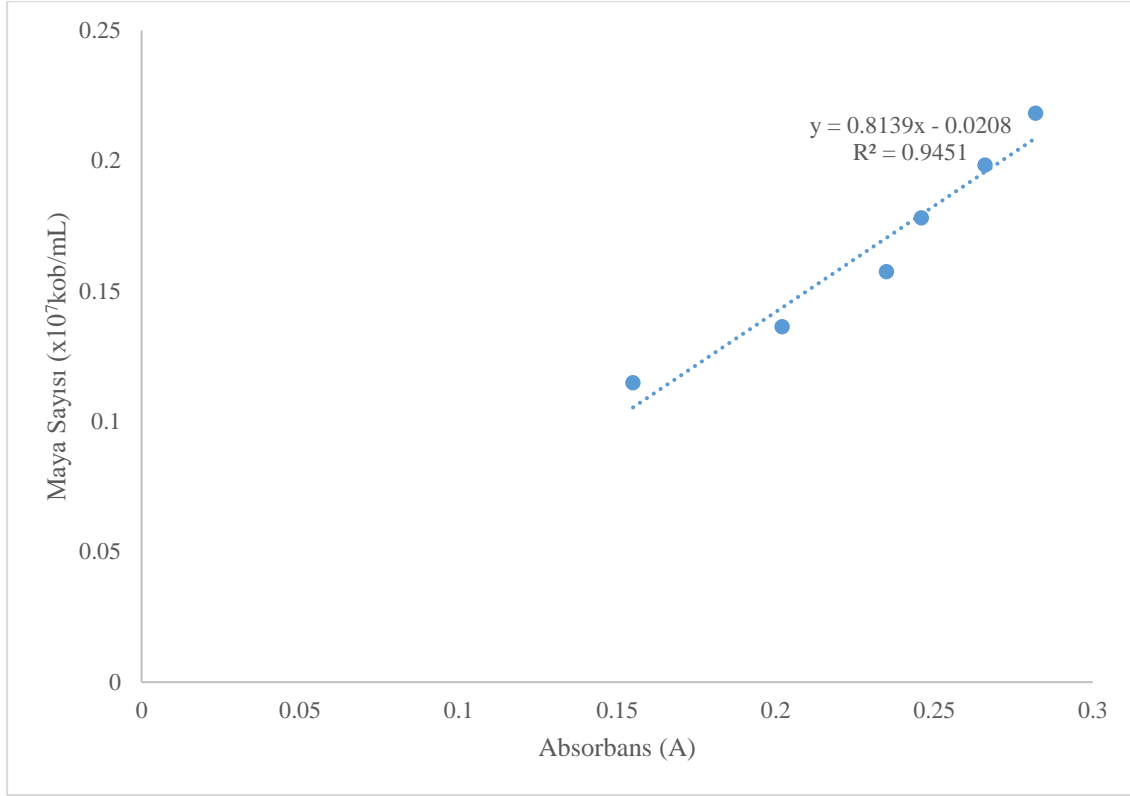
Şekil 4.3. *S. cerevisiae* türü maya izolatlarının optik yoğunluğuna dayalı gelişme hızları (sütun grafiği gösterimi).



Şekil 4.4. *S. cerevisiae* türü maya izolatlarının logaritmik olarak gelişme hızları grafiği.

Çalışmada test edilen *S. cerevisiae* izolatları arasından 4. saatin sonunda en hızlı gelişmeyi PeA2 kodlu izolat göstermiştir. 8. saatin sonunda en yüksek sayıya Ch1 kodlu izolat ulaşmıştır. 24. saat sonunda ise en yüksek sayıya M2 kodlu izolat ulaşarak hızlı bir gelişme göstermiştir. T kodu ile gösterilen ticari *S. cerevisiae* izolatı test edilen izolatlara kıyasla 4., 8. ve 24. saatlerde daha yüksek sayılara ulaşmıştır ve gelişme hızı en yüksek olan maya suşudur.

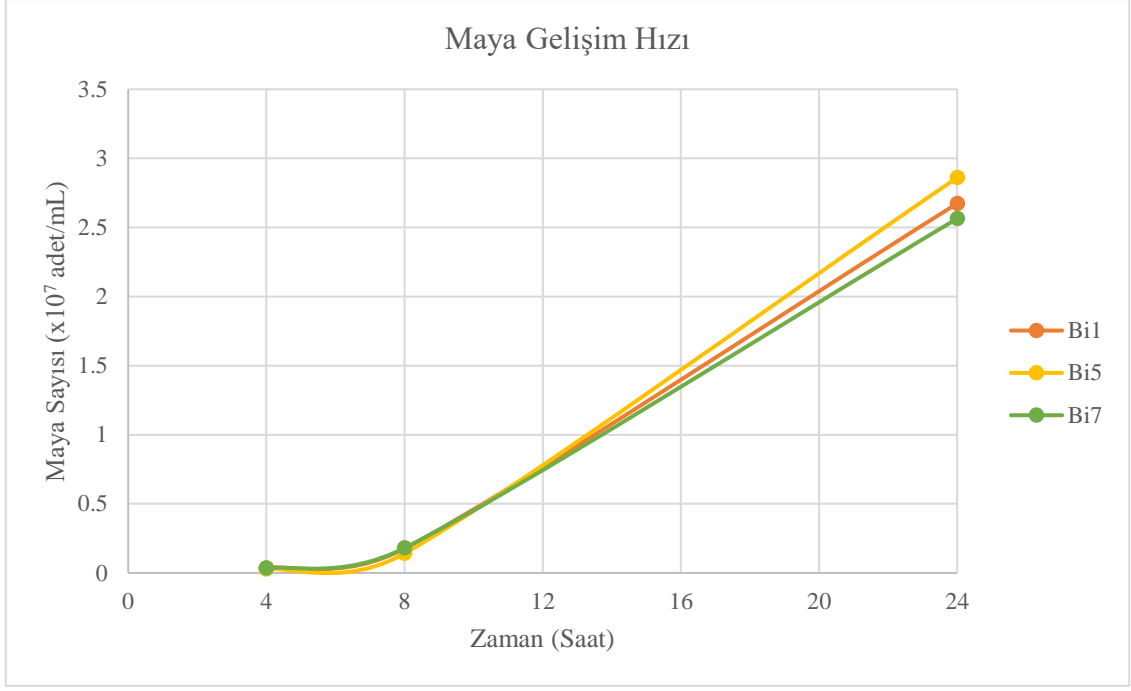
Regresyon doğrusunu oluşturmak amacıyla Bi1 kodlu izolata uygulanan kültürel sayımla 28°C’de 48 saat inkübasyon sonucunda sayının 2.2×10^7 kob/mL olduğu belirlenmiştir.



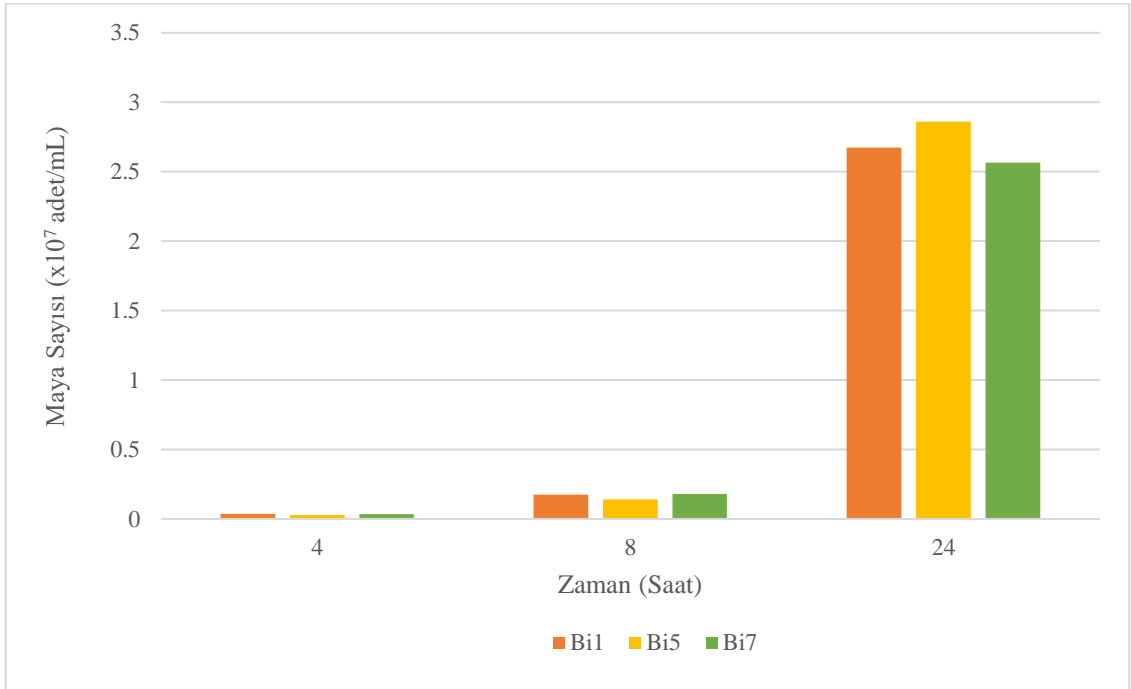
Şekil 4.5. Bi1 kodlu maya izolatının regresyon doğrusu.

Çizelge 4.9. *S. uvarum*/*S. bayanus* türü maya izolatlarının zamana göre sayı değerleri.

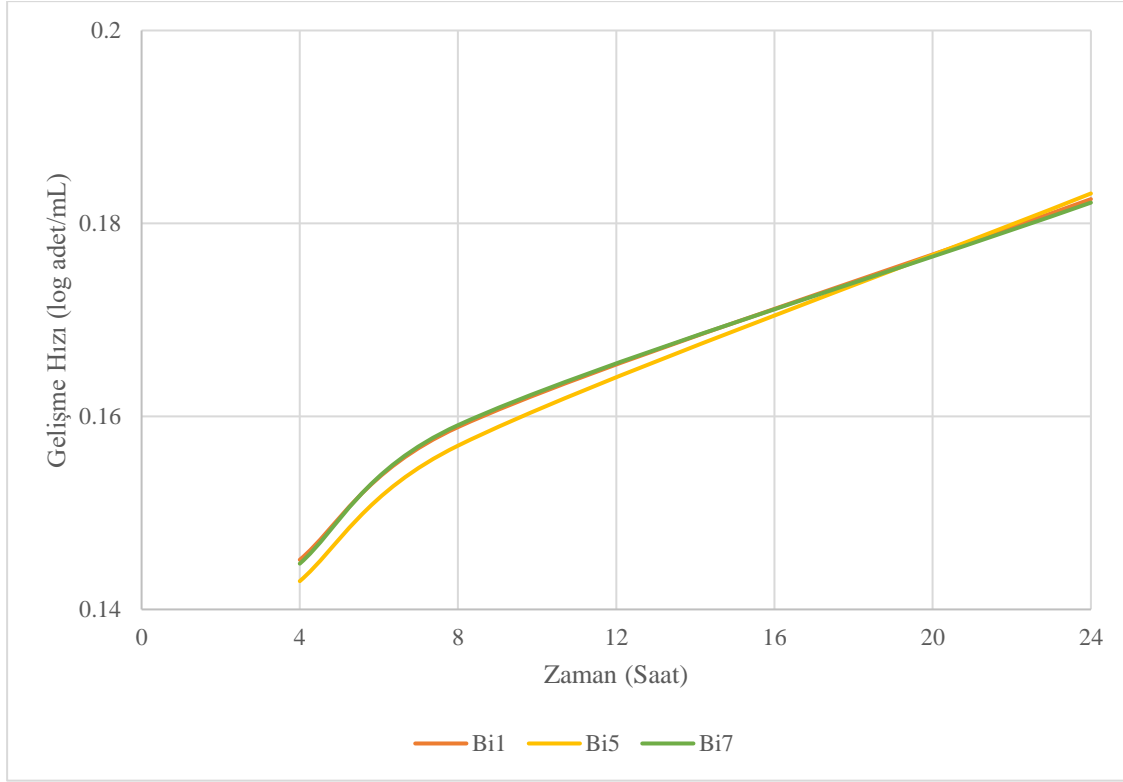
KOD	4.saat (x10 ⁷ adet/mL)	8.saat (x10 ⁷ adet/mL)	24.saat (x10 ⁷ adet/mL)
Bi1	0,0362	0,1762	2,6736
Bi5	0,0280	0,1412	2,8607
Bi7	0,0345	0,1802	2,5644



Şekil 4.6. *S. uvarum*/*S. bayanus* türü maya izolatlarının optik yoğunluğuna dayalı gelişme hızları grafiği.



Şekil 4.7. *S. uvarum*/*S. bayanus* türü maya izolatlarının optik yoğunluğuna dayalı gelişme hızları (sütun grafiği gösterimi).



Şekil 4.8. *S. uvarum*/*S. bayanus* türü maya izolatlarının logaritmik olarak gelişme hızları grafiği.

S. uvarum/*S. bayanus* türü maya izolatlarında 4. saatin sonunda en yüksek sayıya Bi1 kodlu izolat ulaşmıştır. 8. saatin sonunda en yüksek sayıda olan izolat Bi7 iken, 24. saatin sonunda en yüksek sayıya ulaşarak en hızlı gelişmeyi gösteren izolat Bi5 olmuştur.

S. uvarum/*S. bayanus* türü maya izolatlarının 24 saat sonundaki sayıları, *S. cerevisiae* izolatı sayılarından daha düşük bulunmuştur. Ülkemizdeki ekşi hamur ekmeklerinin işlem süresi yaklaşık 24 saat olup, hızlı bir şekilde gelişerek 24 saat sonunda yüksek bir sayıya ulaşan M2 ve PeF kodlu izolatların gelişme hızının bu bakımdan diğer *S. cerevisiae* izolatlarından daha uygun olduğu düşünülmektedir [36].

4.5.6. Maya İzolatlarının Killer Aktivite ve Duyarlılık Testi Sonuçları

Çalışmada izole edilen mayaların killer aktivite ve duyarlılık özellikleri Çizelge 4.10'da verilmektedir. Çizelgeden de görüleceği gibi izolatların hiçbiri killer özellik göstermemektedir. PeC ve PeA1 kodlu izolatlar K1 ve K2 killer toksinlerine karşı duyarlılık göstermezken Ch1, E1, M2, BY1-1, PeF, PeA2, Bi1, Bi5, Bi7, C1 kodlu izolatlar K1 ve K2 killer toksinlerine duyarlıdır.

Çizelge 4.10. İzolatların killer aktivite ve duyarlılık özellikleri.

KOD	Maya Türü	Killer Aktivite	Duyarlılık	
			K1 toksini	K2 Toksini
Ch1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+
E1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+
M2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+
BY1-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+
PeF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+
PeA2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+
PeC	<i>Pichia fermentans</i>	-	-	-
PeA1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	-
	<i>Saccharomyces uvarum/</i>			
Bi1	<i>Saccharomyces bayanus</i>	-	+	+
	<i>Saccharomyces uvarum/</i>			
Bi5	<i>Saccharomyces bayanus</i>	-	+	+
	<i>Saccharomyces uvarum/</i>			
Bi7	<i>Saccharomyces bayanus</i>	-	+	+
C1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+

+: Test sonucu pozitif. -: Test sonucu negatif.

Killer toksin üreten maya türleriyle kontaminasyonun fırıncılık sektöründe istenmeyen bir durumdur [46]. Çalışmadaki *S. cerevisiae* izolatlarının killer özellik göstermemesinin karışık starter kültür olarak kullanılması durumunda olumlu olabileceği düşünülmektedir.

4.5.7. Maya İzolatlarının Proteolitik Aktivitelerine İlişkin Sonuçlar

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi maya izolatları şeffaf zon oluşturarak proteolitik aktivite göstermemiştir.

Çizelge 4.11. Proteolitik aktiviteye ilişkin sonuçlar.

KOD	Maya Türü	Proteolitik Aktivite
Ch1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
E1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
M2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-

Çizelge 4.11. Proteolitik aktiviteye ilişkin sonuçlar (devam).

KOD	Maya Türü	Proteolitik Aktivite
BY1-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
PeF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
PeA2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
PeC	<i>Pichia fermentans</i>	-
PeA1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-
Bi1	<i>Saccharomyces uvarum</i> / <i>Saccharomyces bayanus</i>	-
Bi5	<i>Saccharomyces uvarum</i> / <i>Saccharomyces bayanus</i>	-
Bi7	<i>Saccharomyces uvarum</i> / <i>Saccharomyces bayanus</i>	-
C1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
T	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-

+: Test sonucu pozitif. -: Test sonucu negatif.

Fungal proteazların hamura eklenmesiyle karıştırma zamanı hamurun viskoelastik özelliklerini olumsuz etkilemeden düşürülebilmektedir [18]. Ekşi hamurla ekmek yapımında proteoliz, flavor prekürsörleri için aminoasitlerin yeterli düzeyde serbest kalması açısından fakat aşırı gluten degradasyonunu önlemek amacıyla sınırlı bir düzeyde istenmektedir [96].

Spicher ve Nierle [98] yapmış oldukları çalışmada mayasız ekşi hamurların aminoasit içeriğine karşın maya içeren ekşi hamurların aminoasit içeriğini daha düşük olarak saptamışlardır. Buradaki aminoasit tüketiminin ekşi hamurda bulunan maya miktarına bağlı olduğunu; alanin, glisin ve lisin aminoasitlerinin tüketiminden kaynaklandığını belirtmektedirler. Kullanılan maya türüne göre farklılıklar gözlemlendiğini, *S. cerevisiae*'nin *Candida krusei*'den daha fazla etkili olduğunu ifade etmektedirler.

T kodlu ticari *S. cerevisiae* suşu da proteolitik aktivite göstermemekte olup bu durumun ekmek üretiminde glutenin aşırı degrade olmaması açısından olumlu bir özellik olacağı düşünülmektedir.

4.6. Sekans Analizi Sonuçları

MALDI-TOF MS tanımlama sonuçlarına göre *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanan maya izolatlarına uygulanmış olan Sanger metoduyla sekans analizinin sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Sekans analizi sonuçları.

Kod	Sekans Analizi Sonucu
Ch1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
E1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BY1-1	-
PeF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PeA2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bi1	<i>Saccharomyces uvarum/ Saccharomyces bayanus</i>
Bi5	<i>Saccharomyces uvarum/ Saccharomyces bayanus</i>
Bi7	<i>Saccharomyces uvarum/ Saccharomyces bayanus</i>
C1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

-: Okuma kirli olduğu için değerlendirilememiştir.

Sekans analizi sonucunda 6 adet izolatın *Saccharomyces cerevisiae* olduğu doğrulanırken MALDI-TOF MS tanımlama sonucuna göre *Saccharomyces cerevisiae* olduğu belirlenen 1 adet izolatın doğrulaması okuma kirli olduğu için yapılamamıştır. 3 adet izolat *Saccharomyces uvarum/ Saccharomyces bayanus* olarak tanımlanmıştır. *Saccharomyces bayanus*, şarap yapımında üzümlerin normal fermantasyonunda rol alan bir mayadır [94]. Lager tipi biraların fermantasyonunda *Saccharomyces pastorianus* (*S. uvarum* (*carlsbergensis*)) kullanılmaktadır [99].

Sekans analizine ilişkin U.S. National Library of Medicine sorgulama sonuçları detaylı olarak EK 7 bölümünde verilmiştir.

4.7. MTT (3-(4,5-Dimetil tiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) Testi Sonuçları

Caco-2 hücrelerine uygulanan MTT testi sonuçları Çizelge 4.13, Çizelge 4.14 ve 4.15'te verilmiştir. THP-1 hücreleri için yapılan MTT testi sonuçları Çizelge 4.16, Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. Caco-2 hücreleri ile etkileşim sonucu maya izolatlarının absorbands değerleri (570 nm).

Neg Kon	Poz Kon	BY1-1	E1	M2	PeA2	PeF	Ch1
0.954	0.237	1.669	1.639	2.048	1.815	1.998	1.807
1.007	0.254	1.599	1.669	1.94	1.609	1.831	1.774
1.024	0.252	1.61	1.613	1.985	1.772	1.858	1.9
1.108	0.28	1.651	1.622	1.811	1.76	1.847	1.776
1.1	0.302	1.689	1.64	2.021	1.772	1.785	1.939
1.08	0.264	1.77	1.504	1.994	1.729	1.859	1.862
1.028	0.269	1.732	1.692	2.041	1.645	1.839	1.923
0.92	0.267	1.71	1.709	1.969	1.778	1.822	1.901

Neg Kon: Negatif kontrol. Poz Kon: Pozitif kontrol.

Çizelge 4.14. Caco-2 hücreleri için % canlılık sonuçları.

Neg Kon	Poz Kon	BY1-1	E1	M2	PeA2	PeF	Ch1	
92.84	23.06	162.41	159.49	199.29	176.62	194.43	175.84	
97.99	24.72	155.60	162.41	188.78	156.58	178.18	172.63	
99.65	24.52	156.67	156.96	193.16	172.44	180.80	184.89	
107.82	27.25	160.66	157.84	176.23	171.27	179.74	172.83	
107.04	29.39	164.36	159.59	196.67	172.44	173.70	188.69	
105.10	25.69	172.24	146.36	194.04	168.25	180.90	181.19	
100.04	26.18	168.54	164.65	198.61	160.08	178.96	187.13	
89.53	25.98	166.40	166.31	191.61	173.02	177.30	184.99	
Ort	100	25.85	163.36	159.20	192.30	168.84	180.50	181.02
SE	2.32	0.67	2.02	2.16	2.61	2.45	2.15	2.28

Neg Kon: Negatif kontrol. Poz Kon: Pozitif kontrol. Ort: Ortalama. SE: Standart hata.

Çizelge 4.15. Caco-2 hücreleri için ortalama % canlılık ve güven aralığı.

	Canlılık (%)	Güven aralığı (%95, Mutlak)
Neg Kon	100	± 5.49
Poz Kon	25.84844	± 1.59
BY1-1	163.3621	± 4.78
E1	159.202	± 5.12
M2	192.3002	± 6.18
PeA2	168.8359	± 5.8
PeF	180.5012	± 5.09
Ch1	181.0242	± 5.39

Neg Kon: Negatif kontrol. Poz Kon: Pozitif kontrol.

