



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN MAYA SUŞLARININ
MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE ENDÜSTRİYEL ÖNEME
SAHİP MAYA TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MELİH GÜNAY

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi TÜLAY TURGUT GENÇ

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN MAYA SUŞLARININ MOLEKÜLER
İDENTİFİKASYONU VE ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP MAYA TÜRLERİNİN
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

MELİH GÜNAY

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi TÜLAY TUTGUT GENÇ

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2018-2511

ÇANAKKALE – 2023

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Melih GÜNAY

31/08/2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ'e, çalışmamın tamamlanmasına fikri olarak katkı sağlayan ve tez izleme komitesi üyeleri sayın Dr. Öğr. Üyesi Neslihan DEMİR hocama ve sayın Prof. Dr. Seyhun YURDUGÜL hocama teşekkürü bir borç bilirim.

FDK-2018-2511 doktora tez projesi ile tez çalışmasına maddi destek sağlayan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komitesi'ne,

Uzun ve meşakatli bir süreç olan laboratuvar çalışmalarında tüm zorlukları benimle beraber göğüsleyen, benden yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Çağla ÇAKALOĞLU'na

Bu süreçte manevi olarak desteğini benden esirgemeyen, her zaman pozitif ve motive edici olan sevgili arkadaşım Mümin SARGIN ve eşi Berrin SARGIN'a

Doktora eğitimim süresince desteğini benden esirgemeyen arkadaşım Aslıhan ÖZBİLEN'e

Hayatımın her evresinde benden desteğini esirgemeyen başta annem Ruye ŞENTÜRK olmak üzere değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Melih GÜNAY
Çanakkale, Ağustos 2023

ÖZET

SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN MAYA SUŞLARININ MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP MAYA TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ

Melih GÜNAY

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ

31/08/2023, 152

Süt ve süt ürünleri maya türleri için doğal yaşam ortamıdır. Ayrıca, süt ürünlerinin barındırdığı maya mikrobiyası, koku ve tat oluşumunda önemli role sahiptir. Süt ve süt ürünlerinde *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Yarrowia* ve *Saccharomyces* cinslerine ait maya türlerine sıklıkla rastlanmaktadır. Çalışmada, fermente süt ürünleri olan yoğurt, ayran ve peynir örneklerinden maya suşları izole edilerek API-ID32C tanı kiti ve moleküler yöntemler (ITS-5.8S rDNA ve D1/D2 domininin PCR-RFLP ve DNA dizi analizi) kullanılarak tanımlandı. Ayrıca, tanımlanan maya suşlarının proteaz, lipaz ve üreaz enzim aktiviteleri, farklı karbon kaynaklarındaki fermantasyon kapasiteleri, termotolerans ve osmotolerans özellikleri incelenerek endüstriyel öneme sahip maya suşları belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans* ve *Saccharomyces cerevisiae* maya türlerinin yoğurt örneklerinde, *K. marxianus*, *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae* ve *Rhodotorula mucilaginosa* maya türlerinin ayran örneklerinde, *K. marxianus*, *Wickerhamomyces anomalus* ve *C. parapsilosis* maya türlerinin peynir örneklerinde yoğun olarak bulunduğu belirlendi. *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis*, *W. anomalus*, *P. kudriavzevii*, *Cl. lusitaniae* ve *C. intermedia* türlerine ait toplam yirmi dört maya suşunun endüstriyel olarak önemli olduğu belirlendi. Endüstriyel olarak önemli olduğu belirlenen bu maya suşları fermente ürünlerin üretiminde başlatıcı kültür olarak farklı

kombinasyonlar halinde kullanılabilir ve bu sayede fermente ürünlerin kalitesini arttıma ve olgunlaşma sürecine katkı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Maya, Proteaz, Lipaz, Üreaz, Fermantasyon, Stres



ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION OF YEAST STRAINS ISOLATED FROM DAIRY PRODUCTS AND DETERMINATION OF YEAST SPECIES WITH INDUSTRIAL IMPORTANT

Melih GÜNAY

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Biological Science

Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ

31/08/2023, 152

Milk and dairy products are the natural habitat for yeast species. In addition, the yeast microbiota contained in dairy products has an important role in the formation of odor and taste. Yeast species belonging to the genera *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Yarrowia* and *Saccharomyces* are frequently encountered in milk and dairy products. In the study, yeast strains were isolated from fermented dairy products such as yoghurt, ayran and cheese and identified using API-ID32C identification kit and molecular methods (PCR-RFLP and DNA sequence analysis of ITS-5.8S rDNA and D1/D2 domains). In addition, industrially important yeast strains were determined by examining the protease, lipase and urease enzyme activities, fermentation capacities in different carbon sources, thermotolerance and osmotolerance properties of the identified yeast strains. According to the results, it was determined that *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast species were predominantly present in yoghurt samples, *K. marxianus*, *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae* and *Rhodotorula mucilaginosa* yeast species were densely found in ayran samples, and *K. marxianus*, *Wickerhamomyces anomalus* and *C. parapsilosis* yeast species were predominantly present in cheese samples. It was found that twenty-four yeast strains belongs to *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis*, *W. anomalus*, *P. kudriavzevii*, *Cl. lusitaniae* ve *C. intermedia* yeast species are industrially important. These yeast strains could be used in different combinations as starter cultures in the production of

fermented products and thus can contribute to the ripening process and improving the quality of fermented products.

Keywords: Yeast, Protease, Lipase, Ürease, Fermantation, Stress



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv

BİRİNCİ BÖLÜM

1

GİRİŞ

İKİNCİ BÖLÜM

4

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

14

MATERYAL YÖNTEM

3.1. Maya Suşlarının izolasyonu.....	14
3.2. Maya Suşlarının Tanımlanması.....	14
3.2.1 API-ID32C Kit Sistemi ile Tanımlama.....	15
3.2.2 Moleküler Tanımlanması.....	15
3.3. İzole Edilen Maya Suşlarının Hücre Dışı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	21
3.3.1. Proteaz Aktivitesi.....	21
3.3.2. Lipaz Aktivitesi.....	22
3.3.3. Üreaz Aktivitesi.....	22
3.4. İzole Edilen Maya Suşlarının Fermantasyon Kapasitesinin Belirlenmesi.....	22
3.5. İzole Edilen Maya Suşlarının Sıcaklık ve Glikoz Testi.....	23

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM		24
ARAŞTIRMA BULGULARI		
4.1.	Yoğurttan İzole Edilen Maya Suşları ile Yapılan Çalışmalar.....	25
4.1.1.	Maya Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	26
4.1.2.	Maya Suşlarının Tanımlanması.....	23
4.1.3.	Tanımlanan Maya Suşlarının Hücre Dışı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	48
4.1.4.	Tanımlanan Maya Suşlarının Fermantatif Özellikleri.....	51
4.1.5.	Tanımlanan Maya Suşlarının Osmotolerans ve Termotolerans Özellikleri.....	54
4.2.	Ayrandan İzole Edilen Maya Suşları ile Yapılan Çalışmalar.....	56
4.2.1.	Maya Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	56
4.2.2.	Maya Suşlarının Tanımlanması.....	57
4.2.3.	Tanımlanan Maya Suşlarının Hücre Dışı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	85
4.2.4.	Tanımlanan Maya Suşlarının Fermantatif Özellikleri.....	89
4.2.5.	Tanımlanan Maya Suşlarının Osmotolerans ve Termotolerans Özellikleri.....	89
4.3.	Peynirden İzole Edilen Maya Suşları ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	98
4.3.1.	Maya Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	98
4.3.2.	Maya Suşlarının Tanımlanması.....	100
4.3.3.	Tanımlanan Maya Suşlarının Hücre Dışı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	125
4.3.4.	Tanımlanan Maya Suşlarının Fermantatif Özellikleri.....	129
4.3.5.	Tanımlanan Maya Suşlarının Osmotolerans ve Termotolerans Özellikleri.....	131

BEŞİNCİ BÖLÜM		
SONUÇ ve ÖNERİLER		134
KAYNAKÇA		143
ÖZGEÇMİŞ		I

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
bç	Baz çifti
g	Gram
ITS	Internal Transcribed Spacer
LiOAc	Lityum asetat
M	Molar
L	Litre
ml	Mililitre
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
rDNA	Ribozomal DNA
rpm	Rotate per minute
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TE	Tris EDTA
µl	Mikrolitre

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Çalışmada kullanılan ITS-PCR bileşenleri ve son konsantrasyonları	17
Tablo 2	Çalışmada kullanılan ITS-PCR şartları	17
Tablo 3	Çalışmada kullanılan D1/D2-PCR bileşenleri ve son konsantrasyonu	18
Tablo 4	Çalışmada kullanılan D1/D2-PCR şartları	19
Tablo 5	Restriksiyon enzimlerinin kesim işlemi için kullanılan reaksiyon bileşenleri	20
Tablo 6	Saflaştırma sonrasında maya suşlarının firmalara ve örnekleme yapılan kaynağa göre dağılımı	24
Tablo 7	Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının asimilasyon sonuçlarına göre tanımlanması ve gruplandırılması	28
Tablo 8	Yoğurt kaynaklı maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin PCR amplifikasyonu	32
Tablo 9	Birinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	33
Tablo 10	İkinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	33
Tablo 11	Üçüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	33
Tablo 12	Dördüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	35
Tablo 13	Beşinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	35
Tablo 14	Altıncı PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	35
Tablo 15	Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP sonucu	37

Tablo 16	Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR-RFLP sonucu	41
Tablo 17	Yoğurt kaynaklı maya suşlarının BLAST analizi sonuçları	43
Tablo 18	Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının proteolitik aktiviteleri	49
Tablo 19	Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının lipolitik aktiviteleri	50
Tablo 20	Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının üreaz aktiviteleri	50
Tablo 21	Yoğurt örneklerinde tanımlanan maya suşlarının farklı karbon kaynaklarında fermentasyon kapasiteleri	53
Tablo 22	Yoğurt örneklerinde tanımlanan maya suşlarının termotolerans özellikleri	55
Tablo 23	Yoğurt örneklerinde tanımlanan maya suşlarının osmotolerans özellikleri	55
Tablo 24	Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının asimilasyon sonuçlarına göre tanımlanması ve gruplandırılması	60
Tablo 25	Ayran kaynaklı maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin PCR amplifikasyonu	66
Tablo 26	Birinci PCR grubuna ait maya suşlarının maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	67
Tablo 27	İkinci PCR grubuna ait maya suşlarının maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	68
Tablo 28	Üçüncü grubuna ait maya suşlarının maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	69
Tablo 29	Dördüncü grubuna ait maya suşlarının maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	69
Tablo 30	Beşinci grubuna ait maya suşlarının maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	70
Tablo 31	Altıncı grubuna ait maya suşlarının maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri	70

Tablo 32	Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP sonucu	71
Tablo 33	Ayran kaynaklı maya suşlarının D1/D2 bölgesinin PCR amplifikasyonu	74
Tablo 34	Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR-RFLP sonucu	77
Tablo 35	Ayran kaynaklı maya suşlarının BLAST analizi sonuçları	79
Tablo 36	Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının proteolitik aktiviteleri	86
Tablo 37	Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının lipolitik aktiviteleri	87
Tablo 38	Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının üreaz aktivitesi	89
Tablo 39	Ayran örneklerinde tanımlanan maya suşlarının farklı karbon kaynaklarında fermentasyon kapasiteleri	93
Tablo 40	Ayran örneklerinde tanımlanan maya suşlarının termotolerans özellikleri	96
Tablo 41	Ayran örneklerinde tanımlanan maya suşlarının osmotolerans özellikleri	97
Tablo 42	Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının asimilasyon profili	98
Tablo 43	Peynir kaynaklı maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin PCR amplifikasyonu	107
Tablo 44	Birinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri	108
Tablo 45	İkinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri	108
Tablo 46	Üçüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri	109
Tablo 47	Dördüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri	110

Tablo 48	Beşinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri	110
Tablo 49	Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP sonucu	111
Tablo 50	Peynir örneklerinden izole edilen 26S rDNA gen bölgesi D1/D2 domaininin PCR-RFLP sonucu	116
Tablo 51	Peynir kaynaklı maya suşlarının BLAST analizi sonuçları	118
Tablo 52	Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının proteolitik aktivitesi	126
Tablo 53	Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının lipolitik aktivitesi	127
Tablo 54	Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının üreaz aktivitesi	128
Tablo 55	Peynir örneklerinde tanımlanan maya suşlarının farklı karbon kaynaklarında fermentasyon kapasiteleri	130
Tablo 56	Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının termotolerans özellikleri	132
Tablo 57	Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının osmotolerans özellikleri	133

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının zengin besi ortamında çoğaltılması	25
Şekil 2	Asimilasyon test sonucuna göre maya türlerinin yoğurt örneklerinde dağılımları	29
Şekil 3	Maya suşlarına (Y-1 ile Y-18) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	30
Şekil 4	Maya suşlarına (Y-19 ile Y-35) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	30
Şekil 5	Maya suşlarına (Y-36 ile Y-41) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	31
Şekil 6	Maya suşlarına (Y-1 ile Y-18) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	38
Şekil 7	Maya suşlarına (Y-19 ile Y-35) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	38
Şekil 8	Maya suşlarına (Y-36 ile Y-41) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	39
Şekil 9	Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin yoğurt örneklerinde dağılımı	44
Şekil 10	Maya suşlarının ITS15.8S-ITS2 bölgesi ile oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı.	46
Şekil 11	Maya suşlarının D1/D2 domain bölgesi ile oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı	47
Şekil 12	Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının zengin besi ortamında çoğaltılması	56
Şekil 13	Asimilasyon test sonucuna göre maya türlerinin ayran örneklerinde dağılımları	62
Şekil 14	Maya suşlarına (A-1 ile A-18) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	63

Şekil 15	Maya suşlarına (A-19 ile A-36) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	64
Şekil 16	Maya suşlarına (A-37 ile A-50) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	64
Şekil 17	Maya suşlarına (A-51 ile A-67) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	64
Şekil 18	Maya suşlarına (A-68 ile A-85) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	65
Şekil 19	Maya suşlarına (A-86 ile A-99) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	65
Şekil 20	Maya suşlarına (A-100 ile A-116) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu	65
Şekil 21	Maya suşlarına (A-1 ile A-18) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	72
Şekil 22	Maya suşlarına (A-19 ile A-36) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	72
Şekil 23	Maya suşlarına (A-37 ile A-51) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	73
Şekil 24	Maya suşlarına (A-52 ile A-68) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	73
Şekil 25	Maya suşlarına (A-69 ile A-83) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	73
Şekil 26	Maya suşlarına (A-84 ile A-98) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	74
Şekil 27	Maya suşlarına (A-99 ile A-116) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	74
Şekil 28	Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin ayran örneklerinde dağılımı	80
Şekil 29	Maya suşlarının ITS1.5S-ITS2 bölgesi ile oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı	83
Şekil 30	Maya suşlarının 26S rDNA bölgesi D1/D2 domaini için oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı	84

Şekil 31	Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının zengin besi ortamında çoğaltılması	99
Şekil 32	Asimilasyon test sonucuna göre maya türlerinin peynir örneklerinde dağılımları	103
Şekil 33	Maya suşlarına (G-1 ile G-19) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu	104
Şekil 34	Maya suşlarına (G-20 ile G-27; W-1, W-219; C-1 ile C-8) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu	105
Şekil 35	Maya suşlarına (C-9 ile C-21, C-23) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu	105
Şekil 36	Maya suşlarına (G-12; C-24 ile C-26, C-28, C-29; W-3 ile W-14) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu	105
Şekil 37	Maya suşlarına (W-15 ile W-22, W-24, W-25) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu	106
Şekil 38	Maya suşlarına (C-22, C-23, W-23) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu	106
Şekil 39	Maya suşlarına (G-1 ile G-18) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	112
Şekil 40	Maya suşlarına (G-19 ile G-27; W-1, W-2 ve C-1 ile C-7) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	112
Şekil 41	Maya suşlarına (C-8 ile C-25) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	113
Şekil 42	Maya suşlarına (C-26 ile C-29; W-3 ile W-16) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	113
Şekil 43	Maya suşlarına (W-17 ile W-25) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu	113
Şekil 44	Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin peynir örneklerinde dağılımı	119
Şekil 45	Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin beyaz peynirde dağılımı	120
Şekil 46	Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin çedar peynirinde dağılımı	121

Şekil 47	Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin keçi peynirinde dağılımı	118
Şekil 48	Maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi için oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı	123
Şekil 49	Maya suşlarının 26S rDNA bölgesi D1/D2 domaini için oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı	124



BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Mayalar birçok fermente ürünün (ekmek, şarap, bira vb.) üretiminde, maya ekstraktı, biyoetanol, çeşitli pigmentler ve probiyotikler gibi endüstriyel ürünlerin yanı sıra ilaç sanayi için çeşitli kimyasal maddelerin üretiminde kullanılmaktadır (Jakobsen ve Narvhus, 1996; Verstrepen vd., 2014). Özellikle *Saccharomyces cerevisiae* maya türü bu alanda en yaygın olarak kullanılan model bir organizmadır. *S. cerevisiae* maya türü ayrıca insülin, hepatit aşısı gibi heterolog bileşenlerin üretiminde de kullanılmaktadır (Hou vd., 2012). *S. cerevisiae* maya türüne ilave olarak son yıllarda birçok non-*Saccharomyces* maya türü de endüstride ve biyoteknolojide kullanılmaktadır. Özellikle fermente gıdaların üretiminde yaygın olarak kullanılan maya türleri: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida inconspicua*, *Candida maris*, *Torulopsis kefir*, *Torula koumiss*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces lactis*, laktozu fermente edemeyen maya türleri *Geotrichium penicillatum*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces uvarum*, *Issatchenkia orientalis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida diverca*, *Candida inconspicua*, *Candida pararugosa*, türleridir (Kabak ve Dobson, 2011; Johnson, 2013).

