

Kaktüs Armut (*Opuntia ficus-indica* L.) Meyvesinden Stres Tolerant Mayaların Moleküler Tanımlanması ve Depo Karbonhidrat Birikimleri

Tülay TURGUT GENÇ¹, Melih GÜNAY², Merve SIKIK³

¹ Biyoloji Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

² Biyoloji Anabilim Dalı, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

³ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

✉: tturgutgenc@comu.edu.tr



¹ 0000-0001-5074-3572



² 0000-0003-0336-3010



³ 0000-0003-2552-038X

Geliş (Received): 06.06.2022

Düzeltilme (Revision): 25.07.2022

Kabul (Accepted): 10.08.2022

ÖZ

Kaktüs armut bitkisi (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) yetiştiği coğrafya ve iklim koşulları nedeniyle sıcaklığa ve kuraklığa toleransı oldukça yüksek olan bir kaktüs türüdür. Bu kaktüs türünün bozulmaya başlayan kladotları ve meyveleri mayaların ve diğer mikroorganizmaların çoğalabilmesi için uygun alan oluşturmaktadır. Maya hücreleri stres koşullarında stres metaboliti olarak trehaloz ve glikojen biriktirir. Çalışmamızda kaktüs armut meyvesinden stres dirençli maya türlerinin izole edilerek moleküler yöntemlerle tanımlanması ve depo karbonhidrat birikimlerinin belirlenmesi amaçlandı. Termotolerant ve osmotolerant maya suşlarının moleküler tanımlanmasında 26S rDNA-D1/D2 gen bölgesinin dizi analizi kullanıldı. Stres dirençli maya suşlarının trehaloz ve glikojen birikimleri stres koşullarında enzimatik olarak belirlendi. İzole edilen *K. marxianus*, *K. lactis* ve *P. kudriavzevii* maya türlerine ait tüm maya suşlarının termotolerant ve osmotolerant maya suşları olduğu gözlemlendi. *K. marxianus* ve *K. lactis* maya türünde stres metaboliti olarak glikojenin *P. kudriavzevii* maya türünde ise trehalozun tercih edildiği belirlendi. Diğer izole edilen *A. pullulans*, *H. opuntiae* ve *P. kluyveri* türlerine ait maya suşları arasında stres toleransının ve depo karbonhidratın stresin derecesine ve çeşidine bağlı olarak değiştiği tespit edildi. İzole edilen *K. marxianus* ve *K. lactis* maya suşlarının süt ürünleri endüstrisinde, *P. kudriavzevii* maya suşlarının ise biyoetanol ve fermentasyon endüstrisinde kullanımı için uygun potansiyele sahip oldukları değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Isı Stresi, Osmotik Stres, rDNA, Stres Metaboliti

Molecular Identification of Stress Tolerant Yeasts Isolated from Cactus Pear Fruit (*Opuntia ficus-indica* L.) and Reserve Carbohydrate Accumulations

ABSTRACT

Cactus pear plant (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) is a type of cactus with a high tolerance to heat and drought due to the geographical and climatic conditions in which it grows. The fruits and decaying cladodes of the cactus pear plant provide a suitable environment for yeasts and other microorganisms to grow. Yeast cells accumulate trehalose and glycogen as a stress metabolite under stress conditions. Our study, it was aimed to isolate stress-tolerant yeast species from cactus pear fruit and identify them with molecular methods, and determine their storage carbohydrate accumulations. Sequence analysis of the 26S rDNA-D1/D2 gene region was used for molecular identification of thermotolerant and osmotolerant yeast strains. Trehalose and glycogen accumulations of stress-tolerant yeast strains were determined enzymatically under stress conditions. All isolated strains belonging to *K. marxianus*, *K. lactis* and *P. kudriavzevii* yeast species were determined as thermotolerant and osmotolerant. It was determined that *K. marxianus* and *K. lactis* yeast species preferred glycogen as a stress metabolite while *P. kudriavzevii* yeast species accumulated trehalose. Stress tolerance and the type and amount of reserve carbohydrate were found to be various among the other isolated yeast strains of *A. pullulans*, *H. opuntiae* and *P. kluyveri* depending on the degree and type of stress. It has been evaluated that the isolated *K. marxianus* and *K. lactis* yeast strains have the potential to be used in the dairy industry, while the *P. kudriavzevii* yeast strains are suitable for use in the bioethanol and fermentation industry.

Keywords: Heat Stress, Osmotic Stress, rDNA, Stress Metabolite

GİRİŞ

Cactaceae familyasına ait olan kaktüs armut bitkisi (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) meyveli bir kaktüs türüdür. Doğada 200-300 farklı türünün olduğu

bilinmektedir. Meksika kökenli olan bu bitki Amerika'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde, Güney Afrika'nın kurak ve yarı kurak bölgelerinde ve Akdeniz'in kıyı kesimlerinde dağılım göstermektedir

[1]. Ülkemizde ise Ege ve Akdeniz bölgesinde dağılım göstermekte olup Adana, Mersin, Antalya, Hatay, Osmaniye ve Muğla illerinde yetiştirilmektedir [2]. Halk arasında Hint inciri, Mısır inciri, Frenk inciri, Kilis inciri, babutsa, küreç yemişi, pabuç inciri, eşek inciri, sabbara, frencir, kaktüs meyvesi ve kaynanadili gibi farklı isimlere sahiptir. Birçok meyvenin doğal olarak yetişemediği kurak alanlarda yetişebilmesi ve kuraklık toleransının yüksek olması nedeniyle önemli bir tarımsal üründür. Bu kaktüsün meyveleri şekil, boyut ve renk bakımından değişken olup çok sayıda sert çekirdek içeren etli bir yapıdadır. Kaktüs armut meyvesi besleyici ve sağlığı geliştirici özellikleri nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Ağırıklı olarak taze meyve olarak tüketildiği gibi meyve suyu, reçel, marmelat ve şarap olarak da tüketilmektedir. Kaktüs armut meyvesi önemli bir şeker, mineral ve prebiyotik lif kaynağıdır. Ayrıca tokoferoller, arotenoidler, flavonoidler, fenolik asitler, taurin ve vitaminler (A, B6, C, E ve K) gibi biyolojik aktiviteye sahip çeşitli bileşikler içermektedir [3, 4, 5, 6]. Daha önce yapılan bilimsel çalışmalarda kaktüs armut meyvesinin içerdiği bileşiklerden dolayı anti-inflamatuar, anti-kanserojenik, anti-ülserojenik, hipokolesterolemik, hipoglisemik, hepatoprotektif ve bağışıklık uyarıcı özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [4,5, 6, 7, 8, 9]. Ülkemizde yüksek lif içeriğinden dolayı kilo kontrolünde ve bağırsak problemlerinde, meyve ve yapraklardaki yoğun su oranından dolayı cilt kurumalarına karşı nemlendirici olarak, kolesterol ve kan şekeri seviyesinin kontrolünde, vitamin içeriğinden dolayı üst solunum yolu hastalıklarının tedavisinde ve rahatlatıcı özelliğe sahip riboflavin içeriğinden dolayı stres koruyucu olarak kullanılmaktadır.

Kaktüs bitkisinin meyveleri ve bozulmaya başlayan kladotları mayaların çoğalabilmesi için uygun alan oluşturmaktadır. Çürüyen kaktüs meyve dokusunda bulunan mayalar genellikle diğer meyvelerde bulunan maya türleri ile benzer olmakla beraber sadece nekrotik kaktüs dokularından izole edilen türler kaktofilik mayalar olarak kabul edilmektedir [10, 11]. Mayalar kaktüs nekrotik dokularına *Drosophilla*, kuşlar ve böcekler gibi vektörler aracılığıyla taşınmaktadır. *Pichia cactophila*, *Candida (Ogataea) sonorensis*, *Clavispora opuntiae*, *Kodamaea nitidulidarum*, *Candida restingae*, *Wickerhamiella cacticola* ve *Sporopachydermia* kompleksinin türleri en yaygın kaktofilik türlerdir [11, 12, 13]. Ülkemizde kaktüs meyvesinden izole edilerek tanımlanan maya türleri ile ilgili bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Ağırıklı olarak kaktüs bitkisinin yetiştirilmesi ile ilgili koşullarının optimizasyonu, meyvenin biyokimyasal içeriği, fermentasyonu, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır [14, 15, 16, 17, 18, 19].