Çizelge 4.16. THP-1 hücreleri ile etkileşim sonucu maya izolatlarının absorbans değerleri (570 nm).

Neg Kon	Poz Kon	BY1-1	E1	M2	PeA2	PeF	Ch1
0.130	0.040	0.210	0.192	0.196	0.198	0.200	0.190
0.138	0.043	0.190	0.197	0.212	0.193	0.183	0.186
0.140	0.043	0.202	0.188	0.218	0.213	0.186	0.200
0.151	0.048	0.208	0.200	0.205	0.211	0.185	0.186
0.150	0.051	0.194	0.212	0.193	0.213	0.179	0.204
0.148	0.045	0.196	0.211	0.219	0.207	0.186	0.196
0.140	0.046	0.210	0.201	0.195	0.197	0.184	0.202
0.126	0.045	0.187	0.193	0.216	0.213	0.182	0.200

Neg Kon: Negatif kontrol. Poz Kon: Pozitif kontrol.

Çizelge 4.17. THP-1 hücreleri için % canlılık sonuçları.

	Neg Kon	Poz Kon	BY1-1	E1	M2	PeA2	PeF	Ch1
	93.13	28.78	150.25	137.31	140.17	141.29	142.71	135.53
	98.30	30.84	135.61	140.74	151.57	137.91	130.79	133.05
	99.96	30.60	143.93	134.34	155.75	151.89	132.71	142.50
	108.16	34.00	148.32	142.51	146.74	150.86	131.93	133.20
	107.38	36.67	138.21	151.71	137.66	151.89	127.50	145.43
	105.43	32.06	139.64	150.46	156.59	148.20	132.79	139.65
	100.35	32.66	149.86	143.37	139.52	141.00	131.36	144.23
	89.81	32.42	133.21	138.17	154.26	152.40	130.14	142.58
Ort	100.32	32.25	142.38	142.33	147.78	146.93	132.49	139.52
SE	2.33	0.84	2.35	2.17	2.76	2.09	1.58	1.76

Neg Kon: Negatif kontrol. Poz Kon: Pozitif kontrol. Ort: Ortalama. SE: Standart hata.

Çizelge 4.18. THP-1 hücreleri için ortalama % canlılık ve güven aralığı.

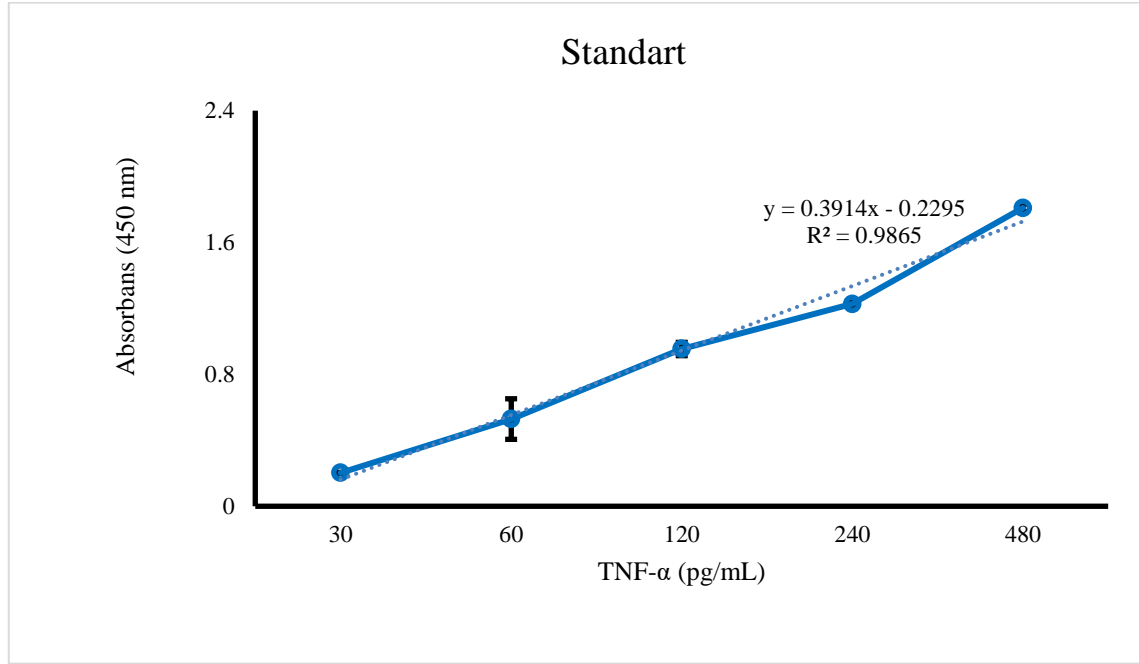
	Canlılık (%)	Güven aralığı (%95, Mutlak)
Neg Kon	100.32	±5.51
Poz Kon	32.25	±1.99
BY1-1	142.38	±5.57
E1	142.33	±5.13
M2	147.78	±6.53
PeA2	146.93	±4.94
PeF	132.49	±3.73
Ch1	139.52	±4.16

Neg Kon: Negatif kontrol. Poz Kon: Pozitif kontrol.

Mikroorganizmaların oluşturdukları bazı metabolitlerin Caco-2 hücreleri gibi kültüre edilmiş kanser hücrelerine etkili olduğu bilinmektedir. Nitekim yapılan bir çalışmada laktik asit bakterilerinin ürettiği çözünebilir metabolitlerin, kültüre edilmiş kanser hücrelerinin gelişimini engellediği belirtilmiştir [100]. Thirabunyanon ve ark. [101]'nin yapmış olduğu çalışmada *L. fermentum* RM28 suşunun metabolitlerinin Caco-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. BY1-1, E1, M2, PeA2, PeF ve Ch1 kodlu izolatlar THP-1 ve Caco-2 hücreleriyle yüksek etkileşim göstermişlerdir. Maya izolatlarının THP-1 ve Caco-2 hücrelerine sitotoksik olmadığı, aksine proliferasyonlarını sağladığı belirlenmiştir. M2 kodlu izolat ile etkileştirilen Caco-2 hücrelerinin canlılığı %192.3002, THP-1 hücrelerinin canlılığı %147.78 olarak ölçülmüş olup M2'nin hücre proliferasyonunu en fazla arttıran izolat olduğu belirlenmiştir. E1 kodlu izolat ile etkileştirilen Caco-2 hücrelerinin canlılığı %159.202 olup E1, diğer izolatlara göre Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu en az arttıran izolat olarak bulunmuştur. PeF kodlu izolat ile etkileştirilen THP-1 hücrelerinin canlılığı %132.49 olup PeF, diğer izolatlara göre THP-1 hücrelerinin proliferasyonunu en az arttıran izolat olarak bulunmuştur.

4.8. Makrofajlardan Çeşitli Sitokinlerin Salınım Seviyelerinin ELISA Metoduyla Ölçümüne İlişkin Sonuçlar

4.8.1. TNF- α Salınımı



Şekil 4.9. TNF- α ELISA kiti standart eğrisi.

Negatif kontrolün her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri Çizelge 4.19'de birlikte verilmiştir. p değerinin hesaplanmasında öncelikle hesaplanmış olan F_{tablo} ve F_{hesap} değerleri karşılaştırılarak t-Test farklı varyanslar varsayarak iki örnek veya t-Test eşit varyanslar varsayarak iki örnek şeklinde analiz edilmiştir.

Çizelge 4.19. Negatif kontrolün TNF- α salınımı bakımından her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri ve izolatların varyans değerleri.

	Bi1	Bi5	Bi7	C1	E1	Ch1	PeA2	PeF	BY1-1	PeC	PeA1	M2
Varyans	0,00512	0,02515	0,00223	0,01297	0,01891	0,00735	0,0109	0,00169	0,00066	0,00757	0,00933	0,01149
p	0,09625	0,9172	0,96375	0,04349	0,08243	0,56587	0,83624	0,0002	0,0303	0,09834	0,98958	0,0083

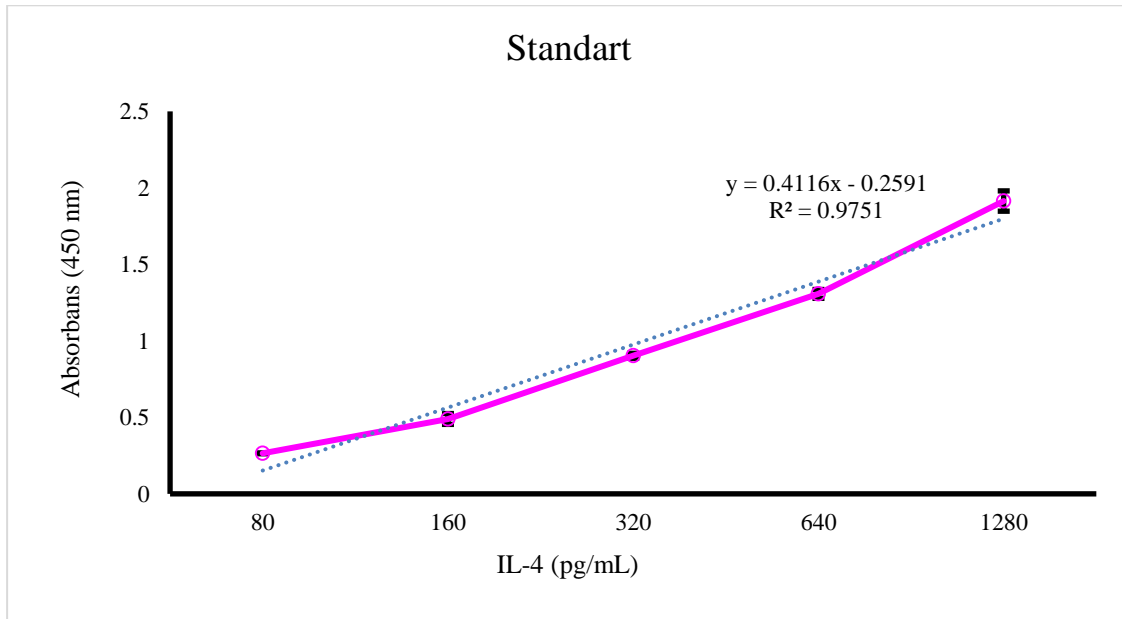
Çizelge 4.23'te yer alan verilere göre THP-1 makrofaj hücrelerinin maya izolatları ile uyarımı sonucunda en yüksek düzeyde TNF- α oluşumu PeF kodlu izolatta görülmüş olup negatif kontrol ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). C1, BY1-1 ve M2 kodlu maya izolatlarıyla uyarılan hücrelerin TNF- α seviyeleri negatif

kontrol değerinden yüksek olup aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Bi1, Bi5, Bi7, E1, Ch1, PeA2, PeC ve PeA1 kodlu maya izolatlarıyla uyarılan hücrelerin TNF- α düzeyi negatif kontrolün değerinden yüksek olup aralarındaki bu fark anlamsızdır ($p > 0.05$). PeF, C1, BY1-1 ve M2 kodlu izolatların makrofajlar tarafından TNF- α sitokini salınımına neden olduğu belirlenmiştir.

Yapılan tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile makrofajlardan TNF- α salınım düzeyi bakımından maya izolatları kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bu test sonucuna göre maya izolatları arasında farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Tukey testi sonuçları Çizelge 4.25'te verilmiştir.

TNF- α ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi üzerine yapılan bir çalışmada *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un oral preparatının TNF- α ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyardığı tespit edilmiştir [102]. *Lactobacillus reuteri* ve *Lactobacillus brevis*'in oral yolla alımının TNF- α , IL-2 ve/veya IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerinin üretimini arttırdığı belirlenmiştir [103]. Probiyotiklerin TNF- α ve IFN- γ sekresyonunu azalttığı ancak IL-10 ve TGF- β sekresyonunu arttırdığı bilinmektedir [104]. TNF- α 'nın makrofajlar tarafından aktif fagositoz veya lipopolisakkarit aktivasyonunu takiben üretildiği bilinmektedir [105,106].

4.8.2. IL-4 Salınımı



Şekil 4.10. IL-4 ELISA kiti standart eğrisi.

Negatif kontrolün her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri Çizelge 4.20’de birlikte verilmiştir. p değerinin hesaplanmasında öncelikle hesaplanmış olan F_{tablo} ve F_{hesap} değerleri karşılaştırılarak t-Test farklı varyanslar varsayarak iki örnek veya t-Test eşit varyanslar varsayarak iki örnek şeklinde analiz edilmiştir.

Çizelge 4.20. Negatif kontrolün IL-4 salınımı bakımından her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri ve izolatların varyans değerleri.

	Bi1	Bi5	Bi7	C1	E1	Ch1	PeA2	PeF	BY1-1	PeC	PeA1	M2
Varyans	0,0068	0,00535	0,17898	0,07943	0,01431	0,0111	0,07959	0,14503	0,03678	0,04419	0,0168	0,22683
p	0,29725	0,02025	0,68136	0,68684	0,0832	0,03144	0,5267	0,41273	0,94532	0,50262	0,77754	0,29655

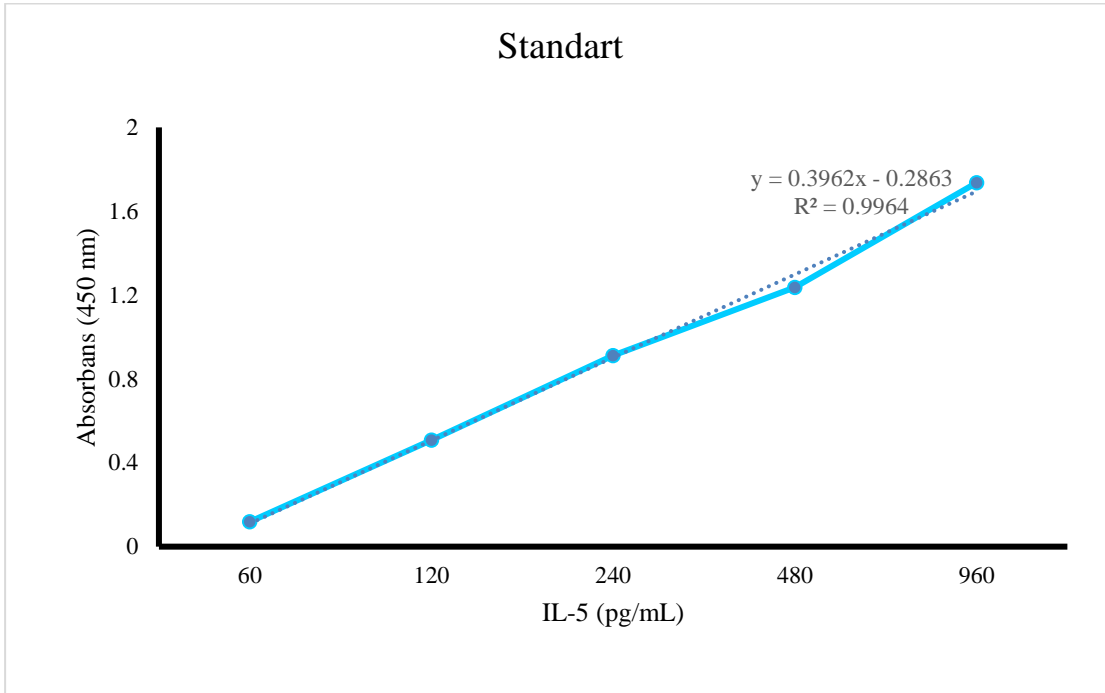
Çizelge 4.23’te yer alan verilere göre THP-1 makrofaj hücrelerinin maya izolatları ile uyarımı sonucunda en yüksek düzeyde IL-4 salınımı M2 kodlu izolatta görülmüştür fakat negatif kontrol ile karşılaştırılmaları sonucunda aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülmüştür ($p>0.05$). Sadece Bi5 ve Ch1 kodlu izolatların negatif kontrole kıyasla IL-4 salınımı üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ve negatif kontrol değerinden düşüktür ($p<0.05$). PeF, BY1-1, PeC ve M2 kodlu maya izolatlarıyla uyarılan THP-1 makrofaj hücrelerinin IL-4 düzeyi negatif kontrolden yüksek olarak ölçülmüştür fakat aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0.05$). Bi1, Bi7, C1, E1, PeA2 ve PeA1 kodlu maya izolatlarıyla uyarılan hücrelerin IL-4 düzeyi negatif kontrol değerinden düşüktür fakat aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). Bi5 ve Ch1 kodlu maya izolatlarıyla uyarılan hücrelerin IL-4 seviyesi negatif kontrol değerinden düşük olup bu izolatlar makrofajlardan IL-4 salınımını azaltmışlardır.

Yapılan tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile makrofajlardan IL-4 salınım düzeyi bakımından maya izolatları kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda maya izolatları arasında önemli farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

IL-4, LPS ile indüklenen proinflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe etmektedir [72]. IL-4’ün aktive edilmiş monositler tarafından TNF- α salınımını inhibe ettiği belirtilmektedir [107]. Aynı zamanda makrofaj sitotoksik aktivitesini, parazit öldürme işlevini ve makrofaj kaynaklı NO üretimini baskıladığı bilinmektedir [72,108]. Fareler

üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda IL-4 uygulamasının *Pseudomonas aeruginosa* 'nın akciğer dokusundan temizlenmesini arttığı görülmüştür [109]. IL-4'ün daha şiddetli sistemik enfeksiyona yol açarak *Staphylococcus aureus* enfeksiyonuna immün cevapta olumsuz bir etkiye neden olduğu ifade edilmektedir [110]. Hayvan modelleri kullanılarak yapılan bir çalışmada maya kaynaklı bir glukanın, fagositik aktivitenin önemli ölçüde uyarılmasına ayrıca IL-4 ve TNF- α 'nın salınımında artışa neden olduğu belirlenmiştir [111].

4.8.3. IL-5 Salınımı



Şekil 4.11. IL-5 ELISA kiti standart eğrisi.

Maya izolatlarıyla uyarılan THP-1 makrofaj hücrelerinin ortalama IL-5 düzeyleri % olarak Çizelge 4.23'te verilmiştir. Negatif kontrolün her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri Çizelge 4.21 'de birlikte verilmiştir. p değerinin hesaplanmasında öncelikle hesaplanmış olan F_{tablo} ve F_{hesap} değerleri karşılaştırılarak t-Test farklı varyanslar varsayarak iki örnek veya t-Test eşit varyanslar varsayarak iki örnek şeklinde analiz edilmiştir.

Çizelge 4.21. Negatif kontrolün IL-5 salınımı bakımından her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri ve izolatların varyans değerleri.

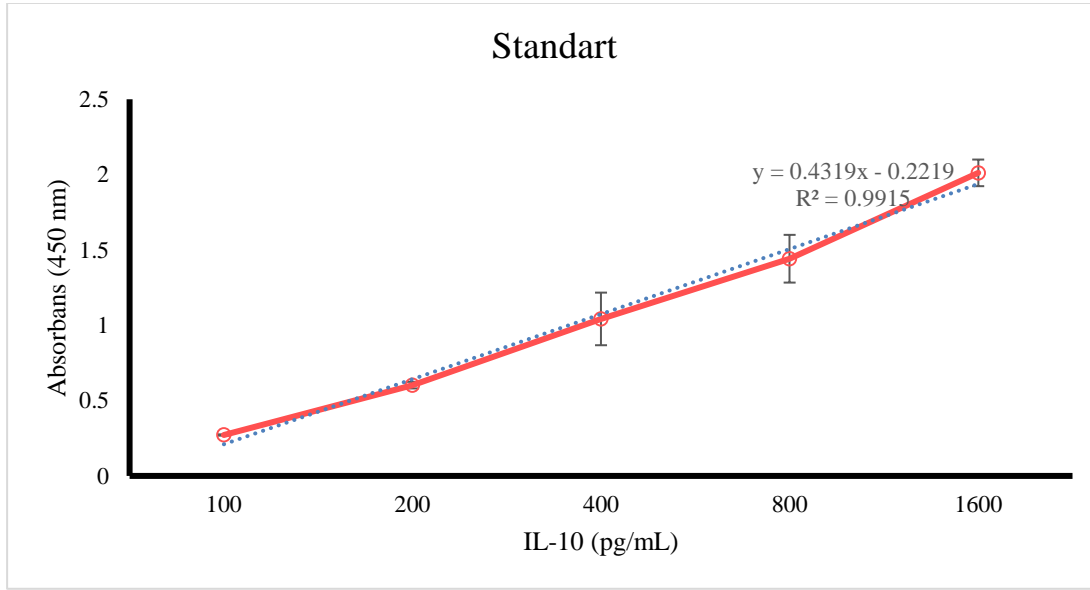
	Bi1	Bi5	Bi7	C1	E1	Ch1	PeA2	PeF	BY1-1	PeC	PeA1	M2
Varyans	0,001174	0,01155	0,001089	0,00994	0,009137	0,001229	0,003389	0,014705	0,007061	0,018744	0,006249	0,003638
p	0,33133	0,049169	0,03044	0,04139	0,814421	0,014068	0,048761	0,058976	0,146772	0,181114	0,028399	0,773848

Çizelge 4.23'te yer alan verilere göre THP-1 makrofaj hücrelerinin maya izolatları ile uyarımı sonucunda en yüksek düzeyde IL-5 salınımı C1 kodlu izolatta görülmüş olup negatif kontrolden farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bi5, Bi7, Ch1, PeA2 ve PeA1 kodlu maya izolatlarıyla uyarılan hücrelerin IL-5 salınım seviyeleri negatif kontrolden düşük olup negatif kontrol ile farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bi1, E1, PeF kodlu maya izolatlarıyla uyarılan hücrelerin IL-5 düzeyleri negatif kontrol değerinden yüksek bulunmuştur fakat negatif kontrol ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir ($p > 0.05$). BY1-1, PeC ve M2 kodlu maya izolatlarıyla uyarılan hücrelerin IL-5 seviyesi negatif kontrolden düşük olup aralarındaki bu fark anlamsızdır ($p > 0.05$). Buna göre C1 kodlu izolat makrofajlardan IL-5 salınımını artırırken; Bi5, Bi7, Ch1, PeA2 ve PeA1 kodlu izolatlar azaltmaktadır.

