

DOĞAL MAYALARIN YAYGIN PATOJENLER ÜZERİNDEKİ İNİHİTÖR ETKİLERİ

Tuba Büyüksırt Bedir*, Hakan Kuleaşan²

¹ Hitit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çorum, Türkiye

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş / Received: 05.08.2019; Kabul / Accepted: 19.01.2020; Online baskı / Published online: 16.02.2020

Büyüksırt Bedir, T., Kuleaşan, H. (2020). Doğal mayaların yaygın patojenler üzerindeki inhibitör etkileri. *GIDA* (2020) 45(1) 182-191 doi: 10.15237/gida.GD19115

Büyüksırt Bedir, T., Kuleaşan, H. (2020). Inhibitory effects of natural yeasts on common pathogens. GIDA (2020) 45(1) 182-191 doi: 10.15237/gida.GD19115

ÖZ

Mayalar, bazı bakteri ve maya türleri üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Bu mayaların, gıdalarda bozulma etmeni ve patojen mikroorganizmaların biyokontrolünde kullanıma olanakları araştırılmaktadır. Bu amaçla, mayaların elde edilebilmesi için çok sayıda doğal materyal ve fermente gıdadan izolasyon yapılmıştır. Ön taramalar sonucunda farklı 110 maya suşu izole edilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatların *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ve *Candida albicans* üzerindeki inhibitör etkileri test edilmiştir. İzolatlardan 8 tanesi *M. luteus*, 2 tanesi *E. coli* ve 4 tanesi *C. albicans* üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Bunlar üzerinde inhibitör etki gösteren suşlara *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O157 ve O157:H7, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium üzerinde de inhibisyon testleri uygulanmıştır. İnhibitör etkinin farklı patojenler üzerinde farklı derecelerde olduğu gözlenmiştir. Patojenlere karşı en fazla katil özellik gösteren izolatlar tanımlanmış ve bu izolatların *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia reukaufii* ve *Saccharomyces cerevisiae* oldukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyel maya, toksin, duyarlı maya, patojen bakteri

INHIBITORY EFFECTS OF NATURAL YEASTS ON COMMON PATHOGENS

ABSTRACT

Yeasts have an inhibitory effects on certain bacterial and yeast species. The possible use of these yeasts on biocontrol of food-spoilage and pathogenic microorganisms was investigated. In order to obtain yeast isolates, various natural materials and fermented foods were used. As a result of preliminary screening, 110 different yeast strains were isolated. The inhibitory effects of the isolates on *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Candida albicans* were tested. Eight of the isolates on *M. luteus*, 2 of them on *E. coli* and 4 of the isolates on *C. albicans* showed inhibitory effect. Strains which exhibit inhibitory effects on these 3 indicator microorganisms were also tested against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157 and O157: H7, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium. Isolates which have greatest killer feature and these were determined as *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia reukaufii* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: Antimicrobial yeast, toxin, sensitive yeast, pathogenic bacteria

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ tubabuyuksirit@hitit.edu.tr

☎ (+90) 364 227 4533

☎ (+90) 364 227 4535

Tuba Büyüksırt Bedir; ORCID no: 0000-0001-8615-4075

Hakan Kuleaşan; ORCID no: 0000-0002-0893-0689

GİRİŞ

Mayaların diğer mikroorganizmaların gelişimini engelleyici etkisi ilk olarak 1909 yılında Hayduck (1909) tarafından ortaya konulmuştur. Bevan ve Makower 1963 yılında bazı *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının aynı türün diğer suşlarına karşı inhibitör bir madde salgıladığını belirlemişlerdir (Polonelli vd., 1983). İlerleyen yıllarda, mayaların diğer mayalara karşı inhibitör etkilerinin, ürettikleri sekonder metabolitlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Suzuki vd., 2001; Marquina vd., 2002). Mayalar tarafından üretilen bu tip antagonist etkiye sahip metabolitler “mikosin” olarak adlandırılmaktadır.

Mikosinler protein veya glikoprotein yapısındaki maddeler olup, duyarlı olan mayaların gelişimini durdurmaktadır. Mikosin aktivitesi ilk olarak *S. cerevisiae*'da saptanmış, daha sonra yapılan çalışmalarla 20 farklı maya cinsinde mikosin aktivitesi belirlenmiştir (Schmitt ve Breinig, 2002). Mikosin üretimi belirlenmiş başlıca maya cinsleri arasında *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* ve *Zygosaccharomyces* yer almaktadır (Young ve Yagiu, 1978; Hodgson vd., 1995; Magliani vd., 1997; Chen vd., 2000; Schmitt ve Breinig, 2002; Dabhole ve Joishy, 2005; Golubev, 2006; Altuntaş ve Özçelik, 2007). İnhibitör etki mekanizmaları henüz tam olarak ortaya konulmamış olmakla birlikte *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Tremella* ve *Trichosporon* gibi bazı maya cinslerinde de mikosin üretiminin varlığı belirlenmiştir (Carreiro vd., 2002).

Bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler için yapılan açıklamalara benzer şekilde, doğal ortamlarda mayaların mikosin üretiminin besin rekabetinde duyarlı mikroorganizmalara karşı bir avantaj sağladığı öne sürülmektedir (Baeza vd., 2008). Mayalardaki bakteri ve küf gelişimini önleyen aktif bileşiklerin organik asitler (heksanoat, oktanoat, ve dekanoat) ve proteinler olduğu belirtilmektedir (Roostita vd., 2011). Bazı *Candida* türleri dahil pek çok maya tarafından ekzotoksinler üretilmektedir. Protein ya da glikoprotein yapısında olan bu toksinler, hücre yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanarak küf, bakteri ve protozoaları öldürebilmektedir

(Çerikcioğlu, 2003; Lopes ve Sangorin, 2010; Liu vd, 2013).

Mayalar tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin kendilerine özgü mekanizmaları, dirençli bakterilere karşı yeni bileşiklerin geliştirilmesinde yeni olanaklar sunmaktadır. Antimikrobiyal peptidler (AMP) pek çok mikroorganizmadan izole edilerek karakterize edilmişlerdir. Bu moleküller duyarlı mikroorganizmaların hücre zarı/duvarı, sitoplazmik yapıları, nükleik asit sentezi, veya metabolizma işleyişini hedef alarak inhibe etmektedirler. (Hou vd., 2011).

Yapılan bir çalışmada elma, yabanmersini, frenk üzümü ve Litvanya'ya özgü kırmızı üzüm şarabından inhibitör etkiye sahip mayalar izole edilmiştir. Çalışmada izole edilmiş suşların inhibisyon mekanizmaları 7 farklı gruba ayrılmıştır. İnhibitör etki gösteren ve yaygın olarak bilinen bazı maya türlerinden farklı mikosinler elde edilerek saflaştırılmıştır. Bu suşların bazılarında endüstriyel olarak kullanılabilme potansiyeline sahip inhibitör maddeler üretilmiş ancak elde edilen aktif bileşen miktarları farklılık göstermiştir. Yapılan genetik çalışmalarda inhibitör maddelerden bazılarının genetik materyalde kodlandığı tespit edilmiş, ancak bazılarının genetik determinantları belirlenmemiştir (Gulbiniene vd., 2004).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada farmösetik bitkilerin çiçeklerinden inhibitör mayalar izole edilmiş ve bunların ürettiği toksinlerin, fungal patojenlerin yanı sıra duyarlı maya hücreleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. *S. cerevisiae* ve *Pichia kluyveri* toksinlerinin, *Dekkera anomala* hücrelerinin gelişimini engellediği belirlenmiştir. Ancak, hem *S. cerevisiae* hem de *P. kluyveri*'nin, *Aspergillus niger*, *C. albicans* ve *Fusarium* spp. üzerinde engelleyici bir etkisi belirlenmemiştir (Dabhole ve Joishy, 2005).

Mayaların inhibitör özelliklerine bağlı olarak dört ayrı fenotip gösterdikleri belirlenmiştir. Bunlar; inhibitör (K), duyarlı (S), nötral (N), inhibitör-duyarlı (K-S) suşlardır. Katil suşlar kendi toksinine bağışıklı olup, nötral suşlar hem toksin

üretmemekte hem de katil toksinine karşı duyarısız kalmaktadır. İnhibitör-duyarlı suşlar öldürücü faktörlere sahip olup, aynı zamanda diğerkatil mayaların toksinlerine karşı da duyarlı davranmaktadır (Altuntaş ve Özçelik, 2007).

Katil mayaların ürettikleri toksinler farklı mekanizmalar yoluyla duyarlı hücreleri inhibe etmektedirler. Katil mayalarda belirlenmiş bu mekanizmalardan en yaygın olanı toksinin hücre duvarına bağlanarak β -glukan sentezini engellemesi ve hücre membranı boyunca kanallar açarak sitoplazma sıvısının dışarı akmasına neden olması şeklindedir. Ayrıca bu toksinlerin bazıları hedef hücredeki DNA ve tRNA sentezini engelleyerek hücre bölünmesini veya işlevlerini kaybetmesini sağlayabilmektedirler. Yapılan çalışmalarda ortaya konulan son mekanizma da hücre içerisine kalsiyum alımının önlenmesi ile olmaktadır (Izgu ve Altınbay, 2004; Suzuki vd., 2001; Klassen ve Meinhardt, 2005).