Mayalar farklı besin kaynaklarını kullanarak değişken ve ekstrem çevre koşullarında hayatta kalabilen canlılardır. Maya hücrelerinde depo karbonhidratları olan trehaloz ve glikojenin hücredeki miktarları hücrelerin fizyolojik durumuna, üreme aşamalarına ve üreme ortamlarına göre değişkenlik gösterir [20].

Trehaloz ve glikojen glikozda üremekte olan maya hücrelerinde logaritmik safhanın sonunda biriktirilmeye başlayıp durağan aşamada devam eder [21, 22]. Ancak ısı stresi ozmotik stres, oksidatif stres ve diğer çevresel stres koşullarında logaritmik aşamada da trehaloz ve glikojen birikimi gerçekleşir.

Stres koşullarında biriktirilen trehaloz ve glikojen stres sonrasında stresten çıkmak için enerji kaynağı olarak kullanılır. Örneğin maya hücrelerinde spor oluşumu ve olgunlaşması süresince biriktirilen glikojen enerji kaynağı olarak kullanılırken, trehaloz olgunlaşmış olan spor içinde bekletilerek spordan çıkışta enerji kaynağı olarak kullanılır [23]. Ayrıca stres koşullarında trehaloz proteinlerin konformasyonlarının bozulmasını engeller ve denatüre proteinlerin agregasyonunu baskılar. Böylece trehaloz hücre zarını ve hücre proteinleri stabilize ederek stres koruyucu etkisini gösterir [24]. Trehaloz sentezinde görev alan trehaloz 6 fosfat sentaz enzimi (Tps1p) heksokinaz (Hxk2p) enzim aktivitesini kontrol ederek glikolitik yolağı ve heksoz taşıyıcı proteinleri (Hxt1-14p) etkileyerek glikoz alımını kontrol eder. Böylece hücredeki enerji (ATP) seviyesini kontrol ederek depo karbonhidrat metabolizmasını ve stres cevabının oluşmasını düzenler [25, 26, 27]. Bu nedenlerden ötürü trehaloz ve glikojen stres koruyucu moleküller veya stres metabolitleri olarak bilinirler [24].

Kaktüs armut bitkisi stres toleransı yüksek olan bir bitki olduğu için barındırdığı mikrobiyal biota içerisinde stres toleransı yüksek mikroorganizmaların bulunması kuvvetli bir olasılıktır. Bu nedenle çalışmamızda kaktüs armut meyvesinden maya türlerinin izole edilerek sıcaklık ve ozmotik stres direnci yüksek olan maya türlerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır. Ayrıca stres direnci yüksek maya türlerinin stres koşullarında biriktirilen stres metabolitinin çeşidi ve miktarı belirlenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Maya İzolasyonu

Kaktüs armut meyve örnekleri olgunlaşma dönemi içerisinde 2019 yılının Ağustos ve Eylül aylarında Mersin ve Adana illerinden aseptik koşullarda toplandı. Çalışmada kullanılan kaktüs armut meyveleri, Mersin ilinin Karacailyas (36° 50' 55.7" K 34°43'48.0" D) ve Kumkuyu (36°30'33.1" K 34°11'53.5" D) ilçelerinden, Adana ilinin Büyükkapılı (36°52'22.1" K 35°33'53.3" D) ve Akpınar (36°49'18.5" K 35°36'28.4" D) ilçelerinden toplandı. Meyve örneklerinin tartımları yapılarak %2 sodyum sitrat çözeltisi içinde homojenize edildi. Daha sonra seri dilüsyonları hazırlanarak %0,25 sodyum propionat içeren YGC (40 gr/l Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar) katı besi ortamına ekimleri yapıldı ve 30 °C'de 2-3 gün inkübe edildi. Petrilerdeki maya kolonilerinin sayımı yapılarak koloni oluşturabilen birim değerleri (CFU/ml) hesaplandı. Koloni morfolojilerine göre farklı maya kolonileri rastgele seçilerek YPD (10 gr/l Yeast Extract, 20 gr/l Bacto-peptone, 20 gr/l Agar, %2 Dextrose) katı besi ortamına geçirildi ve 30 °C'de 2-3 gün inkübe edildi.

YPD besi ortamında üreme gösteren maya suşları %20 gliserol içerisinde -80 °C'de stoklandı.

Isı ve Ozmotik Stres Direnç Testi

Maya suşlarının stres dirençlerini belirleyebilmek için öncelikle izole edilen tüm maya suşlarının YPD zengin besi ortamında gecelik kültürleri oluşturuldu. Taze YPD sıvı kültürlerine gecelik kültürlerden maya hücreleri geçirilerek eksponensiyel aşamaya kadar ($OD_{600} \approx 1,0$) 30 °C'de sabit çalkalama ile (120 rpm) çoğaltıldı. Bu süre boyunca her iki saatte kültürlerden örnek alınarak OD_{600} değeri spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Ayrıca alınan örnekler YPD katı besi ortamına seri dilüsyon yapılarak ekildi ve CFU/ml değeri belirlendi. Daha sonra maya suşlarına ait CFU vs OD_{600} kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Kalibrasyon grafiği kullanılarak logaritmik aşamadaki ($OD_{600} \approx 0,5-0,6$) maya hücrelerinden 5 µl'de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 hücre olacak şekilde seyreltmeler yapılarak YPD katı besi ortamına ekimleri yapıldı. Sıcaklık testi için maya hücreleri YPD katı besi ortamında 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C ve 42 °C'de 2-3 gün inkübe edildi. Ozmotik strese karşı dirençlerini belirleyebilmek için YPD katı besi ortamına farklı tuz konsantrasyonları (0,2M, 0,4M, 0,6M, 0,8M, 1,0M, 1,2M ve 1,4M NaCl) ilave edildi ve maya hücreleri 30 °C'de 2-3 gün inkübe edildi [28]. Testler her maya suşu için her tekrarda üç set olarak üç kez tekrar edildi.

PCR Amplifikasyonu ve Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi

Maya suşlarının genomik DNA izolasyonu daha önce kullanılan yöntem ile yapıldı [29]. 26S rDNA-D1/D2 gen bölgesinin PCR amplifikasyonu için NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') ve NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primerleri kullanılarak daha önce belirtilen PCR koşullarında gerçekleştirildi [30]. Benzer şekilde ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonu için ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak daha önce belirtilen PCR koşullarında amplifikasyonları yapıldı [31]. Elde edilen PCR ürünleri %1.5 agaroz jelde elektroforez edilerek ampikonların uzunluğu Gel-Pro Analyzer v4.0 programı kullanılarak belirlendi. 26S rDNA-D1/D2 ve ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgelerine ait ampikonların pürifikasyonları yapılarak ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesine ait amplifikasyon ürünlerinin Hinfl, HaeIII ve HhaI restriksiyon enzimleri ile üretici firmanın önerdiği koşullarda restriksiyon kesimleri gerçekleştirildi. Restriksiyon ürünleri %1,5 agaroz jelde elektroforez edilerek bantların uzunluğu Gel-Pro Analyzer v4.0 programı kullanılarak belirlendi.

Dizi Analizi ve Filogenetik Analizler

Sıcaklık ve ozmotik stres direnci yüksek olan maya suşlarının restriksiyon profilleri kullanılarak farklı profile sahip en az bir maya suşu DNA dizi analizi için rastgele seçildi. Seçilen maya suşlarının 26S rDNA gen

bölgesine ait PCR ürünleri DNA dizi analizi için firmaya gönderildi. Firma tarafından gönderilen DNA dizilerinin benzerlik analizleri (DNA Sequence Similarity Analysis) NCBI (National Center for Biotechnology Information) servisinin sunduğu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analiz programı kullanılarak yapıldı ve analizi yapılan suşlarla en yüksek homoloji gösteren türler belirlendi. 26S rDNA gen bölgesine ait DNA dizileri MEGA-X programı altında sunulan ClustalW v1.6 parametresi kullanılarak hizalandı. Daha sonra tanımlanan maya türlerinin filogenetik analizleri MEGA-X programı altında yer alan Maksimum parsimoni ağacı 1000 tekrarlı bootstrap parametresi ile oluşturuldu. Filogenetik analizlerde türler arası uzaklıkların belirlenebilmesi için *Schizosaccharomyces pombe* maya türü dış grup olarak seçildi.