Yapılan tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile makrofajlardan IL-5 salınım düzeyi bakımından maya izolatları kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda maya izolatlarının arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Tukey testi sonuçları Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Alerjik rinit hastalığında IL-4 ve IL-5 sitokinlerinin yüksek oranda ortaya çıktığı bildirilmektedir [112,113]. Th2 hücresi sitokinlerinden olan IL-5 eozinofil olgunlaşması, farklılaşması ve sağkalımında önemli bir rol üstlenmektedir [114]. IL-4, IL-5 ve IL-13 parazitlerin temizlenmesine katkıda bulunarak olumlu bir rol üstlenirken astım ve alerjide olduğu gibi uygunsuz bir şekilde açığa çıkmaları halinde hastalık durumunu geliştirebilecekleri belirtilmiştir [114–116].

4.8.4. IL-10 Salınımı



Şekil 4.12. IL-10 ELISA kiti standart eğrisi.

Maya izolatlarıyla uyarılan THP-1 makrofaj hücrelerinin ortalama IL-10 düzeyleri % olarak Çizelge 4.23'te verilmiştir. Negatif kontrolün her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri Çizelge 4.22'de birlikte verilmiştir. p değerinin hesaplanmasında öncelikle hesaplanmış olan F_{tablo} ve F_{hesap} değerleri karşılaştırılarak t-Test farklı varyanslar varsayarak iki örnek veya t-Test eşit varyanslar varsayarak iki örnek şeklinde analiz edilmiştir.

Çizelge 4.22. Negatif kontrolün IL-10 salınımı bakımından her bir maya izolatıyla ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda hesaplanan iki uçlu p değerleri ve izolatların varyans değerleri.

	Bi1	Bi5	Bi7	C1	E1	Ch1	PeA2	PeF	BY1-1	PeC	PeA1	M2
Varyans	0,01613	0,0106	0,00165	0,0008	0,01483	0,00621	0,00021	0,00715	0,01189	0,00206	0,02767	0,01944
p	0,86042	0,05138	0,03313	0,02081	0,42468	0,98137	0,15101	0,01445	0,02133	0,00955	0,04231	0,02373

Çizelge 4.23'te yer alan verilere göre THP-1 makrofaj hücrelerinin maya izolatları ile uyarımı sonucunda en yüksek düzeyde IL-10 salınımı M2 kodlu izolatta görülmüş olup negatif kontrol ile farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bi7, C1, PeF, BY1-1, PeC ve PeA1 kodlu maya izolatlarının hücrelerden IL-10 salınım seviyeleri negatif kontrol değerinden yüksek olup negatif kontrol ile farkları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Bi1, Bi5, E1, Ch1 ve PeA2 kodlu maya izolatlarının hücrelerden IL-

10 salınım seviyeleri negatif kontrolden yüksek olmasına karşın negatif kontrolden farkları istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0.05$). M2, Bi7, C1, PeF, BY1-1, PeC ve PeA1 kodlu izolatların makrofaj hücrelerinden IL-10 salınımını arttırdığı belirlenmiştir.

Yapılan tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile makrofajlardan IL-10 salınım düzeyi bakımından maya izolatları kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda maya izolatları arasındaki önemli farklılık olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Tukey testi sonuçları Çizelge 4.25'te verilmiştir.

IL-10, TNF- α gibi inflamasyon mediyatörlerini inhibe etmektedir ve Gram-negatif sepsiste konakçıyı organ yetmezliği ve ölümden korumada önemli bir rol oynamaktadır [89]. Gackowska ve ark. [117] periferik kan mononükleer hücreleri model sistemi kullanarak LAB suşları kompozisyonunun sitokin sentezi, proliferasyon gibi hücrel tepkilere etkisini test etmişlerdir. LAB suşlarının pro ya da anti inflamatuvar potansiyellerinin kompozisyonlarına kısmen bağlı olduğunu, kullandıkları üç LAB suşunun da tek başlarına veya birlikte kullanıldıklarında IL-10 ve TNF- α 'yı güçlü bir şekilde indüklediklerini göstermişlerdir. LAB suşlarının kompozisyonunun, IL-10 ekspresyonu ile proinflamatuvar reaksiyonların aşağı regülasyonu; TNF- α ekspresyonuyla ise bakteriyel ve viral patojenlerin yok edilmesinde gerekli savunma mekanizmaları için hücrel aktivitelerin artışında kritik faktör olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca proinflamatuvar sitokinlerin yukarı regülasyonunun probiyotikler için muhakkak isetenen bir nitelik olmadığını ifade etmişlerdir.

Çizelge 4.23. Maya izolatlarının THP-1 makrofaj hücreleriyle etkileşimi sonucunda açığa çıkan % sitokin miktarı.

Kod	TNF-α (%)	IL-4 (%)	IL-5 (%)	IL-10 (%)
Neg. Kon.	100	100	100	100
Bi1	110.7656	93.4486	104.8675	101.2991
Bi5	101.0526	80.2871	83.1869	116.0866
Bi7	100.1627	92.1240	76.5408	114.5389
C1	130.8038	94.8711	117.1205	116.2710
E1	125.7512	85.3573	101.4200	106.0626
Ch1	103.3397	80.4959	78.2023	100.1203
PeA2	101.3780	91.7520	85.0388	107.8589
PeF	140.4976	115.4323	116.9375	121.4114

Çizelge 4.24. Maya izolatlarının THP-1 makrofaj hücreleriyle etkileşimi sonucunda açığa çıkan % sitokin miktarı (devam).

BY1-1	109.9426	100.6330	90.4553	122.3416
PeC	112.4689	106.9233	88.6693	123.7049
PeA1	100.0766	97.9902	82.6380	128.6528
M2	139.2823	125.8923	98.5214	131.0666

Neg. Kon: Negatif kontrol. Hücre sayısı ile sitokin cevabı optimize edilmemiştir.

Çizelge 4.25. Maya izolatlarının THP-1 makrofaj hücrelerinden sitokin salınım düzeylerine ilişkin ortalama değerlerinin Tukey testi sonuçları.

Kod	TNF-α	IL-5	IL-10
C1	bcd	f	abcd
E1	abcd	cdef	abc
Bi1	ab	def	ab
Bi5	a	abc	abcd
Bi7	a	a	abcd
Ch1	a	a	a
PeA2	a	abc	abcd
PeF	d	ef	abcd
BY1-1	ab	abcd	abcd
PeC	abc	abcd	bcd
PeA1	a	ab	cd
M2	cd	bcde	d

Farklı harf alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$).

5. YORUM

Tez kapsamında Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan buğday unları kullanılarak hazırlanan ekşi hamurlardan endemik veya doğal suşlardan oluşan izolatların elde edilmesi, ayrıca uygun *S. cerevisiae* suşlarının ekmek yapımında kullanılmak üzere önerilebilmesi hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasıyla elde edilen ekşi hamur kültürlerinin ülkemiz fırıncılık sektöründe ekmek üretiminde kullanılmasıyla yerli maya kullanımının sağlanması ve ayrıca elde edilecek endojen suşların ülkemiz kültür koleksiyonlarına katılması amaçlanmıştır. Diğer taraftan bu mayaların sağlık yönünden etkilerinin ortaya konması da hedeflenmiştir.

1 adet hazır olarak temin edilen ekşi hamur olmak üzere Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden elde edilen unlarla hazırlanan toplam 7 adet ekşi hamur örneğinden maya izolasyonu yapılmıştır. 6 farklı ekşi hamur örneğinden toplamda 12 adet maya izole edilmiştir. İzolatlar MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. Buna göre 10 adet izolat *S. cerevisiae* olarak tanımlanırken 1 adet izolat *Pichia fermentans*, 1 adet izolat *Wickerhamomyces anomalus* olarak tanımlanmıştır. Sekans analizi ile 6 adet izolataın *Saccharomyces cerevisiae* olduğu doğrulanmıştır fakat MALDI-TOF MS tanımlama sonucuna göre *Saccharomyces cerevisiae* olduğu belirlenen 1 adet izolataın (BY1-1) doğrulaması kirli okuma sebebiyle yapılamamıştır. MALDI-TOF MS ile güvenilir tanımlama sınırının altında *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanan 3 adet izolat (Bi1, Bi5, Bi7) sekans analizi ile *Saccharomyces uvarum*/*Saccharomyces bayanus* olarak tanımlanmıştır.

Ek olarak mayaların bazı özelliklerinin ortaya konması amacıyla yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilme ve 37°C'de gelişebilme özellikleri incelenmiştir. Buna göre sadece E1 kodlu izolat bir *S. cerevisiae* izolataı olarak yüksek şeker konsantrasyonunda gelişerek şekeri tolere edebilmiştir. *Saccharomyces bayanus* türü mayaların 37°C'de gelişme göstermediği bilinmektedir [94]. Buna göre sadece Bi1 kodlu izolat 37°C'de GPY broth'da gelişme gösterememiş olup *S. bayanus* türü olabileceği düşünülmektedir.

Tüm izolatların % 2-3-4-5 (w/v) tuz konsantrasyonunda gelişebildiği saptanmıştır. Maya izolatlarının tuza dirençli olmalarının geleneksel ekmek üretiminde olduğu kadar tuz oranı daha yüksek formülasyonlarda da kullanılabilirlikleri açısından avantajlı olduğu

düşünülmektedir. Bi5, PeF, C1 ve Bi7 kodlu izolatların glukozu glukoz fermantasyonu besiyerinde fermente etme hızları diğer izolatlara göre yüksek bulunmuştur. Şeker fermantasyonu besiyerinde Bi1 ve Bi5 kodlu izolatlar glukozu 24 saat içinde tamamen fermente ederken C1, E1 ve M2 kodlu izolatlar 24 saat içerisindeki glukoz fermantasyonu oranlarıyla diğer *S. cerevisiae* izolatları arasında öne çıkmıştır. PeF kodlu izolat şeker fermantasyonu besiyerinde 24 saatin sonunda Durham tüpünün %15'inde gaz oluşturmuştur. Bi1, Bi5, Bi7 kodlu izolatlar fruktozu 24 saat içerisinde fermente ederek diğer izolatlardan fruktoz fermantasyonu kabiliyeti açısından üstün bulunmuşlardır. Ch1, Bi1, Bi5, PeF ve PeA2 kodlu izolatların sakaroz fermantasyonu hızı diğer izolatlardan yüksek bulunmuştur. Ekmek bileşimi açısından ve ticari *S. cerevisiae* suşuyla yapılan karşılaştırmalara göre ekmeğin üretiminde kullanılacak olan mayanın glukoz ve sakarozu hızlı bir şekilde fermente edebiliyor olması önemlidir. Bu bağlamda glukoz fermantasyonu kabiliyeti açısından *S. cerevisiae* izolatları arasından C1, E1 ve M2 kodlu izolatlar; sakaroz fermantasyonu kabiliyeti açısından ise Ch1, PeF ve PeA2 kodlu izolatlar öne çıkmaktadır. Bi1, Bi5 ve Bi7 kodlu *Saccharomyces uvarum*/*Saccharomyces bayanus* izolatlarının yüksek oranda şeker fermantasyonu kabiliyetine sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm maya izolatlarının düşük pH değerlerinde (2.5-3.5-4.5-6.57) gelişebildiği belirlenmiştir. İzolatların düşük pH değerlerini tolere edebilmesi temel alınarak ekşi hamurda mayalarla birlikte bulunan laktik asit bakterilerinden ve bu bakteriler tarafından üretilen metabolitlerden izolatların olumsuz etkilenmeyeceği öngörülmektedir. Maya izolatlarının optik yoğunluğa dayalı gelişme hızları ölçümlerinde *S. cerevisiae* izolatları arasından 24 saatin sonunda en yüksek sayıya M2 ve PeF kodlu izolatlar ulaşarak diğer *S. cerevisiae* izolatlarından daha hızlı gelişme göstermişlerdir. *S. cerevisiae* suşu olan izolatlarla ticari *S. cerevisiae* suşu kıyaslandığında ticari suş diğer tüm izolatlardan hızlı gelişme göstererek en yüksek sayıya ulaşmıştır. *Saccharomyces uvarum*/*Saccharomyces bayanus* türü izolatlar arasından 24. saatin sonunda en yüksek sayıya Bi5 kodlu izolat ulaşarak diğer *Saccharomyces uvarum*/*Saccharomyces bayanus* türü izolatlardan hızlı gelişme göstermiştir. Ekşi hamur üretiminde işlem süresi yaklaşık 24 saat olup bu süre içerisinde hızlı gelişme gösteren suşların starter olarak kullanımının uygun olacağı, bu bağlamda M2 ve PeF kodlu *S. cerevisiae* suşlarının kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir. Tüm *Saccharomyces* cinsi izolatlar (Ch1, E1, M2, BY1-1, PeF, PeA2, Bi1, Bi5, Bi7, C1) K1 ve K2 killer toksinlerine duyarlılık göstermiştir. Hiçbir maya izolatı killer aktivite göstermemiştir. Bu çalışmadaki *S. cerevisiae* izolatlarının killer özellikte olmamasının ekşi hamur florasındaki diğer maya türlerini olumsuz

etkileyecek şekilde killer toksin üretememeleri açısından üretimde starter olarak karışık kültür kullanılması halinde olumlu olacağı düşünülmektedir, fakat saf kültür kullanılması halinde mayaların killer özelliğe sahip olmaları avantajlı bir durum oluşturmaktadır. Hiçbir maya izolatu proteolitik aktivite göstermemekte olup ekmek yapımında aşırı gluten degradasyonu olmaması açısından bu durumun ekmek yapısı üzerinde olumlu bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. Maya izolatlarının ekmekçilik teknolojisi açısından önemli özelliklerini araştırmak için uygulanan testlerin sonuçlarına göre PeF ve M2 kodlu izolatların ekmek üretiminde starter kültür olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bu çalışmada kullanılan *Saccharomyces uvarum*/*Saccharomyces bayanus* suşlarının fermantasyon kabiliyetleri yüksek olup ekmek yapımında starter kültür olarak kullanılmalarının ekmek yapısı ve aroması üzerine etkilerini ortaya koyacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

MTT testi ile bazı maya izolatlarının Caco-2 ve THP-1 hücrelerine toksisitesi incelenmiştir. Buna göre BY1-1, E1, M2, PeA2, PeF ve Ch1 kodlu *S. cerevisiae* türü izolatların THP-1 ve Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Laktik asit bakterisi suşlarının ve metabolitlerinin kanser hücre hatlarına sitotoksik etkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [100],[101]. Ekşi hamur florasında bir arada bulunan maya ve laktik asit bakterisi suşlarının Caco-2 hücreleri üzerine birlikte etkilerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

ELISA metodu kullanılarak maya izolatlarının makrofajlarla etkileşimi sonrasında TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 sitokinlerinin salınım seviyeleri ölçülmüştür. Buna göre PeF, C1, BY1-1 ve M2 kodlu izolatların makrofajlardan TNF- α salınımına neden olduğu belirlenmiştir. Çeşitli *Lactobacillus* türlerinin oral yolla alımının TNF- α düzeyini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [102],[103]. Bi5 ve Ch1 kodlu izolatlar makrofajlardan IL-4 salınımını azaltmışlardır. Yapılan tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA), makrofajlardan IL-4 salınım düzeyi bakımından maya izolatları arasında önemli bir fark olmadığını ortaya koymuştur. IL-4'ün makrofaj sitotoksik aktivitesini, parazit öldürme işlevini ve makrofaj kaynaklı NO üretimini baskılama özelliğine sahip olduğu belirtilmektedir [72,108]. C1 kodlu izolatu makrofajlardan IL-5 salınımını artırırken; Bi5, Bi7, Ch1, PeA2 ve PeA1 kodlu izolatların azalttığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalara göre IL-4 ve IL-5 hem parazitlerin temizlenmesine katkıda bulunarak olumlu bir rol üstlenmekte, hem de astım ve alerji durumlarındaki gibi uygunsuz bir şekilde açığa

çıkmaları halinde hastalık durumunu geliştirebilmektedirler [114–116]. M2, Bi7, C1, PeF, BY1-1, PeC ve PeA1 kodlu izolatların makrofajlardan IL-10 salınımını arttırdığı saptanmıştır. Periferik kan mononükleer hücreleri model sistemi kullanarak yapılan bir çalışmada LAB suşlarının pro ya da anti inflamatuvar potansiyellerinin kompozisyonları ile ilişkili olduğu, kullanılan üç LAB suşunun da tek başlarına veya birlikte kullanımlarında IL-10 ve TNF- α 'yı güçlü bir şekilde indüklediği belirlenmiştir [117]. Bu çalışmada kullanılan maya izolatlarının makrofajlardan TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 sitokinlerinin salınımı üzerindeki etkileri ortaya koyularak LAB'lar gibi mayaların da immün sistem üzerinde etkileri olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulguların mayalar ve makrofajların etkileşimleriyle proinflamatuvar ve anti inflamatuvar tepkilerin anlaşılması hususunda literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] D. Göçmen, Ekşi Hamur ve Laktik Starter Kullanımının Aroma Oluşumuna Etkisi, GIDA. 26 (2001) 13–16.
- [2] A. Elgün, Z. Ertugay, Tahıl İşleme Teknolojisi, 2nd ed., Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 1992.
- [3] Resmi Gazete Tarihi: 04.01.2012 Resmi Gazete Sayısı: 28163 Türk Gıda Kodeksi Ekmek ve Ekmek Çeşitleri Tebliği, (2012).
- [4] V. Lotong, E. Chambers IV, D.H. Chambers, Determination of The Sensory Attributes of Wheat Sourdough Bread, J. Sens. Stud. 15 (2000) 309–326.
- [5] G. Ottogalli, A. Galli, R. Foschino, Italian Bakery Products Obtained with Sourdough: Characterization of the Typical Microflora, Adv Food Sci. 18 (1996) 131–144.
- [6] A. Corsetti, L. Settanni, Lactobacilli in Sourdough Fermentation, Food Res. Int. 40 (2007) 539–558.
- [7] INSOR (Istituto Nazionale di Sociologia Rurale), Atlante Dei Prodotti Tipici: il pane, Roma, 2000.
- [8] R.F. Vogel, M. Pavlovic, M.A. Ehrmann, A. Wiezer, H. Liesegang, S. Offschanka, S. Voget, A. Angelov, G. Böcker, W. Liebl, Genomic Analysis Reveals Lactobacillus sanfranciscensis as Stable Element in Traditional Sourdoughs, Microb. Cell Fact. 10 (2011).
- [9] P. Decock, S. Cappelle, Bread Technology and Sourdough Technology, Trends Food Sci. Technol. 16 (2005) 113–120.
- [10] L. De Vuyst, S. Van Kerrebroeck, H. Harth, G. Huys, H.M. Daniel, S. Weckx, Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform?, Food Microbiol. 37 (2014) 11–29.
- [11] I. Hidalgo, T. Raub, R. Borchardt, Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model Permeability, Gastroenterology. 96 (1989) 736–749.

- [12] H. Satsu, T. Yokoyama, N. Ogawa, Y. Fujiwara-Hatano, M. Shimizu, The Changes In The Neuronal PC12 and The Intestinal Epithelial Caco-2 Cells During The Coculture. The Functional Analysis Using An In Vitro Coculture System, *Cytotechnology*. 35 (2001) 73–79.
- [13] S. Tsuchiya, Y. Kobayashi, K. Tada, T. Konno, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1), *Int. J. Cancer*. 26 (2007) 171–176.
- [14] M. Daigneault, J.A. Preston, H.M. Marriott, M.K.B. Whyte, D.H. Dockrell, The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages, *PLoS One*. 5 (2010).
- [15] M.P. Penfield, A.M. Campbell, Yeast Breads, in: *Exp. Food Sci.*, 2013: pp. 418–441.
- [16] V. Giannone, C. Longo, A. Damigella, D. Raspagliesi, A. Spina, M. Palumbo, Technological Properties of Bakers' Yeasts in Durum Wheat Semolina Dough, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37 (2010) 371–379.
- [17] I. Banu, I. Aprodu, Studies Concerning The Use of *Lactobacillus helveticus* and *Kluyveromyces marxianus* for Rye Sourdough Fermentation, *Eur. Food Res. Technol.* 234 (2012) 769–777.
- [18] Y.Y. Linko, P. Javanainen, S. Linko, *Biotechnology of Bread Baking*, *Trends Food Sci. Technol.* 8 (1997) 339–344.
- [19] Ankara Ticaret Borsası, Ekmek, (n.d.) 1–35. <http://eski.ankaratb.tobb.org.tr/pages.aspx?pageId=248e54ea-60bb-42bc-b67d-3262f4549793> (Erişim tarihi: 14 Mayıs 2019).
- [20] S. P. Cauvain, L. S. Young, *The Chorleywood Bread Process*, 2006.
- [21] M. Arıcı, *Fermentasyon teknolojisi- Bitkisel Fermentasyonlar*, İstanbul, 2017. <https://docplayer.biz.tr/68327141-Fermentasyon-teknolojisi-bitkisel-fermentasyonlar-prof-dr-muhammet-arici.html>.
- [22] Anonim, *Fermentasyon Teknolojisi*, (2017) 1–9. <http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/49153/42145/giris.pdf> (Erişim tarihi: 14 Mayıs 2019).

- [23] M. H. Boyacıoğlu, Effect of Salt, Shortening and Yeast Level on Bread. Fundamentals of Flour Testing and Baking, Fargo, **1991**.
- [24] O. Güneli, Ticari Yaş Mayaların Raf Ömürleri Süresince Performanslarının Değişimi, Namın Kemal Üniversitesi, **2010**.
- [25] M. H. Boyacıoğlu, No Title, Gıda. (**1999**) 36–40.
- [26] M. G. Ganzle, M. Ehmann, W. P. Hammes, Sourdough Fermentation, Appl. Environ. Microbiol. 64 (**1998**) 2616–2623.
- [27] P. Catzeddu, E. Mura, E. Parente, M. Sanna, G.A. Farris, Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Sourdough Breads Produced in Sardinia (Italy) and Multivariate Statistical Analyses of Results, Syst. Appl. Microbiol. 29 (**2006**) 138–144.
- [28] S. Barber, M. J. Torner, M. A. Martínez-Anaya, C. B. de Barber, Microflora of the Sour dough of Wheat Flour Bread IX. Biochemical Characteristics and Baking Performance of Wheat Doughs Elaborated with Mixtures of Pure Microorganisms, Z. Lebensm. Unters. Forsch. (**1989**).
- [29] C. S. Pederson, Microbiology of Food Fermentation, 2nd ed., The Avi Pub. Comp., connecticut, **1979**.
- [30] W. Siebel, J.M. Brummer, Sourdough Process for Bread in Germany, Cereal Foods World. 36 (**1991**) 299–304.
- [31] F. Bakırcı, E. Köse, Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanması, Akad. Gıda. 15 (**2017**) 149–154.
- [32] G. Böcker, P. Stolz, W.P. Hammes, Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der sauerteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*, Getreide, Mehl Und Brot. 49 (**1995**) 370–374.
- [33] H. Stephan, H. Neumann, Technik der Roggen- Sauerteigführung, in: G. Spicher, H. Stephan (Eds.), Handb. Sauerteig Biol. Biochem. Technol., 5th ed., **1999**: pp. 161– 245.
- [34] H. Stephan, H. Neumann, Technik der Weizenvorteig- und Weizensauerteigführung, in: G. Spicher, H. Stephan (Eds.), Handb. Sauerteig Biol. Biochem. Technol., 5th ed., **1999**: pp. 247–275.