Süt ve süt ürünleri bazı farklı maya türleri için uygun bir habitattır (Fleet, 1990; Viljoen, 2001). Bu nedenle de süt ve süt ürünlerinde genellikle maya türlerine rastlanmaktadır. Süt ve süt ürünlerinde bulunan maya türleri yüksek protein, lipit, şeker ve organik asitleri substrat olarak kullanabildiklerinden, yani proteolitik ve lipolitik enzim aktiviteleri yüksek olduğundan bu tip fermente ürünlerde geniş dağılım göstermektedir. Ayrıca, düşük sıcaklık, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında maya türleri yaşayabilmektedir. Bu özellikleri nedeni ile maya türleri fermente süt ürünleri için faydaları (olgunlaşma süreci vb.) olduğu gibi zararlı da (starter kültürlerin üremesini engelleyebilme gibi) olabilmektedir (Jakobsen ve Narvhus, 1996; Lopandic vd., , 2006).

Fermente ürünlerin doğal yollarla üretilmesinde, kendiliğinden gelişen mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların ürettiği enzimler görev almaktadır. Mikrobiyal kökenli olan bu enzimlerin %50'den fazlası endüstriyel öneme sahiptir. Aynı enzimlerin farklı mikroorganizmalar tarafından üretilmesi, spesifik ürün oluşumu için

gereken ortam koşullarının düzenlenmesinde çalışmacılara kolaylık sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan biyoteknolojik çalışmalarda, fermentasyon sürecinde görevli suşlar kullanılarak saf ve iyi karakterize edilmiş yığın enzimlerin üretimi mümkün olabilmektedir. Bu çalışmalar, enzimlerin tekstil ve deterjan endüstrisine dahil edilmesine olanak sağlamaktadır (Kirk vd., 2002; Prakash vd., 2013; Sanchez ve Demain, 2011).

Son yıllarda, endüstriyel enzimler çeşitli doğal substratların parçalanmasında kullanılmaktadır. Örneğin, deterjan, kağıt, fırınlama ve gıda sanayisinde amilaz, lipaz, selüloz ve proteaz enzimleri, tekstil ve deri endüstrisinde lipaz, proteaz, selüloz ve laktaz enzimlerinden faydalanılmaktadır. Ayrıca, gıda ve içecek endüstrisinde, lipaz, proteaz, ksilanaz, pektinaz, invertaz ve inülinaz enzimleri, antimikrobiyal çalışmalarda da amiloglukosidaz ve peroksidaz enzimleri kullanılmaktadır. Bu enzimler arasında proteazlar özellikle süt ve deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmasından dolayı en çok görülen enzimdir. Amilaz ve selülozlar ise proteazların ardından en çok kullanılan diğer enzimler olup, deterjan, fırınlama ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Diğer enzimler ise deterjan, tekstil endüstrileri, alkol üretimi, biyoyakıt üretimi, fırıncılık ve gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerdir (Kirk vd., 2002; Godfrey ve West, 1996).

Mayaların amilaz, lipaz, fitaz, proteaz ve aromatik bileşikleri parçalayabilen oksidaz veya peroksidaz gibi bazı önemli endüstriyel enzimleri üretebildikleri bilinmektedir. Ayrıca hücre dışı enzimlerin birçok endüstriyel alanda kullanıldığı ve kirli suların temizlenmesinde de önemli rolleri olduğu rapor edilmiştir. (Yang vd., 2013; Johnson ve Echavarri-Erasun, 2011). Örneğin, *Kluyveromyces* cinsine ait bazı türler tarafından üretilen kimozi ve laktaz enzimleri ve *K. marxianus* maya türü tarafından üretilen inülinaz enzimleri gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, *S. cerevisiae* maya türü ve *Saccharomyces* cinsine ait bazı maya türleri tarafından kimozi, invertaz ve α -galaktosidaz enzimleri de gıda sanayisi ve yem üretiminde kullanılmaktadır. *Zygosaccharomyces rouxii* maya türü tarafından üretilen L-glutaminaz enzimi tedavi edici olarak, *Candida pseudotropicalis* tarafından üretilen laktaz enzimi gıda üretiminde kullanılmaktadır. *Candida rugosa*, *Pseudozyma antarctica* A, B, *G. candidum* ve *Trichosporon fermentum* maya türleri tarafından üretilen lipaz enziminden, gıda üretiminde, tatlanma, kirli su temizlenmesinde,

biyoremediasyonda, deterjan endüstrisinde faydalanılmaktadır (Aehle 2004, Hasan vd., 2006, Pandey vd., 2006, Vakhlu ve Klur 2006).

Yeni maya türlerinin belirlenmesi ve/veya yüksek oranda endüstriyel enzim üreten maya suşlarının belirlenmesi endüstriyel olarak önemlidir. Bu nedenle tamamlanan doktora çalışmasında fermantasyon ürünü olan farklı süt ürünlerinden izole edilen maya suşları hem asimilasyon test kitiyle hem de moleküler yöntemlerle tanımlandı ve tanımlanan maya türlerinin endüstriyel öneme sahip enzim aktiviteleri, fermantatif özellikleri ve stres tolerans özellikleri belirlendi.



İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mayalar farklı üreme koşullarına uyum sağlayabilmeleri, genetik anlamda manipülasyonların kolaylıkla yapılmasına olanak verdikleri için biyoteknolojik çalışmalarda ve endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaktadır. Fermente süt ürünlerinin eldesinde çeşitli maya türleri aktif olarak görev almaktadır.

Farklı ülkelerde market ve yöresel süt ve süt ürünlerinden çeşitli maya türleri tanımlanmıştır. Daha önce Avustralya Sidney’de perakende satılan süt ürünleri kullanılarak yapılan bir çalışmada pastörize süt, tereyağı, krema, peynir ve dondurmadan *Candida famata*, *Candida diffluens*, *Candida blankii*, *Candida stellata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomycopsis lipolytica* ve *Saccharomyces cerevisiae* maya türleri tanımlanmıştır (Fleet ve Mian, 1987).

Farklı süt ve süt ürünleri (sade ve aromalı yoğurt, ekşi süt, lor ve süzme peynir ile kefir, yöresel tilsit peyniri, peynir altı suyu ve peynir salamurası) kullanılarak yürütülen bir çalışmada toplamda 1013 maya suşu izole edilmiş ve 17 cinse ait 37 farklı maya türünün identifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Rohm vd., 1992). Çalışmanın sonucunda *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *K. marxianus*, *Yarrowia lipolytica* ve *Debaryomyces hansenii* maya türlerinin süt ürünlerinden yoğun olarak bulunduğu rapor edilmiştir.

Çedar ve gouda peynirlerinin üretildiği bir fabrikada, peynir yüzeyinden, salamura, peynir altı suyundan, çalışanların ellerinden ve hava ortamından maya izolasyonu yapılmış ve 187 maya izolatu elde edilmiştir (Viljoen ve Greyling, 1995). Çalışmanın sonucunda, salamura ve lor örneklerinden *Rhodotorula diffluens*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Y. lipolytica*, *Candida zeylanoides*, *Candida catenulata*, *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *D. hansenii*, *Issatchenkia orientalis*, *K. marxianus*, *Trichosporon beigellii* ve *S. cerevisiae* maya türleri tanımlanmıştır.

Danimarka'ya özgü Danablu peynirinin üretim aşamalarında barındırdığı maya mikrobiyotası API-ID32C (BioMerieux, France) kit sistemi kullanılarak belirlenmiştir (Tempel ve Jacobsen, 1998). Çalışmada kullanılan örnekler dört farklı Danablu mandırasından toplanmış ve 166 maya suşu izole edilerek tanımlanmıştır. Çalışmanın sonucunda, çiğ sütte ve salamura peynirlerde *Candida humicola*, *C. famata*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, *C. catenulata*, *Candida lipolytica*, *Trichosporon cutaneum*, *Torulospora delbrueckii*, *R. glutinis*, *Cr. laurentii*, *Candida globosa*, *Zygosaccharomyces* spp. ve *S. cerevisiae* maya türleri tanımlanmıştır.

Maya türlerinin hücre dışı enzim aktivitelerinin rapor edildiği birçok çalışma literatürde mevcuttur. *Debaryomyces polymorphus*, *D. hansenii*, *Debaryomyces castellii*, *Hansenula anomala*, *Kloeckera apiculata* ve *S. cerevisiae* maya türlerinin β -glukosidaz aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Rosi vd., 1994). Ayrıca yürütülen başka bir çalışmada *Aerobasidium pullulans*, *C. parapsilosis* ve *Kloeckera apiculata* maya türlerinin yüksek β -glukosidaz aktivitesi gösterdiğini rapor edilmiştir (McMahon vd., 1999).

Maya türlerinin tanımlanması ve enzimatik aktiviteleri ile ilgili yürütülen bir çalışmada, şarap üretimi sürecinde üzüm şirasından fermantasyon öncesi veya başlangıcında örnekleme yapılmış ve 182 non-*Saccharomyces* maya suşu izole edilmiştir. Daha sonra izole edilen suşların ITS1-5.8S ITS2 rDNA gen bölgeleri çoğaltılmış ve *Hinf* I restriksiyon enzimi kullanılarak PCR-RFLP analizi yapılmıştır (Briones vd., 2000). Biyokimyasal testler ve PCR-RFLP sonuçlarına göre *Metschnikowia pulcherrima*, *Brettanomyces clausenii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia anomala*, *Klyveromyces thermotolerans*, *C. stellata*, *D. hansenii* ve *S. cerevisiae* maya türleri tanımlanmıştır. Çalışmada ayrıca non-*Saccharomyces* maya türlerinin proteinaz, β -gluksidaz ve poligalakturonaz enzim aktiviteleri incelenmiştir. *D. hansenii* maya türü dışındaki tüm maya izolatlarında poligalakturonaz aktivitesi görülürken, *M. pulcherrima* maya türünde β -glukosidaz aktivitesinin yüksek olduğunu gösterilmiştir. *P. membranifaciens* ve *M. pulcherrima* maya türlerinin yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

İtalya'nın Apulia bölgesinde yürütülen bir çalışmada farklı hayvansal sütlerden (inek, keçi, koyun ve su bufalosu) ve apol peynirinden toplamda 105 maya suşu izole edilerek, biyokimyasal yöntemlerle tanımlamıştır (Corbo vd., 2001). Çalışmanın sonucunda, hayvansal sütlerden ve Apul peynirinden 12 farklı cinse ait 36 maya türü tanımlanmıştır. Hayvansal sütlerde ve Apol peynirinde *Candida sake*, *C. catenulata*, *Tr. cutaneum*, *C. zeylanoides* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin en yoğun olarak bulunduğu belirlenmiştir.

Brezilya'nın Minas Gerais bölgesindeki dört farklı lokal üreticiden toplanan yoğurt örneklerinin maya mikrobiyotası biyokimyasal ve fizyolojik testler kullanılarak tanımlanmıştır (Schwan vd., 2001). Yoğurt örneklerinden izole edilen 577 maya suşlarının *D. hansenii*, *D. castellii*, *Mrakia frigida*, *C. parapsilosis*, *Candida maltosa*, *Candida mogii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* ve *Hansenula spp.*, maya türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmanın sonunda *D. hansenii*, *S. cerevisiae*, *Hansenula spp.* maya türlerinin yoğurt örneklerinde yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir.

Daha önce yürütülen bir çalışmada Rokfor peynirinden maya izolasyonu yapılmış ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir (Wojtatowicz vd., 2001). Çalışmanın sonucunda peynir yüzeyindeki maya yoğunluğu 10^5 - 10^9 CFU/g olarak hesaplanırken, iç kısımdaki maya yoğunluğunun 10-100 kat daha az olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre rokfor peynirinde *C. famata*, *C. spherica* maya türleri ve *Candida intermedia* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu, ayrıca *Saccharomyces kluyveri*, *Candida kefir* ve *C. lipolytica* maya türlerinin de sıklıkla bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca *C. famata* olarak tanımlanan maya türlerinin hücre içi ve hücre dışı proteolitik ve lipolitik aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda *C. famata* maya türlerinin %72'inde orta seviyede hücre içi lipolitik aktivite, %38 maya türünün düşük, %45'inin orta ve %17'sinin yüksek seviyede hücre dışı lipolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca *C. famata* türlerinin sadece %10'unun yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Sardinian koyun sütünden elde edilen farklı peynir örneklerinde barındırdığı maya biyotası belirlenerek maya suşlarının enzim aktiviteleri (proteaz ve lipaz), sıcaklık testi, tuz toleransı ve farklı karbon kaynaklarındaki asimilasyon özellikleri belirlenmiştir (Cosentino

vd., 2001). Toplamda 160 farklı peynir örneğinden izole edilen 281 maya suşunun 16 farklı cinse ve 25 farklı maya türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak peynir örneklerinde *D. hansenii* maya türünün baskın olarak bulunduğu, ayrıca *Geotricum candidum*, *Kluyvermoyces lactis*, *K. marxianus* maya türlerinin de peynir örneklerinde sıklıkla bulunduğu belirlenmiştir. *K. lactis*, *K. marxianus* ve *Dekkara anomala* maya türlerinin laktozu fermente edebildiği görülmüştür. Maya türlerinin büyük bir kısmı laktik asidi asimile edebilirken, *D. hansenii*, *Rhodotorula rubra* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin sitratı asimile edebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, tüm maya suşlarının zayıf proteaz ve lipaz aktiviteye sahip olduğu, tanımlanan bazı *D. hansenii* ve *K. lactis* türlerinin osmotolerans özellik gösterdiği belirlenmiştir

Brezilya'da yerel üreticilerden alınan yoğurt örneklerinin maya mikrobiyotası üzerine yürütülen çalışmada, yoğurt örneklerindeki maya yoğunluğu 6×10^7 CFU/g olarak hesaplanmıştır (Moreira vd., 2001). Yoğurt örneklerinden 577 maya suşu izole edilmiş, maya suşları fizyolojik ve morfolojik özelliklerine göre tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yoğurt örneklerinde *Mrakia frigida*, *C. parapsilosis*, *D. castellii*, *Candida maltosa*, *S. cerevisiae* ve *Hansenula* spp., maya türlerinin yoğun olarak yer aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, *Sc. pombe*, *D. hansenii*, *C. mogii* ve *K. marxianus* maya türlerinin de yoğurt biyotasında bulunduğu belirlenmiştir.

Endüstriyel ürünlerin üretiminde, ilaç endüstrisinde mayalardan ve mayalar tarafından üretilen enzimlerden yoğun olarak faydalanılmaktadır. Çeşitli doğal kaynaklardan izole edilen maya türlerinin hücre dışı enzim aktivitelerinin sıklıkla çalışılmaktadır. Güney Afrika'da şarap mahsenlerinden izole edilen 245 tane non-*Saccharomyces* maya suşunun hücre dışı pektinaz, proteaz, β -glukanaz, likenaz, β -glukosidaz, selülaz, xylanaz ve amilaz enzim aktiviteleri incelenmiştir (Strauss vd., 2001). *Candida pulcherrima*, *C. stellata*, *Candida valida*, *Candida oleophila* ve *Kloeckera apiculata* türlerini içeren 9 maya türünün pektolitik enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. *C. stellata*, *C. pulcherrima*, *K. apiculata*, *D. hansenii* türlerine ait bazı maya suşlarının proteolitik enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *C. stellata*, *C. pulcherrima* ve *K. apiculata* maya türlerinin likenaz aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. İzole edilen maya suşlarının hiçbirinde β -glukosidaz aktivitesi görülmezken sadece sekiz maya suşunda β -glukosidaz aktivitesinin

çok zayıf olduğu tespit edilmiştir. *C. stellata*, *C. pulcherrima* ve *K. apiculata* türlerini içeren 11 maya türünde selüloz aktivitesinin, *C. hellenica*, *C. stellata* ve *K. apiculata* maya türlerinde β -glukanaz aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir.

Brezilya tropikal yağmur ormanlarından 348 maya suşu ve 46 maya-benzeri fungus olan *Aerobasidium pullulans* suşları izole edilmiş ve hücre dışı amilaz, lipaz, esteraz, proteaz, pektinaz ve kitinaz aktiviteleri test edilmiştir (Buzzini ve Martini, 2002). Çalışmanın sonucunda, *Geotricum klebahnii*, *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp., *Pichia anomala*, *Pichia stipitis*, *Cr. albidus*, *Cryptococcus humicolus*, *Cr. laurentii*, *Cryptococcus luteolus*, *Pseudozyma antarctica*, *Rhodotorula graminis*, *A. pullulans* maya türlerini içeren 31 maya suşunda amilaz aktivitesinin bulunduğu tespit edilmiştir. *Candida diddensiae*, *Candida magnoliae*, *C. maltosa*, *Candida sake*, *D. hansenii*, *P. anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia sorbophila*, *T. delbrueckii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *A. Pullulans*, *Cr. albidus*, *Cr. humicolus*, *Cr. laurentii*, *Cr. luteolus*, *Ps. antarctica*, *Pseudozyma fusiformata*, *Rhodotorula bacarum*, *R. glutinis*, *Rhodotorula graminis* ve *Rhodotorula mucilaginoso* maya türlerini içeren 162 maya suşunun esteraz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *Zygosaccharomyces* spp., *Ps. antarctica*, *Ps. fusiformata*, *R. bacarum* maya türleri haricinde kalan 395 maya suşundan 160 tane maya suşunda lipaz aktivitesinin görüldüğü, *C. magnoliae*, *C. silvae*, *G. klebahnii*, *P. anomala*, *Pichia spartinae*, *A. pullulans*, *Cr. humicolus*, *Cr. laurentii*, *Cr. luteolus*, *Ps. antarctica*, *Ps. fusiformata* ve *R. bacarum* maya türlerini içeren 62 maya suşunda proteaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir. *C. sake*, *P. guilliermondii*, *P. spartinae*, *A. pullulans* ve *Ps. antarctica* maya türlerini barındıran 42 maya suşunda pektinaz aktivitesinin olduğu ve tüm maya suşları içinde sadece 12 maya suşunda kitinaz aktivitesinin varlığı rapor edilmiştir (Buzzini ve Martini, 2002).