Trehaloz ve Glikojen Birikimi

Maya hücreleri YPD sıvı kültürlerinde sabit çalkalama ile (120 rpm) 30 °C'de eksponensiyel aşamaya kadar ($OD_{600} \approx 0,5-0,6$) üretildi. Bu aşamada maya kültürleri 6 kısma ayrıldı ve birinci kısımdaki hücre kültürü içindeki maya hücreleri stres öncesi trehaloz ve glikojen birikimini belirlemek için kullanıldı. İkinci kısımdaki maya kültürleri 37 °C'de ve üçüncü kısımdaki maya hücreleri 40 °C'de sabit çalkalama ile 4 saat inkübe edildi. Dördüncü, beşinci ve altıncı kısımdaki hücre kültürleri steril distile su ile yıkandıktan sonra sırasıyla 0,8M, 1,0M ve 1,2M NaCl içeren taze YPD sıvı kültürlerine aktarıldı ve 30 °C'de sabit çalkalama ile 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası maya hücrelerinin trehaloz ve glikojen birikimleri daha önce kullanılan yöntemle belirlendi [32]. Maya hücreleri 0,25M Na_2CO_3 içinde süspansiyon edilerek 2 saat kaynatıldıktan sonra 150 µl 1M asetik asit ve 600 µl 0,2M sodyum asetat pH 5.2 ilave edilerek iki kısma ayrıldı. Birinci kısımdaki hücre lizatının üzerine 3mU trehalaz enzimi (Sigma, T8778) ilave edilerek 37 °C'de 18 saat ve ikinci kısımdaki hücre lizatının üzerine 1U/ml amiloglikozidaz enzimi (Sigma, 10115) ilave edilerek 57 °C'de 18 saat inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan glikoz miktarı glikoz-oksidadz-peroksidaz (GOD-POD) kiti (Fluitest®-GLU, Biocon, Almanya) kullanılarak belirlendi. Standart glikoz çözeltisine göre glikoz konsantrasyonları hesaplanarak elde edilen sonuçlar maya yaş ağırlığına göre normalize edildi ve miligram hücrede biriktirilen mikrogram glikoz olarak (µg glikoz/mg yaş maya ağırlığı) olarak verildi.

İstatistik Analizler

Tüm testler en az üç tekrarlı ve her tekrarda üç set olacak şekilde gerçekleştirildi. Veri analizi SPSS (v. 10.0) istatistik programında Bağımsız-Örneklem T-testi %95 güven seviyesi kullanılarak yapıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Termotolerant ve Ozmotolerant Mayaların Belirlenmesi

Hint inciri olarak ta bilinen kaktüs armudu Akdeniz ve Ege bölgelerinin kıyı kesimlerinde doğal olarak yetişen kuraklığa ve sıcaklığa dirençli bir bitki türüdür. Çalışmamızda kaktüs armut meyvesi Adana ve Mersin illerinden olgunlaşma döneminde toplanarak maya izolasyonunda kullanıldı. Farklı koloni morfolojisi (formu, kenarı, tepesi, yüzeyi ve rengi) gösteren 66 maya suşu izole edildi. Kaktüs armut meyvesinde maya yoğunluğu $2,1 \times 10^6$ CFU/ml olarak hesaplandı.

İzole edilen maya suşlarının stres direncini belirleyebilmek için eksponensiyel aşamaya kadar üretilen tüm maya suşlarından 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 hücre gelecek şekilde petrilere ekimleri yapıldı. Isı stresi testi için maya hücreleri zengin besi ortamında farklı sıcaklıklarda inkübe edildi. 37 °C ve üzerindeki inkübasyon sıcaklıklarında 10^3 , 10^2 ve 10^1 hücre sayısında üreme gösteren maya suşları ısı stresine dirençli maya suşları olarak değerlendirildi. Isı stresi sonrası tüm maya suşları 25 °C ve 30 °C'de %100 üreme gösterdikleri için Tablo 1'de yalnızca 30 °C sonuçları verildi. İzole edilen maya suşlarından yalnızca 22 tanesi 37 °C ve üstündeki sıcaklıklarda en az %75 üreme gösterirken 19 maya suşunun bu sıcaklıklarda üreme göstermediği belirlendi. 37 °C'de %75 üreme gösteren 31 maya suşundan 3 tanesinin 40 °C'de %75 ve 42 °C'de %25 üreme gösterdiği, 6 maya suşunun ise 40 °C'de %50 üreme gösterirken 42 °C'de üreme göstermediği belirlendi. 37 °C'de %50 ve altında üreme

gösteren 16 maya suşundan yalnızca 12 tanesinin 42 °C'de %25 üreme gösterebildiği diğer 4 maya suşunun ise 40 °C ve 42 °C'de üreme gösteremediği kaydedildi.

Ozmotik stres testi için maya hücreleri farklı tuz konsantrasyonları içeren zengin besi ortamında 30 °C'de inkübe edildi. 0,8M ve üzerindeki tuz konsantrasyonlarında 10^3 , 10^2 ve 10^1 hücre sayısında üreme gösteren maya suşları ozmotik strese dirençli maya suşları olarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçları Tablo 2'de verildi. Tüm maya suşlarının düşük tuz konsantrasyonunda (0,2M ve 0,4M) %75 ve üzerinde üreme gösterdikleri belirlendi. İzole edilen 9 maya suşunun 0,8M ve üstündeki tuz konsantrasyonlarında en az %50 üreme göstermesinden dolayı ozmotik stres direnci yüksek maya suşları olarak değerlendirildi. 0,8M tuz konsantrasyonunda %50 üreme gösteren 54 maya suşundan 42 tanesinin 1,0M ve üzerindeki tuz konsantrasyonlarında %25, 12 maya suşunun ise 1,2M ve üzerindeki tuz konsantrasyonlarında %25 üreme gösterdiği gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre izole edilen 66 maya suşundan 25 tanesinin (P13, P15, P20, P24, P29, P33, P35, P37, P38, P39, P43, P44, P45, P46, P47, P48, P49, P55, P57, P61, P62, P63, P64, P65 ve P66) ısı stresine karşı dirençli, 11 maya suşunun (P15, P27, P29, P31, P33, P35, P36, P37, P39, P55 ve P57) ozmotik strese karşı dirençli ve 8 maya suşunun (P15, P29, P33, P35, P37, P39, P55 ve P57) hem ısı hem de ozmotik strese karşı dirençli olduğu belirlendi. Isı stresi ve ozmotik stres sonuçlarına göre 28 maya suşu dirençli maya suşları olarak değerlendirildi.

Tablo 1. Maya suşlarının ısı stresinde üreme sonuçları

Maya Suşları	İnkübasyon Sıcaklığı			
	30°C	37°C	40°C	42°C
P13, P15, P20, P24, P33, P38, P39, P43, P44, P45, P46, P47, P48, P49, P55, P57, P61, P62, P63, P64, P65, P66	++++	+++	+++	+++
P29, P35, P37	++++	+++	+++	+
P11, P12, P36, P40, P42, P53	++++	+++	++	-
P3, P8, P22, P26, P27, P28, P30, P31, P32, P34, P41, P60	++++	++	+	-
P4, P21, P25, P59	++++	+	-	-
P1, P2, P5, P6, P7, P9, P10, P14, P16, P17, P18, P19, P23, P50, P51, P52, P54, P56, P58	++++	-	-	-

10^{-10^2} hücre: +++++; 10^3 hücre:+++; 10^4 hücre:++, 10^5 hücre:+

Tablo 2. Maya suşlarının ozmotik streste üreme sonuçları

Maya Suşları	Tuz Konsantrasyonu						
	0,2M	0,4M	0,6M	0,8M	1,0M	1,2M	1,4M
P15, P27, P29, P31, P33, P35, P36, P37, P39	++++	+++	+++	+++	++	++	++
P55, P57, P64	++++	+++	+++	+++	+++	+	+
P34, P38, P40, P42, P43, P44, P45, P46, P47, P48, P49, P53	++++	+++	+++	++	++	+	+
P1 – P14, P16 - P26, P28, P30, P32, P41, P50, P51, P52, P54, P56, P58, P59, P60, P61, P62, P63, P65, P66	++++	+++	++	++	+	+	+

10^{-10^2} hücre: +++++; 10^3 hücre:+++; 10^4 hücre:++, 10^5 hücre:+

Maya Türlerinin Tanımlanması ve Filogenetik Analizi

Maya türlerinin suşları arasında fizyolojik özellikler ve stres toleransları farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda stres direnci yüksek olan maya suşlarına ilave olarak diğer maya suşlarının da genomik DNA izolasyonları yapılarak ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin Hinfl, HaeIII ve HhaI enzimleri ile kesim sonuçlarına göre restriksiyon profilleri oluşturuldu. Böylece aynı türe ait maya suşlarının stres toleransları arasındaki farklılıkların belirlenmesi hedeflendi. Maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin restriksiyonu sonrasında 6 farklı restriksiyon profili olduğu ve stres direnci yüksek olan maya suşlarının 5 farklı profil içinde yer aldıkları gözlemlendi (Tablo 3). Stres direnci yüksek 28 maya suşundan 16 tanesinin birinci profili, 6 tanesinin ise ikinci restriksiyon profilini oluşturduğu gözlemlendi. Birinci restriksiyon profilinde yer alan 12 maya suşu ve ikinci profile bulunan tüm maya suşları 26S rDNA gen bölgesinin DNA dizi analizi için seçildi. Üçüncü, dördüncü ve beşinci restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarından stres direnci yüksek olan P20 maya suşu üçüncü profili, P45 maya suşu dördüncü profili ve P64 maya suşu beşinci profili temsilen dizi analizi için seçildi.