Bu çalışmada doğal maya izolatları içerisinden katil maya özelliğine sahip suşların tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla doğal ortamlar ve fermente gıdalar izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. Toplanan materyaller farklı besiyerlerine ekilerek elde edilen maya suşlarının geniş bir yelpazeyi temsil etmesi hedeflenmiştir. Yapılan ön incelemelerde farklı olduğu düşünölen suşlar seçilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatlar önce *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ve *Candida albicans* olmak üzere 3 indikatör üzerinde test edilmiştir, ardından bunlar üzerinde inhibitör etki gösteren suşlar daha geniş bir patojen mikroorganizma grubu üzerinde denenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Mayaların İzolasyonu, Seçimi ve Saflaştırılması

Araştırmada yer verilen mayalar yılın farklı zamanlarında meyve, sebze, süt ürünleri, toprak, çiçek, ağaç yaprağı ve kabuk gibi doğal ortamlardan izole edilmiştir. Toplanan materyaller 25 mL FTS (% 0.85 w/v tuz) içerisine konularak çalkalanmış ve üzerlerinde bulunan mayaların sıvıya geçmesi sağlanmıştır. Ardından bu sıvıdan alınan örneklerin farklı besiyerlerine yayma plak yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Mayaların izole

edilmesi amacıyla Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBCA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar (SDCA), Potato Dextrose Agar (PDA) gibi seçici besiyerleri kullanılmıştır. Bakteri gelişimini engellemek için PDA besiyeri bileşimine chloramphenicol antibiyotiğı (5 mg/L) eklenmiştir. 30 °C'de 3 gün inkübasyon sürecinin ardından farklı koloniler seçilerek saflaştırılmıştır. Bu amaçla farklı koloni oluşturan suşlar geliştikleri aynı besiyerleri üzerine tek koloni düşürme tekniğıyle ekilerek saf kültürlerin elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen saf kültürler YEPD (% 1 Maya Ekstraktı, % 2 Pepton, % 2 Dekstroz) besiyerlerinde geliştirildikten sonra % 20 gliserol ortamında -20 °C'de saklanmıştır.

İzolatların İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi

Koloni morfolojileri ve mikroskopik incelemelerine göre maya olan mikroorganizmalar belirlenmiştir. İzolatların yaygın gıda patojenlerinin üzerindeki etkilerinin belirlenmesinden önce indikatör olarak belirlenmiş üç mikroorganizma üzerindeki inhibitör etkileri belirlenmiştir. İnhibisyon etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda agar spot difüzyon testi kullanılmıştır. Kullanılan indikatör bakterilerin ilki bu tip çalışmalarda Gram pozitif indikatör bakteri olarak yaygın bir şekilde kullanılan *M. luteus* olarak belirlenmiştir (Kuleaşan ve Çakmakçı, 2003). Kullanılan diğerk bir indikatör ise Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* Tip-P'dir. Maya izolatlarının, yakın türler üzerindeki olası etkilerin belirlenmesi amacıyla da patojen bir maya olan *C. albicans* (ATCC 10231) kullanılmıştır. Bu üç mikroorganizmaya karşı inhibitör etki gösteren suşların belirlenmesinden sonra aynı yöntemle *Staph. aureus* (ATCC 25923), *L. monocytogenes*, *S. cerevisiae*, *Psen. aeruginosa*, *E. coli* O157 ve O157:H7, *B. subtilis*, *S. Typhimurium* üzerinde de inhibisyon testleri uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliğı Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. A. Kadir Halkman'ın Gıda Mikrobiyolojisi Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

Agar spot difüzyon testinde indikatör olarak kullanılan mikroorganizmalardan *M. luteus* ve *E.*

coli TSB (Triptik Soy Broth, Merck, Almanya), *C. albicans* ise YEPD sıvı besiyerinde 18 saat süre ile inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Difüzyon testi öncesi FTS içerisine alınan kültürlerin yoğunlukları hücre McFarland densitometresi (DEN-1B, Letonya) yardımıyla 0.5 McFarland değerine ayarlanmıştır. Bu değer bakterilerde 1.5×10^8 kob/mL (McFarland J., 1907), mayalarda ise $1-5 \times 10^6$ kob/mL (Arendrup vd., 2014) değerlerine karşılık gelmektedir. 45 °C su banyosunda tutulan tüplerde hazırlanmış TSBA besiyeri içerisine aktif bakteri kültüründen veya YEPDA besiyeri içerisine aktif maya kültüründen %1 oranında karıştırılarak petrilere dökülmüş ve katlaşıncaya dek bekletilmiştir. YEPDA besiyerinin hazırlanmasında zon oluşumunun daha kolay ayırt edilebilmesi için % 0.003 oranında metilen mavisi eklenmiştir (Russell vd., 1986).

Buna paralel olarak test edilecek maya izolatı YEPD sıvı besiyerinde 18 saat süre ile inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Bu kültürden 20 µL alınarak agarlı besiyeri üzerine damlatılarak tek nokta ekim yapılmıştır (Polonelli ve Morace, 1986). *M. luteus* petrilere 30 °C'de 48 saat, *E. coli* Tip-I petrilere 37 °C'de 24 saat ve *C. albicans* petrilere 30 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında oluşan zonların ölçümleri yapılmıştır.