Macaristan'da marketlerde satılan ticari süt ürünlerinin barındırdığı maya mikrobiyotası Simplified Identification System (SIM) ve 18S rDNA gen bölgesinin restriksiyon fragment analizi yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır (Vasdinyei ve Daek, 2003). Çalışmanın sonucunda izole edilen 62 maya suşunun *D. hansenii*, *G. candidum*, *Y. lipolytica*, *K. lactis* ve *C. catenulata* maya türlerinin dağılım gösterdiği, *D. hansenii* maya türünün baskın olarak bulunduğu tespit edilmiştir.

Avusturya'daki marketlerden farklı peynir türleri, yoğurt, tereyağı, ekşi kerma, ekşi süt örnekleri olmak üzere 99 farklı süt ürününden 513 maya suşu izole edilerek klasik yöntemle ve moleküler yöntemlerle (RADP-PCR ile D1/D2 rDNA gen bölgelerinin sekans analizi) tanımlanmıştır (Lopandic vd., 2006). Çalışmanın sonucunda, farklı süt ürünlerinde, *Candida pararugosa*, *Candida inconspicua*, *Candida saitoana*, *C. catenulata*, *C. intermedia*, *Candida pseudoglaebosa*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *C. parapsilosis*, *Candida sojae*, *Clavispora lusitaniae*, *Cr. curvatus*, *Debaryomyces fabryi*, *D. hansenii*, *G. candidum*, *Issatchenkia orientalis*, *Kazachstania unispora*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *Picha fermentans*, *P. guilliermondii*, *T. delbrueckii*, *Y. lipolytica*, *R. mucilaginosa*, *Tr. cutaneum*, *Trichosporon ovoides* ve *S. cerevisiae* maya türlerinin bulunduğunu tespit edilmiştir.,

Çeşitli süt ve süt ürünlerinin maya mikrobiyotasının belirlendiği başka bir çalışmada, ham süt ve market sütlerinde, *D. hansenii*, *C. parapsilosis*, *C. intermedia*, *Cr. curvatus*, *Geotrichum geotrichum*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *I. orientalis*, *P. fermentans*, *Pichia farinosa*, *P. anomala*, *P. membranifaciens*, *Trichosporon beigeli* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (Büchl ve Seiler, 2011). Endüstriyel olarak üretilen ayranlarda *C. tropicalis*, *Geotrichum* spp., *Issatchenkia* spp., *Kluyveromyces* spp., *P. anomala*, *P. kluyveri*, *D. hansenii*, *Galactomyces* spp., *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* maya türlerinin dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Ürdün tereyağı ile yapılan ayranlarda ise *G. geotrichum*, *I. orientalis*, *T. delbrueckii*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *P. kluyveri*, ve *Trichosporon ovoides* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, beyaz peynirin yüzey biyotasında *D. hansenii*, *G. geotrichum*, *I. orientalis*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Tr. Beigeli* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

Atık su artıma tesislerinden izole edilen 257 maya suşu moleküler yöntemler (D1/D2 domaininin DNA dizi analizi) tanımlanarak hücre dışı enzim aktiviteleri (lipaz, proteaz, manganaz bağımlı peroksidaz (MnP) ve lignin peroksidaz (LiP)) belirlenmiştir (Yang vd., 2013). Çalışmanın sonucunda, 92 maya suşunun petri deneylerinde enzim aktivitelerine pozitif sonuç verdiği, bu suşlardan 16 tanesinin ise lipaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Lipaz aktivitesine sahip maya suşlarının *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *Cr. curvatus*, *T. delbrueckii*, *Tr. montevidense*, *Filobasidium uniguttulatum* türlerine ait olduğu, 14 maya

suşunun proteaz aktivitesi gösterdiği ve bu suşların *Candida palmiroleophila*, *Cr. albidus*, *Candida* sp., *P. spartinae*, *P. membranifaciens*, *R. mucilaginosa*, *T. delbrueckii*, *Tr. montevideense*, *Pseudozyma* sp. ve *Y. lipolytica* maya türlerine ait olduğu gösterilmiştir. Çalışmada 257 suşunun da amilaz, selüloz ve fitaz aktivitesine sahip olmadığı tespit edilmiştir (Yang vd., 2013).

Mısır'da farklı süt ürünlerinden (sofra tereyağı, tereyağı, kareish peyniri, damietta peyniri, ras peyniri ve işlenmiş peynir) izole edilen maya suşları klasik tanımlama yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir (Mohammed vd., 2017). Çalışmanın sonucunda süt ürünlerinde, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *Cr. neoformans*, *Debaryozyma hansenii* (*C. famata*), *G. candidum*, *I. orientalis* (*C. krusei*), *K. marxianus* (*C. kefir*), *P. fermentans* (*C. lambica*), *R. glabrata*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* (*C. robusta*), *Tr. asahii*, *Trichosporon mucoides* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Mısır'da bazı süt ürünlerinden (bufalo sütü, yoğurt, tereyağı ve kareisk peyniri) maya suşları farklı izolasyon ortamlarında yapılmış ve tanımlanmıştır (Moubasher vd., 2017). Elde edilen sonuçlara göre her bir izolasyon ortamında *Candida*, *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Rhodotorula* ve *Trichosporon* cinslerine ait maya türleri tanımlanmıştır. Ayrıca, en az bir izolasyon ortamından izole edilen *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *Cyberlindnera jadinii*, *D. hansenii*, *G. candidum*, *Kazachstania unisporus*, *Kluyveromyces marxianus*, *M. guilliermondii*, *Pichia exigua*, *R. mucilaginosa* ve *T. asahii* maya türlerinin süt ürünlerinde yoğun olarak bulunduğu görülmüştür.

Süt ürünleri üreticilerinden toplanan yumuşak peynir, sert peynir, krem peyniri ve yoğurt örneklerinden maya izolasyonu yapılarak moleküler yöntemlerle (D1/D2 rDNA gen bölgesi, ITS1-5.8s ITS2 rDNA gen bölgesi, beta tübülün geni ve EF- α (Elongation Factor α) gen bölgelerinin dizi analizi) tür tanımlaması yapılmıştır (Mounier vd., 2017). Çalışma sonucunda, süt ürünlerinde, *C. inconspicua*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *Cr. curvatus*, *Cr. diffluens*, *Cr. pseudolongus*, *Cr. uniguttulatus*, *D. hansenii*, *G. geotrichum*,

K. lactis, *K. marxianus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *P. fermentans*, *R. graminis*, *R. mucilaginosa*, *Sporodiobolus salmonicolo*, *Tr. asahii*, *Y. lipolytica* maya türleri tanımlanmıştır.

Mısır'ın geleneksel peyniri olan Karish peynirinin maya biyotası ve probiyotik özelliklerinin araştırıldığı çalışmada, API-ID20 kit sistemi ve ITS-rDNA bölgesi kullanılarak maya türleri tanımlanmıştır (Abdel-Ghany vd., 2019). *S. cerevisiae* (25%), *Wickerhamomyces anomalus* (23%), *P. kudriavzevii* (19%), *K. lactis* (17%), *G. candidum* (6%), *D. hansenii* (4%), *C. tropicalis* (3%), *Cryptococcus neoformans* (1%), *Rhodotorula glabrata* (1%) ve *Tri. cutaneum* (1%) maya türlerinin karish peynirinin biyotasını oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca, *S. cerevisiae*, *W. anomalus* ve *P. kudriavzevii* maya türlerinin yüksek probiyotik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Kamerun'un Kuzey bölgesinden toplanan yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının tanımlaması yapılmıştır. Çalışmada 26S rDNA gen bölgesinin PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) yöntemi ile tanımlaması yapılmıştır (Maïworé vd., 2019). *Malassezia globosa*, *Hanseniaspora uvarum*, *Galactomyces candidum*, *C. tropicalis*, *A. pullulans*, *T. globosa*, *Saccharomyces cerevisiae/paradoxus*, *Pichia kluyveri*, *C. parapsilosis*, *T. delbrueckii*, *K. marxianus*, *Candida orthopsilosis* ve *Pseudozyma* sp. maya türlerinin yoğurt örneklerinde dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Yoğurt örneklerinde *G. candidum*, *C. parapsilosis*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae/paradoxus* ve *K. marxianus* maya türlerinin baskın olarak bulunduğu tespit edilmiştir.

Extremadura (İspanya) bölgesinden toplanan geleneksel yumuşak peynirlerinden 149 maya suşu izole edilerek ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat-Polimerase Chain Reaction) yöntemiyle tanımlanmıştır (Benito vd., 2020). *D. hansenii*, *Debaryomyces vindobonensis*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *Candida cabralensis*, *Candida pararugosa*, *C. zeylanoides*, *Y. lipolytica*, *P. fermentans*, *Pichia cactophila*, *P. kudriavzevii* ve *Pichia jadinii* maya türlerinin yumuşak peynirlerin biyotasında bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *P. fermentans* olarak tanımlanan altı maya suşunun, *P. kudriavzevii* olarak tanımlanan üç maya

suşunun, *K. marxianus* olarak tanımlanan üç maya suşunun, *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* olarak tanımlanan birer maya suşunun peynir gelişimi için potansiyel probiyotik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

Geleneksel Türk peynirlerinden (tulum, kaşkaval, mihaliç, örgü, beyaz, sepet ve keçi peyniri) izole edilen maya suşları moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır (Özmen-Togay vd., 2020). *K. lactis*, *C. parapsilosis*, *Cl. lusitaniae*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *R. mucilaginosa*, *Meyerozyma guilliermondii* (eski adı: *Pichia guilliermondii*), *C. zeylanoides* ve *Candida albicans* maya türlerinin geleneksel peynir çeşitlerinde dağılım gösterdiği belirlenmiştir. *K. marxianus* ve *D. hansenii* maya türlerinin peynir türlerinde baskın olarak bulunduğu, kaşkaval peynirinden tanımlanan *D. hansenii* ve *R. mucilaginosa* maya türlerinin antiilisteriyal etkiye sahip olduğu, *K. lactis* olarak tanımlanan bir maya suşunun (örgü peyniri) proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Türkiye’de yürütülen bir çalışmada Divle mağarası (Karaman, Türkiye) peynirinin olgunlaşma sürecinde *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. lactis*, *C. zeylanoides* ve *G. candidum* maya türlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Ozturkoglu-Budak vd., 2016a). Tanımlanan maya türlerinin proteolitik ve lipolitik aktivitelerinin incelendiği başka bir çalışmada ise *Y. lipolytica* maya türünün yüksek seviyede lipaz aktivitesine ve orta seviyede proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *D. hansenii* ve *G. candidum* maya türlerinin düşük seviyede proteaz aktivitesi gösterdiği, *K. lactis* ve *C. zeylanoides* maya türlerinin proteolitik aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir (Ozturkoglu-Budak vd., 2016b). *D. hansenii*, *K. lactis* ve *C. zeylanoides* maya türlerinin orta seviyede lipolitik aktivite gösterdiği, *G. candidum* maya türünün ise düşük lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Tereyağından izole edilen maya suşları D1/D2 domainin DNA dizi analizi kullanılarak tanımlanmış ve tanımlanan maya suşlarının hücre dışı lipolitik, amilolitik ve proteolitik enzim aktiviteleri incelenmiştir (Yalçın vd., 2017). *C. zeylanoides* olarak tanımlanan maya suşlarının çoğunda yüksek lipolitik ve proteolitik aktivite görülmüş, sadece bir *C. zeylanoides* maya suşunun amilolitik aktiviteye sahip olduğu diğer maya suşlarının ise enzim aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir.

Gaziantep bölgesine ait 208 yöresel yoğurt örneğinden yalnızca yirmi beş tanesinden maya izolasyonu yapılabilmektedir (Kılıç vd., 2019). Yoğurt örneklerinde maya yoğunluğu $1-1,8 \times 10^8$ CFU/g olarak hesaplanmıştır. İzole edilen maya suşları MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) yöntemi tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, yoğurt örneklerinde %52 oranda *C. kefir* maya türünün yoğun olarak bulunduğu belirlenmiştir. Dağılım gösteren diğer maya türleri ise *S. cerevisiae* (%36), *C. tropicalis* (%8) ve *C. lipolytica* (%4) olarak tespit edilmiştir.

Genellikle süt ve süt ürünlerinden izole edilen maya suşlarının tanımlanması klasik tanımlama yöntemleri, tanı kitleri veya moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Klasik tanımlama yöntemlerinin zor ve zaman alması nedeniyle çalışmada, hızlı tanımlama kiti (API-ID32C) ve moleküler yöntemler (ITS1-5.8S ITS2 rDNA ve D1/D2 domainine ait gen bölgelerinin PCR-RFLP analizi ve bu genlerin DNA dizi analizi) kullanılarak süt ürünlerinden (yoğurt, ayran ve peynir) izole edilen maya suşlarının tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Maya türleri tarafından üretilen hücre dışı enzimler fermente ürünlerin oluşmasında, olgunlaşmasında, tat koku gibi özelliklerin oluşmasında büyük öneme sahiptir. Maya türlerinin hücre dışı enzim aktivitelerinin belirlenmesinde şaraplık üzümlerden veya şarap üretim aşamalarından izole edilen maya suşları yoğun olarak kullanılmaktadır. Süt ve süt ürünlerinden izole edilen maya suşlarının hücre dışı enzim aktivitelerinin belirlenmesi üzerine yürütülen çalışma sayısı ise oldukça azdır. Bu nedenle, çalışmada süt ürünlerinden izole edilerek tanımlanan maya suşlarının hücre dışı proteaz, lipaz ve üreaz aktiviteleri incelenmiş, maya suşlarının fermantatif özellikleri, osmotolerans ve termotolerans özellikleri belirlenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Maya suşlarının izolasyonu

Araştırmada kullanılan maya suşları TTG-Maya Kültür Koleksiyonu'na ait olup, 2006 yılında Bolu ve çevresinde yer alan yerel üreticilerden temin edilen süt ürünlerinden (yoğurt, peynir ve ayran) izole edildi. Aseptik koşullarda laboratuvara getirilen yoğurt, peynir ve ayran örnekleri %2'lik sodyum sitrat çözeltisinde homojenize edildi. Daha sonra antibiyotik içeren YGC (40 gr/L Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar) besi ortamı hazırlandı ve küf gelişimini önlemek için besi ortamlarına %0,1 sodyum propionat YGC besi ortamına ilave edildi. Hazırlanan besi ortamlarına homojenize edilen örneklerden 50µl yayma ekim yapıldı ve 30°C sıcaklıkta 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Gelişim gösteren maya suşları için CFU (Colony Forming Unit) değeri CFU/mL olarak hesaplandı ve koloni yapısı farklılık gösteren maya suşları rastgele seçilerek YPD (10 g/L Yeast Extract, 20 g/L Bacto-Peptone, 20 g/L Agar, %2 Dextrose) besi ortamına transfer edildi. İzole edilen maya suşları ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 C'de stoklandı. Doktora tez çalışmasında kullanılmak üzere, yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilen maya suşları stoklardan çıkarıldı ve canlandırılması için YPD katı besi ortamına ekimleri yapıldı. Üreme gösteren maya suşları yeniden saflaştırıldı ve daha sonra yürütülecek olan çalışmalarda kullanılmak üzere %20 gliserolde içerisine aktarıldı ve -80°C stokları yeniledi. Canlandırma işlemi esnasında üreme göstermeyen maya suşları ise çalışma kapsamından çıkartılarak kalan maya suşları ile çalışmalara devam edildi.

3.2. Maya Suşlarının Tanımlanması

Araştırmada, yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilen maya suşları öncelikle mikro ölçekli asimilasyon kiti olan API-ID32C (Analytical Profile Index) tanı kitiyle (bioMérieux, Fransa) ve daha sonra izole edilen maya suşları PCR-RFLP analizi ile ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi ve 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait gen bölgelerinin DNA dizi analizi ile tanımlanması yapıldı.

3.2.1. API-ID32C Kit Sistemi ile Tanımlama

API-ID32C kit sistemi 32 farklı substrat içeren bir asimilasyon testi olup, hızlı tanı kiti olarak maya ve diğer mantarların tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır (Meletiadis vd., 2011; Karasu-Yalcin vd., 2017; Osuntokun vd., 2018). İzole edilen maya suşlarının API-ID32C kit sistemi kullanılarak üretici firmanın önerdiği yapıldı. API-ID32C kit sistemi farklı azot ve karbon kaynaklarını substrat olarak içeren ve klinik mikrobiyolojide sıklıkla kullanılan hızlı bir tanı kitidir. Kit sistemi içerisinde Galaktoz, Aktidiyon, Sükroz, *N*-Asetil-Glukozamin, D,L-Laktat, L-Arabinoz, Sellobiyoz, Rafinoz, Maltoz, Trehaloz, 2-Keto-Glukonat, α -Metil-D-Glukozit, Mannitol, Laktoz, Inositol, Sorbitol, D-Xylose, Gliserol, Ramnoz, Palatinoz, Eritritol, Melibiyoz, Glukuronat, Melezitoz, Glukonat, Levulinat, Glukoz, Sorboz, Glukozamin ve Eskulin substrat olarak bulunmaktadır. Maya suşları bu substratları kullanılabilirliğine göre pozitif veya negatif olarak işaretlendi. Elde edilen değerler üretici firmanın sağladığı APIWEB v4.0 programında analiz edildi ve maya türlerinin tanımlanması yapıldı.

3.2.2. Moleküler Tanımlama

Maya türlerinin tanımlanmasında ribozomal RNA genlerinin PCR-RFLP ve DNA dizi analizleri sıklıkla kullanılmaktadır (Gibson vd., 2011; Togay vd., 2020). Bu nedenle izole edilen maya suşları ITS-5.8S rDNA ve 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak tanımlandı.

Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilerek saflaştırılan maya suşlarının genomik DNA izolasyonları LiOAc+SDS yöntemi kullanılarak yapıldı (Kristjuhan vd., 2011). YPD besi ortamında çoğaltılan maya kolonilerinden bir tanesi içerisinde 200 μ l 0,2M LiOAc ve %1 SDS solüsyonu bulunan 1,5 μ l steril tüplere aktarıldı.

Elde edilen hücre süspansiyonu 70°C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dk. süreyle inkübe edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 300µl saf etil alkol (%96-99) ilave edilerek vorteks (Stuarts Vorkex Mixer-SA8) ile yavaşça karıştırıldı ve 12500 rpm hızda 3 dk. boyunca santrifüj yapıldı (Hettich Zentrifuges-Universal 320). Süpernatant kısımları atıldıktan sonra pelet üzerine 1 ml %70'lik etil alkol ilave edildi ve 12500 rpm'de 3 dk. süreyle tekrar çöktürüldü. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 100µl TE pH.8 (Tris-EDTA) ilave edilerek 12500 rpm'de 45sn santrifüj yapıldı. İzolasyon sonrası elde edilen genomik DNA örnekleri devam eden çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

ITS-5.8S rDNA Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

Maya suşlarına ait genomik DNA kullanılarak ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesi mayalara özgü evrensel olduğu bilinen ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı (White vd., 1990). PCR reaksiyonları BIO-RAD Thermal Cycler cihazı kullanılarak 30 µl hacimde olacak şekilde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan PCR bileşenleri ve PCR şartları Tablo 1 ve Tablo 2'de verildi. Elde edilen PCR ürünleri (5 µl), 6X yükleme tamponu (2 µl) (Thermo-Scientific, R0611) kullanılarak, %1,5 (w/v) agaroz jelde 120 voltya 120 dk yürütüldü. PCR ürünleri ultra violet transilluminatör (UV) üzerinde Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi kullanılarak görüntülendi. PCR ürünlerinin bant büyüklüklerinin hesaplanması için 100bp marker (Thermo-Scientific, SM041) referans alındı ve PCR uzunlukları Gel-Pro Analyzer v4.0 programı kullanılarak hesaplandı. Yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilen maya suşları, ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin PCR uzunluklarına göre gruplandırıldı.

Tablo 1

Çalışmada kullanılan ITS-PCR bileşenleri ve son konsantrasyonu

PCR Bileşenleri (30 µL)	Miktarı (µL)	Son Konsantrasyon
10X Reaksiyon Buffer	3	1X
MgCl ₂	3,6	1,5 mM
Forward Primer (ITS-1)	1,2	10pmol/ µL
Reverse Primer (ITS-4)	1,2	10pmol/ µL
dNTP	0,6	0,2 mM
Taq Polimeraz	0,3	1U
dH ₂ O	19,1	
DNA tamplate	1	50-100 ng

Tablo 2

Çalışmada kullanılan ITS-PCR şartları

Reaksiyon Aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	3	1
Denatürasyon	94	1	-
Primer bağlanması	60	0,45	30
Uzama	72	1	-
Sonlanma	72	10	1

26S rDNA D1/D2 bölgesinin PCR Amplifikasyonu

Maya suşlarına ait genomik DNA kullanılarak 26S rDNA gen bölgesi içinde yer alan D1/D2 domaini, NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') ve NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primerleri ile çoğaltıldı (Kurtzmann ve Robnett, 1998).

PCR reaksiyonları, BIO-RAD Thermal Cycler cihazı kullanılarak 30 µl hacimde olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonu için kullanılan bileşenler ve reaksiyon şartları Tablo 3 ve Tablo 4’te verildi. PCR amplifikasyonu sonucunda elde edilen PCR ürünleri (5 µl) ve 6X yükleme tamponu (2 µl) (Thermo-Scientific, R0611) kullanılarak, %1,5 (w/v) agaroz jelde 120 voltta 120 dk. yürütüldü. PCR ürünleri ultra violet transilluminatör (UV) üzerinde görüntülendi ve PCR görüntüleri Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi kullanılarak görüntülendi. PCR ürünlerinin bant büyüklüklerini belirlemek için 100bp marker (Thermo-Scientific, SM041) referans alındı ve Gel-Pro Analyzer v4.0 programı kullanılarak bant büyüklükleri hesaplandı. Yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilen maya suşları D1/D2 rDNA gen bölgesinin PCR büyüklüklerine göre gruplandırıldı.

Tablo 3

Çalışmada kullanılan D1/D2-PCR bileşenleri ve son konsantrasyonu

PCR Bileşenleri (30 µL)	Miktarı (µL)	Son Konsantrasyon
10X Reaksiyon Buffer	3	1X
MgCl ₂	3,6	1,5 mM
Forward Primer (NL-1)	1,2	10pmol/ µL
Reverse Primer (NL-4)	1,2	10pmol/ µL
dNTP	0,6	0,2 mM
Taq Polimeraz	0,3	1U
dH ₂ O	19,1	
DNA tamplate	1	50-100 ng

Tablo 4

Çalışmada kullanılan D1/D2-PCR şartları

Reaksiyon Aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	3	1
Denatürasyon	94	1	-
Primer bağlanması	52	0,45	30
Uzama	72	5	-
Sonlanma	72	10	1

Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi

Yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 rDNA gen bölgelerine ait PCR ürünleri farklı restriksiyon enzimleri (HaeIII, HinfI, HhaI, AluI ve MspI) kullanılarak üretici firmanın gösterdiği yönergeye göre restriksiyon işlemleri yapıldı. Restriksiyon kesim şartları Tablo 5'te verildi. Restriksiyon kesimleri sonucunda elde edilen ürünler 100bç marker (Thermo-Scientific, SM041) ile birlikte %3 (w/v) agaroz jelde 120dk. süreyle 120 voltta yürütüldü. Restriksiyon ürünlerine ait görüntüler ultra violet transilluminatör (UV) tablasında Olympus C-5060 marka fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğraflandı. İzole edilen maya suşlarının restriksiyon kesimi sonucunda elde edilen bant büyüklükleri Gel-Pro Analyzer v4.0 programı kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre maya suşları ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 rDNA gen bölgelerini restriksiyon profillerine göre gruplandırıldı.

Tablo 5

Restriksiyon enzimlerinin kesim işlemi için kullanılan reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (μ L)
Restriksiyon enzimi	0,5
10X Green buffe	1
Kalıp DNA	5
Nükleaz Free Su	8,5
Toplam hacim	15

DNA Dizi Analizleri

Doktora tez çalışması kapsamında yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının PCR-RFLP sonuçlarına göre, farklı restriksiyon profili gösteren maya suşları rastgele seçildi. Seçilen maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 rDNA gen bölgelerine ait PCR ürünleri, Applied Biotechnologies 3500xl Genetic Analyzer cihazı kullanılarak DNA sekansı yapıldı. “.abi” formatında elde edilen DNA dizileri MEGA-11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis – 11) programında görüntülendi ve maya suşlarına ait DNA dizileri “.fasta” formatına çevrilerek kaydedildi (Kumar vd., 2018). Seçilen maya suşlarına ait “.fasta” formatındaki ITS1-58S-ITS2 ve D1/D2 rDNA gen dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) web servisi altında bulunan BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak analiz edildi ve yüksek benzerlik gösteren maya türleri belirlendi (Altschul vd., 1990). Maya türlerinin tanımlanmasında BLAST sonucuna göre CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), ATCC (American Type Culture Collection), CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), NRRL (Northern Regional Research Laboratory) gibi veri tabanlarında yer alan tip suşlar referans alındı, %95 ve üzerinde dizi benzerliği gösteren maya suşları doğru kabul edildi. Tanımlanan maya suşlarına ait ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 rDNA dizileri NCBI web servisi altında yer alan GenBank veri tabanına yüklenerek maya suşları için erişim numarası (Accession Number) alındı.

Filogenetik Analizler

DNA dizi analizi için seçilen maya suşları arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için, seçilen maya suşlarının “.fasta” uzantılı ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 rDNA dizileri ve dış grup olarak seçilen maya türü ClustalW v1.6 parametrelerine göre hizalandı. Daha sonra, hizalanan DNA dizileri arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi için maksimum parsimony (MP) ağacı Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) parametreleri ve bootstrap metoduna göre oluşturuldu. Filogenetik ağacın kolları arasındaki mesafenin belirlenmesi için bootstrap metodu 1000 tekrarlı olarak kullanıldı ve %50'nin altındaki bootstrap değerleri ağaç üzerinde gösterilmedi. Tüm filogenetik analizler MEGA-11 programı kullanılarak gerçekleştirildi (Kumar vd., 2018). Ayrıca, yapılan tüm analizler her bir izolasyon kaynağı için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

3.3. İzole Edilen Maya Suşlarının Hücre Dışı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Doktora tez çalışmasında yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının hücre dışı proteaz, lipaz ve üreaz aktiviteleri belirlenmiştir.

3.3.1. Proteaz Aktivitesi

İzole edilen maya suşlarının proteaz aktivitesi için, YPD+Skim milk besi ortam kullanıldı (Bilinski vd., 1987). 10 g Yeast Extract, 20 g Bacto-peptone, 20 g Agar tartılarak 1000 mL distile su içerisinde çözüldü ve 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Besi ortamı petrilere dökülmeden önce içerisine %50 skim milk (yağsız süt) ilave edildi ve 20 mL olarak petrilere hazırlandı. İzole edilen maya suşları, stoktan çıkartılarak canlandırıldı ve taze maya kültürlerinden 5µl alınarak besi ortamlarına damla ekimi yapıldı. Daha sonra, ekimleri yapılan petrilere 30 °C de 10 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Petrilere üreme gösteren maya suşlarının etrafında zon oluşturanlar proteaz pozitif, oluşturmayanlar ise proteaz negatif olarak belirlendi. Proteaz pozitif maya suşlarının etrafında oluşan zon çapları ölçüldü.

3.3.2 Lipaz Aktivitesi

İzole edilen maya suşlarının lipolitik aktivitesi YPD + tribütrin agar besi ortam kullanılarak test edildi (Atlas ve Parks, 1993). 3 g Yeast Extract, 5 g Bacto-peptone, 10 g tribütrin ve 15 g Agar tartılarak 1000 mL distile su içerisinde eklendi ve 121 °C de 15 dk otoklavandı. Otoklav sonrasında, besi ortamları 20 mL olacak şekilde petrilere döküldü. Petriler donduktan sonra taze kültürden alınan maya suşları 5µl olacak şekilde damla ekimleri yapıldı. Maya suşları etrafında şeffaf zon oluşturan maya suşları lipaz pozitif, oluşturmayan lipaz negatif olarak belirlendi. Lipaz aktivitesi olan maya suşlarının oluşturduğu zon çapları ölçülerek kaydedildi.

3.3.3 Üreaz Aktivitesi

İzole edilen tüm maya suşlarının hücre dışı üreaz aktivitesi Christensen Urea Agar besi ortamı (1g/L Pepton; 1g/L Dextroz; 5g/L Sodyum klorid, NaCl; 2 g/L potasyum fosfat-monobazik, monobazik, KH₂PO₄; 20g/l Ure, 0,012g/L Fenol kırmızısı, 15g/L Agar) kullanılarak belirlendi (Brink, 2010). Besi ortamı hazırlanırken agar dışındaki tüm bileşenler 100 ml saf su içerisinde çözülerek filtre sterilizasyona (0,45µm) tabi tutuldu. Daha sonra, 900 ml saf su içerisinde agar çözülerek 121 °C de 15 dk. Süreyle sterilize edildi. Agar çözeltisi soğuduktan sonra üzerine 100 mL üre çözeltisi steril bir şekilde ilave edildi ve elde edilen üreaz ortamı cam tüplere eğik bir şekilde döküldü. Maya suşları besi ortamlarına ekilerek 10 gün süreyle 30 °C de inkübasyona bırakıldı. Her gün renk değişimleri kontrol edilerek kayıt altına alındı. Besi ortamında sarıdan pembeye bir renk dönüşüne neden olan maya suşları üreaz pozitif olarak değerlendirildi.

3.4. İzole Edilen Maya Suşlarının Fermantasyon Kapasitesinin Belirlenmesi

Süt ürünlerinden izole edilen maya suşlarının fermentasyon kapasiteleri Karki ve arkadaşları (2017) tarafından belirlenen ortam koşullarına göre test edildi. İzole edilen maya suşlarının fermentasyon kapasitelerinin belirlenmesi için, her bir besi ortamı 200 ml olacak şekilde sırasıyla, YEP + %2 Dekstroz, YEP + % 2 Galaktoz, YEP + %2 Sükroz, YEP + %2

Laktoz, YEP +%2 Maltoz ve YEP + %2 Gliserin (YEP: 10 g Yeast Ekstract, 20 g Bacto-Pepton) sıvı besi ortamları hazırlandı. Fermantasyon indikatörü olarak brom timol mavisi (BTB) kullanıldı. Taze maya kültürlerinden alınan maya örnekleri uygun seyreltmeler yapılarak her bir karbon kaynağına ekimleri yapıldı. Daha sonra, flaskların ağızları sıkıca kapatılarak 30 °C'de 7 ile 25 gün arası inkübasyona bırakıldı. BTB solusyonundaki renk değişimine bakılarak maya suşlarının fermentasyon kapasiteleri belirlendi. Yürütülen tüm çalışmalar her bir izolasyon kaynağı için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

3.5. İzole Edilen Maya Suşlarının Sıcaklık ve Glikoz Testi

Yoğurt, peynir ve ayran örneklerinden izole edilen maya suşları, 5µl olacak şekilde YPD besi ortamına damla ekimleri yapıldı ve besi ortamları 37 ve 45 °C'de 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Üreme gösteren maya suşları pozitif, üreme göstermeyen maya suşları ise negatif olarak işaretlendi. Ayrıca izole edilen maya suşlarına glikoz stres testi yapıldı. Bu amaçla maya suşları %50 dekstroz içeren besi ortamına 5 µl olarak damla ekimi yapıldı, üreme gösteren maya suşları pozitif, göstermeyen maya suşları ise negatif olarak belirlendi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada kullanılan maya suşları 2006 yılında Bolu yöresinde bulunan 11 farklı üretici firmadan toplanan süt ürünlerinden izole edilerek TTG-Yeast koleksiyonunda Tülay TURGUT GENÇ tarafından stoklanmıştır. Saflaştırma sonrasında maya suşlarının firmalara göre dağılımları Tablo 6’da verildi. Öncelikle maya suşlarının YPD katı besiyerine ekimleri yapılarak canlı maya suşlarının sayısı belirlendi. Peynir örneklerinden izole edilen 81 maya suşunun tümünün, ayran örneklerinden izole edilerek stoklanan 118 maya suşundan 116 tanesinin ve yoğurt örneklerinden izole edilerek stoklanan 55 maya suşundan 41 tanesinin gelişim gösterdiği belirlendi. Canlandırma sonrası tüm maya suşları %20’lik gliserol içerisinde -80 °C derin dondurucuda tekrar stoklandı. Elde edilen sonuçlar karışıklığa neden olmaması için Araştırma Bulguları bölümünde yoğurt, ayran ve peynir olmak üzere üç ayrı başlık altında sunuldu.

Tablo 6

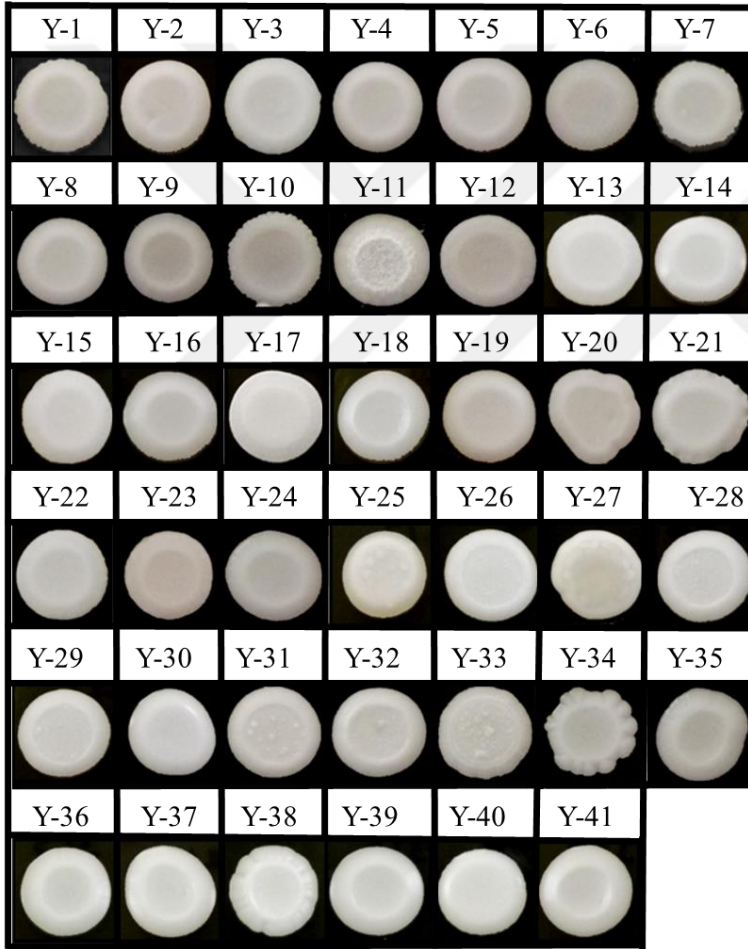
Saflaştırma sonrasında maya suşlarının firmalara ve örnekleme yapılan kaynağa göre dağılımı

ÜRETİCİ FİRMA KODU	PEYNİR	AYRAN	YOĞURT
F-1		16	
F-2	27		
F-3	2		
F-4	29		
F-5			24
F-6			9
F-7		43	
F-8			6
F-9		30	2
F-10		27	
F-11	23		

4.1. Yoğurttan İzole Edilen Maya Suşları ile Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Maya Yoğunluğunun Belirlenmesi

Yoğurt örneklerinde maya yoğunluğunu belirlemek için izole edilen maya suşlarının koloni oluşturan birim (CFU, Colony Forming Unit) değeri g/mL olarak hesaplandı ve 6×10^3 CFU/mL olarak tespit edildi. Maya suşlarının zengin besi ortamında canlandırılması sonrasında kırk bir maya suşunun çoğalabildiği gözlemlendi (Şekil 1). Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşları “Y” olarak kodlandırıldı.