Tablo 3. ITS PCR-RFLP sonuçları

Maya Suşları	Restriksiyon Enzimleri		
	Hinfl	HaeIII	HhaI
P13, P15, P24, P29, P33, P35, P37, P44, P46, P48, P49, P55, P57, P61, P62, P66	225-180-80	400-150	225-210-80
P38, P39, P43, P47, P63, P65	275-200-125-80	650-100	320-200-190
P1, P2, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P14, P16, P17, P18, P19, P20 , P23, P50, P51, P52, P54, P56, P58	280-180-80	450-150	200-190-100
P21, P28, P30, P32, P34, P36 , P41, P45 , P53, P60	350-180-150	500-100	310-300
P3, P11, P12, P22, P26, P27, P31 , P40, P42, P64	250-200	375-100	180-95-90
P25, P59	215-140-140-100	300-200-100	290-220-90

Strese dirençli maya suşları koyu-kalın olarak ve 26S rDNA gen bölgesi sekansı yapılan maya suşları altı çizili olarak gösterildi.

Diğer restriksiyon profilinde stres direnci yüksek maya suşu bulunmadığı için bu profilden DNA dizi analizi için maya suşu seçilmedi. Ancak altıncı restriksiyon profilinde yer alan P25 ve P59 maya suşları koloni morfolojisine (koloni formuna, koloni kenarına, koloni tepesine, koloni yüzeyine ve koloni rengine göre) ve ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin restriksiyon analizine göre *Rhodotorula glutinis* maya türü olarak değerlendirildi.

Stres direnci yüksek olan 28 maya suşunun 21 tanesi 26S rDNA gen bölgesinin DNA dizi analizi ve tür tanımlaması için kullanıldı. Elde edilen DNA dizilerinin benzerlik analizleri NCBI servisinin sunduğu BLAST analiz programı kullanılarak yapıldı ve analizi yapılan suşlarla en yüksek homoloji gösteren türler belirlenerek Tablo 4'te verildi. Elde edilen tür tanımlama sonuçlarına göre birinci restriksiyon profilinde yer alan 12 maya suşu (P13, P15, P24, P33, P44, P46, P48, P49, P57, P61, P62 ve P66) *Pichia kudriavzevii* maya türü olarak tanımlandı. İkinci restriksiyon profilini oluşturan 6 maya suşundan bir tanesi (P43) *Kluyveromyces lactis* olarak diğer beş maya suşu (P38, P39, P47, P63 ve P65) ise *Kluyveromyces marxianus* olarak belirlendi. Üçüncü restriksiyon profilinde yer alan P20 maya suşu *Aureobasidium pullulans*, dördüncü profile yer alan P45 maya suşu *Hanseniaspora opuntiae* ve beşinci profile yer alan P64 maya suşu *Pichia kluyveri* olarak tanımlandı. Bu sonuçlara göre birinci profile yer alan 16 maya suşu *P. kudriavzevii* olarak, üçüncü profile yer alan 22 maya suşu *A. pullulans* olarak, dördüncü profile yer alan 10 maya suşu *H. opuntiae* olarak ve beşinci profile yer alan 10 maya suşu *P. kluyveri* olarak değerlendirildi. Böylece kaktüs armut meyvesinden izole edilerek tanımlanan maya türlerinin yüzdelik dağılımı *A. pullulans* için %33, *P. kudriavzevii* için %24, *P. kluyveri* için %15, *H. opuntiae* için %15, *K. marxianus* için %8, *R. glutinis* için %3 ve *K. lactis* için %2 olarak belirlendi.

Tablo 5. 26S rDNA bölgesi kullanılarak tanımlanan maya türleri ve Genbank Erişim Kodları

Maya Suşu	Tanımlanan Maya Türü (Referans Erişim Numarası)	GenBank Erişim Kodu
P13	<i>P. kudriavzevii</i> (MH545928.1)	MW832516
P15	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832517
P20	<i>A. pullulans</i> (JX462671.1)	MW832518
P24	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832519
P33	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832520
P38	<i>K. marxianus</i> (KY108103.1)	MW832521
P39	<i>K. marxianus</i> (KY108106.1)	MW832522
P43	<i>K. lactis</i> (KY108006.1)	MW832523
P44	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832524
P45	<i>H. opuntiae</i> (KY107820.1)	MW832525
P46	<i>P. kudriavzevii</i> (JX645718.1)	MW832526
P47	<i>K. marxianus</i> (KC544466.1)	MW832527
P48	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832528
P49	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832529
P57	<i>P. kudriavzevii</i> (MH545928.1)	MW832530
P61	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832531
P62	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832532
P63	<i>K. marxianus</i> (KY108106.1)	MW832533
P64	<i>P. kluyveri</i> (KY108826.1)	MW832534
P65	<i>K. marxianus</i> (KY108106.1)	MW832535
P66	<i>P. kudriavzevii</i> (KY108850.1)	MW832536

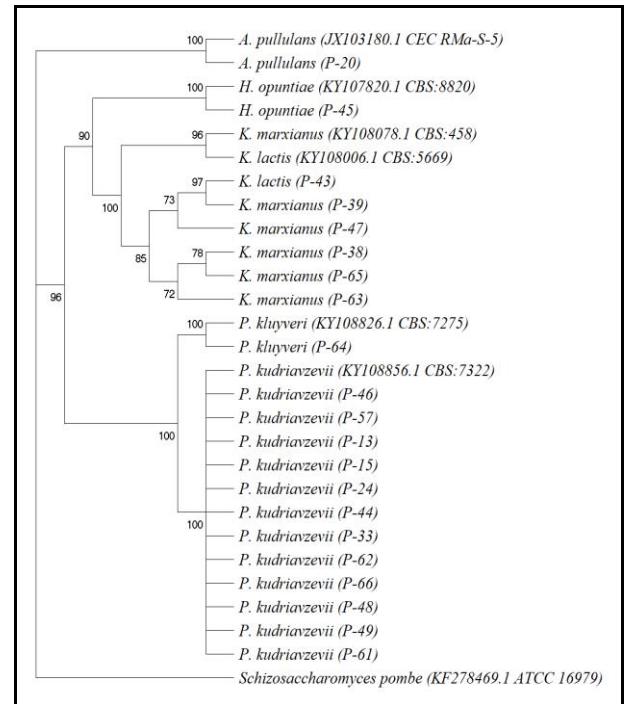
Endüstriyel olarak önemli olan *Saccharomyces cerevisiae* maya türüne ilave olarak diğer stres toleransı yüksek non-*Saccharomyces* maya türlerinin izolasyonu ve tanımlanması oldukça önemlidir. Özellikle *Pichia*,

Debaryomyces ve *Kluyveromyces* cinslerine ait maya türlerinin farklı streslere karşı toleransının yüksek olduğu bilinmektedir [33, 34, 35, 36]. *K. marxianus* maya suşlarının yüksek sıcaklıklarda etanol üretme kapasitesine sahip olmalarından dolayı *K. marxianus* endüstriyel olarak önemli bir maya türüdür [41, 42, 43, 44, 45]. Benzer şekilde *P. kudriavzevii* maya türünün de ısı direncinin ve etanol üretim kapasitesinin yüksek olması sebebiyle son yıllarda oldukça önem kazanan bir maya türüdür [42, 43, 44]. Çalışmamızda da izole edilen *K. marxianus*, *K. lactis* ve *P. kudriavzevii* maya türlerine ait tüm maya suşları ısı ve ozmotik strese karşı toleranslı olduklarından endüstriyel potansiyele sahip maya suşları olarak değerlendirildi.