Mayaların tanımlanması

Elde edilen izolatların tür düzeyinde tanımlamaları Orta Doğu Teknik Üniversitesi Teknokenti bünyesinde faaliyet gösteren REFGEN şirketinde (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.) ABI PRISM 3730XL (Perkin Elmer, Amerika Birleşik Devletleri) marka otomatik gen sekans cihazı kullanılarak yapılmıştır. 18S ribozomal DNA gen dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın ilk aşamasında doğal ortamlardan koloni morfolojisine ve mikroskop görüntülerine göre 110 adet maya suşu izole edilerek saflaştırılmış ve 14 adedi antimikrobiyal etki göstermiştir. İlk inhibisyon aşamasında bu suşlardan inhibitör etki gözlenen 1 ve 84 numaralı izolatlar asma bitkisi sürgünü ve yaprağından, 19 numaralı izolat beyaz üzümünden, 17, 26 ve 30 numaralı izolatlar kırmızı üzümünden, 31 numaralı izolat topraktan, 25, 51, 54 ve 94 numaralı izolatlar peynirden, 27 numaralı izolat çiçekten (süs yoncası), 11 ve 95 numaralı izolatlar ise elmadan izole edilmiştir. İzole edilen suşlardan 8 tanesi *M. luteus* üzerinde, 2 tanesi *E. coli* üzerinde ve 4 tanesi *C. albicans* üzerinde inhibe edici etki göstermiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. İzolatların bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki antagonist etkileri ve zon çapları
Table 1. Antagonist effect of isolates on some pathogenic microorganisms and zone diameters

İzolat No / Isolate Number	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i> Tip I	<i>Staph. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Pseu. aeruginosa</i>
1	14.33±0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	27.00±1.15	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	30.67±1.45	-	-	-
19	20.67±1.20	-	-	-	-	-	-	-	-	32.33±3.48	-
25	-	-	-	-	-	14.00±0.58	-	18.67±1.76	-	-	14.33±0.33
26	12.00±0.58	16.00±1.15	12.33±0.33	14.67±1.76	11.67±0.33	18.67±1.76	13.67±0.88	20.67±0.88	-	-	17.67±1.20
27	-	13.33±0.33	12.00±0.58	13.67±1.20	12.33±1.86	13.67±1.20	12.67±0.88	23.00±3.21	-	-	13.33±1.45
30	-	10.00±0.58	8.33±0.33	10.00±0.58	12.33±0.33	14.33±0.33	11.67±1.20	24.00±0.58	-	-	14.00±0.58
31	14.33±1.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	16.33±0.67	-	-	-	-	-	-	-	-	26.33±1.86	-
54	16.66±0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	26.67±2.85	-
84	-	11.33±0.67	11.67±0.33	13.00±0.58	14.00±0.58	-	15.00±0.58	26.33±1.86	-	-	-
94	17.33±0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	18.67±0.88	-	-	-	-	-	-	-	-	21.00±2.52	-

*Zon çapları mm olarak verilmiştir.

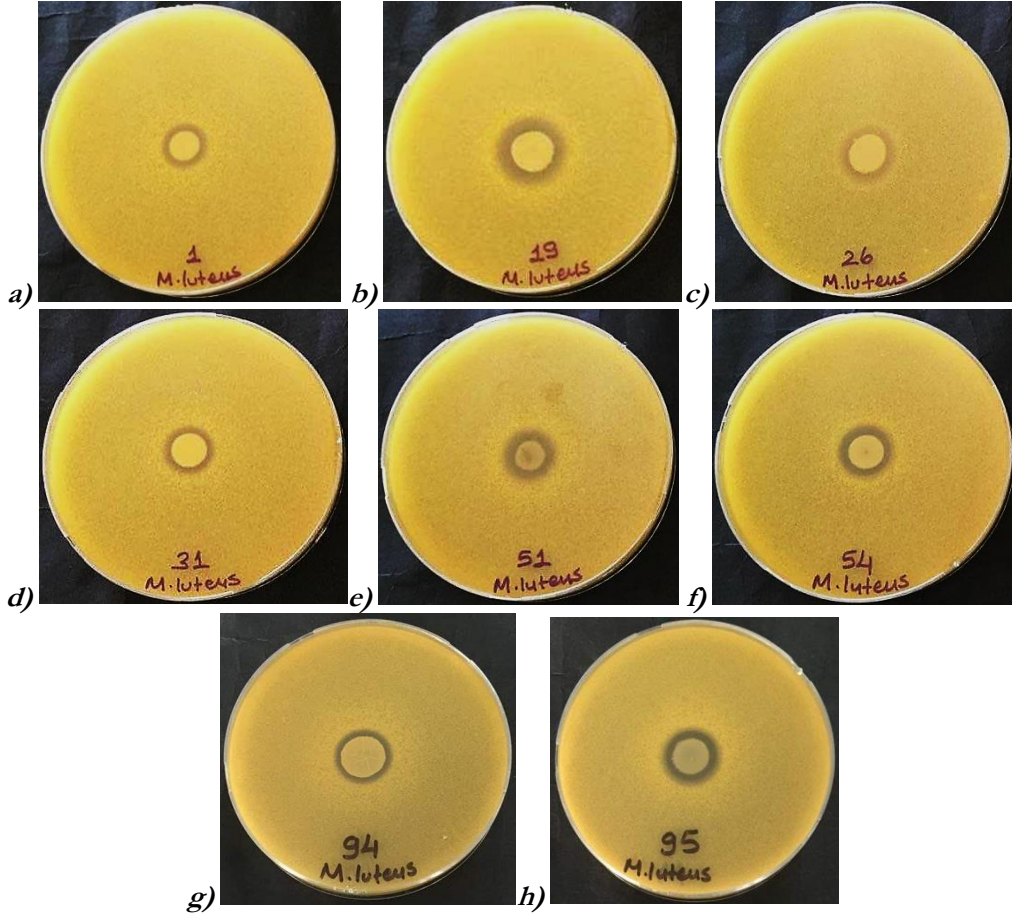
*Zone diameters are given in mm.