- [35] L. De Vuyst, P. Neysens, The Sourdough Microflora: Biodiversity and Metabolic Interactions, *Trends Food Sci. Technol.* 16 (2005) 43–56.
- [36] K.E. Gerçekaslan, H.G. Kotancılar, G. Kaban, M. Murat, Vakfikebir Ekmek Hamurundan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanısı, *Akad. Gıda.* 10 (2012) 47–50.
- [37] P. Stolz, Biological Fundamentals of Yeast and Lactobacilli Fermentation in Bread Dough, in: *Handb. Dough Ferment.*, 2003.
- [38] G. Huys, H.-M. Daniel, L. De Vuyst, Handbook on Sourdough Biotechnology, in: M. Gobetti, M. Ganzle (Eds.), *Handb. Sourdough Biotechnol.*, 2013: pp. 1–298.
- [39] M. Gobetti, A. Corsetti, J. Rossi, The sourdough microflora. Interactions Between Lactic Acid Bacteria and Yeasts: Metabolism of Amino Acids, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10 (1994) 275–279.
- [40] M. Gobetti, A. Corsetti, J. Rossi, The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41 (1994) 456–460.
- [41] M. Gobetti, The sourdough microflora: Interactions of Lactic Acid Bacteria and Yeasts, *Trends Food Sci. Technol.* 9 (1998) 267–274. https://ac.els-cdn.com/S0924224498000533/1-s2.0-S0924224498000533-main.pdf?_tid=374d7bc5-cad9-4517-bef2-4035e077124d&acdnat=1538738100_97c43ae200795fcc48d514b679af2320.
- [42] J. F. R. Lues, B.C. Vilijoen, M. Miller, B.A. Prior, Interaction of Non-culture Microbial Flora on Dough Fermentation, *Food Microbiol.* 10 (1993) 205–213.
- [43] Å. Hansen, B. Hansen, Flavour of Sourdough Wheat Bread Crumb, *Eur. Food Res. Technol.* 202 (1996) 244–249.
- [44] S. Yılmaz, S. Duyan, C. Artuk, H. Diktaş, Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları, *TAF Prev. Med. Bull.* 13 (2014) 421–426.
- [45] A. Wieser, L. Schneider, J. Jung, S. Scuhbert, MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics — identification of microorganisms and beyond (mini review), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 965–974.
- [46] E. Güneş Altuntaş, F. Özçelik, Killer Özellikli Mayaların Etki Mekanizmaları ve

- Endüstride Yol Açtıkları Sorunlar, GIDA. 32 (2007) 205–212.
- [47] F. Özçelik, U. Türkmen, S. Ateş, Farklı Bölgelerden İzole Edilen Şarap Mayalarının Killer Özelliklerinin Belirlenmesi, Tr. J. Biol. 20 (1996) 241–249.
- [48] A. Salek, R. Schnettler, U. Zimmermann, Stably Inherited Killer Activity in Industrial Yeast Strains Obtained by Electrotransformation, FEMS Microbiol. Lett. 96 (1992) 103–110.
- [49] P. Pfeiffer, F. Radler, Comparison of The Killer Toxin of Type K2, Arch. Microbiol. 137 (1984) 357–361.
- [50] K. Shimizu, T. Adachi, K. Kitano, T. Shimazaki, A. Totsuka, S. Hara, H.H. Dittrich, Killer Properties of Wine Yeasts and Characterization of Killer Wine Yeasts, J. Ferment. Technol. 83 (1985) 421–426.
- [51] H. J. J. Vuuren, B.D. Wingfield, Killer Yeasts-Cause of Stuck Fermentations in a Wine Cellar, S. Afr. J. Enol. Vitic. 7 (1986) 113–118.
- [52] F. Özçelik, S. Dönmez, Killer Yeasts and The Determination of Killer Characters of Some Yeasts, Doğa. Tr. J. Biol. 17 (1993) 1–4.
- [53] C. Suzuki, K. Yamada, N. Okada, S. Nkkuni, Isolation and Characterization of Halotolerant Killer Yeasts from Fermented Foods, Agric. Biol. Chem. 53 (1989) 2593–2597.
- [54] D. Marquina, C. Peres, F. V. Caldas, J.F. Marques, J.M. Peinado, I. & Spencer-Martins, Characterization of The Yeast Population in Olive Brines, Lett. Appl. Microbiol. 14 (1992) 279–283.
- [55] M. J. Almeida, C.S. Pais, Characterization of The Yeast Population from Traditional Corn and Rye Bread Doughs, Lett. Appl. Microbiol. 23 (1996) 154–158.
- [56] S. Karasu Yalçın, Ş. Şenses Ergül, Z.Y. Özbaş, Moleküler Esaslı Yöntemlerin Gıda Kaynaklı Mayaların Tanımlanmalarında Kullanılmaları, GIDA. 35 (2010) 379–386.
- [57] E. Atil, DNA Dizileme Eğitim Bilgileri, (n.d.) 19. https://www.tarimorman.gov.tr/ABDGM/Belgeler/İDARİ_İŞLER/2014_kasım/2.pdf (Erişim tarihi: 10 Şubat 2020).

- [58] M. Arda, DNA Baz Sıralarının Saptanması, (n.d.). <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EFF2E0CE320E627780> (Erişim tarihi: **10 Şubat 2020**).
- [59] S. Susever, Moleküler Dna Dizi Analiz Yöntemleri, Yakın Doğu Üniversitesi. (n.d.). http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/12_dna_dizi_analizi_yontemleri_98.pdf (Erişim tarihi: **25 Şubat 2020**).
- [60] O. Tokur, A. Aksoy, In Vitro Sitotoksitate Testleri, Harran Üniv Vet Fak Derg. 6 (2017) 112–118.
- [61] T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, J. Immunol. Methods. 65 (1983) 55–63.
- [62] T. L. Riss, R.A. Moravec, Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate The Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-based Cytotoxicity Assays, Assay Drug Dev. Technol. 2 (2004) 51–62.
- [63] D. Biriken Salın, N. Albayrak, S. Yıldız, H. Özenci, Caco-2 Epitel Hücreleri ve THP-1 Makrofaj Hücrelerinin Streptococcus pyogenes ve Escherichia coli'ye Karşı Bakterisidal Etki Ve Nitrik Oksit Yanıtlarının Araştırılması, Mikrobiyol. Bul. 43 (2009) 373–381.
- [64] H. Satsu, Y. Ishimoto, T. Nakano, T. Mochizuki, T. Iwanaga, M. Shimizu, Induction by Activated Macrophage-like THP-1 Cells of Apoptotic and Necrotic Cell Death in Intestinal Epithelial Caco-2 Monolayers via Tumor Necrosis Factor-Alpha, Exp. Cell Res. 312 (2006) 3909–3919.
- [65] H. Bosshart, M. Heinzelmann, THP-1 Cells As a Model For Human Monocytes, Ann. Transl. Med. 4 (2016) 438.
- [66] S. Epelman, K.J. Lavine, G.J. Randolph, Origin and Functions of Tissue Macrophages, Immunity. 41 (2014) 21–35.
- [67] G. Mayer, İmmünoloji- Bölüm On Üç Sitokinler ve İmmünoregülasyon, Çeviri: Yula, Erkan. (2016). <https://www.microbiologybook.org/Turkish-immunol/immunolchapter13turk.htm> (Erişim tarihi: **11 Mayıs 2020**).
- [68] P. Rodriguez, M. Heyman, C. Candalh, M. A. Blaton, C. Bouchaud, Tumour Necrosis Factor- α Induces Morphological and Functional Alterations of Intestinal

- Ht29 cl.19a Cell Monolayers, Cytokine. 7 (1995) 441–448.
- [69] E. A. Green, R. A. Flavell, The Temporal Importance of TNF α Expression In The Development of Diabetes, Immunity. 12 (2000) 459–469.
- [70] N. Parameswaran, S. Patial, Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages, Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 20 (2010) 87–103.
- [71] J. Hou, U. Schindler, W.J. Henzel, T.C. Ho, M. Brasseur, S.L. Mcknight, An Interleukin-4-Induced Transcription Factor : IL-4 Stat, Science (80-.). 265 (1994) 1701–1706.
- [72] S. M. Opal, V.A. DePalo, Impact of Basic Research On Tomorrow’s Medicine Anti-Inflammatory Cytokines *, Chest. 117 (2000) 1162–1172.
- [73] P. Chomarat, J. Banchereau, An Update On Interleukin-4 and Its Receptor (Review), Eur. Cytokine Netw. 8 (1997) 333–344.
- [74] S. Maltby, K. M. McNagny, S. J. Ackerman, J. Du, Y. Mori, H. Iwasaki, K. Akashi, K. Takatsu, M. Rådinger, A. Bossios, J. Lötvall, N. A. Lee, Eosinophilopoiesis, Eosinophils Heal. Dis. (2013) 73–119.
- [75] T. Krakauer, IL-10 Inhibits The Adhesion of Leukocytic Cells to IL-1-Activated Human Endothelial Cells, Immunol. Lett. 45 (1995) 61–65.
- [76] N. Çalışkan, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri TLT114-İmmünolojik Yöntemler, 2020.
- [77] Y. Akça, F. Alkan, A. Özkul, S. Bilge Dağalp, M.T. Karaoğlu, T.Ç. Oğuzoğlu, Enzyme Linked Immunosorbent Assay, (n.d.) 1–19. [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/10197/mod_resource/content/0/12.Hafta 1- ELISA.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/10197/mod_resource/content/0/12.Hafta%201-ELISA.pdf) (Erişim tarihi: 11 Temmuz 2020).
- [78] D. Yarrow, Methods For The Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts, in: The Yeasts, 2008: pp. 77–100.
- [79] Anonim, ATCC medium: 2093 Malt Yeast Extract 50% Glucose Agar (MY50G), (n.d.)1.<https://www.atcc.org/~media/EFFD93AF961644F498398853F48C3BC6.ashx> (Erişim tarihi: 11 Mayıs 2019).
- [80] V. Gürgün, A.K. Halkman, Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara, 1988.

- [81] C. P. Kurtzman, Yeasts In Food, in: T. Boekhout, V. Robert (Eds.), Methods to Identify Yeasts, CRC Press, Germany, **2003**: pp. 69–121.
- [82] M. Psani, P. Kotzekidou, Technological Characteristics of Yeast Strains and Their Potential As Starter Adjuncts In Greek-style Black Olive Fermentation, World J. Microbiol. Biotechnol. 22 (**2006**) 1329–1336.
- [83] W. F. Harrigan, M. E. McCance, Laboratory Methods in Microbiology, London, Academic Press INC., **1966**.
<https://books.google.com/books?id=qPxfAwAAQBAJ&pgis=1>.
- [84] T. Idoui, J. Boudjerda, E. Leghouchi, N.-E. Karam, Naturally Fermented Jijelian Black Olives: Microbiological Characteristics and Isolation of Lactic Acid Bacteria, Grasas y Aceites. 60 (**2009**) 516–520.
- [85] A. Temiz, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, 1st ed., Şafak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, **1994**.
- [86] A. Solmaz Avcıkurt, E. Altun, Oral Antidiyabetik Metforminin Hepatosellüler Kanser Hücreleri Üzerine Etkisi, Cukurova Med. J. 43 (**2018**) 557–561.
- [87] D. A. DeStefano, A. P. Grybauskas, J. L. Sherald, B. Momen, Q. Huang, J. H. Sullivan, Effect of The Growth Regulator Paclobutrazol On Growth of The Bacterial Pathogen Xylella fastidiosa, Arboric. Urban For. 33 (**2007**) 246–252.
- [88] O. Arroyo-Helguera, A. De Las Penas, I. Castaño, Occurence Of Killer Candida glabrata Clinical Isolates, Brazilian J. Microbiol. (**2012**) 880–887.
- [89] S. Niğdelioğlu, Laktik Asit Bakterilerinin Antiproliferatif, Antigenotoksik ve Antiinflamatuvar Etkilerinin Belirlenmesi, Gazi Üniversitesi, **2013**.
- [90] R. Tabak, Geleneksel Yoğurtlardan Starter Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Tanımlaması ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi, **2018**.
- [91] D. J. Erasmus, G. K. Van Der Merwe, H. J. J. Van Vuuren, Genome-wide Expression Analyses: Metabolic Adaptation of Saccharomyces cerevisiae to High Sugar Stress, FEMS Yeast Res. 3 (**2003**) 375–399.
- [92] C. O. Chicester, Advances in Food Research: Volume 12, Academic Press INC., **1963**.
- [93] T. Sato, Y. Tanaka, Studies On The Sugar Tolerance of Bakers' Yeast (II). Relation

- Between Sugar Tolerance and Invertase Activity, *J. Ferment. Technol.* 39 (1961) 718–723.
- [94] Department of Viticulture & Enology University of California, *Saccharomyces bayanus*, (n.d.). <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/saccharomyces-bayanus> (Erişim tarihi: **15 Nisan 2020**).
- [95] Z. Salvadó, F.N. Arroyo-López, J.M. Guillamón, G. Salazar, A. Querol, E. Barrio, Temperature Adaptation Markedly Determines Evolution Within The Genus *Saccharomyces*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 2292–2302.
- [96] M. G. Gänzle, J. Loponen, M. Gobbetti, Proteolysis in Sourdough Fermentations: Mechanisms and Potential For Improved Bread Quality, *Trends Food Sci. Technol.* 19 (2008) 513–521.
- [97] S. Paramithiotis, S. Gioulatos, E. Tsakalidou, G. Kalantzopoulos, Interactions Between *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria In Sourdough, *Process Biochem.* 41 (2006) 2429–2433.
- [98] G. Spicher, W. Nierle, Proteolytic Activity of Sourdough Bacteria*,**, *Appl Microbiol Biotechnol.* 28 (1988) 487–492.
- [99] G. G. Stewart, *Saccharomyces: Brewer's Yeast*, Second Edi, Elsevier, **2014**.
- [100] Y. Aso, H. Akazan, and BLP Study Group, Prophylactic Effect of a *Lactobacillus casei* Preparation on the Recurrence of Superficial Bladder Cancer, *Urol Int.* 49 (1992) 125–129.
- [101] M. Thirabunyanon, P. Boonprasom, P. Niamsup, Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Milks On Antiproliferation of Colon Cancer Cells, *Biotechnol Lett.* 31 (2009) 571–576.
- [102] P. Popova, G. Guencheva, G. Davidkova, A. Bogdanov, E. Pacelli, G. Opalchenova, T. Kutzarova, C. Koychev, Stimulating Effect of DEODAN (An Oral Preparation From *Lactobacillus bulgaricus* " LB51 ") on Monocytes / Macrophages and Host Resistance to Experimental Infections, 15 (1993) 25–37.
- [103] C. B. M. Maassen, C. Van Holten-neelen, F. Balk, J.H. Den Bak-Glashouwer, R.J. Leer, J.D. Laman, W.J.A. Boersma, E. Claassen, Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains, 18 (2000) 2613–2623.

- [104] A. Özden, İnflamatuvar Barsak Hastalığında Probiyotiklerin Yeri, Güncel Gastroenteroloji. 12 (2008) 121–127.
- [105] J. S. Friedland, D. G. Remick, R. Shattock, G. E. Griffin, Secretion of Interleukin-8 Following Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by Human Monocyte Cell Lines, Eur J Immunol. 22 (1992) 1378.
- [106] L. Eckmann, H.C. Jung, C. Schürer-Maly, A. Panja, E. Morzycka-Wroblewska, M.F. Kagnoff, Differential Cytokine Expression by Human Intestinal Epithelial Cell Lines: Regulated Expression of Interleukin 8, Gastroenterology. 105 (1993) 1689–1697.
- [107] A. A. te Velde, R. J. Huijbens, K. Heije, J.E. DeVries, C. G.. Figdor, Interleukin-4 (IL-4) Inhibits Secretion of IL-1 Beta, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-6 by Human Monocytes, Blood. 76 (1990) 1392–1397.
- [108] E. Vannier, L.C. Miller, C.A. Dinarello, Coordinated Antiinflammatory Effects of Interleukin 4: Interleukin 4 Suppresses Interleukin 1 Production But Up-regulates Gene Expression and Synthesis of Interleukin 1 Receptor Antagonist, Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 4076–4080.
- [109] S. Jain-Vora, A. M. Levine, Z. Chroneos, G.F. Ross, W. M. Hull, J. A. Whitsett, Interleukin-4 Enhances Pulmonary Clearance of Pseudomonas aeruginosa, Infect. Immun. 66 (1998) 4229–4236.
- [110] O. Hultgren, M. Kopf, A. Tarkowski, Staphylococcus aureus-induced Septic Arthritis and Septic Death Is Decreased In IL-4-deficient Mice: Role of IL-4 As Promoter For Bacterial Growth, J. Immunol. 160 (1998) 5082–5087.
- [111] V. Vetvicka, A. Vashishta, S. Saraswat-Ohri, J. Vetvickova, Immunological effects of yeast- and mushroom-derived β -glucans, J. Med. Food. 11 (2008) 615–622.
- [112] S. T. Holgate, Review- Innate and Adaptive Immune Responses In Asthma, Nat. Med. 18 (2012) 673–683.
- [113] J. Kim, J. Kim, H. In, M. Joo, Bifidobacterium longum and Lactobacillus plantarum Alleviate House Dust Mite Allergen-induced Allergic Rhinitis by Regulating IL-4 , IL-5 , and IL-10 Expression, FOOD Agric. Immunol. 30 (2019) 581–593.

- [114] G. Caramori, D. Groneberg, K. Ito, P. Casolari, I.M. Adcock, A. Papi, New Drugs Targeting Th2 Lymphocytes In Asthma, *J. Occup. Med. Toxicol.* 3(Suppl 1) (2008) 1–29.
- [115] B. Bosnjak, B. Stelzmueller, K.J. Erb, M.M. Epstein, Review-Treatment of Allergic Asthma : Modulation of Th2 Cells and Their Responses, *Respir. Res.* 12 (2011) 1–17.
- [116] C. Poe, C. Youngblood, K. Hodge, K. Kemp, Treatment of Established TH2 Cells With 4 μ 8c , An Inhibitor of IRE1 α , Blocks IL-5 But Not IL-4 Secretion, *BMC Immunol.* 20 (2019) 1–10.
- [117] L. Gackowska, J. Michalkiewicz, M. Krotkiewski, A. Helmin-Basa, I. Kubiszewska, D. Dzierzanowska, Combined Effect of Different Lactic Acid Bacteria Strains On The Mode of Cytokines Pattern Expression In Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (2006) 13–21.

EKLER

EK 1 – Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

Glukoz Fermantasyonu Besiyeri

% 2 (w/v) glukoz, % 2 (w/v) yeast extract, %0.5 pepton içermektedir. Bileşenler 1 L suda çözülüp 121°C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Şeker Fermantasyonu Besiyeri

Bileşim	g/L
Glikoz	20
Yeast extract	10

Glukoz fermantasyonu, fruktoz fermantasyonu ve sakaroz fermantasyonunun değerlendirilmesi amacıyla sırasıyla şeker olarak D+ glukozmonohidrat, D-fruktoz reinst ve sakaroz kullanılmıştır. 1 L çözelti için 20 gram şeker tartılarak % 1.0 (w/v) yeast extract çözeltisinde çözülmüştür. 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Malt Extract Broth (MEB)

Malt Extract Broth (Merck) besiyeri ekşi hamurdan izole edilen mayaların canlandırılmasında kullanılmıştır. 1L MEB hazırlanması için 17 g besiyeri tartılmıştır. Besiyeri 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Gliserollü Malt Extract Broth (MEB)

Ekşi hamurdan izole edilen saf kolonilerin -70 °C’de saklanması amacıyla hazırlanmıştır. 1L MEB hazırlanması için 17 g besiyeri tartılmıştır. İçerisine aynı hacimde gliserol eklenmiştir. Besiyeri 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Yeast Extract Agar (YEA)

Yeast Extract Agar (Merck) besiyerinden 1 L hazırlamak için 35 gram tartılmıştır. 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Maximum Recovery Diluent

Dilüsyon hazırlanması amacıyla bazı deney aşamalarında Maximum Recovery Diluent (Merck) kullanılmıştır. 1 L hazırlanması için 9.5 gram tartılıp 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Yeast Extract Malt Extract (YM) Broth

Bileşim	g/L
Yeast extract	3
Malt extract	3
Pepton	5
Glukoz	10

1 L damıtık suda çözdürüldükten sonra 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Yeast Extract Malt Extract (YM) Agar

YM Broth besiyeri malzemeleri tartılıp içerisine 15 g agar eklenmiştir ve 1 L damıtık suda çözdürüldükten sonra 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Yeast Extract Peptone Dextrose- Methylene Blue (YEPD-MB) Agar

Bileşim	g/L
Yeast extract	10
Agar	20
Pepton	20
Glukoz	20

İzole edilen mayaların killer aktivitelerinin belirlenmesi ve duyarlılık testlerinin yapılması amacıyla kullanılmıştır. Bileşenler 1 L damıtık suda çözüldükten sonra % 0.003 (w/v) oranında olacak şekilde metilen mavisi ilave edilmiştir. 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Besiyeri pH’ını 4.5’e ayarlamak üzere 0.1 M sitrat-fosfat tamponu kullanılmıştır.