Pullulan polisakkaritinin üretiminde yaygın olarak kullanılan *A. pullulans* oldukça geniş bir dağılım alanına sahip olup poliektremotolerant maya türüdür [45, 46, 47, 48]. *A. pullulans* maya türüne ait suşlar yüksek tuz içeren ortamlarda, asidik ve bazik ortamlarda ve düşük sıcaklıklarda hayatta kalabildiği için stres dirençli maya türü olarak bilinmektedir [49, 50, 51, 52]. Ancak çalışmamızda izole edilerek *A. pullulans* olarak tanımlanan 22 maya suşundan bir maya suşu (P20) hariç diğer maya suşlarının ısı stresine ve ozmotik strese dirençli olmadıkları gözlemlendi. Ağırlıklı olarak fermentasyon proseslerinde kullanılan *H. opuntiae* etanol direnci yüksek olan bir maya türüdür [53, 54]. *S. cerevisiae* gibi *H. opuntiae* maya türü de Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (The European Food Safety Authority, EFSA) tarafından güvenli (Qualified Presumption of Safety, QPS) maya türü olarak değerlendirilmektedir [55]. *H. opuntiae* olarak tanımlanan 10 maya suşundan P45 maya suşunun ısı stresine ve P36 maya suşunun ozmotik strese karşı direncinin yüksek olduğu belirlendi. Diğer *H. opuntiae* maya suşlarının ise ısı stresine ve ozmotik strese karşı dirençlerinin değişken ve düşük seviyede olduğu gözlemlendi. Bezer şekilde *P. kluyveri* olarak tanımlanan P64 maya suşunun ısı stresine, P27 ve P31 maya suşlarının ozmotik strese karşı dirençli oldukları gözlemlendi. Diğer *P. kluyveri* olarak tanımlanan maya suşlarından ise ısı stresine ve ozmotik strese karşı dirençlerinin düşük veya orta seviyede ve değişken olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlara göre stres toleransının *K. marxianus* ve *P. kudriavzevii* maya türlerinin suşları arasında farklılık göstermediği, *A. pullulans*, *H. opuntiae* ve *P. kluyveri* maya türlerinin suşları arasında ise farklılık gösterdiği belirlendi.

Moleküler olarak tanımlanan *K. marxianus*, *K. lactis*, *P. kudriavzevii*, *A. pullulans*, *H. opuntiae* ve *P. kluyveri* maya türlerine ait 26S rDNA gen bölgelerinin filogenetik analizleri MEGA-X programı altında sunulan ClustalW v1.6 parametresi kullanılarak yapıldı. Elde edilen Maximum parsimoni filogenetik ağacı Şekil 1'de verildi. Filogenetik analizlerde türler arası uzaklıkların belirlenebilmesi için *S. pombe* maya suşu dış grup olarak seçildi. Elde edilen ağaç uzunluğu 625, tüm nükleotid bölgelerinin CI (Consistency Index) değeri 0,713, RI (Retention Index) değeri 0,876, RC

(Rescaled Index) değeri 0,625 olarak belirlendi. Ayrıca maksimum parsimoni ağacına ait parsimony informatif bölgeler için iCI (Consistency Index) değeri 0,680, iRI (Retention Index) değeri 0,876 ve iRC (Rescaled Index) değeri 0,596 olarak hesaplandı [56]. Maksimum parsimoni ağacı bootstrap metodu 1000 tekrarlı olarak ve Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algoritması kullanılarak oluşturuldu. Elde edilen bootstrap değerleri ağaçta verilirken, 50'nin altında olan bootstrap değerleri gösterilmedi [57, 58]. Maksimum parsimony ağacına göre maya suşları iki ana klada ayrıldı. Birinci klada yer alan *A. pullulans* maya suşunun diğer tüm maya suşlarından ayrıldığı gözlemlendi. İkinci klada yer alan 20 maya suşundan 13 tanesinin *Pichia* cinsine ve 6 tanesinin *Kluyveromyces* cinsine ait olduğu, *H. opuntiae* maya suşunun ise *Kluyveromyces* cinsinden ayrıldığı tespit edildi.



Şekil 1. Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı. MP ağacı, MEGA-X programı içerisinde yer alan filogenetik analiz programında, Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algoritması ve bootstrap metodu kullanılarak, 1000 tekrarlı olarak oluşturuldu. %50'nin altında kalan bootstrap değerleri gösterilmedi.

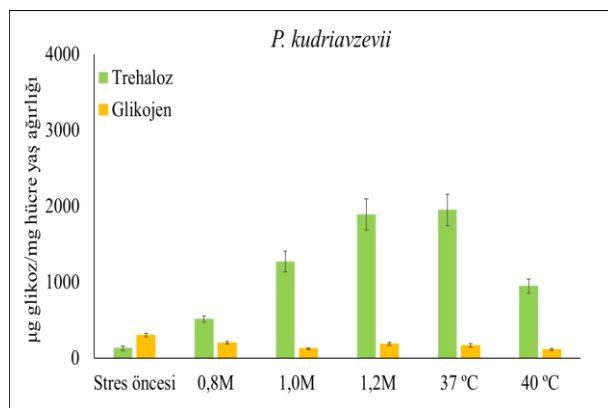
Stres Direnci Yüksek Mayaların Trehaloz ve Glikojen Birikimleri

Maya hücrelerinin stres koşullarında stres metaboliti olarak trehaloz ve glikojen biriktirmesinden dolayı çalışmamızda ısı stresine ve ozmotik strese dirençli maya türlerinin biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarı belirlendi. Her maya türünü temsilen bir maya suşu seçilerek logaritmik aşamaya kadar stres içermeyen ortamda üretilerek ısı stresi için 37 °C ve 40 °C'ye ve ozmotik stres için 0,8M, 1,0M ve 1,2M tuz içeren üreme

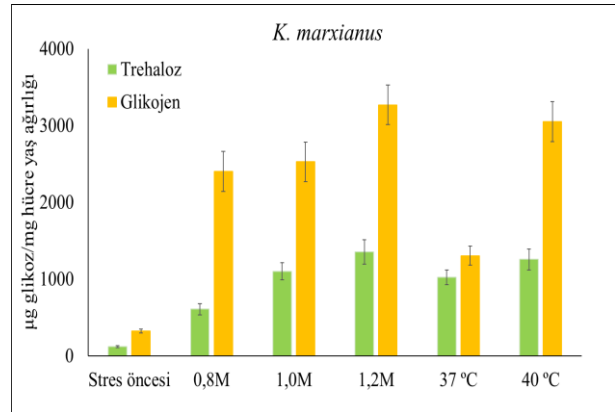
ortamlarına geçirildi. Stres koşullarında 4 saat üretilen maya hücrelerinin depo karbonhidrat miktarı enzimatik olarak belirlendi.

P. kudriavzevii maya suşunun (P15) stres koşullarında belirlenen trehaloz ve glikojen miktarı Şekil 2’de verildi. Stres içermeyen koşullarda *P. kudriavzevii* maya suşunda ölçülen glikojen miktarının trehaloz miktarından fazla olduğu ($p<0,05$), stres koşullarında ise trehaloz miktarında anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Maya hücrelerinin trehaloz miktarında 37 °C’de 15 kat 40 °C’de 7 kat, 0,8M tuz konsantrasyonunda 4 kat, 1,0M tuz konsantrasyonunda 10 kat ve 1,2M tuz konsantrasyonunda 15 kat artış ($p<0,05$) gözlemlendi. Hücre içinde biriktirilen trehalozun ozmotik stresin oranına paralel olarak arttığı ısı stresinin oranına göre ise azaldığı tespit edildi. Glikojen miktarındaki anlamlı azalma ($p<0,05$) ise stres koşullarında glikojen sentezleyemediği, aksine glikojeni yitirdiği gözlemlendi. *P. kudriavzevii* maya türünün stres metaboliti olarak trehalozu tercih ettiği belirlendi.