** Zon çapları ortalaması ± standart hata 3 tekrerrür ait ortalamaları ifade etmektedir.

** The mean zone diameters ± standard error values represent of triplicates.

İzole edilen mayalardan 8 tanesi *M. luteus* 'a karşı inhibitör etki göstermiştir. Gram pozitif bir bakteri olan *M. luteus* patojen olmamakla birlikte bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır (Seifert vd., 1995; Wieser vd., 2002). *M. luteus* 'a karşı zon veren mayalar Şekil 1'de gösterilmiştir. Ochigava vd.

(2011) yaptıkları çalışmada *Hansenula anomala*, *Williopsis mrakii*, *Kluyveromyces drosophylarum*, *Kluyveromyces lactis* ve *Candida tropicalis* türlerinin Gram pozitif patojen veya patojen olmayan bakterilere karşı inhibe edici özellik gösterdiğini tespit etmiştir.



Şekil 1. İzolatların *M. luteus* üzerindeki antagonist etkileri a) 1; b) 19; c) 26; d) 31; e) 51; f) 54; g) 94; h) 95.

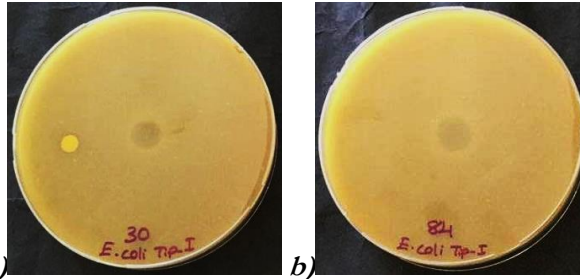
Figure 1. Antagonist effect of isolates on *M. luteus* a) 1; b) 19; c) 26; d) 31; e) 51; f) 54; g) 94; h) 95.

İzole edilen mayalardan 2 tanesi Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* Tıp-1'e karşı inhibitör etki göstermiştir. *E. coli* Tıp 1 patojen olmadığı gibi, vücutta B vitamini sentezine katıldığı için yararlı olarak dahi nitelendirilmektedir. Ancak herhangi bir ortamda *E. coli* Tıp 1'in bulunması bağırsak kökenli diğer patojenlerin de olabileceği potansiyelini göstermektedir (Halkman, 2011). *E. coli*'ye karşı zon veren mayalar Şekil 2'de gösterilmiştir. Polonelli ve Morace (1986) yaptıkları çalışmada, 36 *Hansenula*, *Pichia*,

Saccharomyces ve *Candida* cinsinin, bakteri ve mayalara karşı inhibe edici etkisini araştırmıştır. *E. coli*'nin de içinde bulunduğu 11 bakteri suşuna karşı test edilmiştir. Daha önce mayalarla sınırlı olduğu düşünülen katil özelliğinin bakterilere karşı da etkili olduğu ilk defa belirlenmiştir. Chen vd. (2015) yaptıkları çalışmada kısırak sütünün fermentasyonu ile elde edilen Kırmız'dan 3 adet *S. cerevisiae* ve 2 adet *Kluyveromyces marxianus* suşunu izole etmişlerdir. Bu maya suşlarının ürettikleri mikosinin *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi

olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada da çiftlik hayvanlarının ürünlerinden mayalar izole edilmiştir. Mayaların antimikrobiyal aktivitesi *Psen. aeruginosa*, *Staph. aureus* ve *E. coli*'ye karşı agar spot difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Meyveli

yoğurt izolatları *Psen. aeruginosa*'ya karşı yüksek oranda (35 mm), *Staph. aureus* ve *E. coli*'ye karşı orta derecede antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu izolatın *Candida parapsilosis* olduğu belirlenmiştir (Roostita vd., 2011).

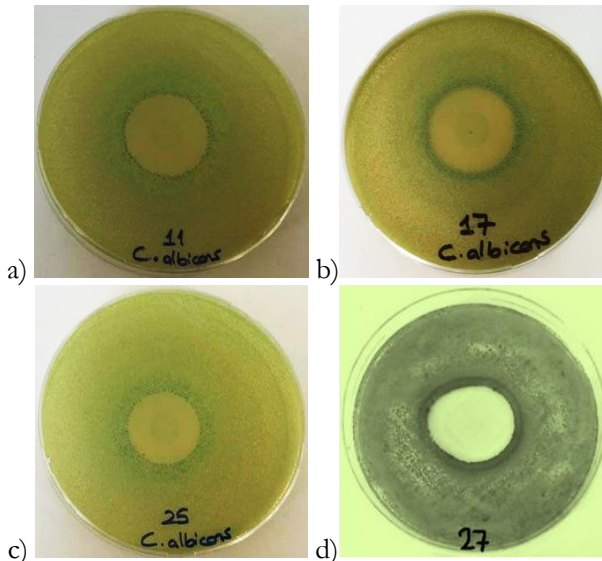


Şekil 2. İzolatların *E. coli* üzerindeki antagonist etkileri a) 30; b) 84.