Malt Extract Yeast Extract 50 % Glucose (MY50G) Agar

10 g malt extract, 2.5 g yeast extract, 10 g agar ve 500 g glukoz 500 mL distile suda ısıtılarak çözdürülmüştür. Daha sonra besiyeri kaynar su banyosunda 45 dk tutularak sterilize edilmiştir.

Yeast Extract Peptone Glucose (YPG) Broth

Bileşim	g/L
Yeast extract	10
Glukoz	20
Pepton	20

Bileşenler damıtık su içerisinde çözdürüldükten sonra 1 N HCl ile pH değeri 4.5'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

10%'luk Milk Agar

Bileşim	g/L
Yeast extract	3
Pepton	5
Agar	15

Bileşenler 900 mL damıtık suda çözüldükten sonra 100 mL % 10 'luk rekonstitüe yağsız süt eklenmiştir. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Glucose Pepton Yeast Extract (GPY) Broth

Bileşim	g/L
Glukoz	20
Pepton	10
Yeast extract	5

1 L damıtık suda çözdürüldükten sonra 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Glucose Pepton Yeast Extract (GPY) Agar

40 g glukoz, 5 g pepton, 20 g agar 500 mL demineralize suda çözdürüldükten sonra 500 mL demineralize suda çözdürülmüş 5 g yeast extract çözeltisi ile karıştırlmıştır. 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

EK 2 – Araştırmada Kullanılan Tampon, Boya ve Çözeltiler

Metilen mavisi

Killer aktivite testi için kullanılan metilen mavisi, 1 g toz metilen mavisi 100 mL damıtık suda çözümlenerek hazırlanmıştır.

0.1 M Sitrat-fosfat tampon çözeltisi (pH: 2.6)

Sitrik asit çözeltisi	0.1 M
Na ₂ HPO ₄ çözeltisi	0.2 M

Sitrik asitten (Carlo Erba Reagent) 2.1 g tartıldı, 100 mL hacme 121°C’de 15 dk sterilize edilmiş damıtık suyla tamamlanmıştır. Na₂HPO₄’ten (Merck) 3.5 g tartılıp 100 mL hacme 121°C’de 15 dk sterilize edilmiş damıtık suyla tamamlanmıştır. Sitrik asit çözeltisinden 90 mL, Na₂HPO₄ çözeltisinden 10 mL alınarak karıştırılmıştır.

Serum fizyolojik

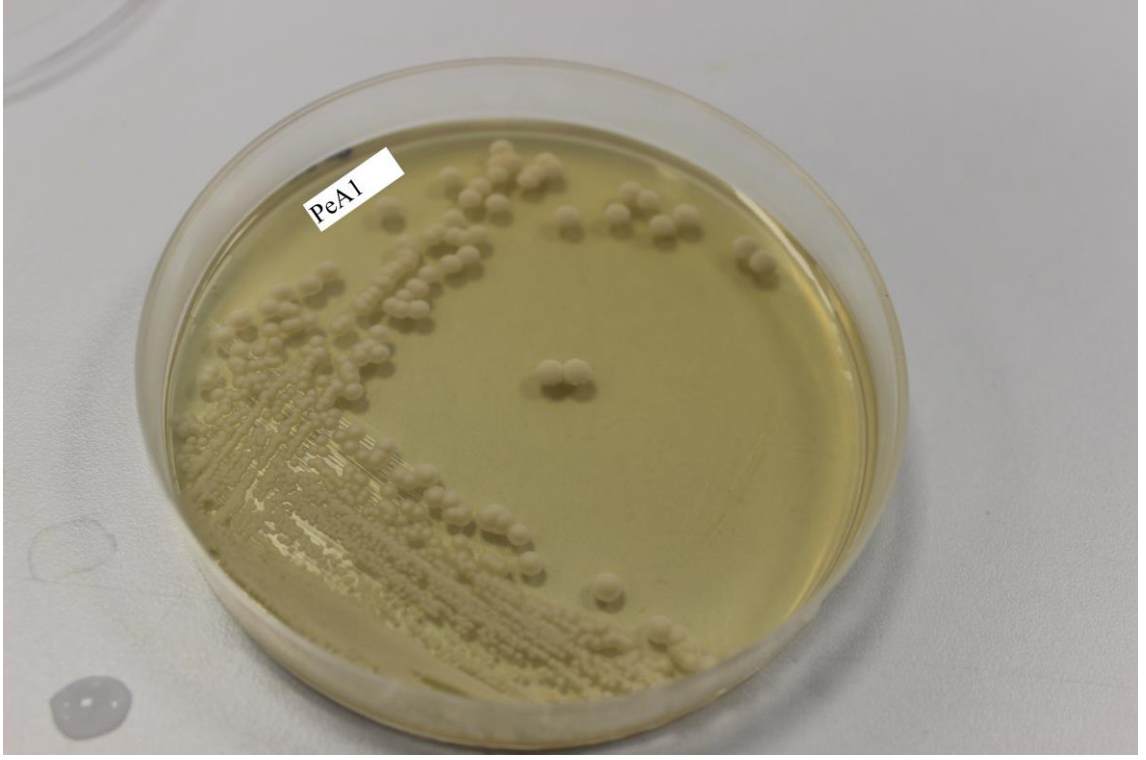
% 0.85 (w/v) NaCl çözeltisidir. 8.5 g NaCl tartılıp 1L’ye damıtık suyla tamamlanmıştır. 121°C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

1 N HCl çözeltisi

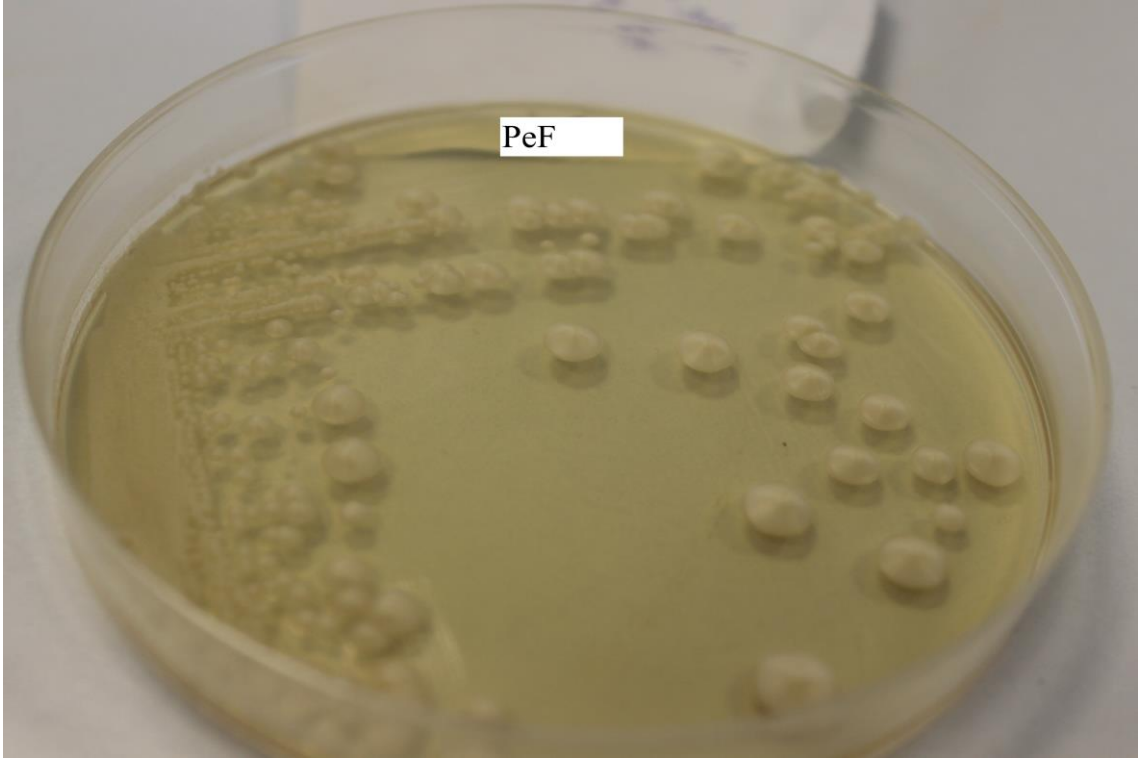
HCl	8.93 mL
Saf su	100 mL

% 35 saflıkta HCl kullanılarak hazırlanmıştır. $d=1.16$ g/mL $m_w=36.46$ g/mol

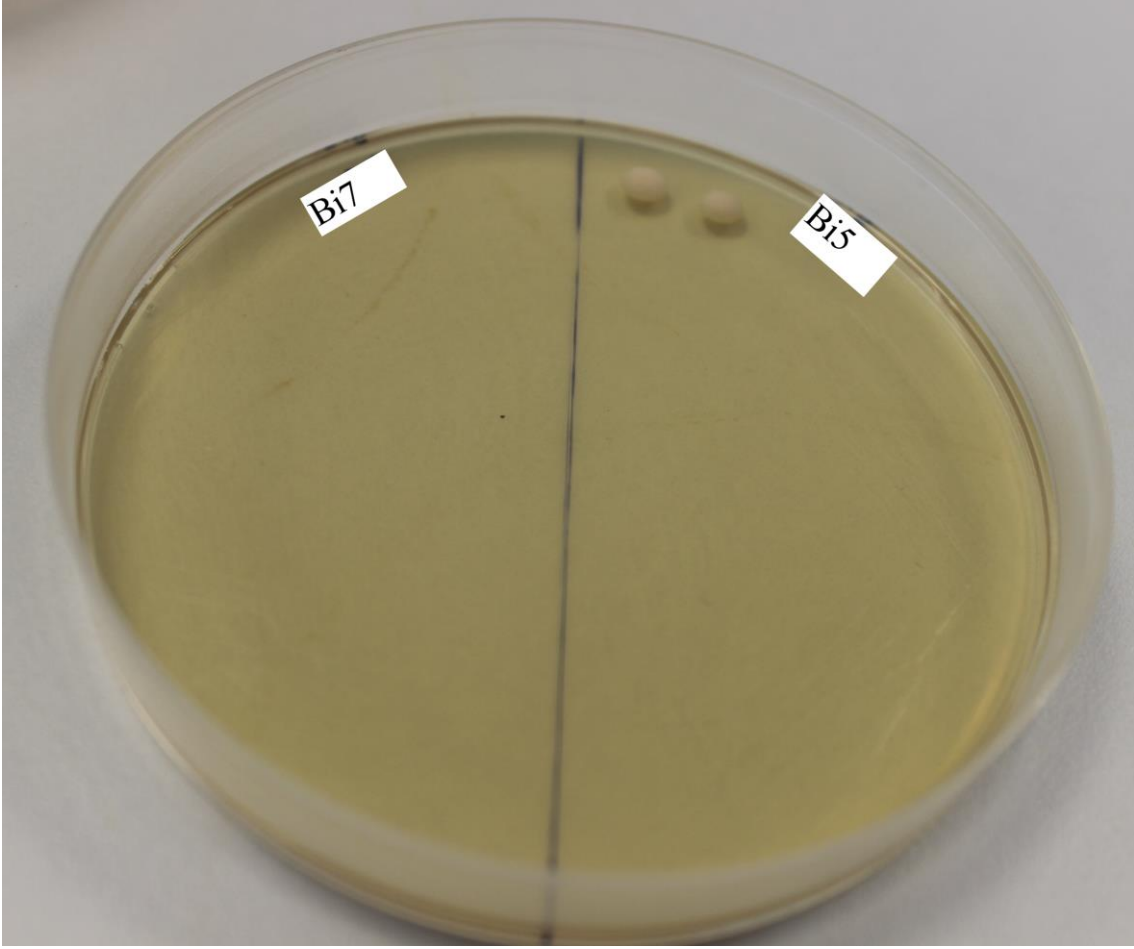
EK 3 – Mayaların 37°C’de Gelişmesine İlişkin Görseller



Şekil EK 3.1. PeA1 kodlu izolatın GPY agarda gelişimi.

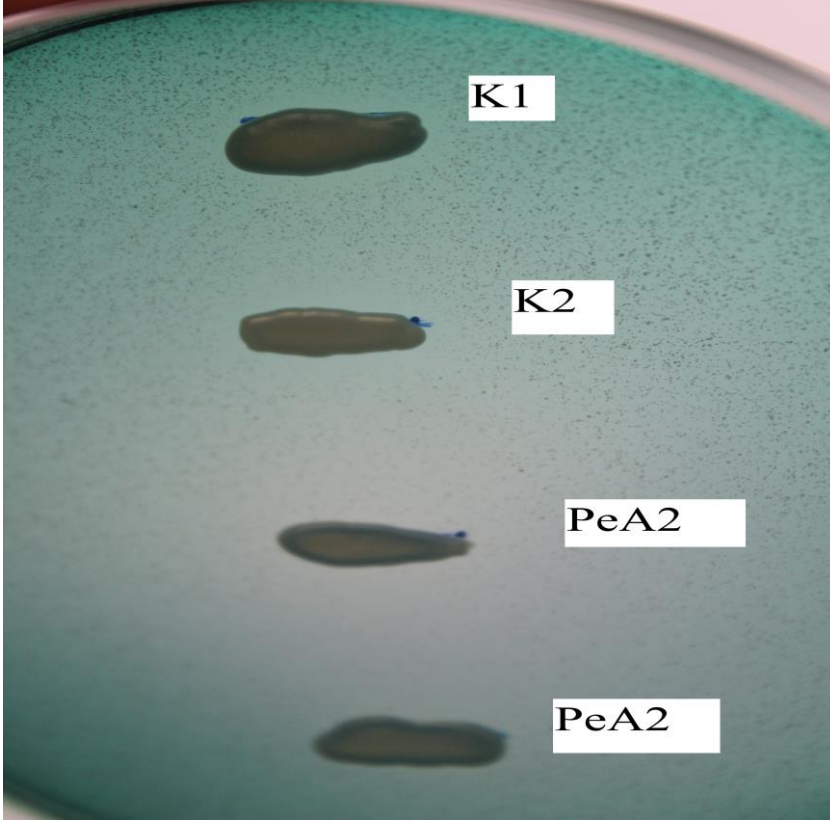


Şekil EK 3.2. PeF kodlu izolatın GPY agarda gelişimi.

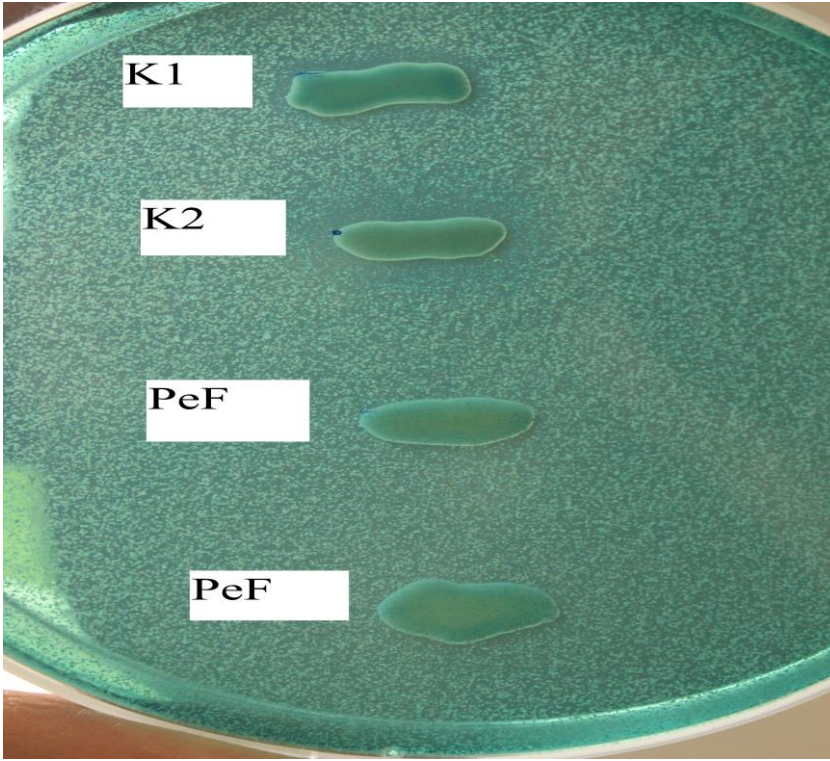


Şekil EK 3.3. Bi7 ve Bi7 kodlu izolatların GPY agarda gelişimi.

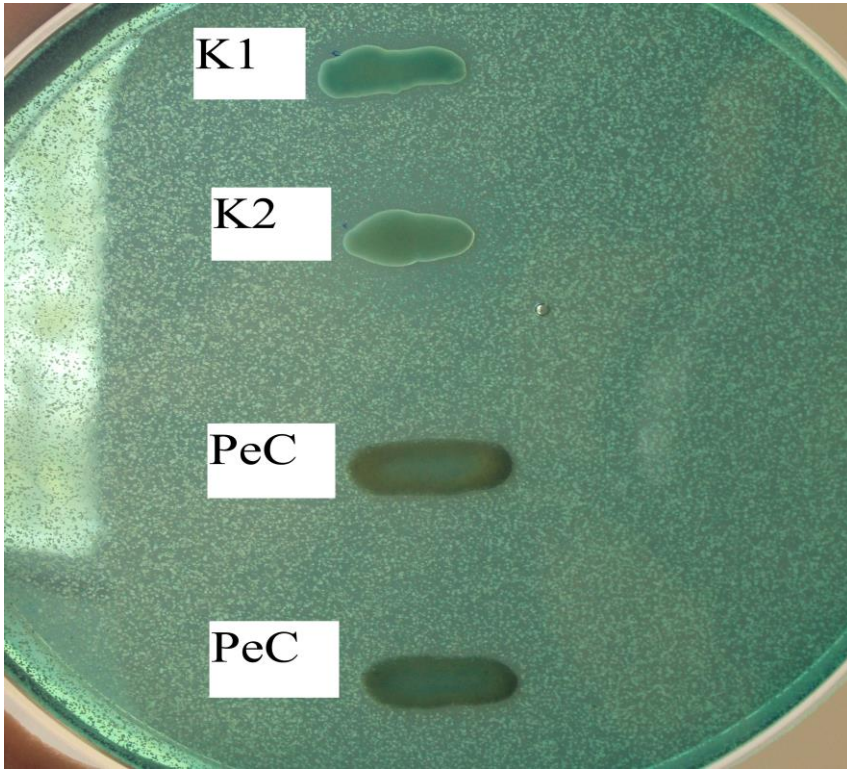
EK 4- Mayaların Killer Aktivite Testleri ve Duyarlılık Testlerine İlişkin Görseller



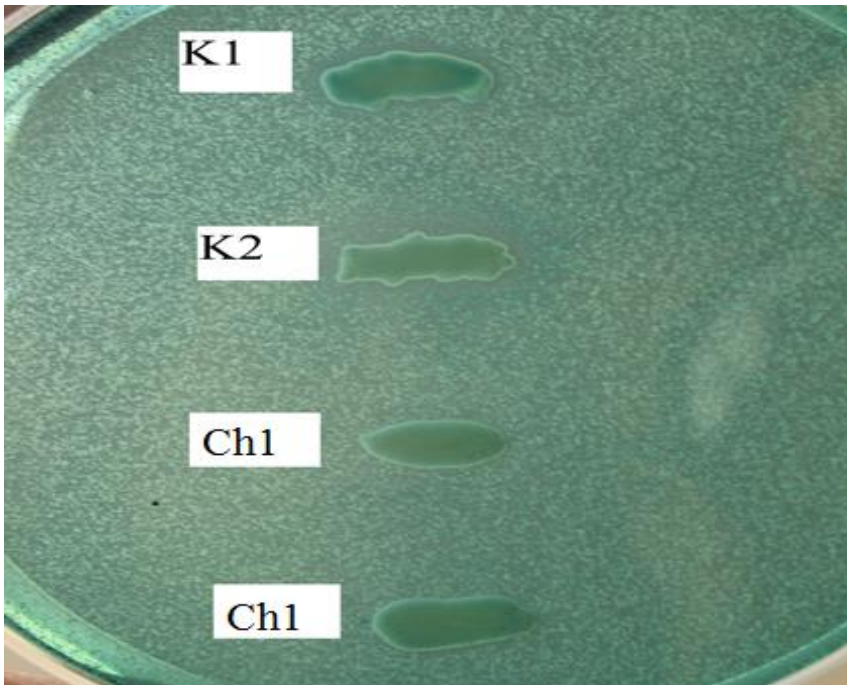
Şekil EK 4.1. PeA2 kodlu izolatın killer aktivite testi.



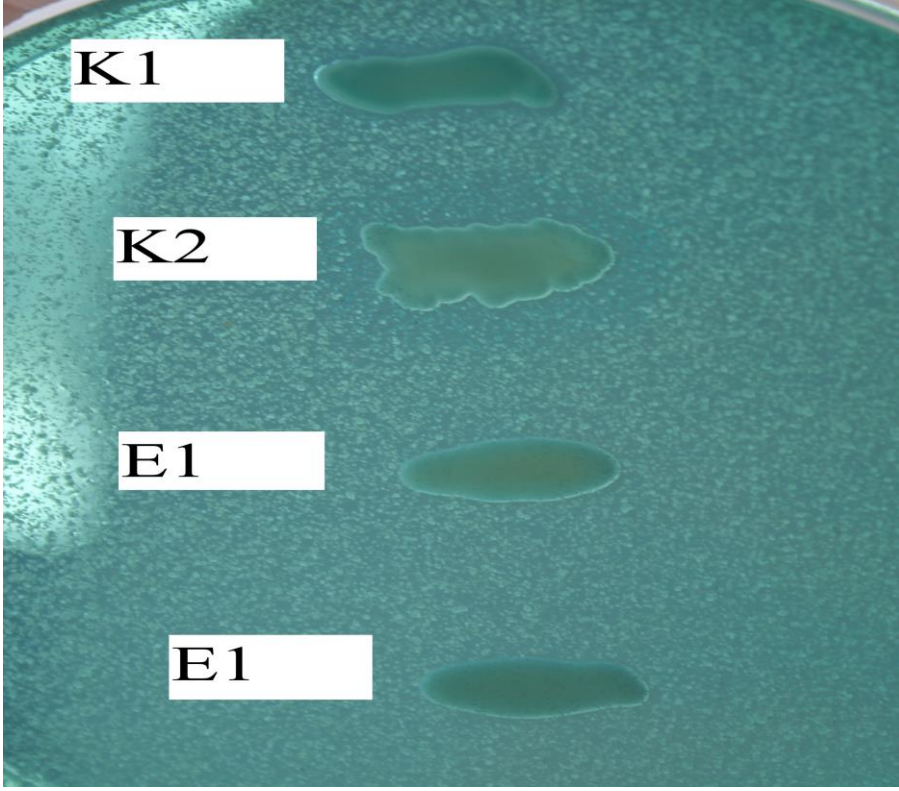
Şekil EK 4.2. PeF kodlu izolatın killer aktivite testi.