K. marxianus (P39) ve *K. lactis* (P43) maya suşlarının stres koşullarında biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarı Şekil 3 ve Şekil 4’te verildi. Stres içermeyen koşullarda *K. marxianus* ve *K. lactis* maya suşlarının biriktirdiği glikojen miktarının trehaloz miktarından fazla olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi. Stres koşullarında *K. marxianus* maya suşunun trehaloz ve glikojen miktarında 5 ile 10 kat arasında anlamlı bir artış ($p<0,05$) olduğu belirlendi. *K. marxianus* maya hücrelerinin 37 °C’de biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarının birbirine yakın seviyede olduğu gözlemlenirken 40 °C’de glikojen miktarının trehaloz miktarından yaklaşık 2 kat fazla olduğu ($p<0,05$) belirlendi. Ozmotik stres koşullarında *K. marxianus* maya hücrelerinin glikojen birikiminin trehaloz birikiminden 2-4 kat fazla ($p<0,05$) olduğu gözlemlendi. *K. marxianus* maya hücrelerinde hücre içinde biriktirilen trehaloz ve glikojen miktarının uygulanan stresin oranına paralel olarak arttığı tespit edildi. *K. marxianus* maya suşunun stres metaboliti olarak trehalozu ilave ağırlıklı glikojen biriktirdiği belirlendi.

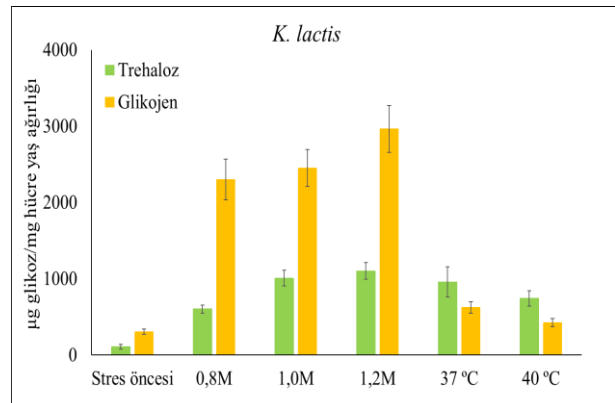


Şekil 2. Stres koşullarında *P. kudriavzevii* (P15) maya türünün trehaloz ve glikojen birikimi



Şekil 3. Stres koşullarında *K. marxianus* (P39) maya türünün trehaloz ve glikojen birikimi

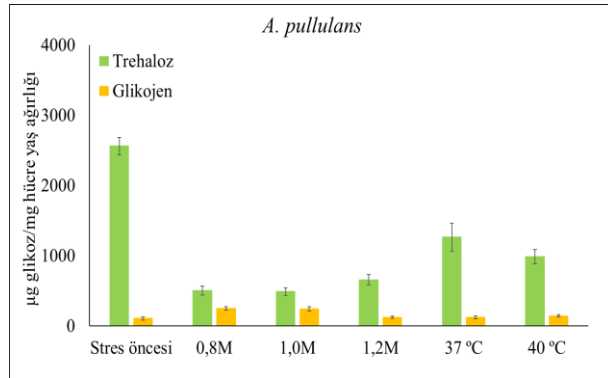
K. lactis maya hücrelerinin trehaloz miktarının 37 °C’de 9 kat ve 40 °C’de 7 kat arttığı ($p<0,05$) gözlemlenirken glikojen miktarının 37 °C’de 2 kat arttığı 40 °C’de ise değişmediği ($p<0,05$) belirlendi. Ozmotik stres koşullarında ise *K. lactis* maya hücrelerinin trehaloz ve glikojen birikiminin 5 ile 10 kat arasında arttığı ($p<0,05$) gözlemlendi. *K. lactis* maya hücrelerinin ısı stresinde trehaloz miktarının glikojen miktarından fazla olduğu, ozmotik strese ise glikojen miktarının trehaloz miktarından fazla olduğu belirlendi. Bu durum stresin çeşidine göre *K. lactis* maya hücrelerinin biriktirdiği stres metabolitinin değiştiğini göstermektedir.



Şekil 4. Stres koşullarında *K. lactis* (P43) maya türünün trehaloz ve glikojen birikimi

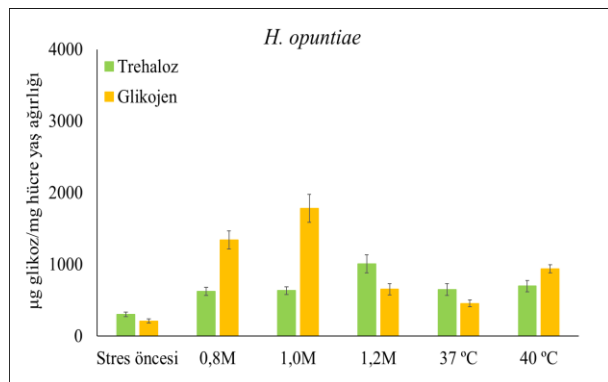
A. pullulans (P20) maya suşunun stres koşullarında biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarı Şekil 5’te verildi. Stres içermeyen koşullarda *A. pullulans* maya suşunun biriktirdiği trehaloz miktarının glikojen miktarından yaklaşık 24 kat fazla olduğu ($p<0,05$) stres koşullarında ise anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Logaritmik aşamada biriktirilen trehalozun %50’sinin ısı stresinde ve yaklaşık %80’nin ozmotik stres koşullarında yıkıldığı, glikojen miktarının ise değişmediği gözlemlendi. Bu durum *A. pullulans* maya

hücrelerinin stres koşullarında trehaloz ve glikojen dışında farklı bir stres metabolitini (örneğin gliserol) biriktirebileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5. Stres koşullarında *A. pullulans* (P20) maya türünün trehaloz ve glikojen birikimi

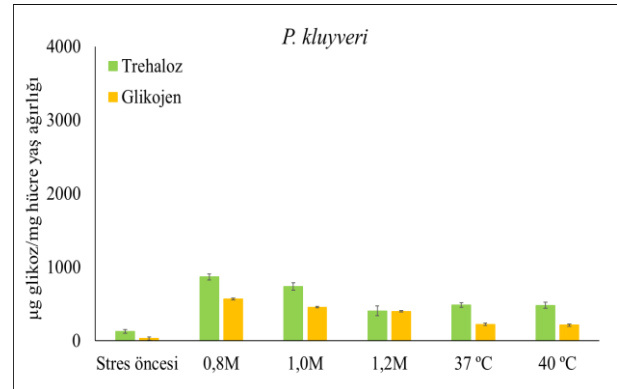
H. opuntiae (P45) maya suşunun stres koşullarında biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarı Şekil 6'da verildi. Stres içermeyen koşullarda *H. opuntiae* maya suşunun trehaloz ve glikojen miktarları arasında anlamlı bir fark olmadığı, stres koşullarında ise trehaloz ve glikojen miktarında en az 2 kat artış ($p < 0,05$) olduğu belirlendi. Isı stresinde maya hücrelerinin trehaloz birikiminin 3 kat glikojen birikiminin ise 2 ile 4 kat arasında arttığı, sıcaklık arttıkça biriktirilen depo karbonhidrat çeşidinin trehalozdan glikojene doğru kaydığı gözlemlendi. Maya hücrelerinin 0,8M ve 1,0M tuz konsantrasyonundaki trehaloz miktarının glikojen miktarından 2-3 kat daha az olduğu ($p < 0,05$), 1,2M tuz konsantrasyonunda ise glikojen miktarının azaldığı trehaloz miktarının arttığı belirlendi. Bu durum *H. opuntiae* maya hücrelerinde stresin miktarına ve çeşidine göre trehaloz ve glikojen birikiminin değiştiğini göstermektedir.



Şekil 6. Stres koşullarında *H. opuntiae* (P45) maya türünün trehaloz ve glikojen birikimi

P. kluyveri (P64) maya suşunun stres koşullarında biriktirdiği trehaloz ve glikojen miktarı Şekil 7'de

verildi. Stres içermeyen koşullarda *P. kluyveri* maya suşunun içerdiği trehaloz miktarının glikojen miktarından fazla olduğu ($p < 0,05$), stres koşullarında ise trehaloz ve glikojen miktarında anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. Isı stresinde maya hücrelerinin trehaloz birikiminin glikojen birikiminden 2 kat fazla olduğu ($p < 0,05$), ozmotik stres koşullarında ise stresin yoğunluğuna göre trehaloz birikiminin azaldığı ($p < 0,05$) glikojen birikiminde ise anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.