Figure 2. Antagonist effect of isolates on *E. coli* a) 30; b) 84.

Bu çalışma kapsamında izole edilen mayalardan 4 tanesi *C. albicans*'a karşı inhibitör etki göstermiştir. *C. albicans*'a karşı zon veren mayalar Şekil 3'te gösterilmiştir. *C. albicans*, toprak ve bitkilerde de bulunmakla birlikte esas kaynağı insan vücudu olan fırsatçı bir patojendir (McCullough vd., 1996; Aydın, 2004). Son yıllarda, bağışıklık sistemi zayıf kişilerde *Candida* enfeksiyonlarının görülme sıklığı artmıştır. En patojenik *Candida* türü olan *C. albicans* klinik örneklerinde en sık karşılaşılan türdür (Lim ve Tay, 2011). Yapılan bir diğer çalışmada esasen insan kökenli bir patojen olan *C.*

albicans, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* türleri ağaç yaprağından, su ve topraktan izole edilmiştir. Çalışmada 10 adet basidiomiset ve 11 adet askomiset türünün *Candida* spp. izolatlarına karşı inhibitör etkileri araştırılmıştır. Basidiomisetler arasında en iyi sonuç *Rhodotorula glutinis* ve *R. mucilaginosa*'da gözlenmiştir (Vadkertiova ve Slavikova, 2007). Katil maya *Williopsis (Hansenula) mrakii*, pH 4.5'te *C. albicans*'a karşı inhibe edici özellik göstermiştir (O'Leary, 1987).



Şekil 3. İzolatların *C. albicans* üzerindeki antagonist etkileri a) 11; b) 17; c) 25; d) 27.

Figure 3. Antagonist effect of isolates on *C. albicans* a) 11; b) 17; c) 25; d) 27.

Çalışmamızda, indikatör mikroorganizmaların en az birine karşı antagonistik etki gösteren maya suşlarının *Staph. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. cerevisiae*, *Pseu. aeruginosa*, *E. coli* O157 ve O157:H7, *B. subtilis*, *S. Typhimurium* üzerinde gösterdikleri inhibitör etkileri test edilmiş, sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir. *S. cerevisiae*'ya karşı izolatların hiç biri zon vermemiştir. Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda da *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*'a karşı inhibitör aktivite göstermemiştir (Janisiewicz vd., 2001). Genel olarak patojen mikroorganizmaların çoğunda zon veren 26, 27, 30 ve 84 nolu maya suşları olmuştur. Bu katil mayaların tür düzeyinde tanımlamaları 18S ribozomal DNA gen dizi benzerliği ile tespit edilmiş ve Gen Bankasına kaydedilerek kayıt numarası (Accession Number) alınmıştır. Yapılan tanımlamada 26 numaralı izolatın *M. pulcherrima* (MN622823), 27 numaralı izolatın *M. reukaufii* (MN622824), 30 numaralı izolatın *M. pulcherrima* (MN622825) ve 84 numaralı izolatın *S. cerevisiae* (MN622826) oldukları belirlenmiştir.

Farris vd. (1991) yaptıkları çalışmada üzüm ve sırasından 260 tane *M. pulcherrima* suşu izole etmişler ve 6 suşun katil maya olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek öldürme etkisi pH 3.6 ve 5.2 aralığında, 48 saat veya 72 saat geliştirilen kültürlerde elde edilmiştir. Lopes ve Sangorin (2010) yaptıkları çalışmada *M. pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomala* ve *Torulopsis delbrueckii* olmak üzere üç türe ait 36 maya izolatının inhibitör etkisi, şarapta bozulmaya neden olan *Pichia guilliermondii* ve *P. membranifaciens*'e karşı biyokontrol ajanları olarak kullanılması açısından test edilmiştir. En geniş etki spektrasi, *W. anomala* ve *M. pulcherrima* izolatlarında tespit edilmiştir. Fernández de Ullivarri vd. (2018) yaptıkları çalışmada *W. anomalus*'un, şarapta bozulmaya neden olan *Pichia guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Brettanomyces bruxellensis* ve *Dekkera anomala* türlerini engelleyen mikosin salgıladığını belirlemişlerdir.

Oro vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada yedi adet *M. pulcherrima* suşunun farklı maya cinslerine ait 114 mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. *M. pulcherrima*'nın *S. cerevisiae*'nin gelişmesi üzerinde

hiçbir etkisi görülmezken, bozulmalara sebep olan *Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora* ve *Pichia* cinsleri gibi yabancı mayalar üzerinde geniş ve etkili bir antimikrobiyal etki göstermiştir.