Şekil 1. Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının zengin besi ortamında çoğaltılması

4.1.2. Maya Suşlarının Tanımlanması

Maya türlerinin geleneksel tanımlama yöntemlerinin zaman alması, maliyetinin fazla olması ve hatalı sonuçlar verebilmesi nedeni ile tanı kitlerinin ve özellikle moleküler tanı yöntemlerinin kullanımında artış görülmüştür (Pincus vd., 2007). Tanı kitlerinin maliyetinin yüksek olmasına rağmen özellikle hızlı sonuç vermesinden dolayı özellikle klinik testlerde ve hastanelerde yoğun olarak kullanılmaktadır. Ancak hızlı tanı kitleride hatalı sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle moleküler tanımlama yöntemleri en güvenilir tanımlama yöntemleridir. Genellikle maya türlerinin tanımlanmasında ribozomal DNA (rDNA) bölgelerinin (ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ve 26S rDNA) PCR-RFLP analizleri ve DNA dizi analizleri sıklıkla kullanılmaktadır (Gibson vd., 2011; Garnier vd., 2017; Moubasher vd., 2018; Haastrup vd., 2018; Genç ve Günay, 2020; Togay vd., 2020). Çalışmada yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşları öncelikle mayalar için spesifik hızlı tanımlama kiti (API-ID32C asimilasyon test kiti) kullanılarak tanımlandı. Daha sonra ise ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ve D1/D2 rDNA gen bölgelerinin PCR-RFLP analizi ve bu bölgelerin DNA dizi analizleri ile tür tanımlamaları yapıldı.

API-ID32 Kit Sistemi ile Tanımlanması

Yoğurt örneklerinden izole edilen 41 maya suşunun API-ID32C kit sistemi kullanılarak tür tanımlaması sonucu *Candida kefyr*, *Candida lambica*, *Candida lipolytica*, *Candida inconspicua*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* ve *Saccharomyces cerevisiae* olmak üzere toplam sekiz maya türü belirlendi. Asimilasyon sonuçlarına göre *C. kefyr* olarak tanımlanan on bir maya suşunun sekiz farklı asimilasyon profili oluşturduğu görüldü (Tablo 7). Y-39 ve Y-41 maya suşlarının birinci profilde, Y-34 ve Y-35 maya suşlarının ikinci profilde, Y-24 ve Y-36 maya suşlarının üçüncü profilde yer aldığı gözlemlendi. Diğer maya suşlarının ise (Y-14, Y-16, Y-18, Y-37) ayrı ayrı asimilasyon profilleri oluşturduğu belirlendi. *C. lambica* olarak tanımlanan on yedi maya suşunun asimilasyon testi sonuçlarına göre beş farklı profil oluşturduğu, dokuz maya suşunun (Y-1, Y-2, Y-4, Y-7, Y-8, Y-15, Y-19, Y-20 ve Y-23) birinci asimilasyon profilinde, beş maya suşunun (Y-12, Y-13, Y-17, Y-21 ve Y-22) ikinci asimilasyon profilinde yer aldığı belirlendi. Diğer *C. lambica* maya suşlarının (Y-3, Y-5 ve Y-9) ise farklı asimilasyon

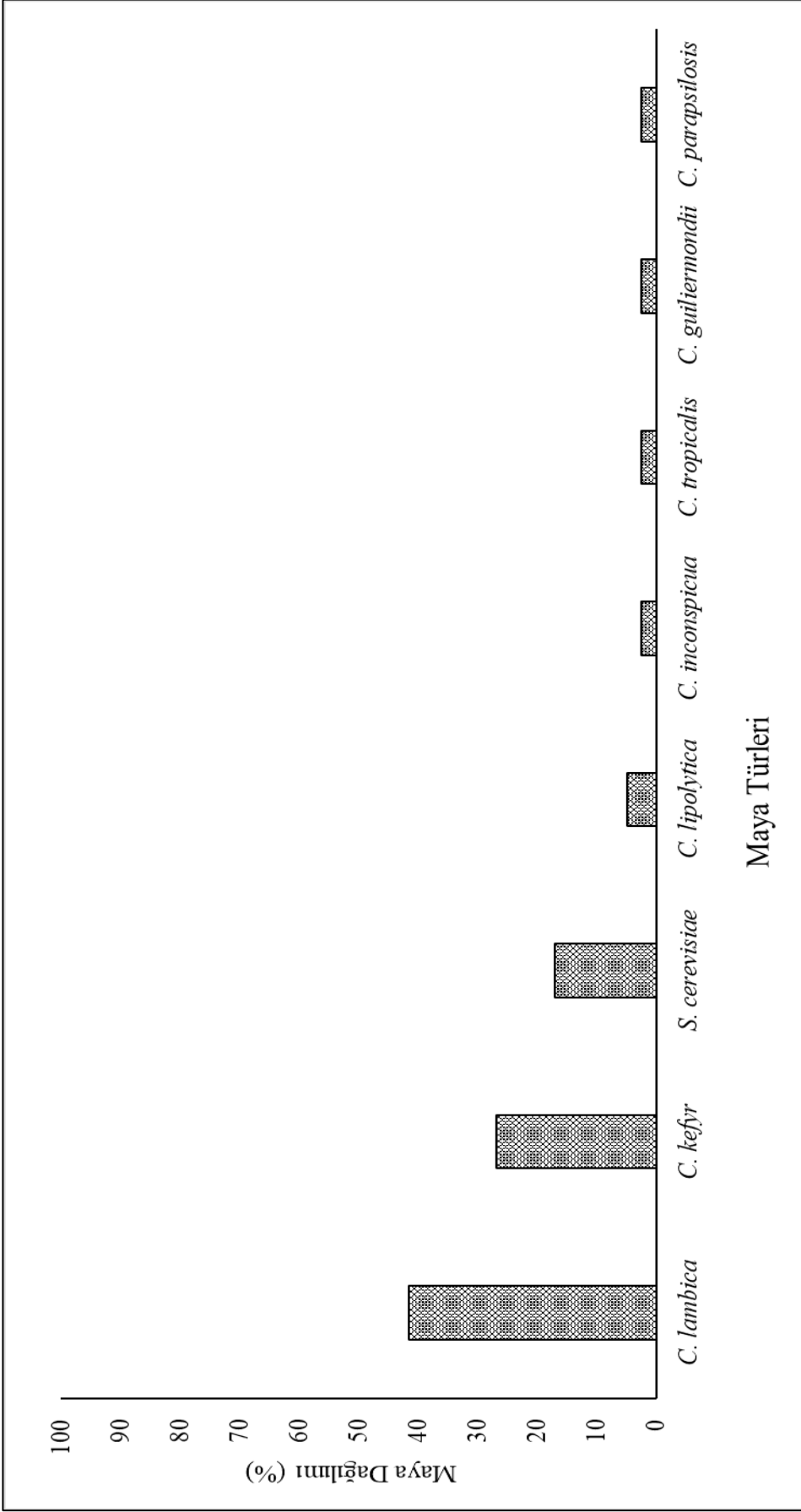
profilleri oluşturduğu görüldü. *C. lipolytica* olarak tanımlanan iki maya suşunun (Y-25 ve Y-27) iki farklı profil oluşturduğu gözlenirken *C. inconspicua* (Y-6), *C. tropicalis* (Y-6), *C. guilliermondii* (Y-30) ve *C. parapsilosis* (Y-40) olarak tanımlanan maya suşlarının herpsinin ayrı asimilasyon profiline sahip olduğu tespit edildi. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan yedi maya suşunun üç farklı profil oluşturduğu tespit edildi. Beş maya suşu (Y-26, Y-28, Y-29, Y-32 ve Y-38) birinci profilde yer alırken diğer iki maya suşunun (Y-31 ve Y-33) ayrı ayrı profiller oluşturduğu tespit edildi.

Tanımlanan maya suşlarının yüzdelerik dağılımı Şekil 2’de verildi. Asimilasyon test sonuçlarına göre yoğurt örneklerinde *C. lambica* maya türünün (%41,5) yoğun olarak bulunan maya türü olduğu belirlendi. Yoğurt örneklerinde *C. kefyra* maya türünün %26,9 ve *C. lipolytica* maya türünün %4,9 oranında dağılım gösterdiği gözlemlendi. *C. inconspicua*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* ve *C. parapsilosis* maya türlerinin ise yoğurt örneklerinde eşit oranda (%2,4) dağılım gösterdiği tespit edildi. *S. cerevisiae* maya türünün yoğurt örneklerinde %17,1 oranında dağılım gösterdiği belirlendi. Yoğurt örneklerinde non-*saccharomyces* maya türlerinin (%82,9) yoğun olarak bulunduğu olarak gözlemlendi.

Tablo 7

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının asimilasyon sonuçlarına göre tanımlanması ve gruplandırılması

Tanımlanan Maya Türleri	Profil Numarası (G) ve Suş Kodu (Y)
<i>C. kefir</i>	G1: Y-39, Y-41 G2: Y-34, Y-35 G3: Y-24, Y-36 G4: Y-14 G5: Y-10 G6: Y-16 G7: Y-18 G8: Y-37
<i>C. lambica</i>	G1: Y-1, Y-2, Y-4, Y-7, Y-8, Y-15, Y-19, Y-20, Y-23 G2: Y-12, Y-13, Y-17, Y-21, Y-22 G3: Y-3 G4: Y-5 G5: Y-9
<i>C. lipolytica</i>	G1: Y-25 G2: Y-27
<i>C. inconspicua</i>	G1: Y-6
<i>C. tropicalis</i>	G1: Y-11
<i>C. guiliermondii</i>	G1: Y-30
<i>C. parapsilosis</i>	G1: Y-40
<i>S. cerevisiae</i>	G1: Y-26, Y-28, Y-29, Y-32, Y-38 G2: Y-31 G3: Y-33

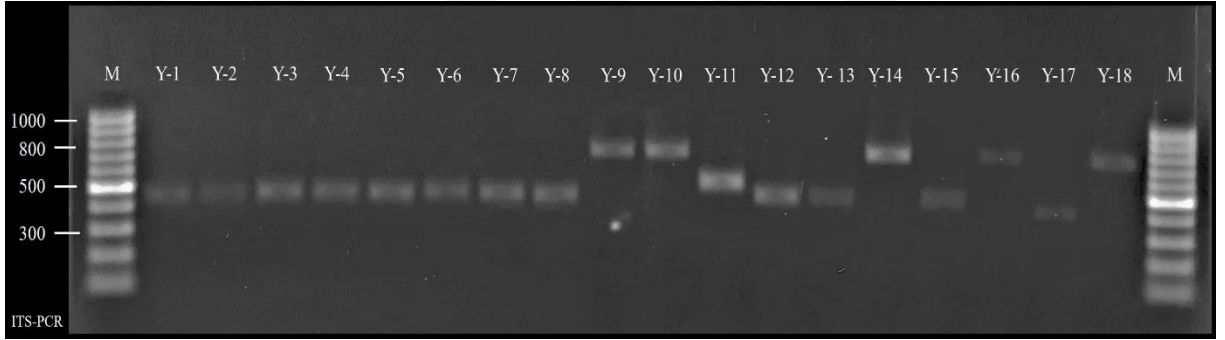


Şekil 2. Asimilasyon test sonucuna göre maya türlerinin yoğurt örneklerinde dağılımları

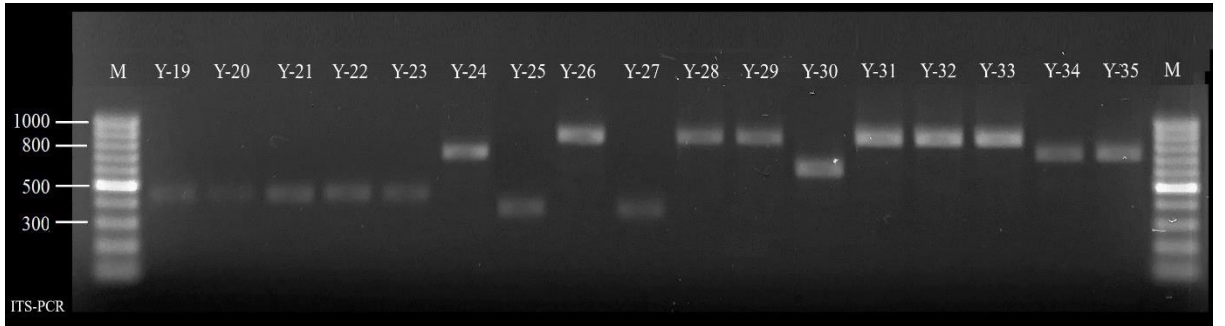
Moleküler Yöntemlerle Tanımlama

ITS-5.8S Bölgesinin PCR-RFLP Analizi

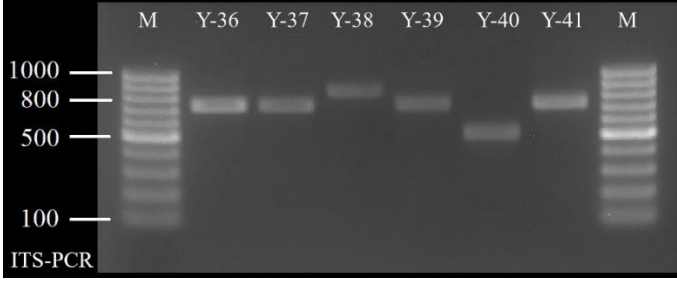
Maya suşlarının genomik DNA izolasyonu sonrası ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin ITS1 ve ITS4 primeri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Suşu kodu Y-1 ile Y-18 arasında olan maya suşlarına ait PCR sonrası agaroz jel görüntüsü Şekil 3'te, Y-19'dan Y-35'e kadar olan maya suşlarına ait jel görüntüsü Şekil 4'te ve Y-36'dan Y-41'e kadar olan maya suşlarına ait jel görüntüsü Şekil 5'te verildi. Amplifikasyon sonrası PCR ürünlerinin bant uzunluğuna göre maya suşları gruplandırıldı.



Şekil 3. Maya suşlarına (Y-1 ile Y-18) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 4. Maya suşlarına (Y-19 ile Y-35) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 5. Maya suşlarına (Y-36 ile Y-41) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu

Yoğurt örneklerinden izole edilen kırk bir maya suşu ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin PCR bant uzunluğuna göre altı gruba ayrıldı (Tablo 8). Birinci grupta yer alan iki maya suşunun (Y-25 ve Y-27) yaklaşık 400 bp uzunluğunda PCR ürünü verildiği görüldü. İkinci PCR grubunda yer alan on sekiz maya suşunun (Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-6, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-15, Y-17, Y-19, Y-20, Y-21, Y-22, Y-23 ve Y-40) yaklaşık 500 bp büyüklüğünde PCR ürünü verildiği, üçüncü PCR grubunda yer alan iki maya suşunun ise (Y-11 ve Y-30) yaklaşık olarak 600 bp büyüklüğünde PCR ürünü verildiği tespit edildi. Dördüncü grupta bulunan yedi maya suşunun (Y-24, Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39 ve Y-41) yaklaşık 750 bp ve beşinci grupta bulunan altı maya suşunun (Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-18 ve Y-35) yaklaşık 800 bp büyüklüğünde PCR ürünleri verdikleri görüldü. PCR ürünlerine göre altıncı grubu oluşturan altı maya suşunun (Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32 ve Y-33) yaklaşık 900 bp büyüklüğünde PCR ürünü verildiği tespit edildi.

Maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgelerine ait PCR ürünleri HinfI, HaeIII, MspI, AluI ve HhaI restriksiyon enzimleri kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde kesildi ve elde edilen restriksiyon ürünlerine göre maya suşları tekrar gruplandırıldı. PCR ürünlerine göre birinci grupta yer alan (P-1) iki maya suşu (Y-25 ve Y-27) PCR-RFLP analizi sonrasında tek bir profil (R-1) oluşturdu (Tablo 9). R-1 restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının Msp I enzimi için kesim bölgesi içermediği, Hae III, Hinf I ve Alu I enzimleri için tek kesim bölgesine sahip olduğu ve Hha I enzimi için iki kesim bölgesine sahip olduğu görüldü.

İkinci PCR grubunda yer alan on sekiz maya suşu (P-2) restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasında beş restriksiyon grubuna (R-2, R-3, R-4, R-5 ve R-6) ayrıldığı gözlemlendi

(Tablo 10). Restriksiyon profillerine göre ikinci grupta (R-2) yer alan on bir maya suşunun üçüncü grupta (R-3) yer alan dört maya suşundan Hha I enzimi ile ayrıştığı görüldü. Restriksiyon profiline göre dördüncü grupta (R-4) yer alan Y-6 maya suşunun Hae III ve Alu I enzimleri için kesim bölgesi içermediği, R-2 restriksiyon profilinde bulunan maya suşlarından bu enzimlerin kesim sonuçları ile ayrıldığı, R- restriksiyon profilinde bulunan maya suşlarından ise bu enzimlere ilave olarak Hha I kesim sonuçlarına göre ayrıştığı belirlendi. Beşinci grupta (R-5) yer alan maya suşunun (Y-17) diğer gruplardan (R-2, R-3 ve R-4) Hinf I, Alu I ve Msp I enzimi ile ayrıldığı gözlemlendi. Altıncı grupta (R-6) yer alan Y-40 maya suşunun Alu I ve Msp I enzimleri için kesim bölgesi içermediği, Hae III, Hinf I ve Hha I enzim kesim sonuçlarına göre diğer restriksiyon profillerinden ayrıldığı tespit edildi.

ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesine ait PCR bant büyüklüğüne göre üçüncü grupta (P-3) yer alan iki maya suşunun (Y-11 ve Y-30) HaeIII ve Msp I enzimleri ile birbirlerinden ayrıldığı tespit edildi (Tablo 11). Ayrıca, bu maya suşlarının Alu I enzimi için kesim bölgesi içermediği gözlemlendi.

Tablo 8

Yoğurt kaynaklı maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin PCR amplifikasyonu

PCR Bant Büyüklüğü (bp)	Maya Suşları
P-1 (~400)	Y-25, Y-27
P-2 (~500)	Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-6, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-15, Y-17, Y-19, Y-20, Y-21, Y-22, Y-23, Y-40
P-3 (~600)	Y-11, Y-30
P-4 (~750)	Y-24, Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39, Y-41
P-5 (~800)	Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-18, Y-35
P-6 (~900)	Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32, Y-33

Tablo 9

Birinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-1 (~400 bç)	R-1	Y-25, Y-27	250-105	190-160	185-110-60	285-75	-----

Tablo 10

İkinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-2 (~500 bç)	R-2	Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-15, Y-20	330-95-70	260-190	150-90-90-85-85	290-100-90	250-90-80
	R-3	Y-19, Y-21, Y-22, Y-23	330-95-70	260-190	210-190-80	290-100-90	250-120-80
	R-4	Y-6	-----	260-190	150-90-90-85-85	-----	250-90-80
	R-5	Y-17	330-95-70	200-200-90	210-190-80	380-95	385-75
	R-6	Y-40	395-100	245-240	300-200	-----	-----

Tablo 11

Üçüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-3 (~600 bç)	R-7	Y-11	490-105	300-300	310-290	-----	375-190
	R-8	Y-30	400-105-90	300-300	300-285	-----	370-120-100

PCR bant büyüklüğüne göre dördüncü grupta (P-4) yer alan yedi maya suşunun dört farklı restriksiyon profili (R-9, R-10, R-11 ve R-12) oluşturduğu görüldü (Tablo 12). PCR-

RFLP sonuçlarına göre R-9 restriksiyon profilinde yer alan dört maya suşunun (Y-36, Y-37, Y-39 ve Y-41), R-10, R-11 ve R-12 restriksiyon profillerinde yer alan birer maya suşunun (Y-24, Y-34 ve Y-35) Msp I enzimi için kesim bölgesi içermediği, Hha I enzimi için benzer kesim profili verdiği gözlemlendi. R-10 restriksiyon profilinde yer alan Y-24 maya suşunun diğer restriksiyon profillerinden (R-9, R-11 ve R-12) Alu I enzimi ile ayrıştığı belirlendi. R-11 restriksiyon profilinde yer alan maya suşunun (Y-34) Hae III enzimi ile R-9, R-10 ve R-12 restriksiyon profillerinden ve Alu I enzimi ile R-10 restriksiyon profilinden ayrıştığı belirlendi. R-12 restriksiyon profilinde yer alan Y-35 maya suşunun ise Hae III kesimi ile R-11 profilinden, Alu I kesimi ile R-10 profilinden ve Hinf I enzimi ile R-9, R-10 ve R-11 restriksiyon profillerinden ayrıştığı tespit edildi.

ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesini PCR amplifikasyon ürünlerine göre beşinci grupta (P-5) yer alan beş maya suşunun (Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-18) Hae III, Hinf I, Hha I ve Alu I restriksiyon enzimleri ile aynı profile sahip olduğu gözlemlendi (Tablo 13). R-13 restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının dördüncü PCR grubunda (P-4) yer alan maya suşları gibi Msp I enzimi için kesim bölgesine sahip olmadığı belirlendi.

PCR-RFLP sonuçlarına göre altıncı grupta (P-6) yer alan yedi maya suşunun (Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32, Y-33 ve Y-38) tüm enzimler için benzer kesim profili oluşturduğu gözlemlendi (Tablo 14).

Tablo 12

Dördüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-4 (~750 bç)	R-9	Y-36, Y-37, Y-39, Y-41	645-95	295-185- 110-90-90	300-190- 150-85	400-180- 155	-----
	R-10	Y-24	710-30	295-185- 110-90-90	280-200- 190-90	320-320- 100	-----
	R-11	Y-34	300-250- 190	295-185- 110-90-90	300-190- 150-85	400-180- 155	-----
	R-12	Y-35	645-95	300-215- 125	300-190- 150-85	400-180- 155	-----

Tablo 13

Beşinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-5 (~800 bç)	R-13	Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-18	695-100	295-185- 110-90-90	290-200- 200-100	390-210- 200	-----

Tablo 14

Altıncı PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-6 (~900 bç)	R-14	Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32, Y-33, Y-38	325-245- 170-155	385- 380-120	380- 380-125	775- 100	700- 90-85

Yoğurt örneklerinden izole edilen kırk bir maya suşunun ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP analiz sonuçları Tablo 15’te özetlendi. Maya suşlarının ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP analizi sonucuna göre on dört farklı restriksiyon profili oluşturduğu görüldü. Ayrıca, PCR amplifikasyonu sonrası aynı grupta yer alan maya suşlarının RFLP analizi sonucunda farklı restriksiyon profillerine sahip olduğu tespit edildi. Bu durum ITS-5.8S bölgesinin RFLP sonuçlarına göre, yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının en fazla on dört farklı maya türüne ait olabileceğini göstermektedir.



Tablo 15

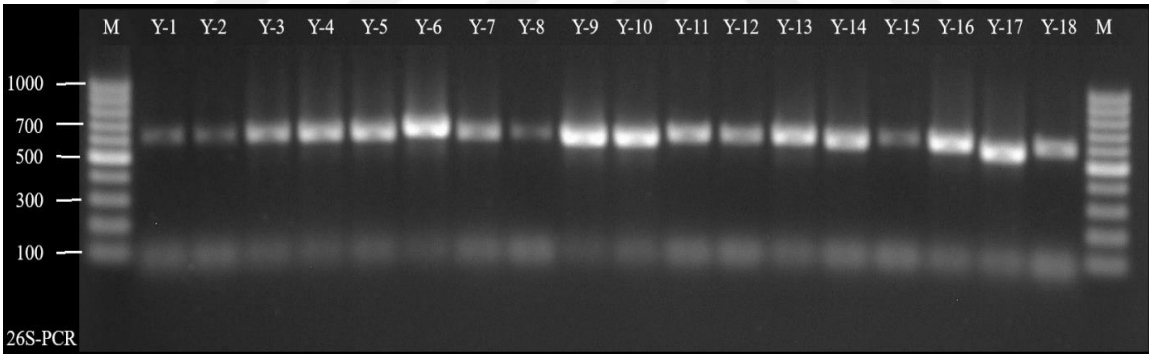
Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP sonucu

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-1 (~400 bç)	R-1	Y-25, Y-27	250-105	190-160	185-110-60	285-75	No cut
	R-2	Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-15, Y-20	330-95-70	260-190	150-90-90-85-85	290-100-90	250-90-80
	R-3	Y-19, Y-21, Y-22, Y-23	330-95-70	260-190	210-190-80	290-100-90	250-120-80
	R-4	Y-6	-----	260-190	150-90-90-85-85	-----	250-90-80
	R-5	Y-17	330-95-70	200-200-90	210-190-80	380-95	385-75
	R-6	Y-40	395-100	245-240	300-200	-----	-----
P-3 (~600 bç)	R-7	Y-11	490-105	300-300	310-290	-----	375-190
	R-8	Y-30	400-105-90	300-300	300-285	-----	370-120-100
P-4 (~750 bç)	R-9	Y-36, Y-37, Y-39, Y-41	645-95	295-185-110-90-90	300-190-150-85	400-180-155	-----
	R-10	Y-24	710-30	295-185-110-90-90	280-200-190-90	320-320-100	-----
	R-11	Y-34	300-250-190	295-185-110-90-90	300-190-150-85	400-180-155	-----
	R-12	Y-35	645-95	300-215-125	300-190-150-85	400-180-155	-----
P-5 (~800)	R-13	Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-18	695-100	295-185-110-90-90	290-200-200-100	390-210-200	-----
P-6 (~900)	R-14	Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32, Y-33, Y-38	325-245-170-155	385-380-120	380-380-125	775-100	700-90-85

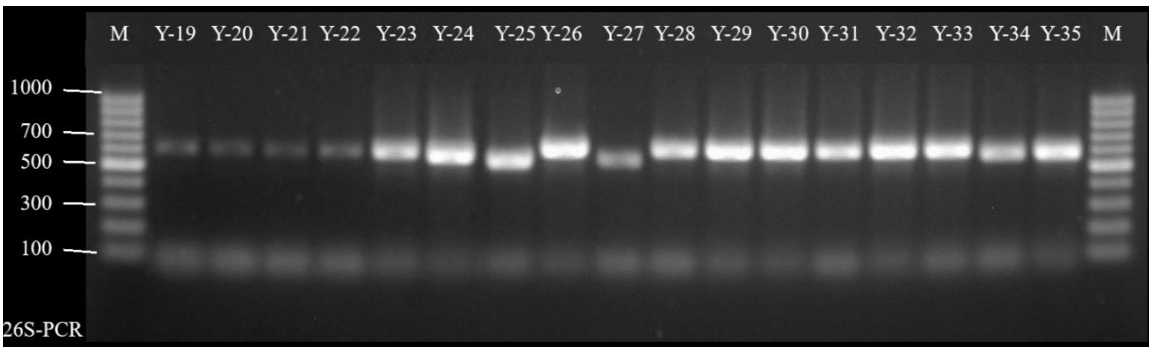
26S rDNA Bölgesinin PCR-RFLP Analizi

Maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR amplifikasyonu maya spesifik primerler (NL1 ve NL4) kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası Y-1 ile Y-18 arasında kodlu maya suşlarına ait PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri Şekil 6'da, Y-19 ile Y-35 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 7'de ve Y-36 ile Y-41 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 8'de verildi. Amplifikasyon sonrası maya suşlarının D1/D2 domainine ait PCR bant büyüklüklerinin yaklaşık 600-650 bp aralığında olduğu ve tek bir grupta toplandığı belirlendi. Bu nedenle D1/D2 domaininin PCR ürünleri için gruplama yapılmadı.

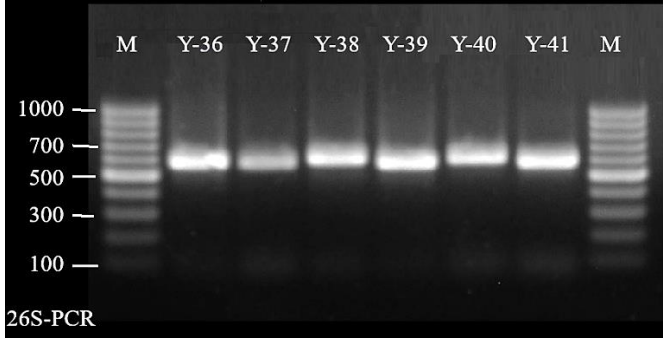
Maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR ürünününün Hae III, Hinf I, Hha I, Alu I ve Msp I restriksiyon enzimleri ile kesimi ile yapılan PCR-RFLP analizi sonucunda on bir farklı restriksiyon profili elde edildi (Tablo 16).



Şekil 6. Maya suşlarına (Y-1 ile Y-18) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 7. Maya suşlarına (Y-19 ile Y-35) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 8. Maya suşlarına (Y-36 ile Y-41) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu

Restriksiyon profillerine göre birinci grupta (R-1) yer alan on maya suşunun, dördüncü restriksiyon profilinde (R-4) yer alan Y-11 maya suşunun ve altıncı restriksiyon profilinde (R-6) yer alan beş maya suşunun Hae III enzimi ile kesimi sonrasında benzer profil verdiği ve diğer restriksiyon profillerinden ayrıldığı görüldü. Benzer şekilde R-3 restriksiyon profilinde yer alan beş maya suşunun, R-5 restriksiyon profilinde yer alan Y-17 maya suşunun, R-7 restriksiyon profilinde yer alan beş maya suşunun ve R-8 restriksiyon profilinde yer alan iki maya suşunun Hae III enzimi ile kesimi sonrasında benzer restriksiyon profiline sahip olduğu tespit edildi. R-10 ve R-11 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının da Hae III enzimi için benzer kesim profiline sahip olduğu belirlendi. R-2 restriksiyon profilinde yer alan Y-6 maya suşunun ise Hae III enzimi diğer profillerden ayrıştığı gözlemlendi. Maya suşlarının Hinf I enzimi ile kesimi sonrasında R-3 ile R-6 profilinin, R-2 ile R-5 profilinin, R-8 ile R-9 ve R-10 profilinin, R-7 ile R-11 profilinin benzer kesim sonucuna sahip olduğu gözlenirken R-1 ve R-4 profillerinin Hinf kesimi sonrası birbirlerinden ve diğer kesim profillerinden farklı profiller oluşturduğu belirlendi.

Maya suşlarının Hha I enzimi ile kesimi sonrasında, R-3, R-4, R-7, R-9 ve R-11 restriksiyon profillerinde yer alan toplam yirmi bir maya suşunun Hha I enzimi için kesim bölgesi içermediği tespit edildi. Ayrıca birinci restriksiyon profilinde (R-1) yer alan on maya suşu ile altıncı restriksiyon profilinde (R-6) yer alan beş maya suşunun Hha I enzimi için benzer kesim profiline sahip olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde R-5, R-8 ve R-10 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının Hha I enzimi için benzer kesim profiline sahip olduğu tespit edildi. R-2 kesim profilinde yer alan bir maya suşunun ise diğer Hha I kesim profillerinden farklı kesim sonucu verdiği gözlemlendi.

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının Alu I enzimi ile restriksiyon kesimi sonucuna göre R-1, R-3, R-6, R-7 ve R-11 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının benzer kesim profiline sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca, R-2 restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının R-4 profilinde yer alan maya suşları benzer Alu I kesim profili oluşturduğu belirlendi. Msp I enzimi ile yapılan kesim işlemi sonrasında R-3 ve R-4 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının Msp I enzimi için kesim bölgesi içermediği, R-2 restriksiyon profili dışında kalan diğer restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının Msp I enzimi için benzer kesim profili oluşturduğu tespit edildi.

Yoğurt örneklerinden izole edilen kırk bir maya suşunun 26S rDNA D1/D2 bölgesinin PCR-RFLP analizi sonucuna göre on bir farklı restriksiyon profili oluşturduğu görüldü. Ayrıca, PCR amplifikasyonu sonrası aynı grupta yer alan maya suşlarının RFLP analizi sonucunda birbirlerinden ayrıldığı tespit edildi. Bu durum D1/D2 domainin RFLP sonuçlarına göre, yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının en fazla on bir farklı maya türünü temsil edebileceğini göstermektedir.

Tablo 16

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR-RFLP sonucu

RFLP Grup No.	Maya Suşları	PCR-RFLP / D1/D2 Domain				
		Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
R-1	Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-15	250-210-150	400-110-95	220-220-135	250-190-150	510-95
R-2	Y-6	275-135-135	250-200-150	290-185-95	400-200	390-125-110
R-3	Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-18	415-190	400-200	-----	250-190-150	-----
R-4	Y-11	250-210-150	400-150-150	-----	400-200	-----
R-5	Y-17	415-190	250-210-150	500-100	300-300	510-95
R-6	Y-19, Y-20, Y-21, Y-22, Y-23	250-210-150	400-200	220-220-135	250-190-150	510-95
R-7	Y-24, Y-37, Y-39, Y-40, Y-41	415-190	350-240	-----	250-190-150	510-95
R-8	Y-25, Y-27	415-190	215-215-200	525-100	300-285	510-95
R-9	Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32, Y-33, Y-38	300-190-150	215-215-200	-----	205-200-195	510-95
R-10	Y-30	500-100	215-215-200	525-100	190-185-175	510-95
R-11	Y-34, Y-35, Y-36	500-100	350-240	-----	250-190-150	510-95