Şekil 7. Stres koşullarında *P. kluyveri* (P64) maya türünün trehaloz ve glikojen birikimi

SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı fizyolojik streslere karşı toleransı yüksek olan maya türleri gıda endüstrisinde, fırıncılıkta, ilaç ve alkollü içecek üretiminde kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* Avrupa Gıda Güvenliği (European Food Safety Authority, EFSA) ve Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration, FDA) tarafından güvenli olarak tanımlanan (Generally Recognized As Safe, GRAS) ve en yaygın kullanılan maya türüdür. *S. cerevisiae* maya türü dışında strese dayanıklı non-*Saccharomyces* maya türlerinin tanımlanması ve endüstriyel alanda kullanılması tür çeşitliliği açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda stres toleransı yüksek olan kaktüs armut bitkisinden sıcaklık ve ozmotik stres direnci yüksek maya türleri izole edilerek moleküler yöntemlerle tanımlandı. Ayrıca stres direnci yüksek maya türlerinin stres koşullarında biriktirdiği depo karbonhidrat çeşidi ve miktarı belirlendi. İzole edilen 66 maya suşundan 25 maya suşunun ısı stresine karşı, 11 maya suşunun ozmotik strese karşı ve 8 maya suşunun hem ısı stresine hem de ozmotik strese karşı dirençli olduğu belirlendi.

Son yıllarda dondurulmuş-hamur endüstrisinde (frozen-dough) kullanılan kryo-mayaların (Cryo-yeast) önemi artmıştır. Kryo-mayaların en temel özelliği depo karbonhidrat birikiminin özellikle trehaloz birikiminin yüksek olmasıdır [59, 60]. Ayrıca bu mayaların donmaya karşı dirençli olduğu gibi ısı ve ozmotik strese (şeker ve tuz kaynaklı) karşı da dirençli olmaları istenen özelliklerdir [25, 61, 62, 63]. Trehaloz ayrıca

yiyeceklerin dayanıklılığını artırmada, ilaç ve kozmetik endüstrisinde stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel amaçlarla kullanılan mayaların üretim sırasında ve sonrasında dayanıklılıkları maya hücrelerinin farklı karbonhidratları enerji kaynağı olarak kullanabilmelerine ve değişik metabolitleri biriktirebilmelerine bağlıdır. Trehaloz ve glikojen stres koşullarında biriktirilen ve hücreleri olumsuz dış etkenlere karşı koruyan metabolitlerdir. Trehaloz biriktirmeyen maya hücreleri ise glikojen gibi alternatif karbon kaynaklarını depo karbonhidratı olarak biriktirmektedir. Trehaloz ve glikojen birikimi yüksek olan mayalar endüstriyel öneme sahip mayalar olduğundan çalışmamızda stres direnci yüksek maya türlerinin trehaloz ve glikojen birikimleri belirlendi.

K. marxianus ve *K. lactis* maya türleri stres koşullarında ağırlık olarak glikojen biriktirirken *P. kudriavzevii* maya türünün ağırlık olarak trehaloz biriktirdiği tespit edildi. *K. marxianus*, *K. lactis* ve *P. kudriavzevii* maya türlerine ait izole edilen tüm maya suşlarının termotolerant ve ozmotolerant özelliklerinden ve yüksek miktarda stres metaboliti biriktirdiklerinden dolayı endüstriyel öneme sahip maya türleri oldukları belirlendi. Diğer izole edilen *A. pullulans*, *H. opuntiae* ve *P. kluyveri* maya türlerinde stres toleransının suşlar arasında farklılık gösterdiği belirlendi. Stres metabolitinin çeşidinin ve miktarının stresin derecesine ve çeşidine göre maya türleri arasında farklılık gösterdiği tespit edildi. Ancak bu sonucun doğrulanması için aynı maya türüne ait diğer maya suşlarında da benzer analizlerin yapılarak etanol stresi gibi farklı stres koşullarında da tekrar edilmesi gerekmektedir. *A. pullulans* maya türünde stres koşullarında trehalozun yıkıldığı ve glikojenin sentezlenmediği gözlemlendi. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda maya hücrelerinde trehaloz ve glikojene ilave olarak diğer bir stres metaboliti olan gliserolün miktarının belirlenmesi uygun olacaktır.

TEŞEKKÜR

Çalışmalar Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından FHD-2020-3237 proje numarası ile ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından TUBİTAK-2209-A programı ile desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Cassano A., Conidi C., Timpone R., D'Avella M., Drioli E. A membrane based process for the clarification and the concentration of the cactus pear juice, *Journal of Food Engineering*, 80, 914-921, 2007.
- [2] Yılmaz C. Dikenli incir (*Opuntia ficus-indica* L.) yetiştiriciliği, *Tarım Türk*, 24: 14-16, 2010.
- [3] Livrea M. A., Tesoriere L. Health benefits and bioactive components of the fruits from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill., *Journal of the Professional Association Cactus Development*, 8, 73-90, 2006.
- [4] Mobhammer M. R., Stintzing F. C., Carle R. Cactus pear fruits (*Opuntia* spp.): A review of processing

technologies and current uses, *Journal of the Professional Association Cactus Development*, 8, 1-25, 2006.

- [5] Tesoriere L., Gentile C., Angileri F., Attanzio A., Tutone M., Allegra M., Livrea M. A. Trans-epithelial transport of the betalain pigments indicaxanthin and betanin across Caco-2 cell monolayers and influence of food matrix, *European Journal of Nutrition*, 52, 1077-1087, 2012.
- [6] Panda K. S., Behera K. S., Qaku W. X., Sekar S., Ndinteh T. D., Nanjundaswamy H. M., Ray R. C., Kayitesi E. Quality enhancement of prickly pears (*Opuntia* sp.) juice through probiotic fermentation using *Lactobacillus fermentum* - ATCC 9338, *LWT-Food Science and Technology*, 75, 453-459, 2017.
- [7] Coria Cayupan Y. S., Ochoa M. J., Nazareno M. Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits: Changes in bioactive compound contents during ripening process, *Food Chemistry*, 126, 514-519, 2011.
- [8] Jimenez-Aguilar D. M., Lopez-Martinez J., Hernandez-Brenes C., Gutierrez-Urbe J., Welti-Chanes J. Dietary fiber, phytochemical composition and antioxidant activity of Mexican commercial varieties of cactus pear, *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 66-73, 2015.
- [9] Stintzing F. C., Herbach K. M., Mobhammer M. R., Carle R., Yi W., Sellappan S., Akoh C. C., Bunch R., Felker P. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442-451, 2005.
- [10] Lachance M. A., Starmer W. T., Phaff H. J. Identification of yeasts found in decaying cactus tissue, *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 1025-1036, 1988.
- [11] Ganter P. F., Benevides de Moraes P., Rosa C. A. Yeasts in Cacti and Tropical Fruit. In book: *Yeasts in Natural Ecosystems, Diversity*, 2017.
- [12] Freitas L. F. D., Batista T. M., Santos A. N. O., Hilário H. O., Moreira R. G., Franco G. R., Moraes P. B., Lachance M. A., Rosa C. A. Yeast communities associated with cacti in Brazil and the description of *Kluyveromyces starmeri* sp. nov. based on phylogenomic analyses, *Yeast*, 37, 625-637, 2020.
- [13] Starmer W. T., Aberdeen V., Lachance M. A. The biogeographic diversity of cactophilic yeasts. In Péter G., Rosa C. (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts. The Yeast Handbook*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006.
- [14] Coşkun Y., Türker N., Ekiz H. I., Aksay S., Karababa E. Effect of pH and temperature on the thermostability of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) yellow orange pigments, *Food Nahrung*, 44(4), 261-263, 2000.
- [15] Türker N., Coşkun Y., Ekiz H. I., Aksay S., Karababa E. The effects of fermentation on the thermostability of the yellow-orange pigments extracted from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*), *European Food Research and Technology*, 212, 213-216, 2001.
- [16] Kabas Ö., Özmerdi A., Akıncı İ. Physical properties of cactus pear (*Opuntia ficus indica* L.) grown wild in Turkey, *Journal of Food Engineering*, 73, 198-202, 2006.
- [17] Dengiz T. N., Zengin H. Hint İnciri (*Opuntia ficus-indica*) meyve suyunun kimyasal ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi, *İstanbul Aydın Üniversitesi Dergisi*, 30, 125-150, 2016.
- [18] Çakmak M., Bakar B., Ibrahim M. S., Özer D., Karataş F., Saydam S. Effect of freezing and drying methods on some biochemical properties of prickly fig (*Opuntia ficus-indica*) fruit, *Yüzüncü Yıl University Journal of Agricultural Science*, 30(3), 535-543, 2020.
- [19] Çağlar A., Akarca G., Tomar O., Ekmekçi E. Some physicochemical and sensory properties of cactus fruit (*Opuntia ficus-indica* L.) vinegar produced by traditional method, *European Journal of Science and Technology*, 18, 952-957, 2020.
- [20] François J., Parrou J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 125-145, 2001.