Acuña-Fontecilla vd. (2017) yaptıkları çalışmada 103 maya suşunun *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal özelliği araştırılmıştır. *Pichia*, *Candida* ve *Saccharomyces* cinslerinden olmak üzere dokuz maya suşunun bu üç patojene karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlenmiştir.

Chen vd. (2015) yaptıkları çalışmada 3 adet *S. cerevisiae* suşunu izole etmiş ve bu maya suşlarının ürettikleri mikosinin *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi olduğunu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada *S. uvarum*, *S. cerevisiae*, *S. hybrids*, *S. diastaticus* ve *S. capensis* türlerinin inhibitör etkileri araştırılmıştır. Protein yapısında toksin ürettiği belirlenen suşların birbirlerine karşı antagonistik etkileri incelenmiştir. *S. uvarum*, *S. cerevisiae*, *S. hybrids* türleri *S. cerevisiae* ve *S. diastaticus*'a karşı inhibitör etki gösterirken, *S. diastaticus* ve *S. capensis* de *S. cerevisiae* ve *S. hybrids*'e karşı inhibitör etki göstermiştir (Young ve Yagiu, 1978).

SONUÇ

Mevsimsel olarak mayaların doğada yaygın olarak bulunması ve izolasyon kaynaklarının çeşitli olması farklı maya suşlarının izolasyon ihtimalini arttırmaktadır. Koloni yapılarına göre farklılık gösterenler saflaştırılmış ve mikroskopta incelenerek hücre şekillerine göre maya olanlar tespit edilmiştir. İlk inhibisyon aşamasında *E. coli*, *M. luteus* ve *C. albicans* üzerindeki inhibitör etkileri test edilmiştir. Bu üç indikatör mikroorganizmaya karşı inhibitör etki gösteren suşların *Staph. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. cerevisiae*, *Pseu. aeruginosa*, *E. coli* O157 ve O157:H7, *B. subtilis*, *S. Typhimurium* üzerinde de inhibisyon testleri uygulanmıştır. İnhibitör etkinin farklı patojenler üzerinde farklı derecelerde olduğu gözlenmiştir. Patojenlere karşı en etkin katil özellik gösteren izolatların tanımlanması sonucunda *M. pulcherrima*, *M. reukaufii* ve *S. cerevisiae* oldukları belirlenmiştir.

Mikosin üreten yeni katil maya türlerinin belirlenmesi için bu konu üzerinde yapılan

araştırmaların sayısı artmaktadır. Son yıllarda katil toksinlerin besin maddelerinin muhafaza edilmesinde biyolojik koruyucu olarak kullanım olanakları özellikle araştırılmaktadır. Elde edilecek olumlu sonuçlar gıdalarda bozulma etmeni ve patojen mikroorganizmaların inhibe edilmesinde ve/veya baskılanmasında kullanılarak hem gıdaların raf ömrünü uzatmada hem sağlıklı gıda üretiminde yeni olasılıklar sunacaktır. Özellikle fermente gıdaların üretiminde kullanılan starter mikroorganizmalara yardımcı kültür olarak kullanımları ortamda bulunan istenmeyen mikroorganizmaların baskılanması yoluyla ürün kalitesinin artmasını sağlayabilecekleri düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 4848-D1-17 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Acuña-Fontecilla, A., Silva-Moreno, E., Ganga, M.A. (2017). Evaluation of antimicrobial activity from native wine yeast against food industry pathogenic microorganisms. *CJT-AJ Food*, 15(3), 457-465.

Altuntaş, E.G., Özçelik, F. (2007). Killer özellikli mayaların etki mekanizmaları ve endüstride yol açtıkları sorunlar. *GIDA*, 32 (4), 205-212.

Arendrup, M.C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W. (2014). The subcommittee on antifungal susceptibility testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Aydın, M. (2004). *Candida* cinsi mantarlar (*Candida albicans*). Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. 133:1109-1118. Güneş yayınevi, Ankara.

Baeza, M.E., Sanhueza, M.A., Cifuentes, V.H. (2008). Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biol Res*, 41: 173-182.

Bevan, E.A., Makower, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. Proceedings of the 11th International Congress of

Genetics. September 1963, The Hague, The Netherlands, 1: 202-203.

Carreiro, S.C., Pagnocca, F.C., Bacci, M., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., Middelhoven, W.F. (2002). Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiol*, 47(3): 259-262.

Chen, W.B., Han, Y.F., Jong, S.C., Chang, S.C. (2000). Isolation purification and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1029-1035.

Chen, Y., Aorigele, C., Wang, C., Simujide, H., Yang, S. (2015). Screening and extracting mycocin secreted by yeast isolated from Koumiss and their antibacterial effect. *J Food Nutr Res*, 3(1): 52-56.

Çerikcioğlu, N. (2003). Maya Öldürücü Toksinin Tıbbi Önemi. *Mikrobiyal Bülte*, 37: 215-221.

Dabhole, M.P., Joishy, K.N. (2005). Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* on sensitive yeasts and fungal pathogens. *Indian J Biotechnol*, 4: 290-292.

Farris, G.A., Mannazzu, I., Budroni, M. (1991). Identification of killer factor in the yeast genus *Metschnikowia*. *Biotechnol Lett*, 13, 297-298.

Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L.M., Raya, R.R. (2018). Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. *Biol Control*, 121: 223-228.

Golubev, W. I. (2006). Antagonistic interactions among yeasts, in bio-diversity and ecophysiology of yeasts, eds. G. Péter and C. Rosa (Berlin: Springer),197-219.

Gulbinienė, G., Kondratienė, L., Jokantaite, T., Serviėne, E., Melvydas, V., Petkuniėne, G. (2004). Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Technol Biotechnol*, 42(3): 159-163.

Halkman, K. (2011). Almanya'daki EHEC salgını ve düşündürdükleri. Köşe Yazısı, 01 Temmuz 2011, Cum. [https://www.labmedya.com/ġggg,yşN\(almanyadaki-ehc-salgını-ve-düşündürdükleri](https://www.labmedya.com/ġggg,yşN(almanyadaki-ehc-salgını-ve-düşündürdükleri), Erişim tarihi: (17.05.2019).

Hayduck, F., (1909).Über einen Hefengiftstoff in Hefe. *Wochenschr Brau* 26: 677-679. (In German)

- Hodgson, V.J., Button, D., Walker, G.M. (1995). Anticandida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol*, 141: 2003-2012.
- Hou, F., Li, J., Pan, P., Xua, J., Liua, L., Liua, W., Songa, B, Li, N., Wana, J., Gaoa, H. (2011). Isolation and characterisation of a new antimicrobial peptide from the skin of *Xenopus laevis*. *Int J Antimicrob Agents*, 38: 510-515.
- Izgu, F., Altinbay, D. (2004). Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo- β -1,3-glucanase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 685-693.
- Janisiewicz, W.J., Tworzoski, T.J., Kurtzman, C.P. (2001). Biocontrol potential of *Metchnikovia pulcherrima* strains against blue mold of apple, *Phytopathol*, 91: 1098-1108.
- Klassen, R., Meinhardt, F. (2005). Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell Microbiol*. 7: 393-401.
- Kuleaşan, H., Çakmakçı, M.L. (2003). Bakteriyosinlerin özellikleri, Gıda Mikrobiyolojisinde Kullanım Alanları ve İleri Dönemlerdeki Kullanım Potansiyelleri. *GIDA*, 28: 123-129.
- Lim, S.L., Tay, S.T. (2011). Diversity and killer activity of yeasts in malaysian fermented food samples. *Trop Biomed*, 28(2): 438-443.
- Liu, G.L., Chi, Z., Wang, G.Y., Wang, Z.P., Li, Y., Chi, Z.M. (2013). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit Rev Biotechnol*, 35(2): 222-234.
- Lopes, C.A., Sangorrin, M.P. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Rev Argent Microbiol*, 42: 298-306.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*, 10: 369-400.
- Marquina, D., Santos, A., Peinado, J.M. (2002). Biology of killer yeast. *Int Microbiol*, 5: 65-71.
- McCullough, M.J., Ross, B.C., Reade, P.C. (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 25(2): 136-144.
- McFarland J. (1907). Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc*, 14: 1176-1178.
- Ochigava, I., Collier, P.J., Walker, G.M., Hakenbeck R. (2011). *Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie Leeuwenhoek*, 99: 559-566.
- O'Leary, E.C. (1987). A study of killer yeast activity against the opportunistic pathogen *Candida albicans*. Thesis Presented for the Degree of Master of Science. School of Biological Sciences National Institute for Higher Education, Dublin, Ireland.
- Oro, L., Ciani, M., Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metchnikovia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol*, 116: 1209-1217.
- Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M., Morace, G. (1983). Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol*, 17(5): 774-780.
- Polonelli, L., Morace, G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol*, 24(5): 866-869.
- Roostita, L.B., Fleet, G.H., Wendry, S.P., Apon, Z.M., Gemilang, L.U. (2011). Determination of yeasts antimicrobial activity in milk and meat products. *Adv J Food Sci Technol*, 3(6): 442-445.
- Russell, I. (1986). Killer yeast identification. *J Am Soc Brew Chem*, 44(3): 123-125.
- Schmitt, M.J., Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol*, 26: 257-276.
- Seifert, H., Kaltheuner, M., Perdreau-Remington, F. (1995). *Micrococcus luteus* endocarditis: case report and review of the literature. *Zentralbl Bakteriol*, 282: 431-5.
- Suzuki, C., Ando, Y., Machida, S. (2001). Interaction of SMKT, a killer toxin produced by

Pichia farinosa, with the yeast cell membranes. *Yeast*, 18(16): 1471-1478.

Vadkertiova, R., Slavikova, E. (2007). Killer activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. *Pol J Microbiol*, 56 (1): 39-43.

Young, T. W., Yagiu, M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Leeuwenhoek*, 44(1): 59-77.

Wieser, M., Denner, E.B., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral, D., Lubitz, W., Maszenan, A.M., Patel, B.K., Seviour, R.J., Radax, C., Busse, H.J. (2002). Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int J Syst Evol Mikrobiol*, 52(2): 629-637.