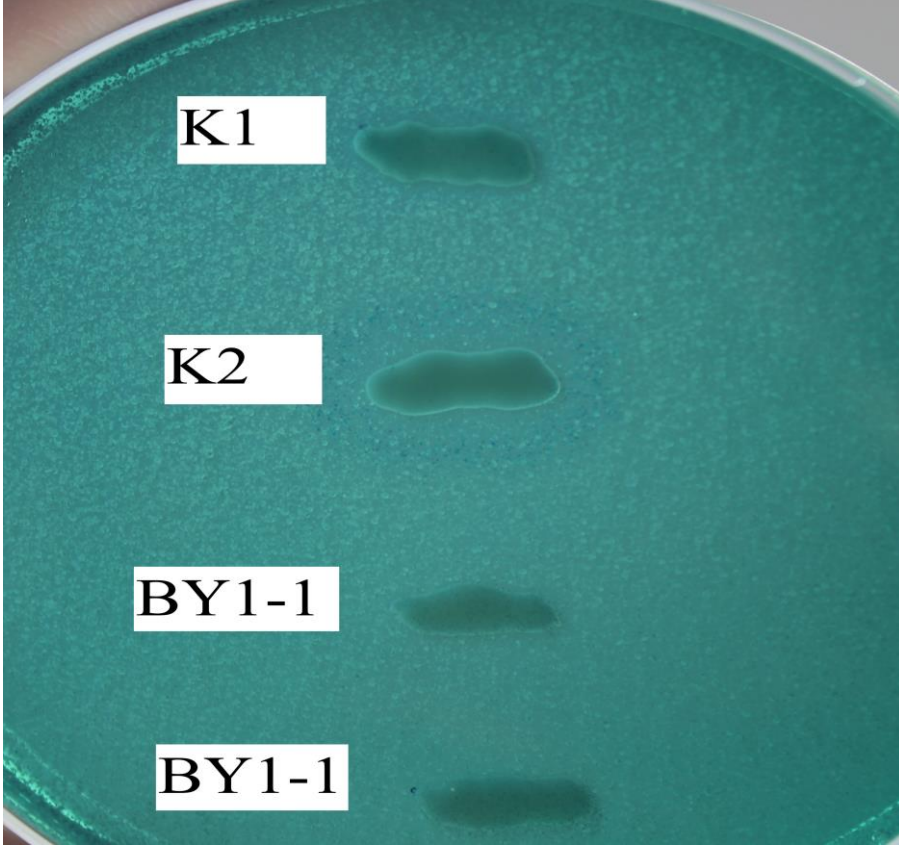
Şekil EK 4.3. PeC kodlu izolatın killer aktivite testi.



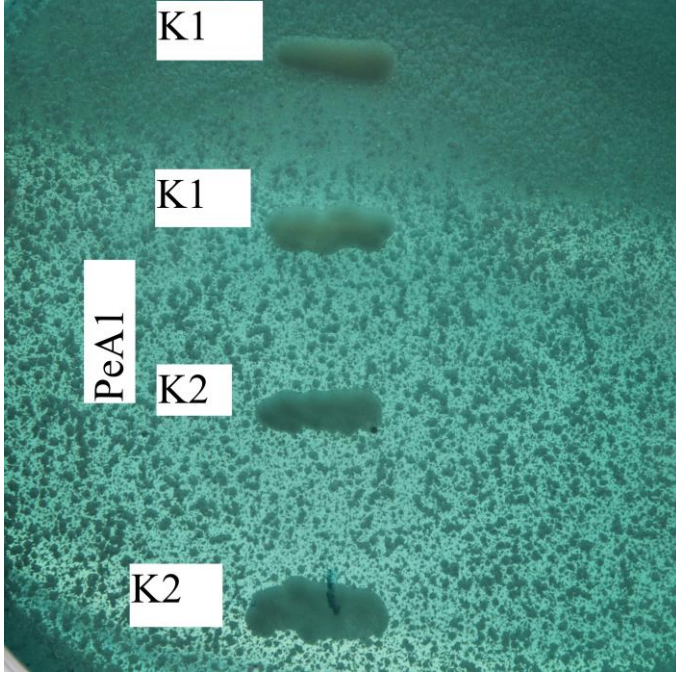
Şekil EK 4.4. Ch1 kodlu izolatın killer aktivite testi.



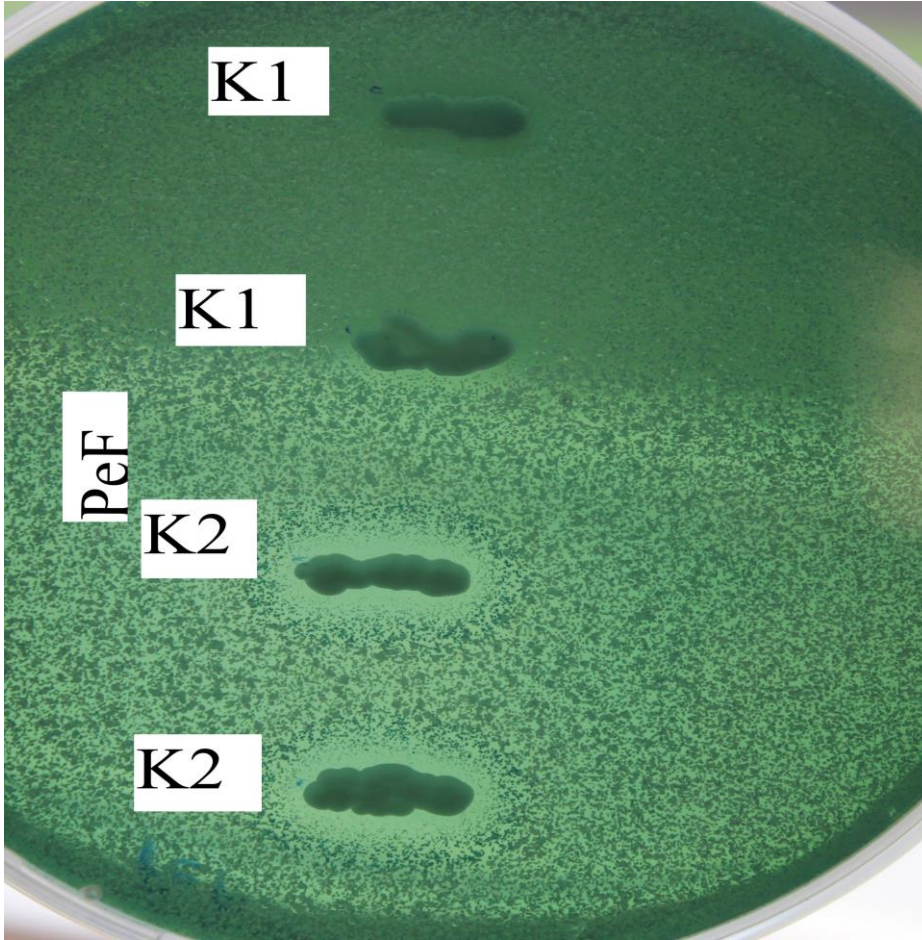
Şekil EK 4.5. E1 kodlu izolatın killer aktivite testi.



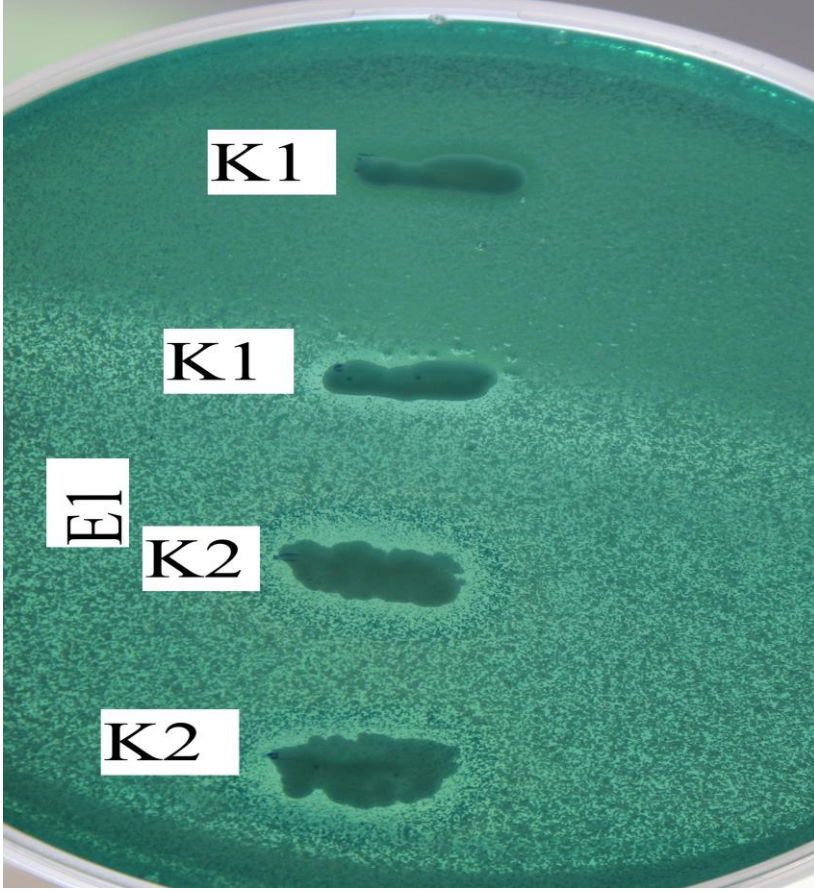
Şekil EK 4.6. BY1-1 kodlu izolatın killer aktivite testi.



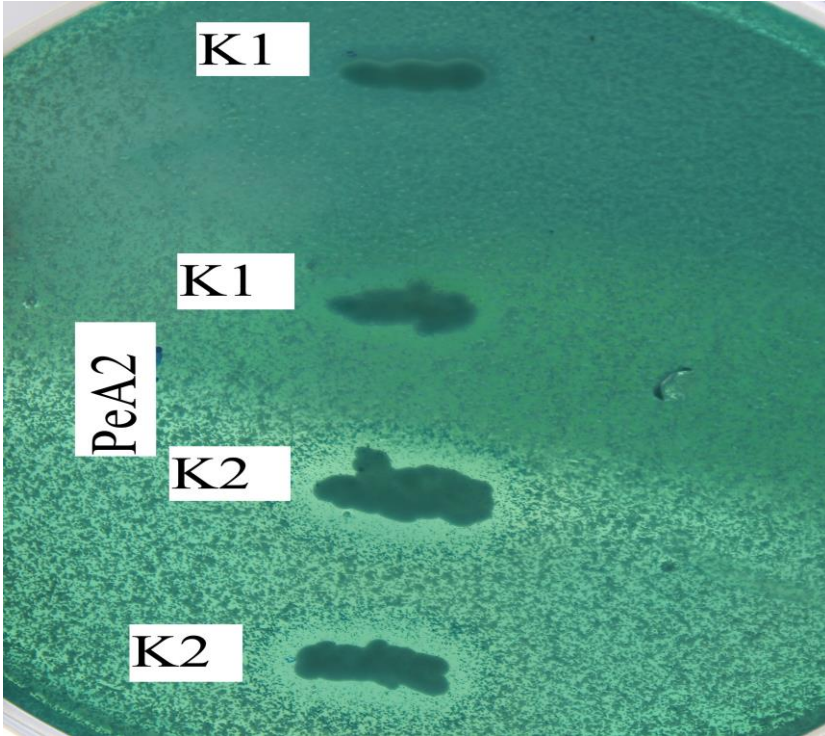
Şekil EK 4.7. PeA1 kodlu izolatin duyarlılık testi.



Şekil EK 4.8. PeF kodlu izolatin duyarlılık testi.



Şekil EK 4.7. E1 kodlu izolatın duyarlılık testi.



Şekil EK 4.8. PeA2 kodlu izolatın duyarlılık testi.

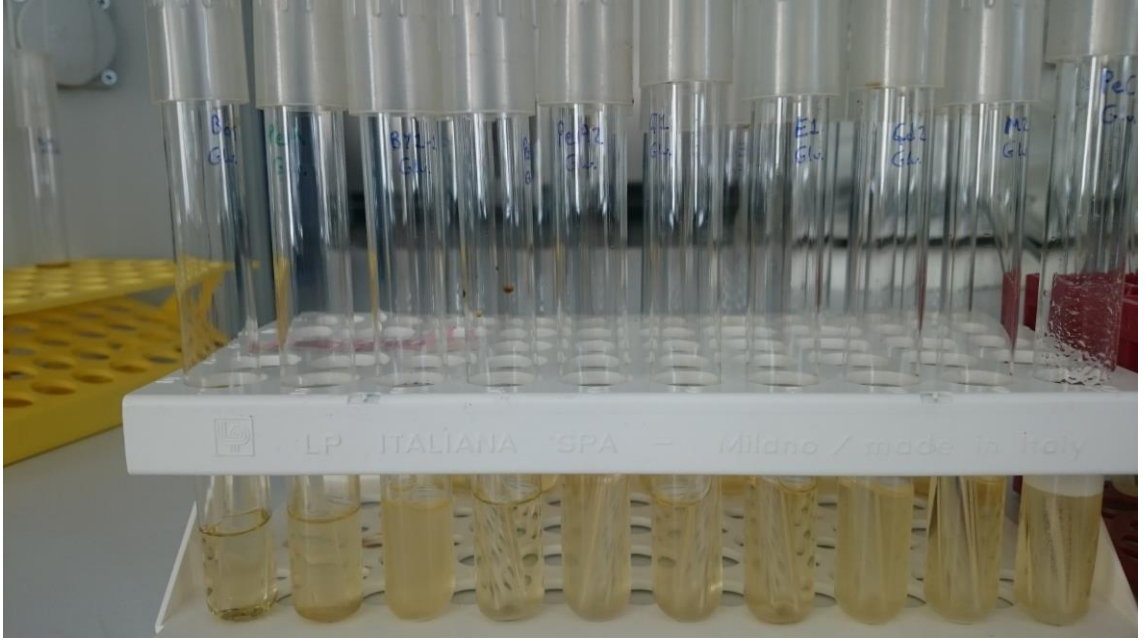
EK 5- Mayaların Fermantasyon Testlerine İlişkin Görseller



Şekil EK 5.1. Fruktöz fermantasyonuna ilişkin görsel.



Şekil EK 5.2. Glukoz fermantasyonuna ilişkin görsel (glukoz fermantasyonu besiyeri).



Şekil EK 5.3. Glukoz fermantasyonuna ilişkin görsel.



Şekil EK 5.4. Sakaroz fermantasyonuna ilişkin görsel.



Şekil EK 5.5. PeA1 kodlu izolatın fruktoz fermantasyonu.



Şekil EK 5.6. PeA1 kodlu izolatın glukoz fermantasyonu (glukoz fermantasyonu besiyeri).



Şekil EK 5.7. Bi1 kodlu izolatın glukoz fermantasyonu (glukoz fermantasyonu besiyeri).

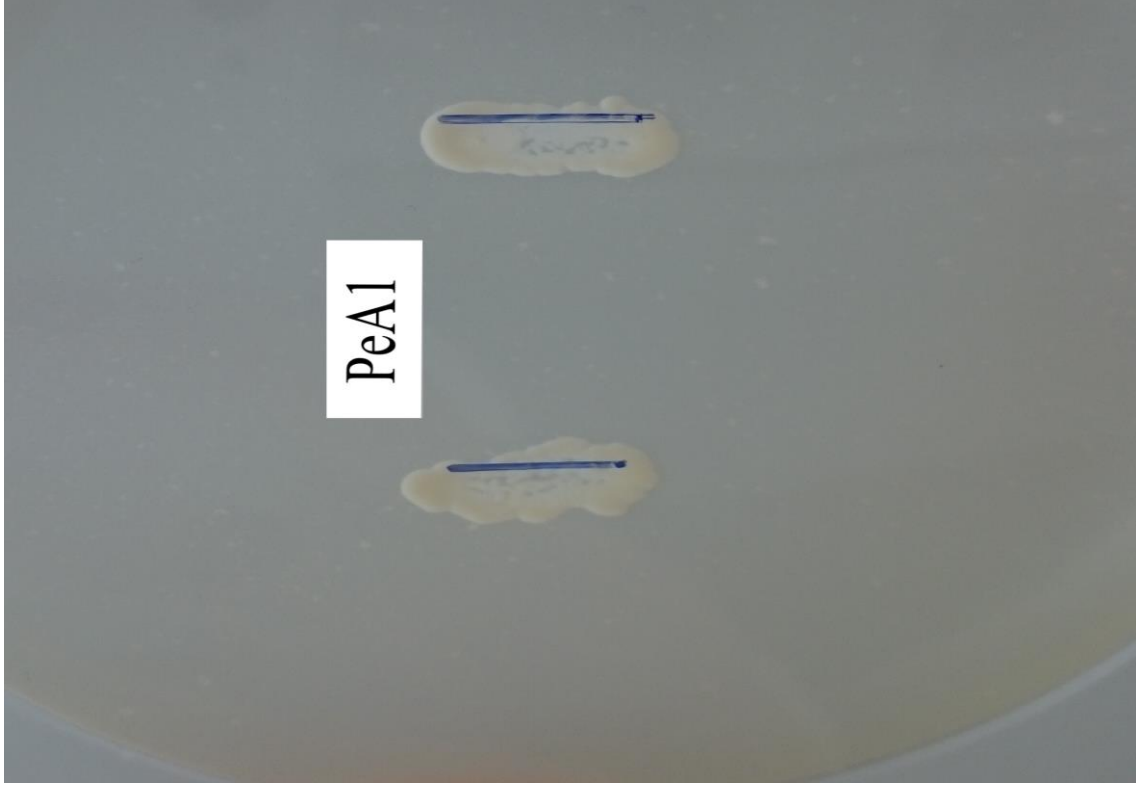


Şekil EK 5.7. PeA1 kodlu izolatın sakaroz fermantasyonu.

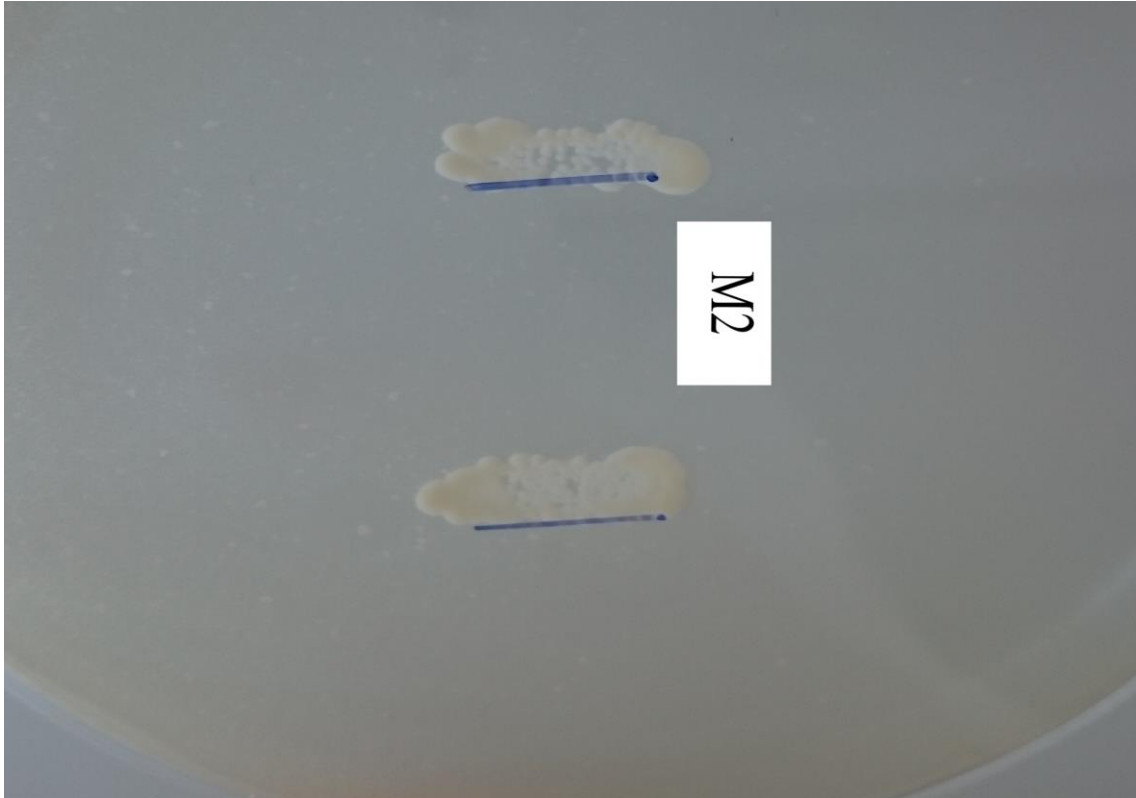


Şekil EK 5.8. PeA1 kodlu izolatın glukoz fermantasyonu.