- [21] François J., Blazquez M. A., Arino J., Gancedo C., Storage carbohydrates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast sugar metabolism. Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications, Technomic Publishing Company, 16, 285-303, 1997.
- [22] François J., Walther T., Parrou J. L. Genetics and regulation of glycogen and trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, Microbial Stress Tolerance for Biofuels, Microbiology Monographs, 22, 29-55, 2012.
- [23] Kane S. M., Roth R. Carbohydrate Metabolism During Ascospore Development in Yeast. Journal of Bacteriology, 118(1), 8-14, 1974.
- [24] Argüelles J. C. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: A Comparative analysis. Archives of Microbiology, 174, 217-224, 2000.
- [25] Shima J, Takagi H. Stress-Tolerance of Baker's-Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cells: Stress-Protective Molecules and Genes Involved in Stress Tolerance. Biotechnology and Applied Biochemistry, 53(3), 155-164, 2009.
- [26] Fraenkel D., Nielsen J. Trehalose-6-Phosphate Synthase and Stabilization of Yeast Glycolysis. FEMS Yeast Research, 16(1), 1-6, 2016.
- [27] Petitjean M, Teste M. A., Léger-Silvestre I., François J. M., Parrou J. L. A New Function for The Yeast Trehalose-6P Synthase (Tps1) Protein, as Key Pro-Survival Factor During Growth, Chronological Ageing, and Apoptotic Stress. Mechanisms of Ageing and Development, 161(2017), 234-246, 2016.
- [28] Türkel S., Turgut T. Analysis of the effects of hyperosmotic stress on the derepression of invertase activities and the growth of different Baker's yeast strains, Turkish Journal of Biology, 26, 155-161, 2002.
- [29] Kristjuhan A., Lööke M., Kristjuhan K. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications, Biotechniques, 50(5), 325-328, 2011.
- [30] Kurtzman C. P., Robnett C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, Antonie van Leeuwenhoek, 73, 331-371, 1998.
- [31] White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, California, USA. p. 315-322, 1990.
- [32] Parrou J. L., François J. A Simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells, Analytical Biochemistry, 248, 186-188, 1997.
- [33] Breuer U., Harms H. *Debaryomyces hansenii*-an extremophilic yeast with biotechnological potential, Yeast, 23, 415-437, 2006.
- [34] Yamamoto H., Shima T., Yamaguchi M., Mochizuki Y., Hoshida H., Kakuta S., Kondo-Kakuta C., Noda N. N., Inaqaki F., Itoh T., Akada R., Ohsumi Y. The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* is a useful organism for structural and biochemical studies of autophagy, Journal of Biological Chemistry, 115, 6833-6842, 2015.
- [35] Choi D. H., Eun-Hee Park E. H., Kim M. D. Isolation of thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* from nuruk. Food Science and Biotechnology, 26, 1357-1362, 2017.
- [36] Mejía-Barajas J. A., Montoya-Pérez R., Salgado-Garciglia R., Aguilera-Aguirre L., Cortés-Rojo C., Mejía-Zepeda R., Arellano-Plaza M., Saavedra-Molina A. Oxidative stress and antioxidant response in a thermotolerant yeast. Brazilian Journal of Microbiology, 48(2), 326-332, 2017.
- [37] Limtong S., Sringiew C., Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*, Bioresource Technology, 98, 3367-3374, 2007.
- [38] Christensen A. D., Kádár Z., Oleskiewicz-Popiel P., Thomsen M. H. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 38, 283-289, 2011.
- [39] Arellano-Plaza M., Gschaedler-Mathis A., Noriega-Cisneros R. Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mezcal process during oxidative stress, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(7), 1279-1287, 2013.
- [40] Charoensopharat K., Thanonkeo P., Thanonkeo S., Yamada M. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at high temperature by newly isolated thermotolerant inulin-utilizing yeast *Kluyveromyces marxianus* using consolidated bioprocessing, Antonie Van Leeuwenhoek, 108, 173-190, 2015.
- [41] Choudhary J, Singh S, Nain L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic biomass, Electronic Journal of Biotechnology, 21, 82-92, 2016.
- [42] Dhaliwal S. S., Oberoi H. S., Sandhu S.K., Nanda D., Kumar D., Uppal S. K. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*, Bioresource Technology, 102, 5968-5975, 2011.
- [43] Kaewkrajay C., Dethoup T., Limtong S. Ethanol production from cassava using a newly isolated thermotolerant yeast strain, Science Asia, 40, 268-277, 2014.
- [44] Chamnipa N., Thanonkeo S., Klanrit P., Thanonkeo P. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production, Brazilian Journal of Microbiology, 49(2), 378-391, 2018.
- [45] Chi Z., Wang F., Chi Z., Yue L., Liu G., Zhang T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast, Applied Microbiology and Biotechnology, 82, 793-804, 2009.
- [46] Gaur R., Singh R., Gupta M., Gaur M. K. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan, African Journal of Biotechnology, 9, 7989-7997, 2010.
- [47] Gostinčar C., Grube M., de Hoog G. S., Zalar P., Gunde-Cimerman N. Extremotolerance in fungi: evolution on the edge, FEMS Microbiology and Ecology, 71, 2-11, 2010.
- [48] Gostinčar C., Grube M., Gunde-Cimerman N. Evolution of fungal pathogens in domestic environments? Fungal Biology, 115, 1008-1018, 2011.
- [49] Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts, FEMS Microbiology and Ecology, 32, 235-240, 2000.
- [50] Shiomi N., Yasuda T., Inoue Y., Kusumoto N., Iwasaki S., Katsuda T., Katoh S. Characteristics of neutralization of acids by newly isolated fungal cells, Journal of Bioscience and Bioengineering, 97, 54-58, 2004.
- [51] Kogej T., Ramos J., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments, Applied and Environmental Microbiology, 71, 6600-6605, 2005.
- [52] Gostinčar C., Ohm R. A., Kogej T., Sonjak S., Turk M., Zajc J., Zalar P., Grube M., Sun H., Han J., Sharma A., Chiniquy J., Ngan C. Y., Lipzen A., Barry K., Grigoriev I. V., Gunde-Cimerman N. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species, BMC Genomics, 15 (549), 1-28, 2014.

- [53] Luan Y., Zhang B. Q., Duan C. Q., Yan G. L. Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*, *LWT–Food Science and Technology*, 92, 177–186, 2018.
- [54] Martin V., Valera M., Medina K., Boido E., Carrau F. Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* Yeast Genus on Wines, *Fermentation*, 4 (76), 1–21, 2018.
- [55] Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies R., Girones R., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Nørrung B., Robertson L., Ru G., Sanaa M., Simmons M., Skandamis P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlström H., Cocconcelli P. S., Klein G., Maradona M.P., Querol A., Suarez J. E., Sundh I., Vlak J., Correia S., Herman L. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 6: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2017, *EFSA Journal*, 15, 4664–4841, 2017.
- [56] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution*, 39, 783-791, 1985.
- [57] Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 2000.
- [58] Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms, *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549, 2018.
- [59] Shima J, Hino A, Yamada C, Suzuki Y, Nakajima R, Watanabe H, Mori K, Takano Y. Stress Tolerance in Doughs of *Saccharomyces cerevisiae* Trehalase Mutants Derived From Commercial Baker's Yeast. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7), 2841–2846, 1999.
- [60] Sasano Y., Haitani Y., Hashida K., Ohtsu I., Shima J, Takagi H. Simultaneous Accumulation of Proline and Trehalose in Industrial Baker's Yeast Enhances Fermentation Ability in Frozen Dough. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 13(5), 592-595, 2012.
- [61] Murakami Y, Yokoigawa K, Kawai F, Kawai H. Lipid Composition of Commercial Bakers' Yeasts Having Different Freeze-Tolerance in Frozen Dough. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(11), 1874–1878, 1996.
- [62] Ohtake S, Wang Y. J. Trehalose: Current Use and Future Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6),2020-2053, 2011.
- [63] Dong J., Chen D., Wang G., Zhang C., Du L., Liu S., Zhao Y., Xiao D. Improving Freeze-Tolerance of Baker's Yeast Through Seamless Gene Deletion of NTH1 and PUT1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43, 817–828, 2016.