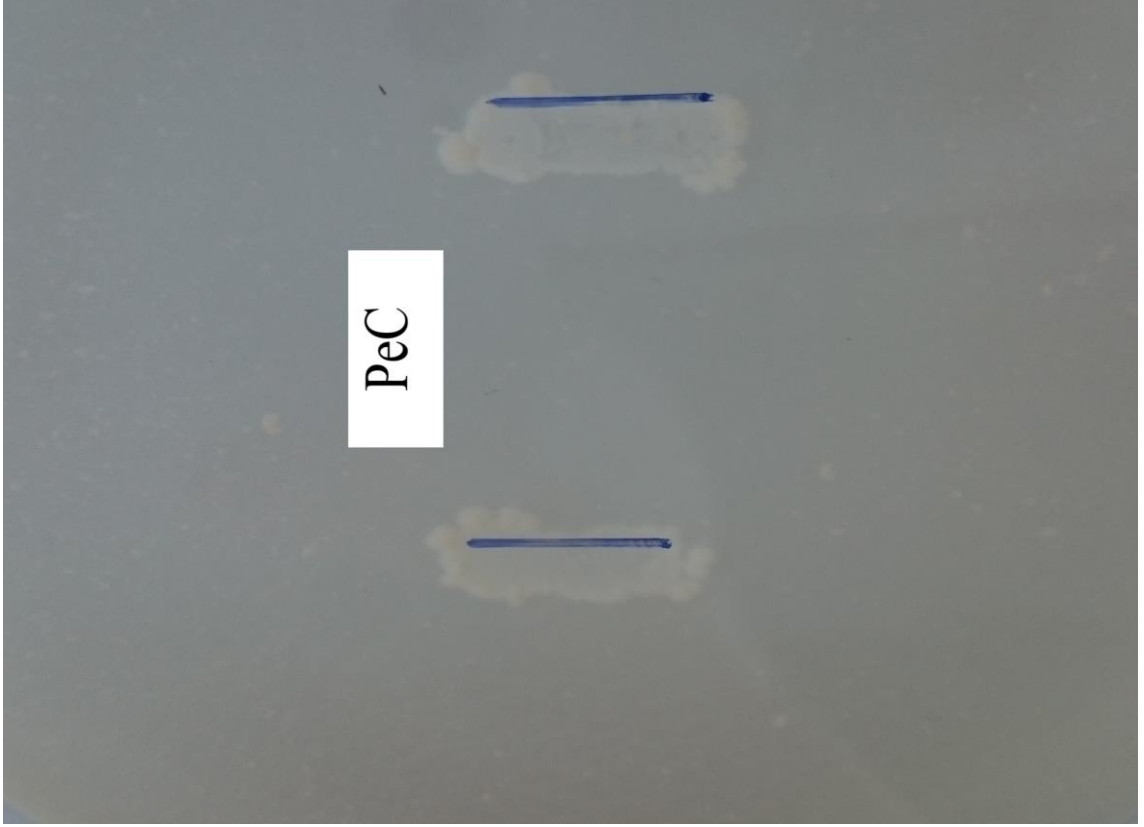
EK 6- Mayaların Proteolitik Aktivite Testine İlişkin Görseller



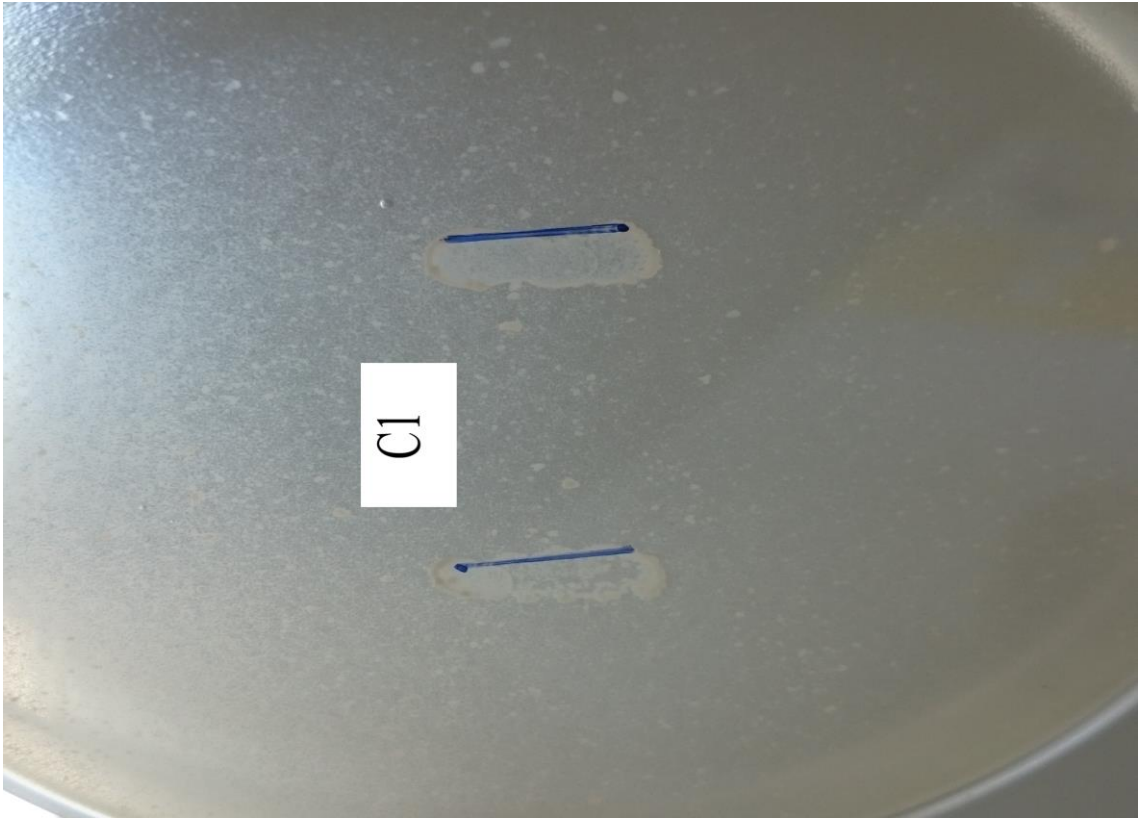
Şekil EK 6.1. PeA1 kodlu izolatin % 10'luk Milk agar besiyerinde gelişimi.



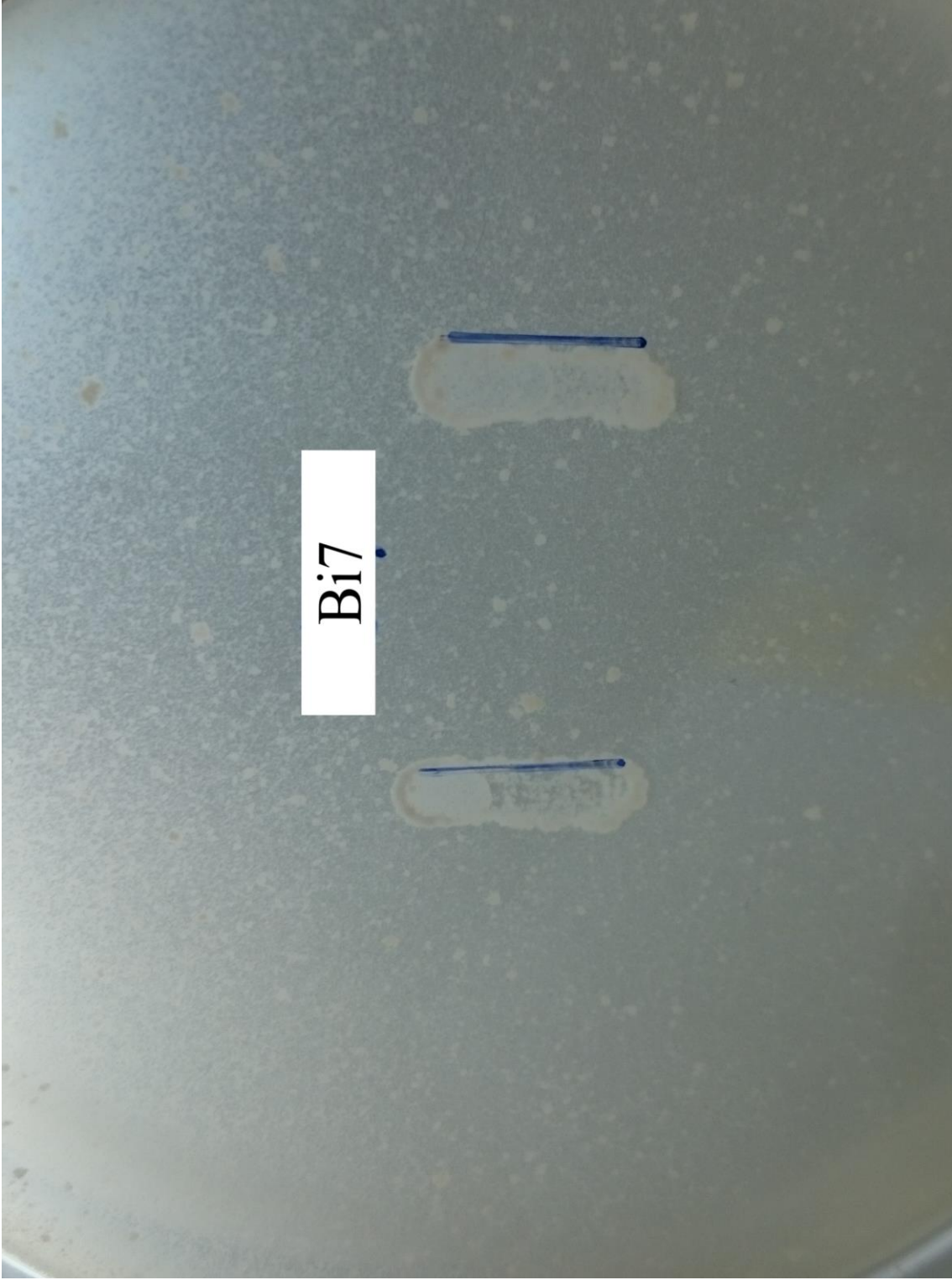
Şekil EK 6.2. M2 kodlu izolatin % 10'luk Milk agar besiyerinde gelişimi.



Şekil EK 6.3. PeC kodlu izolataın % 10'luk Milk agar besiyerinde gelişimi.



Şekil EK 6.4. C1 kodlu izolataın % 10'luk Milk agar besiyerinde gelişimi.



Şekil EK 6.5. Bi7 kodlu izolatın % 10'luk Milk agar besiyerinde gelişimi.

EK 7 – Sekans Analizi Sonuçları

Job Title **PeF_EC_1-ITS4-A03-2020-01-20**

RID [DW74.IVMW016](#) [Download All](#)

Program **BLASTN** [Citation](#)

Database **nt** [See details](#)

Query ID **lcl|Query_34817**

Description **None**

Molecule type **dna**

Query Length **401**

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Manage Columns](#) Show **100**

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate CM27 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and inte	741	741	100%	0.0	100.00%	MT136558.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y59/Borassus aethiopicum sapoLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence intern	741	741	100%	0.0	100.00%	MH585904.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y38/Borassus aethiopicum sapoLaRIA/Pama/Burkina internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribos	741	741	100%	0.0	100.00%	MH585903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y130/Borassus aethiopicum sapoLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence inter	741	741	100%	0.0	100.00%	MH585901.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y125/Borassus aethiopicum sapoLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence inter	741	741	100%	0.0	100.00%	MH585899.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate K46A small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA	741	741	100%	0.0	100.00%	MK973014.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain VOSS_2 ITS4 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence	741	741	100%	0.0	100.00%	MG541169.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain UCDEFST.84-10 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA complete sequence and i	741	741	100%	0.0	100.00%	MH595215.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate BRY03 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and in	741	741	100%	0.0	100.00%	MK106347.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Makgeolli chromosome 12	741	74904	100%	0.0	100.00%	CP025108.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae IFM 40093 genes for 18S rRNA ITS1 5.8S rRNA ITS2 28S rRNA partial and complete sequence	741	741	100%	0.0	100.00%	LC413763.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae IFM 40027 genes for internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA internal transcribed spacer 2 and 28S ribosom	741	741	100%	0.0	100.00%	LC413761.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate Tei small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA ge	741	741	100%	0.0	100.00%	MH453894.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae voucher IUVV-VAIMS-W18.6F small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8	741	741	100%	0.0	100.00%	MH252554.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae voucher IUVV-VAIMS-W18.3F small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8	741	741	100%	0.0	100.00%	MH252553.1

Şekil EK 7.1. PeF kodlu izolatın sekans analizi sonucu.

Job Title **PeF_EC_1-ITS4-A03-2020-01-20**

RID [DW74.IVMW016](#) [Download All](#)

Program **BLASTN** [Citation](#)

Database **nt** [See details](#)

Query ID **lcl|Query_34817**

Description **None**

Molecule type **dna**

Query Length **401**

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) **Taxonomy**

Reports [Lineage](#) [Organism](#) [Taxonomy](#)

100 sequences selected

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
<input type="checkbox"/> Eungi	100	4	
<input type="checkbox"/> Saccharomyces	72	3	
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae	59	1	Saccharomyces cerevisiae hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces sp.	1	1	Saccharomyces sp. hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus	12	1	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus hits
<input type="checkbox"/> uncultured fungus	28	1	uncultured fungus hits

Şekil EK 7.2. PeF kodlu izolatın taksonomik sonucu.

Job Title **PeA2_EC_2-ITS4-B03-2020-01-20**
 RID [DW7ASTJ9014](#) [Download All](#)
 Program **BLASTN** [Citation](#)
 Database **nt** [See details](#)
 Query ID **lcl|Query_62387**
 Description **None**
 Molecule type **dna**
 Query Length **457**
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results
 Organism only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + Add organism
 Percent Identity to E value to Query Coverage to
 Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y59/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence...	845	845	100%	0.0	100.00%	MH585904.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y38/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S r...	845	845	100%	0.0	100.00%	MH585903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y130/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence...	845	845	100%	0.0	100.00%	MH585901.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y125/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence...	845	845	100%	0.0	100.00%	MH585899.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces sp. strain CHK8 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and intern...	845	845	100%	0.0	100.00%	MH045256.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain Hitachi-SUY1	845	845	100%	0.0	100.00%	LC311315.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain IMA 105Y	845	845	100%	0.0	100.00%	LT005165.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain KawY1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, an...	845	845	100%	0.0	100.00%	KJ630759.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus culture CBS 5824 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer...	845	845	100%	0.0	100.00%	KY105149.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain DMc 134507 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transc...	845	845	100%	0.0	100.00%	KJ3833193.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain ICMustafa22	845	845	100%	0.0	100.00%	LT572507.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain AJMCC 10229 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequen...	845	845	100%	0.0	100.00%	KJ023222.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1307 chromosome XII sequence	845	1.294e+05	100%	0.0	100.00%	CP006391.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate YN2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene...	845	845	100%	0.0	100.00%	KJ502661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces sp. YC9 13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern...	845	845	100%	0.0	100.00%	KF747750.1

Şekil EK 7.3. PeA2 kodlu izolatin sekans analizi sonucu.

Job Title **PeA2_EC_2-ITS4-B03-2020-01-20**
 RID [DW7ASTJ9014](#) [Download All](#)
 Program **BLASTN** [Citation](#)
 Database **nt** [See details](#)
 Query ID **lcl|Query_62387**
 Description **None**
 Molecule type **dna**
 Query Length **457**
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results
 Organism only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + Add organism
 Percent Identity to E value to Query Coverage to
 Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments **Taxonomy**

Reports Lineage Organism **Taxonomy**

100 sequences selected

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
<input type="checkbox"/> Eungi	100	6	
- <input type="checkbox"/> Saccharomyces	76	5	
- - <input type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae	61	2	Saccharomyces cerevisiae hits
- - - <input type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1307	1	1	Saccharomyces cerevisiae YJM1307 hits
- - - <input type="checkbox"/> unclassified Saccharomyces	2	2	
- - - <input type="checkbox"/> Saccharomyces sp.	1	1	Saccharomyces sp. hits
- - - <input type="checkbox"/> Saccharomyces sp. YC9_13	1	1	Saccharomyces sp. YC9_13 hits
- - <input type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus	12	1	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus hits
- <input type="checkbox"/> uncultured fungus	24	1	uncultured fungus hits

Şekil EK 7.4. PeA2 kodlu izolatin taksonomik sonucu.

Job Title **C1_EC_3 ITS4_002_2020-01-29**
 RID [DW7MGUJ0014](#) [Download All](#)
 Program BLASTN [Citation](#)
 Database nt [See details](#)
 Query ID Icl|Query_32617
 Description None
 Molecule type dna
 Query Length 427
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results
 Organism *only top 20 will appear* exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + Add organism
 Percent Identity to E value to Query Coverage to
 Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y59/Borassus aethiopicum sapLaBIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, i	789	789	100%	0.0	100.00%	MH685804.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y38/Borassus aethiopicum sapLaBIA/Pama/Burkina internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S r	789	789	100%	0.0	100.00%	MH685903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y130/Borassus aethiopicum sapLaBIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence,	789	789	100%	0.0	100.00%	MH685901.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y125/Borassus aethiopicum sapLaBIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence,	789	789	100%	0.0	100.00%	MH685899.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces sp. strain CH48 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and intern	789	789	100%	0.0	100.00%	MH045266.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain Htachi-SUY1	789	789	100%	0.0	100.00%	LC311315.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain IMA 105Y	789	789	100%	0.0	100.00%	U805145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain KinY1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, an	789	789	100%	0.0	100.00%	KX430769.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus culture CRS-5824 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer	789	789	100%	0.0	100.00%	KY105140.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain DMc 134507 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal trans	789	789	100%	0.0	100.00%	KX331031.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain IGMustafa22	789	789	100%	0.0	100.00%	U817607.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain AJMC 10229 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequen	789	789	100%	0.0	100.00%	KX023222.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1307 chromosome XII sequence	789	1.209e+05	100%	0.0	100.00%	CP006391.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate YH2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	789	789	100%	0.0	100.00%	KJ502661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces sp. YC9.13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	789	789	100%	0.0	100.00%	KF747750.1

Şekil EK 7.5. C1 kodlu izolatın sekans analizi sonucu.

Job Title **C1_EC_3 ITS4_002_2020-01-29**
 RID [DW7MGUJ0014](#) [Download All](#)
 Program BLASTN [Citation](#)
 Database nt [See details](#)
 Query ID Icl|Query_32617
 Description None
 Molecule type dna
 Query Length 427
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results
 Organism *only top 20 will appear* exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + Add organism
 Percent Identity to E value to Query Coverage to
 Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments **Taxonomy**

Reports Lineage Organism **Taxonomy**

100 sequences selected

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
<input type="checkbox"/> Eungi	100	6	
<input type="checkbox"/> Saccharomyces	85	5	
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae	70	2	Saccharomyces cerevisiae hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1307	1	1	Saccharomyces cerevisiae YJM1307 hits
<input type="checkbox"/> unclassified Saccharomyces	2	2	
<input type="checkbox"/> Saccharomyces sp.	1	1	Saccharomyces sp. hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces sp. YC9.13	1	1	Saccharomyces sp. YC9.13 hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus	12	1	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus hits
<input type="checkbox"/> uncultured fungus	15	1	uncultured fungus hits

Şekil EK 7.6. C1 kodlu izolatın taksonomik sonucu.

Job Title **##1_EC_4 ITS4_004_2020-01-29**
 RID [DW750400016](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID [Ic|Query_22907](#)

Description None

Molecule type dna

Query Length 407

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions **Graphic Summary** Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Manage Columns](#) Show

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y59/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence int	747	747	100%	0.0	99.75%	MN585903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y20/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S rib	747	747	100%	0.0	99.75%	MN585903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y130/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence i	747	747	100%	0.0	99.75%	MN585903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y125/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence i	747	747	100%	0.0	99.75%	MN585903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces sp. strain CH63 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and internal	747	747	100%	0.0	99.75%	MH045286.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1 5.8S rRNA ITS2 28S rRNA partial and complete sequence strain Hitachi-SUY1	747	747	100%	0.0	99.75%	LC311315.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genomic DNA sequence contains ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 strain IMA 105Y	747	747	100%	0.0	99.75%	LT505145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain KivY1 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and	747	747	100%	0.0	99.75%	K0430769.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus culture CBS 5824 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer	747	747	100%	0.0	99.75%	KY105140.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain DMc 134507 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcr	747	747	100%	0.0	99.75%	K0333103.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genomic DNA sequence contains ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 strain 32Mustafa22	747	747	100%	0.0	99.75%	LT577607.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain AUMC 10229 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequenc	747	747	100%	0.0	99.75%	K0023222.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1307 chromosome XII sequence	747	1.144e+05	100%	0.0	99.75%	CP006391.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate YN2 13S ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene	747	747	100%	0.0	99.75%	K4502861.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces sp. YC9 13 18S ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene and interna	747	747	100%	0.0	99.75%	HE747750.1

Şekil EK 7.7. Ch1 kodlu izolatin sekans analizi sonucu.

Job Title **##1_EC_4 ITS4_004_2020-01-29**
 RID [DW750400016](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID [Ic|Query_22907](#)

Description None

Molecule type dna

Query Length 407

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions **Graphic Summary** Alignments **Taxonomy**

Reports [Lineage](#) [Organism](#) **Taxonomy**

100 sequences selected

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
<input type="checkbox"/> Fungi	100	7	
<input type="checkbox"/> Saccharomyces	92	6	
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae	75	2	Saccharomyces cerevisiae hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1307	1	1	Saccharomyces cerevisiae YJM1307 hits
<input type="checkbox"/> unclassified Saccharomyces	2	2	
<input type="checkbox"/> Saccharomyces sp.	1	1	Saccharomyces sp. hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces sp. YC9 13	1	1	Saccharomyces sp. YC9 13 hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus	13	1	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus hits
<input type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae	1	1	Saccharomyces cf. cerevisiae hits
<input type="checkbox"/> uncultured fungus	8	1	uncultured fungus hits

Şekil EK 7.8. Ch1 kodlu izolatin taksonomik sonucu.

Job Title **Bi1_EC_5_ITS4_006_2020-01-29**

RID [DW7VHG5D014](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID Icd|Query_56123

Description None

Molecule type dna

Query Length 507

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Manage Columns](#) Show 100

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus isolate Sag101 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spac	937	937	100%	0.0	100.00%	MH17189.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum isolate 2543 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	937	937	100%	0.0	100.00%	MH17414.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum isolate AW1496 internal transcribed spacer 1 partial sequer	937	937	100%	0.0	100.00%	MH048998.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum strain UCDFST-68-40 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA complete sequence and int	937	937	100%	0.0	100.00%	MH595343.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus isolate F21599 ITS small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosom	937	937	100%	0.0	100.00%	MH267707.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus strain SF5-310-402 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	937	937	100%	0.0	100.00%	MH023214.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum strain SF5-310-488 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	937	937	100%	0.0	100.00%	MH023213.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum strain Hval_F2 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA	937	937	100%	0.0	100.00%	MH458499.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum CBS 395 ITS region from TYPE material	937	937	100%	0.0	100.00%	NR_153310.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus strain Novocimiyanskaya 3 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequ	937	937	100%	0.0	100.00%	MG720169.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 8632 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosom	937	937	100%	0.0	100.00%	KY105240.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 8694 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosom	937	937	100%	0.0	100.00%	KY105239.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 8691 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosom	937	937	100%	0.0	100.00%	KY105238.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 10271 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	937	937	100%	0.0	100.00%	KY105237.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 395 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosom	937	937	100%	0.0	100.00%	KY105236.1

Şekil EK 7.9. Bi1 kodlu izolatin sekans analizi sonucu.

Job Title **Bi1_EC_5_ITS4_006_2020-01-29**

RID [DW7VHG5D014](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID Icd|Query_56123

Description None

Molecule type dna

Query Length 507

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments **Taxonomy**

Reports Lineage Organism **Taxonomy**

100 sequences selected

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomycetes	118	13	
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces	117	12	
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus	29	1	Saccharomyces bayanus hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum	36	2	Saccharomyces uvarum hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum x Saccharomyces eubayanus	1	1	Saccharomyces uvarum x Saccharomyces eubayanus hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum	5	1	Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces pastorianus	11	1	Saccharomyces pastorianus hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum	2	1	Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces uvarum	1	1	Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces uvarum hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus	6	1	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae	2	1	Saccharomyces cerevisiae hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cf. bayanus/pastorianus	12	1	Saccharomyces cf. bayanus/pastorianus hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces sp.	1	1	Saccharomyces sp. hits
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces eubayanus	9	1	Saccharomyces eubayanus hits
<input checked="" type="checkbox"/> saccharomycete sp. NZSBMV10-B6	1	1	saccharomycete sp. NZSBMV10-B6 hits

Şekil EK 7.10. Bi1 kodlu izolatin taksonomik sonucu.

Job Title **Bi5_EC_6 ITS4_008_2020-01-29**

RID [DW99GRCG014](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID Icl|Query_2201

Description None

Molecule type dna

Query Length 516

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Manage Columns](#) Show

select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus isolate Seg01 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MH317189.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum isolate 2643 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MX174143.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum isolate AW1496 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MK049898.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum strain UCDFST_48-40 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA, complete sequence, and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MH495343.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus isolate E21689 ITS small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MK267707.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus strain SFS-310-402 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MH020214.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum strain SFS-310-408 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MH020213.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum strain Hual_F2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MH452609.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum CBS 795 ITS region, from TYPE material	953	953	100%	0.0	100.00%	NR_153310.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces bayanus strain Novocimiyanskaya 2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	MG720169.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 8692 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	KY105240.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 8694 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	KY105239.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 8691 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	KY105238.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 10271 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	KY105237.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces uvarum culture CBS 795 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	953	953	100%	0.0	100.00%	KY105236.1

Şekil EK 7.11. Bi5 kodlu izolatin sekans analizi sonucu.

Job Title **Bi5_EC_6 ITS4_008_2020-01-29**

RID [DW99GRCG014](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID Icl|Query_2201

Description None

Molecule type dna

Query Length 516

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

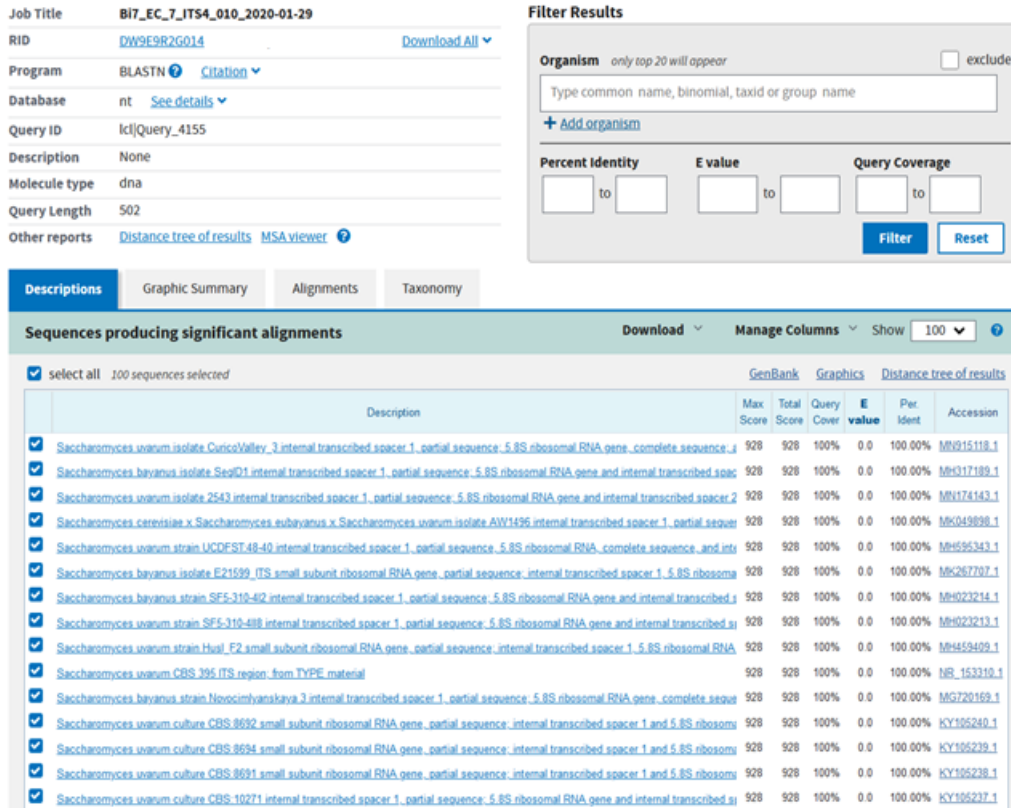
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | **Taxonomy**

Reports | Lineage | Organism | **Taxonomy**

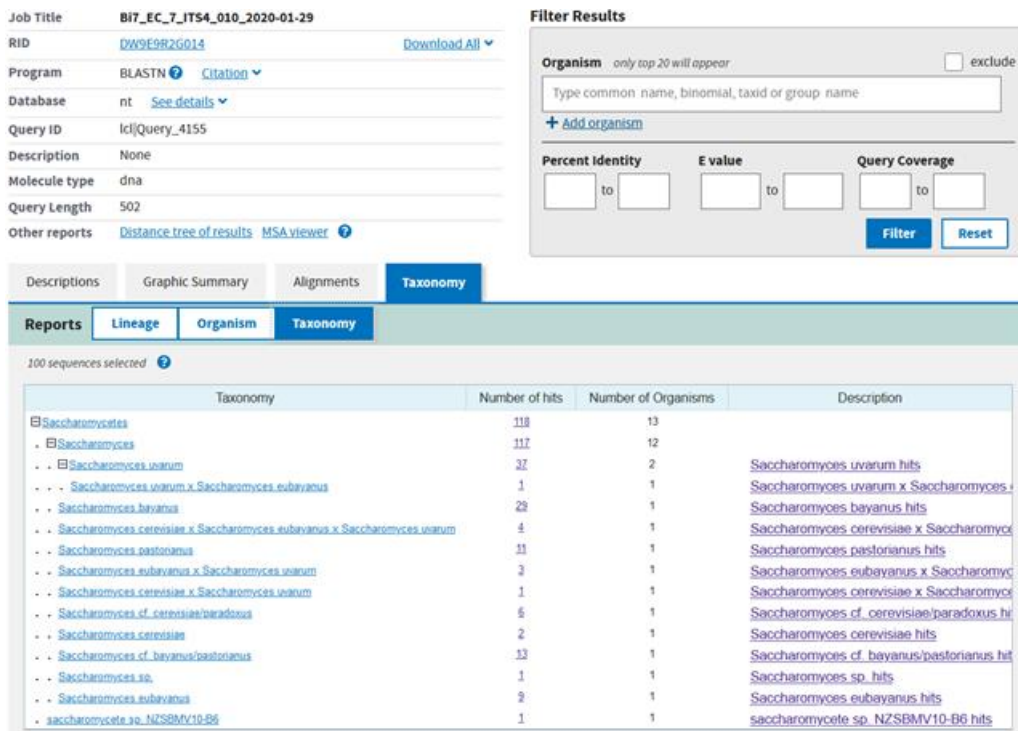
100 sequences selected

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
[-] Saccharomycetes	118	13	
[-] Saccharomyces	117	12	
[-] Saccharomyces bayanus	29	1	Saccharomyces bayanus hits
[-] Saccharomyces uvarum	37	2	Saccharomyces uvarum hits
[-] Saccharomyces uvarum x Saccharomyces eubayanus	1	1	Saccharomyces uvarum x Saccharomyces eubayanus hits
[-] Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum	4	1	Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum hits
[-] Saccharomyces pastorianus	11	1	Saccharomyces pastorianus hits
[-] Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum	3	1	Saccharomyces eubayanus x Saccharomyces uvarum hits
[-] Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces uvarum	1	1	Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces uvarum hits
[-] Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus	6	1	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus hits
[-] Saccharomyces cerevisiae	2	1	Saccharomyces cerevisiae hits
[-] Saccharomyces cf. bayanus/pastorianus	13	1	Saccharomyces cf. bayanus/pastorianus hits
[-] Saccharomyces sp.	1	1	Saccharomyces sp. hits
[-] Saccharomyces eubayanus	9	1	Saccharomyces eubayanus hits
[-] Saccharomycete sp. NZS8MV10-B6	1	1	saccharomycete sp. NZS8MV10-B6 hits

Şekil EK 7.12. Bi5 kodlu izolatin taksonomik sonucu.



Şekil EK 7.13. Bi7 kodlu izolatın sekans analizi sonucu.



Şekil EK 7.14. Bi7 kodlu izolatın taksonomik sonucu.

Job Title **M2_EC_8_ITS4_012_2020-01-29**

RID [DW9N1TD9016](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID lcl|Query_41741

Description None

Molecule type dna

Query Length 406

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Manage Columns](#) Show 100

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y59/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence nt	745	745	100%	0.0	99.75%	MN585904.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y39/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S rite	745	745	100%	0.0	99.75%	MN585903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y130/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence nt	745	745	100%	0.0	99.75%	MN585901.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y125/Borassus aethiopicum sapLaRIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence nt	745	745	100%	0.0	99.75%	MN585899.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain VQSS_2 ITS4 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequen	745	745	100%	0.0	99.75%	MG641169.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces sp. strain ChKR internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and internal	745	745	100%	0.0	99.75%	MH045266.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1 5.8S rRNA ITS2 28S rRNA partial and complete sequence strain Hitachi-SUY1	745	745	100%	0.0	99.75%	LC311315.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genomic DNA sequence contains ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 strain IMA 105Y	745	745	100%	0.0	99.75%	LT605145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain KawY1 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence and	745	745	100%	0.0	99.75%	KX430759.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus culture CBS 5824 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer	745	745	100%	0.0	99.75%	KY106140.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Dmic 134507 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcri	745	745	100%	0.0	99.75%	KX833103.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae genomic DNA sequence contains ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 strain IQMustafa22	745	745	100%	0.0	99.75%	LT577607.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain AJUMC 10229 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequenc	745	745	100%	0.0	99.75%	KX023222.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1307 chromosome XII sequence	745	1.141e+05	100%	0.0	99.75%	CP006391.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate YH2 18S ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene	745	745	100%	0.0	99.75%	KJ450266.1

Şekil EK 7.15. M2 kodlu izolatın sekans analizi sonucu.

Job Title **M2_EC_8_ITS4_012_2020-01-29**

RID [DW9N1TD9016](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID lcl|Query_41741

Description None

Molecule type dna

Query Length 406

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | **Taxonomy**

Reports | Lineage | **Organism** | Taxonomy

100 sequences selected

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Fungi	fungi		100	
· Saccharomyces	budding yeasts		89	
· · Saccharomyces cerevisiae	budding yeasts	745	74	Saccharomyces cerevisiae hits
· · Saccharomyces sp.	budding yeasts	745	1	Saccharomyces sp. hits
· · Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus	budding yeasts	745	12	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus hits
· · Saccharomyces cerevisiae YJM1307	budding yeasts	745	1	Saccharomyces cerevisiae YJM1307 hits
· · Saccharomyces sp. YC9.13	budding yeasts	745	1	Saccharomyces sp. YC9.13 hits
· uncultured fungus	fungi	739	11	uncultured fungus hits

Şekil EK 7.16. M2 kodlu izolatın taksonomik sonucu.

Job Title **E1_EC_10_ITS4_016_2020-01-29**

RID [DW9V76MH016](#) [Download All](#)

Program **BLASTN** [Citation](#)

Database **nt** [See details](#)

Query ID **lcl|Query_61297**

Description **None**

Molecule type **dna**

Query Length **432**

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Manage Columns](#) Show **100**

select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate DMZ7 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence	798	798	100%	0.0	100.00%	MT136558.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y59/Borassus aethiopicum sapLaBIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence	798	798	100%	0.0	100.00%	MH585904.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y38/Borassus aethiopicum sapLaBIA/Pama/Burkina internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S r	798	798	100%	0.0	100.00%	MH585903.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y130/Borassus aethiopicum sapLaBIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence	798	798	100%	0.0	100.00%	MH585901.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Y125/Borassus aethiopicum sapLaBIA/Pama/Burkina small subunit ribosomal RNA gene partial sequence	798	798	100%	0.0	100.00%	MH585899.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae isolate K46A small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal	798	798	100%	0.0	100.00%	MH573014.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain VOSS_2 ITS4 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA gene complete sequen	798	798	100%	0.0	100.00%	MG641169.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain Makpedeli chromosome 12	798	80686	100%	0.0	100.00%	CP925108.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae IFM40903 genes for 18S rRNA ITS1 5.8S rRNA ITS2 28S rRNA partial and complete sequence	798	798	100%	0.0	100.00%	LC413763.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae Tej small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal R	798	798	100%	0.0	100.00%	MH453894.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae voucher BUV/VAM/S-W18_9F small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1	798	798	100%	0.0	100.00%	MH252554.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae voucher BUV/VAM/S-W18_3F small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1	798	798	100%	0.0	100.00%	MH252553.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae voucher BUV/VAM/S-W18_1F small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1	798	798	100%	0.0	100.00%	MH252552.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae voucher BUV/VAM/S-W3_34J small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1	798	798	100%	0.0	100.00%	MH252549.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae voucher BUV/VAM/S-W2_1J small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1	798	798	100%	0.0	100.00%	MH252545.1

Şekil EK 7.17. E1 kodlu izolatın sekans analizi sonucu.

Job Title **E1_EC_10_ITS4_016_2020-01-29**

RID [DW9V76MH016](#) [Download All](#)

Program **BLASTN** [Citation](#)

Database **nt** [See details](#)

Query ID **lcl|Query_61297**

Description **None**

Molecule type **dna**

Query Length **432**

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | **Taxonomy**

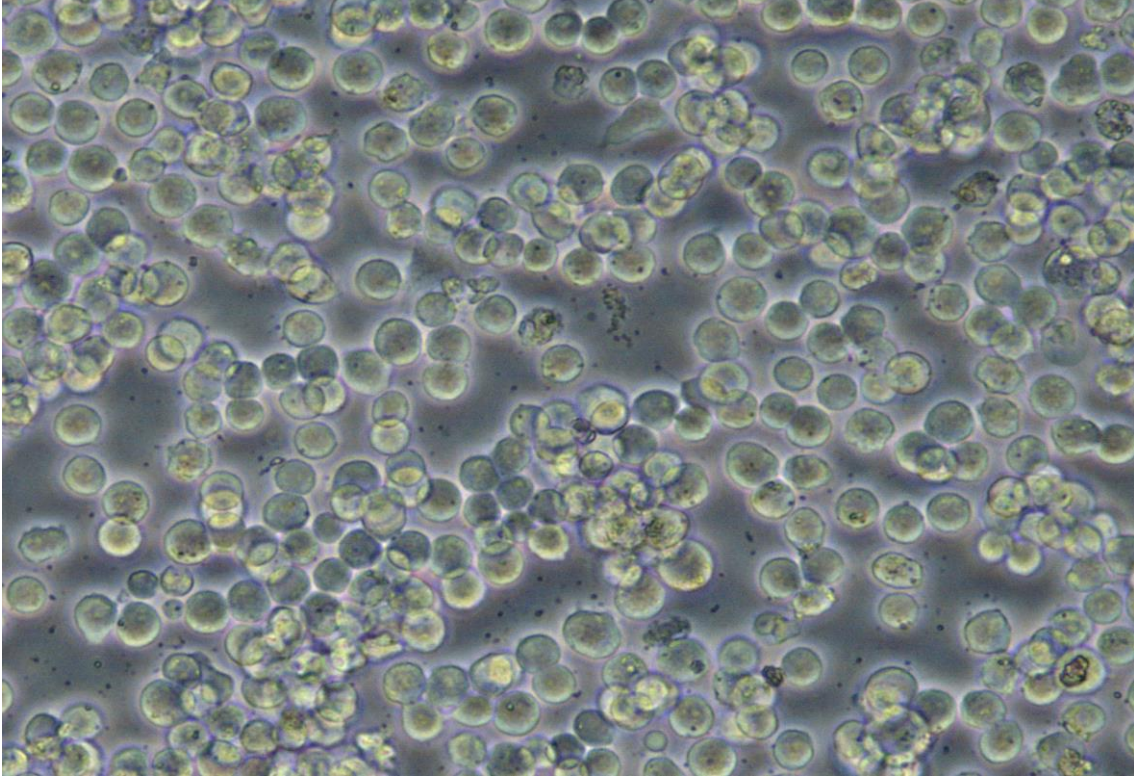
Reports | Lineage | Organism | **Taxonomy**

100 sequences selected

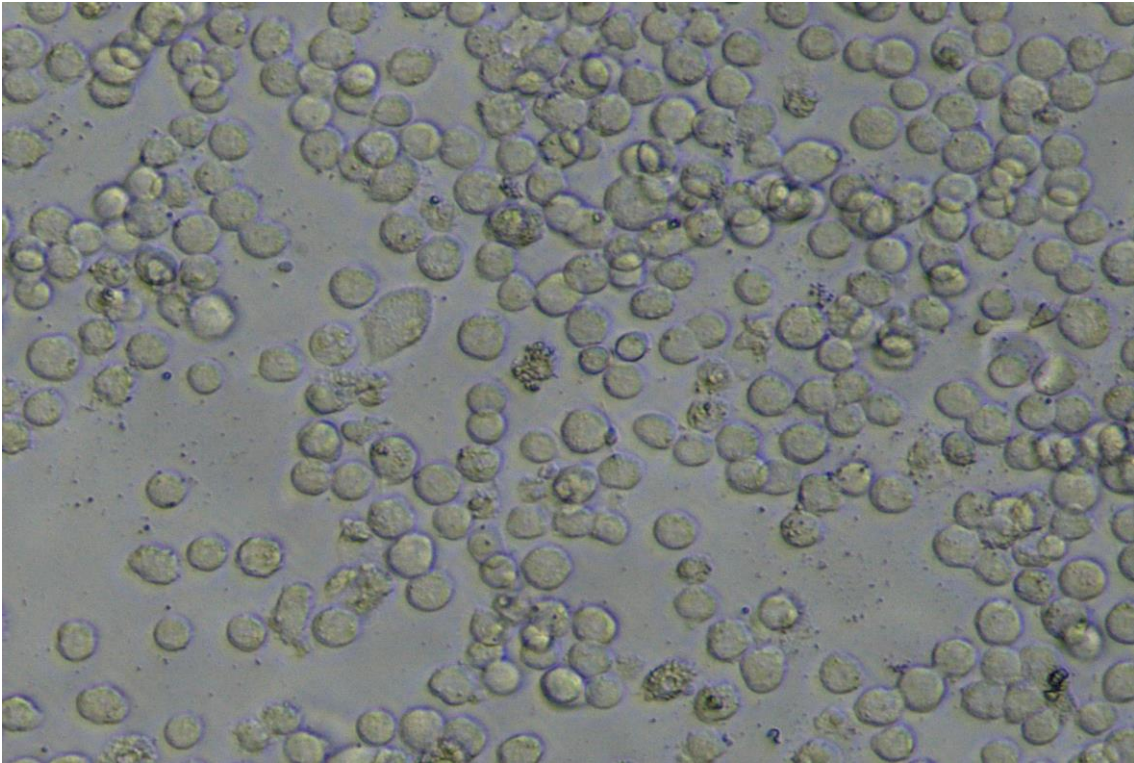
Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
Eukaryota	103	9	
Eukaryota	52	8	
Eukaryota	52	5	Saccharomyces cerevisiae hits
Saccharomyces cerevisiae	1	1	Saccharomyces cerevisiae YJM270 hits
Saccharomyces cerevisiae	1	1	Saccharomyces cerevisiae YJM1574 hits
Saccharomyces cerevisiae	1	1	Saccharomyces cerevisiae YJM1463 hits
Saccharomyces cerevisiae	1	1	Saccharomyces cerevisiae YJM1307 hits
unclassified Saccharomyces	2	2	
Saccharomyces sp.	1	1	Saccharomyces sp. hits
Saccharomyces sp.	1	1	Saccharomyces sp. YC9_13 hits
Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus	11	1	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus hits
uncultured fungus	34	1	uncultured fungus hits

Şekil EK 7.18. E1 kodlu izolatın taksonomik sonucu.

EK 8 – THP-1 Hücreleri Morfolojik Görünümleri



Şekil EK 7.19. PMA uygulaması ncesi THP-1 hücreleri.



Şekil EK 7.20. PMA ile uyarılmış THP-1 hücreleri (72 saat sonunda).

EK 9 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ece Konuralp
Doğum yeri : Malatya
Doğum tarihi : 15.03.1994
Medeni hali : Bekar
Yazışma adresi : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü 06800
Beytepe Ankara
Telefon : 0312 297 71 00
Elektronik posta adresi : ece_knrlp@hotmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
(2012-2017)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
(2017-2020)

İş Tecrübesi

08.2015 - 09.2015 : Kaunas University of Technology (Staj)
07.2016 - 08.2016 : Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı (Staj)