DNA Dizi Analizi ve Filogenetik İlişkilerin Belirlenmesi

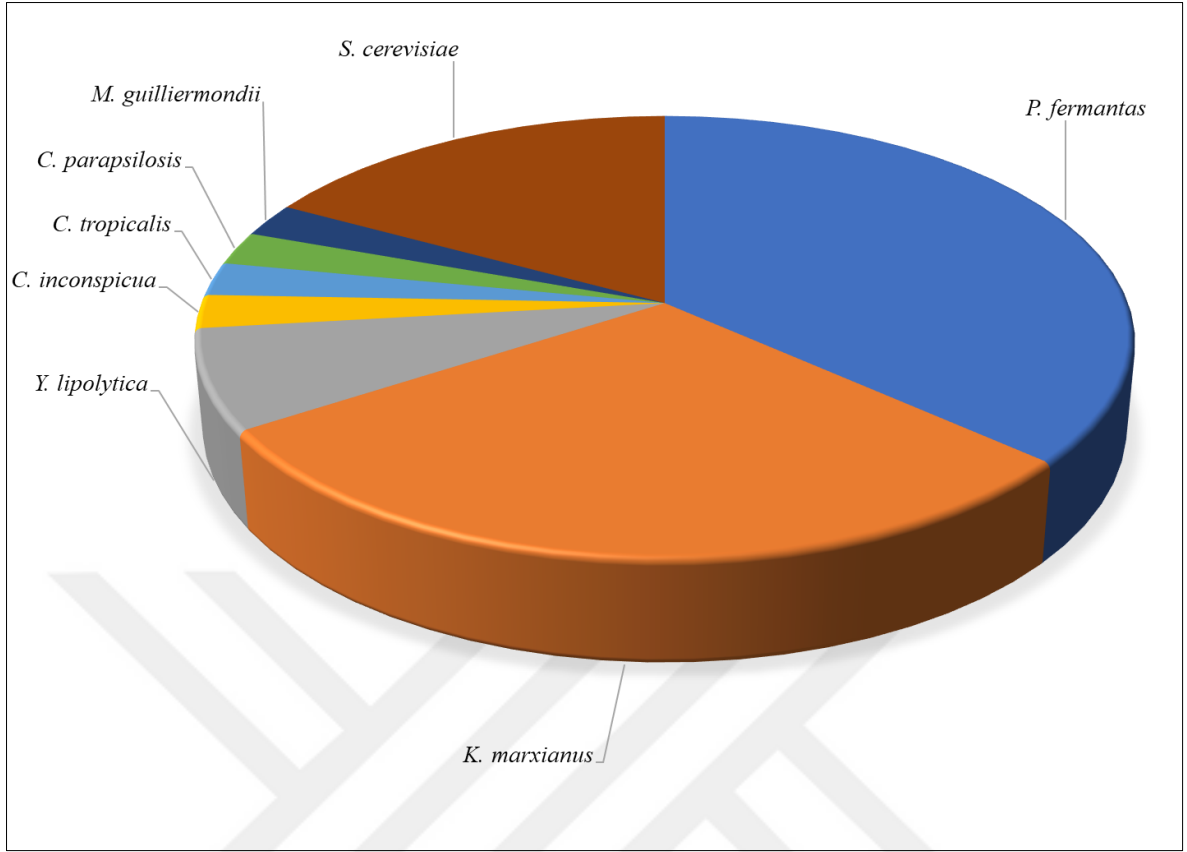
Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S ile D1/D2 bölgesinin PCR-RFLP analizi sonrası elde edilen restriksiyon profillerinin her birinden rastgele iki maya suşu seçilerek DNA dizi analizi için MedSanTek firmasına gönderildi. ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 rDNA gen bölgelerinin restriksiyon profillerine göre Y-5, Y-6, Y-11, Y-14, Y-17, Y-20, Y-23, Y-24, Y-25, Y-29, Y-30, Y-34, Y-35, Y-36, Y-38 ve Y-40 olmak üzere on altı maya suşu seçildi. Firma tarafından gönderilen “.abi” uzantılı dosyalar MEGA-11 programı ile “.fasta” formatına çevrildi ve DNA dizi analizleri NCBI veri tabanı bünyesinde yer alan BLAST programı kullanılarak gerçekleştirildi. On altı maya suşuna ait DNA dizileri ile yüksek homoloji gösteren maya türleri belirlendi. BLAST analizi sonucunda tanımlanan maya suşları, benzerlik yüzdeleri ve referans alınan maya türlerinin GenBank erişim numaraları Tablo 17’de verildi. BLAST analizi sonucunda beş maya suşu (Y-14, Y-24, Y-34, Y-35 ve Y-36) *Kluyveromyces marxianus*, üç maya suşu (Y-5, Y-20 ve Y-23) *Pichia fermentas*, iki maya suşu (Y-17 ve Y-25) *Yarrowia lipolytica*, Y-6 maya suşu *Candida inconspicua*, Y-11 maya suşu *Candida tropicalis*, Y-40 maya suşu *Candida parapsilosis*, Y-30 maya suşu *Meyerozyma guilliermondii* ve iki maya suşu (Y-29 ve Y-38) *Saccharomyces cerevisiae*, maya türü olarak tanımlandı.

Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin yoğurt örneklerinde dağılımı Şekil 9’da verildi. Elde edilen sonuçlara göre yoğurt örneklerinde *P. fermentas* (%36,6) ve *K. marxianus* (%29,3) maya türlerinin yoğun olarak bulunan maya türleri olduğu belirlendi. *Y. lipolytica* maya türünün ise %7,3 oranında yoğurt örneklerinde dağılım gösterirken *C. inconspicua*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *M. guilliermondii* maya türlerinin eşit oranda (%2,4) dağılım gösterdiği tespit edildi. Yoğurt örneklerinde non-*saccharomyces* maya türünün (%82,9) yoğun olarak dağılım gösterdiği gözlemlendi. *S. cerevisiae* maya türünün ise yoğurt örneklerinde %17,1 oranında dağılım gösterdiği belirlendi.

Tablo 17

Yoğurt kaynaklı maya suşlarının BLAST analizi sonuçları

Maya Suşları	ITS-5.8S rDNA Gen Bölgesi				26S rDNA D1/D2 Domaini				
	Benzerlik	Tanımlanan Maya Türü (Reff. Acc. No)	GenBank Erişim No	Benzerlik	Tanımlanan Maya Türü (Reff. Acc. No)	GenBank Erişim No	Benzerlik	Tanımlanan Maya Türü (Reff. Acc. No)	GenBank Erişim No
Y-5	99,50%	<i>Pichia fermentas</i> (NR_130688.1)	OR534237	99,45%	<i>Pichia fermentas</i> (KY108803.1)	OR512402			OR512402
Y-6	96,77%	<i>Candida inconspicua</i> (NR_111116.1)	OR534238	99,64%	<i>Candida inconspicua</i> (KY106512.1)	OR512403			OR512403
Y-11	99,57%	<i>Candida tropicalis</i> (NR_111250.1)	OR534239	99,45%	<i>Candida tropicalis</i> (NG_054834.1)	OR512404			OR512404
Y-14	99,53%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NR_111251.1)	OR534240	99,62%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR512405			OR512405
Y-17	98,28%	<i>Yarrowia lipolytica</i> (NR_111212.1)	OR534241	99,80%	<i>Yarrowia lipolytica</i> (KY110188.1)	OR512406			OR512406
Y-20	99,51%	<i>Pichia fermentas</i> (NR_130688.1)	OR534242	99,45%	<i>Pichia fermentas</i> (KY108803.1)	OR512407			OR512407
Y-23	100,00%	<i>Pichia fermentas</i> (NR_130688.1)	OR534243	96,88%	<i>Pichia fermentas</i> (KY108803.1)	OR512408			OR512408
Y-24	99,53%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NR_111251.1)	OR534244	99,62%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR512409			OR512409
Y-25	97,96%	<i>Yarrowia lipolytica</i> (NR_111212.1)	OR534245	100,00%	<i>Yarrowia lipolytica</i> (KY110188.1)	OR512410			OR512410
Y-29	98,03%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NR_111007.1)	OR534246	99,82%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KR069090.1)	OR512411			OR512411
Y-30	99,45%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (NR_111247.1)	OR534247	99,28%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (KY108521.1)	OR512412			OR512412
Y-34	100,00%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NR_111251.1)	OR534248	99,43%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR512413			OR512413
Y-35	99,53%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NR_111251.1)	OR534249	99,62%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR512414			OR512414
Y-36	99,84%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NR_111251.1)	OR534250	99,43%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR512415			OR512415
Y-38	99,17%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NR_111007.1)	OR534251	100,00%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KR069090.1)	OR512416			OR512416
Y-40	99,17%	<i>Candida parapsilosis</i> (NR_130673.1)	OR534252	99,64%	<i>Candida parapsilosis</i> (NG_054833.1)	OR512417			OR512417



Şekil 9. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin yoğurt örneklerinde dağılımı

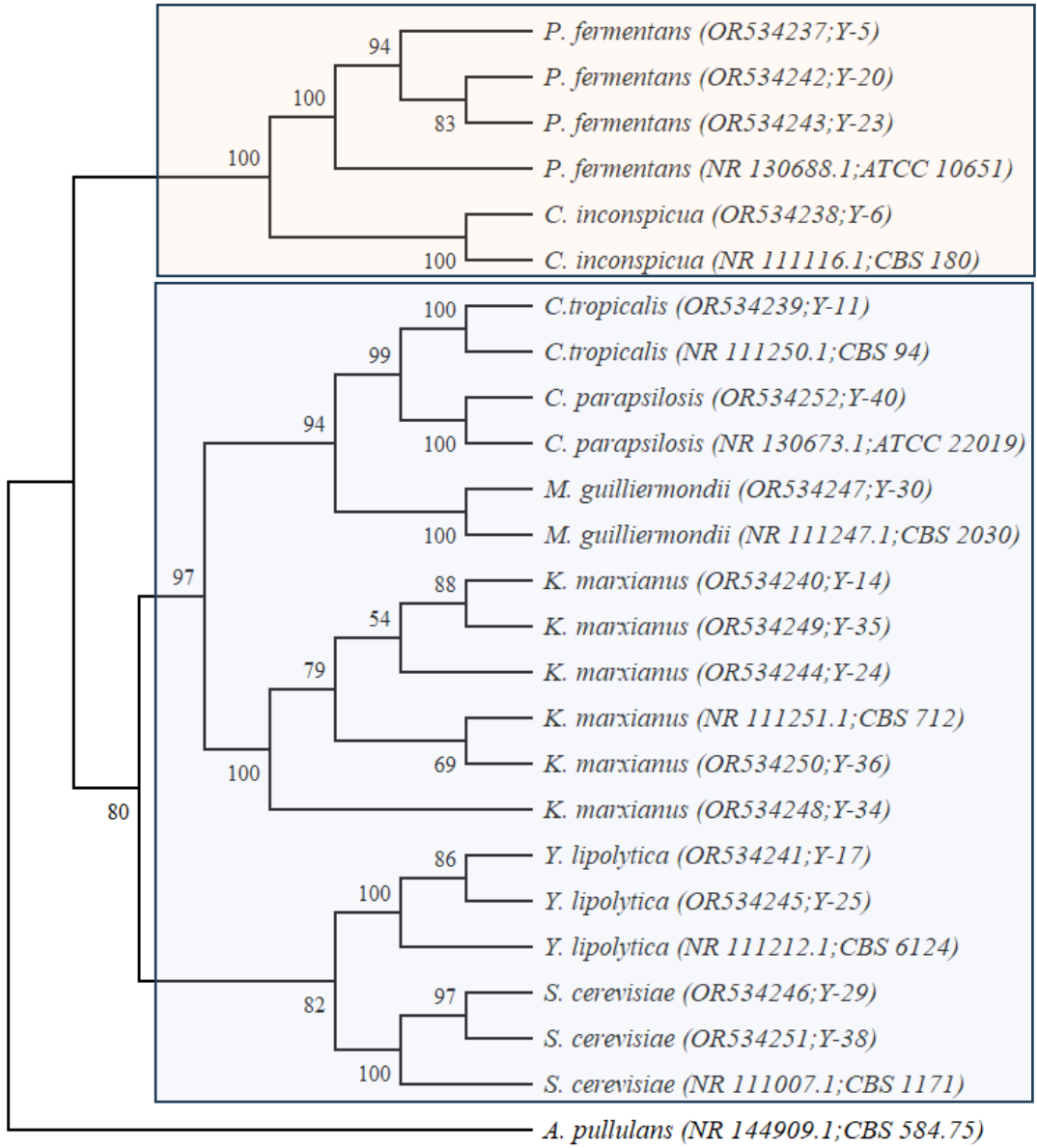
Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının API-ID32C kit sistemi ile yapılan tanımlama işlemi ile moleküler yöntemlerle yapılan tanımlama işlemi karşılaştırıldığında, API-ID32 test sistemiyle sekiz farklı maya türü tanımlanırken, moleküler yöntemler kullanılarak yedi farklı tür tanımlandığı belirlendi. API-ID32C test sonucuna göre *C. lambica* olarak tanımlanan Y-9 maya suşu ITS -58S ve D1/D2 bölgesi dizi analizine göre *K. marxianus* maya türü olarak, asimilasyon profiline göre *C. inconspicua* olarak tanımlanan Y-6 maya suşu moleküler yöntemlerle *P. fermentans* maya türü olarak tanımlandı. Benzer şekilde API-ID32C test sonucuna göre *C. lambica* olarak tanımlanan Y-17 maya suşu moleküler yöntemlerle *Y. lipolytica* maya türü olarak tanımlandı.

Asimilasyon testi sonuçlarına göre *C. parapsilosis* olarak tanımlanan Y-40 maya suşu ve *C. tropicalis* olarak tanımlanan Y-11 maya suşu moleküler yöntemler ile yapılan tanımlamada da aynı türler olduğu gözlemlendi. Asimilasyon test sonucuna göre *C. kefir* olarak tanımlanan on bir maya suşu moleküler yöntemlerle *K. marxianus* (Syn. *C. kefir*) olarak, *C.*

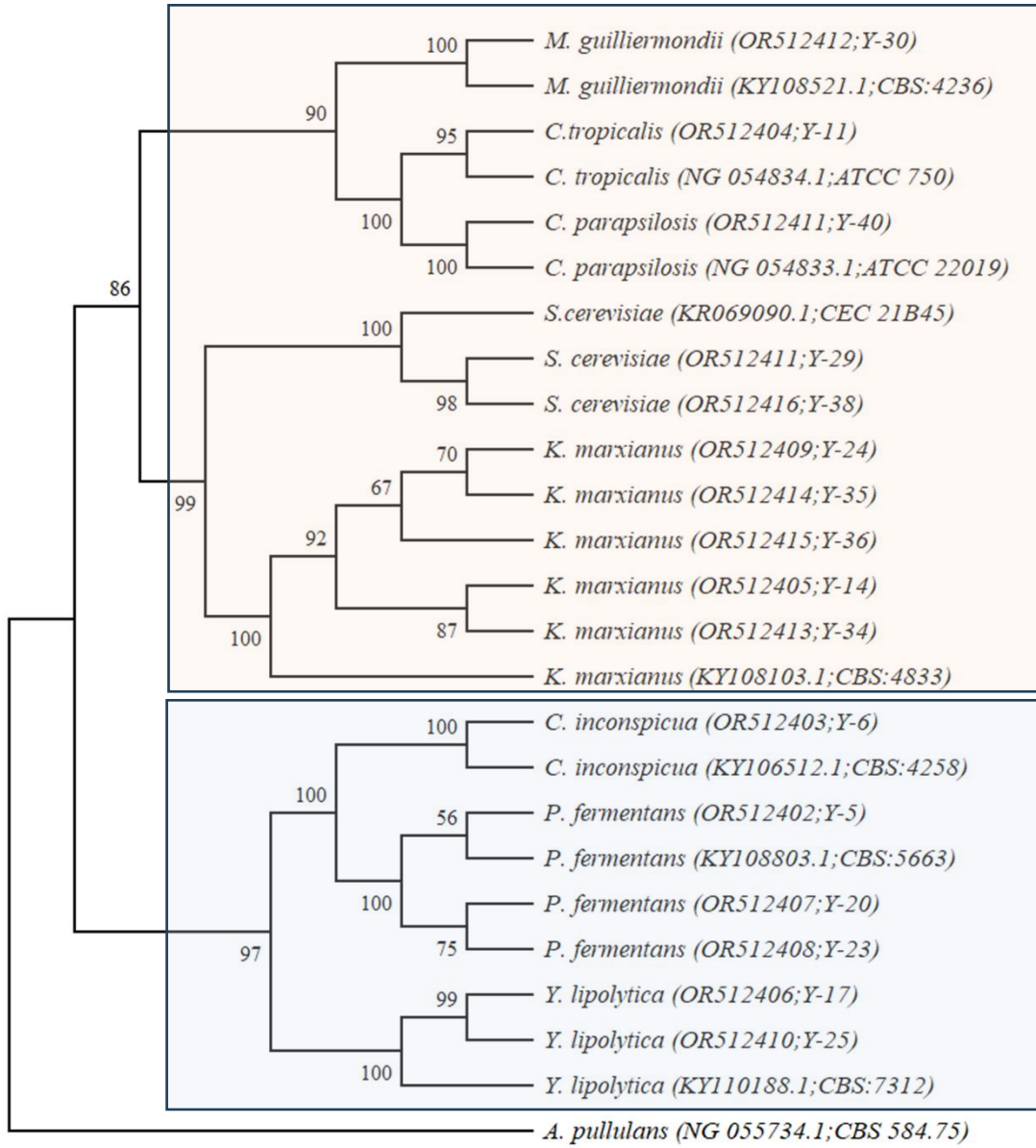
gulliermondii olarak tanımlanan bir maya suşu (Y-30) *M. gulliermondii* (Syn. *C. gulliermondii*) olarak, *C. lambica* olarak tanımlanan on beş maya suşu *P. fermentans* (Syn. *C. lambica*) olarak ve *C. lipolytica* olarak tanımlanan iki maya suşu (Y-25 ve Y-27) *Y. lipolytica* (*C. lipolytica*) olarak tanımlandı. Ayrıca, API-ID32C test sistemi ile *S. cerevisiae* olarak tanımlanan yedi maya suşunun moleküler yöntemlerle de *S. cerevisiae* olarak tanımlandığı belirlendi.

Yoğurt örneklerinden tanımlanan maya suşları arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için öncelikle her bir maya türüne ait referans maya türü seçildi ve bu türe ait ITS-1-5.8S-ITS2 rDNA ve D1/D2 domaini için DNA dizileri NCBI-Nükleotid veri tabanı üzerinden indirildi. Türler arası uzaklıkları belirlenmesi için ise dış grup olarak CBS Maya veri tabanından ITS-5.8S gen bölgesi için NR_144909.1 erişim numaralı *Aureobasidium pullulans* maya suşu ve D1/D2 domaini için NG_055734.1 erişim numaralı *Aureobasidium pullulans* maya suşu seçildi. Tüm maya suşlarına ait ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ve D1/D2 domaini DNA dizileri MEGA-11 programı altında yer alan ClustalW v1.6 hizalama parametresi kullanılarak hizalandı. Maya türlerinin filogenetik ilişkileri tespit edebilmek için MEGA-11 programı kullanılarak maksimum parsimoni (MP) ağacı oluşturuldu. ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesi için MP ağacı Şekil 10, D1/D2 domaini için MP ağacı Şekil 11’de gösterildi.

ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi için oluşturulan MP filogenetik ağacı incelendiğinde, maya türlerinin iki ana gruba ayrıldığı görüldü. Birinci grupta *P. fermentans* ve *C. inconspicua* maya türlerinin, ikinci grupta ise *Y. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *M. gulliermondii* ve *K. marxianus* maya türlerinin bulunduğu görüldü. İlk grupta yer alan *C. inconspicua* maya türünün diğer *Candida* türlerinden ayrıldığı, benzer şekilde. *M. gulliermondii* maya türü *P. gulliermondii* maya türü ile sinonim olmasına rağmen, diğer *Pichia* türlerinden ayrıldığı tespit edildi. Aynı şekilde D1/D2 rDNA gen bölgesine göre oluşturulan MP ağacı incelendiğinde, maya suşlarının benzer şekilde iki ana gruba ayrıldığı tespit edildi. Birinci grup *Y. lipolytica*, *P. fermentans* ve *C. inconspicua* maya türlerinin yer aldığı, diğer grubun ise *K. marxianus*, *C. inconspicua*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *M. gulliermondii* ve *S. cerevisiae* maya türlerini içerdiği görüldü.



Şekil 10. Maya suşlarının ITS15.8S-ITS2 bölgesi ile oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı. Ağaç üzerinde %50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterildi.



Şekil 11. Maya suşlarının D1/D2 domain bölgesi ile oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı. Ağaç üzerinde %50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterildi.

ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi için oluşturulan MP ağacı incelendiğinde, maya türleri iki ana gruba ayrıldığı görüldü. Birinci grupta *P. fermentans* ve *C. inconspicua* maya türlerinin bulunduğu görüldü. İkinci grupta yer alan maya türleri ise iki alt gruba ayrıldı ve birinci alt grupta *Y. lipolytica* ve *S. cerevisiae* maya türlerinin ikinci alt grupta ise *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *M. guilliermondii*, *K. marxianus* maya suşlarının bulunduğu görüldü. İlk grupta yer alan *C. inconspicua* maya türünün diğer *Candida* türlerinden ayrıldığı, benzer şekilde. *M. guilliermondii* maya türü *P. guilliermondii* maya türü ile sinonim olmasına

rağmen, diğer *Pichia* türlerinden ayrıldığı tespit edildi. Aynı şekilde D1/D2 rDNA gen bölgesine göre oluşturulan MP ağacı incelendiğinde, maya türlerinin yine iki ana gruba ayrıldığı tespit edildi. Birinci grupta yer alan maya türleri kendi içinde iki alt gruba ayrıldı. Birinci alt grupta *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis* ve *M. guilliermondii* maya türleri, ikinci alt grupta ise *K. marxianus* ve *S. cerevisiae* maya türlerinin bulunduğu görüldü. İkinci grupta ise *C. inconspicua*, *P. fermentans* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin yer aldığı tespit edildi.

4.1.3. Maya Suşlarının Hücre Dışı Proteaz, Lipaz ve Üreaz Aktiviteleri

Doğal fermente ürünlerin eldesinde kendiliğinden gelişen mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların ürettiği enzimler görev almaktadır. Mikrobiyal kökenli olan bu enzimlerin %50'den fazlası endüstriyel öneme sahiptir. Bu nedenle izole edilen maya suşlarında endüstriyel öneme sahip proteaz, lipaz ve üreaz aktiviteleri belirlendi.

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının hücre dışı proteaz aktiviteleri sonuçları incelendiğinde *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *M. guilliermondi* maya türlerine ait suşlarda proteaz aktivitesi bulunmadığı belirlendi (Tablo 18). *P. fermentans* olarak tanımlanan on altı maya suşundan Y-6 maya suşunun proteaz aktivitesine sahip olmadığı, bir maya suşunun (Y-15) düşük, on dört maya suşunun (Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-19, Y-20, Y-21, Y-22 ve Y-23) ise yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi. Tanımlanan on iki *K. marxianus* maya suşundan dört tanesi (Y-10, Y-14, Y-18 ve Y-24) proteaz aktivitesi göstermezken altı maya suşunun (Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39 ve Y-41) düşük ve iki maya suşunun (Y-9 ve Y-16) ise yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. *Y. lipolytica* olarak tanımlanan üç maya suşundan bir maya suşunun (Y-17) düşük diğer iki maya suşunun (Y-25 ve Y-27) ise yüksek proteaz aktivitesi içerdiği tespit edildi. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan yedi maya suşundan yalnızca Y-33 maya suşunda yüksek ve dört maya suşunda (Y-28, Y-31, Y-32 ve Y-38) düşük proteaz aktivitesine rastlanırken iki maya suşunda (Y-26, Y-29) proteaz aktivitesi gözlenmedi.

Maya suşlarının lipaz aktivitesi sonuçlarına göre *C. tropicalis* maya türüne ait bir maya suşunda (Y-11) ve *Y. lipolytica* maya türüne ait iki maya suşunda (Y-25 ve Y-27)

düşük seviyede lipaz aktivitesine rastlandı (Tablo 19). Yoğurt örneklerinden izole edilen diğer otuz sekiz maya suşunda ise hücre dışı lipaz aktivitesi tespit edilmedi.

Yoğurt örneklerinden izole edilerek *P. fermentans* ve *S. cerevisiae* olarak tanımlanan tüm maya suşlarında üreaz aktivitesinin bulunmadığı, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *M. guilliermondii* olarak tanımlanan tüm maya suşlarında ise düşük üreaz aktivitesinin bulunduğu gözlemlendi (Tablo 20). *K. marxianus* maya türüne ait sekiz maya suşunda üreaz aktivitesine rastlanmazken üç maya suşunun (Y-34, Y-37 ve Y-39) düşük ve bir maya suşunun (Y-18) yüksek üreaz aktivitesi içerdiği belirlendi. *Y. lipolytica* olarak tanımlanan tüm maya suşlarında ise yüksek seviyede üreaz aktivitesi tespit edildi.

Tablo 18

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının proteolitik aktiviteleri

Maya Türleri	Yüksek Aktivite	Düşük Aktivite	Aktivite Göstermeyen
<i>C. parapsilosis</i> (1)	-	-	Y-40
<i>C. tropicalis</i> (1)	-	-	Y-11
<i>M. guilliermondii</i> (1)	-	-	Y-30
<i>Y. lipolytica</i> (3)	Y-17	Y-25, Y-27	-
<i>S. cerevisiae</i> (7)	Y-33	Y-28, Y-31, Y-32, Y-38	Y-26, Y-29
<i>K. marxianus</i> (12)	Y-9, Y-16	Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39, Y-41	Y-10, Y-14, Y-18, Y-24
<i>P. fermentans</i> (16)	Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-19, Y-20, Y-21, Y-22, Y-23	Y-15	Y-6

Tablo 19

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının lipolitik aktiviteleri

Maya Suşları	Yüksek Aktivite.	Düşük Aktivite	Aktivite Göstermeyen
<i>C. parapsilosis</i> (1)	-	-	Y-40
<i>C. tropicalis</i> (1)	-	Y-11	-
<i>M. guilliermondii</i> (1)	-	-	Y-30
<i>Y. lipolytica</i> (3)	-	Y-25, Y-27	Y-17
<i>S. cerevisiae</i> (7)	-	-	Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32, Y-33, Y-38
<i>K. marxianus</i> (12)	-	-	Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-18, Y-24, Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39, Y-41
<i>P. fermentas</i> (16)	-	-	Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-6, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-15, Y-19, Y-20, Y-21, Y-22, Y-23

Tablo 20

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının üreaz aktiviteleri

Maya Suşları	Yüksek Aktivite	Düşük Aktivite	Aktivite Göstermeyen
<i>C. parapsilosis</i> (1)	-	Y-40	-
<i>C. tropicalis</i> (1)	-	Y-11	-
<i>M. guilliermondii</i> (1)	-	Y-30	-
<i>Y. lipolytica</i> (3)	Y-17, Y-25, Y-27	-	-
<i>S. cerevisiae</i> (7)	-	-	Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32, Y-33, Y-38
<i>K. marxianus</i> (12)	Y-18	Y-34, Y-37, Y-39	Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-24, Y-35, Y-36, Y-41
<i>P. fermentas</i> (16)	-	-	Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-6, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-15, Y-19, Y-20, Y-21, Y-22, Y-23

Elde edilen sonuçlara göre *Y. lipolytica* maya türüne ait Y-17, Y-25 ve Y-27 maya suşlarının, *K. marxianus* maya türüne ait Y-9, Y-16 ve Y-18 maya suşlarının, iki maya suşu hariç (Y-6 ve Y-15) diğer tüm *P. fermentans* maya suşlarının ve *S. cerevisiae* maya türüne ait Y-33 maya suşunun endüstriyel öneme sahip maya suşları olduğu belirlendi. Ayrıca, aynı türe ait maya suşlarının farklı hücre dışı enzim aktivelemelerine sahip oldukları gözlemlendi.

4.1.4. Maya Suşlarının Fermantatif Özellikleri

Yoğurt örneklerinden izole edilerek tanımlanan maya suşlarının farklı karbon kaynaklarında (glikoz (dekstroz), galaktoz, sükröz, laktoz, maltoz ve gliserol) fermantatif özellikleri incelendi ve elde edilen sonuçlar Tablo 21’de verildi. Maya suşlarının fermantasyon kapasitelerine göre oluşturdukları profiller incelendiğinde, *C. parapsilosis* maya türüne ait bir maya suşunun (Y-40), *K. marxianus* maya türüne ait iki maya suşunun (Y-24 ve Y-41) ve *Y. lipolytica* maya türüne ait bir (Y-17) maya suşunun tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin yüksek olduğu, gözlemlendi. *K. marxianus* maya türüne ait altı maya suşunun (Y-10, Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39) gliserol hariç ve iki maya suşunun (Y-9 ve Y-14) maltoz hariç diğer tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin bulunduğu tespit edildi. Y-16 ve Y-18 *K. marxianus* maya suşlarının ise galaktoz ve laktozda fermantasyon kapasitesinin bulunmadığı gözlemlendi. *Y. lipolytica* maya türüne ait Y-25 maya suşunun maltoz dışında ve Y-27 maya suşunun galaktoz ve maltoz dışında diğer tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin yüksek olduğu belirlendi.

P. fermentans maya türüne ait tüm maya suşlarının glikoz ve gliserol içeren karbon kaynaklarında fermantatif özelliğinin yüksek olduğu ancak diğer karbon kaynaklarında suşlar arasında farklılıkların bulunduğu belirlendi. Y-21 ve Y-22 suşları hariç diğer *P. fermentans* maya suşlarının laktoz içeren ortamda fermantasyon kapasitesinin bulunmadığı, Y-12 maya suşunun ise dekstroz ve gliserol hariç diğer tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin bulunmadığı tespit edildi. *M. guilliermondii* maya suşunun (Y-30) laktoz dışındaki tüm karbon kaynaklarında fermantasyon testinin pozitif sonuç verdiği belirlendi. *C. tropicalis* olarak tanımlanan Y-11 maya suşunun ise laktoz ve gliserol içeren karbon kaynaklarında fermantasyon yeteneğinin bulunmadığı gözlemlendi. *S. cerevisiae* maya

suşlarının fermantatif özellikleri incelendiğinde Y-26, Y-28 ve Y-29 maya suşlarının laktoz hariç diğer karbon kaynaklarını fermente edebildiği, diğer *S. cerevisiae* maya suşlarının ise karbon kaynağına bağlı olarak fermentasyon kapasitelerinin değişkenlik gösterdiği tespit edildi.

Farklı karbon kaynaklarını kullanabilen ve bu karbon kaynaklarında fermantasyon yeteneği olan maya suşları özellikle endüstriyel fermente ürünlerin eldesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışma sonucunda, *K. marxianus* maya türüne ait Y-24 ve Y-41 maya suşlarının, *Y. lipolytica* maya türüne ait Y-17 maya suşunun ve *C. parapsilosis* maya türüne ait Y-40 maya suşunun endüstriyel olarak önemli maya suşları olduğu tespit edildi.

Tablo 21

Yoğurt örneklerinde tanımlanan maya suşlarının farklı karbon kaynaklarında fermentasyon kapasiteleri

Maya Türü	Suş Kodu	Glu	Gal	Suk	Lak	Mal	Gli	
<i>C. parapsilosis</i>	Y-40	+	+	+	+	+	+	
<i>C. tropicalis</i>	Y-11	+	+	+	-	+	-	
<i>M. guilliermondii</i>	Y-30	+	+	+	-	+	+	
<i>K. marxianus</i>	Y-10, Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39	+	+	+	+	+	-	
	Y-9, Y-14	+	+	+	+	-	+	
	Y-24, Y-41	+	+	+	+	+	+	
	Y-16	+	-	+	-	-	+	
<i>P. fermentans</i>	Y-18	+	-	+	-	+	+	
	Y-1, Y-2, Y-6, Y-13	+	-	+	-	-	+	
	Y-7, Y-8, Y-19, Y-20	+	+	+	-	-	+	
	Y-3, Y-15	+	-	+	-	+	+	
	Y-4, Y-23	+	+	-	-	+	+	
	Y-21, Y-22	+	-	+	+	-	+	
	Y-5	+	+	+	-	+	+	
	Y-12	+	-	-	-	-	+	
	<i>S. cerevisiae</i>	Y-26, Y-28, Y-29	+	+	+	-	+	+
		Y-31, Y-38	+	+	+	-	+	-
Y-32		+	-	-	+	-	+	
Y-33		+	-	+	+	-	+	
<i>Y. lipolytica</i>	Y-17	+	+	+	+	+	+	
	Y-25	+	+	+	+	-	+	
	Y-27	+	-	+	+	-	+	

Glu: Glukoz (Dekstroz), Gal: Galaktoz, Suk: Sükroz, Lak: Laktoz, Mal: Maltoz, Gli: Gliserol

4.1.5. Maya Suşlarının Termotolerans ve Osmotolerans Özellikleri

Yoğurt örneklerinden tanımlanan maya suşlarının termotolerans özellikleri farklı sıcaklıklar (37 ve 45 °C) kullanılarak ve osmotolerans özellikleri %50 dekstroz içeren zengin besi ortamı kullanılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre Y-29 *S. cerevisiae* suşu hariç diğer tüm maya suşlarının 37 °C sıcaklıkta üreme gösterdiği tespit edildi (Tablo 22). *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *M. guilliermondii* maya türlerine ait maya suşlarının 37 °C hem sıcaklıkta üreme gösterdiği ancak de 45 °C sıcaklıkta üreme göstermediği gözlemlendi. *P. fermentans* maya türüne ait on altı maya suşundan bir tanesi hariç (Y-6) diğer maya suşlarının 45 °C sıcaklıkta çoğalamadığı tespit edildi. *K. marxianus* maya türüne ait on iki maya suşundan bir tanesi hariç (Y-16) diğer maya suşlarının (Y-9, Y-10, Y-14, Y-18, Y-24, Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39, Y-41) 37 °C ve 45 °C sıcaklıkta gelişim gösterdiği, ancak Y-16 maya suşunun 45 °C sıcaklıkta çoğalamadığı belirlendi. *Y. lipolytica* maya türüne ait tüm suşların ise 37 °C ve 45 °C sıcaklıkta üreme gösterdiği belirlendi. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan maya suşlarının tümü (Y-29 maya suşu hariç) 37 °C sıcaklıkta üreme gösterirken, diğer *S. cerevisiae* maya suşlarının 45 °C sıcaklıkta üreme göstermediği tespit edildi.

Maya suşlarının osmotolerans testi sonucuna göre, *P. fermentans*, *K. marxianus* ve *Y. lipolytica* olarak tanımlanan tüm maya suşlarının %50 dekstroz içeren besi ortamında üreme göstermediği tespit edildi (Tablo 23). Ancak, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *M. guilliermondii* olarak tanımlanan maya suşlarının yüksek osmotolerant özelliğe sahip oldukları belirlendi. *S. cerevisiae* maya suşlarının tamamının ise %50 dekstroz içeren besi ortamında üreme gösterdiği gözlemlendi.

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının enzim aktiviteleri, fermantatif özellikleri ve stres dirençleri göz önüne alındığında, *Y. lipolytica* maya türüne ait tüm suşların (Y-17, Y-25 ve Y-27), *S. cerevisiae* maya türüne ait dört maya suşunun (Y-28, Y-31, Y-33 ve Y-38), *K. marxianus* maya türüne ait beş maya suşunun (Y-9, Y-16, Y-18, Y-24 ve Y-41), *P. fermentans* maya türüne ait Y-5 maya suşunun ve *C. parapsilosis* maya türüne ait Y-40 maya suşunun endüstriyel olarak önemli maya suşları olduğu belirlendi.

Tablo 22

Yoğurt örneklerinde tanımlanan maya suşlarının termotolerans özellikleri*

Maya Türü	37 °C Test	45 °C Test
<i>C. parapsilosis</i>	Y-40	-
<i>C. tropicalis</i>	Y-11	-
<i>M. guilliermondii</i>	Y-30	-
<i>P. fermentas</i>	Y-1, Y-2, Y-3, Y-4, Y-5, Y-7, Y-8, Y-12, Y-13, Y-15, Y-19, Y-20, Y-21, Y-22, Y-23	Y-6
<i>K. marxianus</i>	Y-9, Y-10, Y-14, Y-16, Y-18, Y-24, Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39, Y-41	Y-9, Y-10, Y-14, Y-18, Y-24, Y-34, Y-35, Y-36, Y-37, Y-39, Y-41
<i>S. cerevisiae</i> *	Y-26, Y-28, Y-31, Y-32, Y-33, Y-38	-
<i>Y. lipolytica</i>	Y-17, Y-25, Y-27	Y-17, Y-25, Y-27

**S. cerevisiae* maya türünü Y-29 suşu her iki sıcaklıkta da üreme göstermediği için tabloda verilmedi.

Tablo 23

Yoğurt örneklerinde tanımlanan maya suşlarının osmotolerans özellikleri*

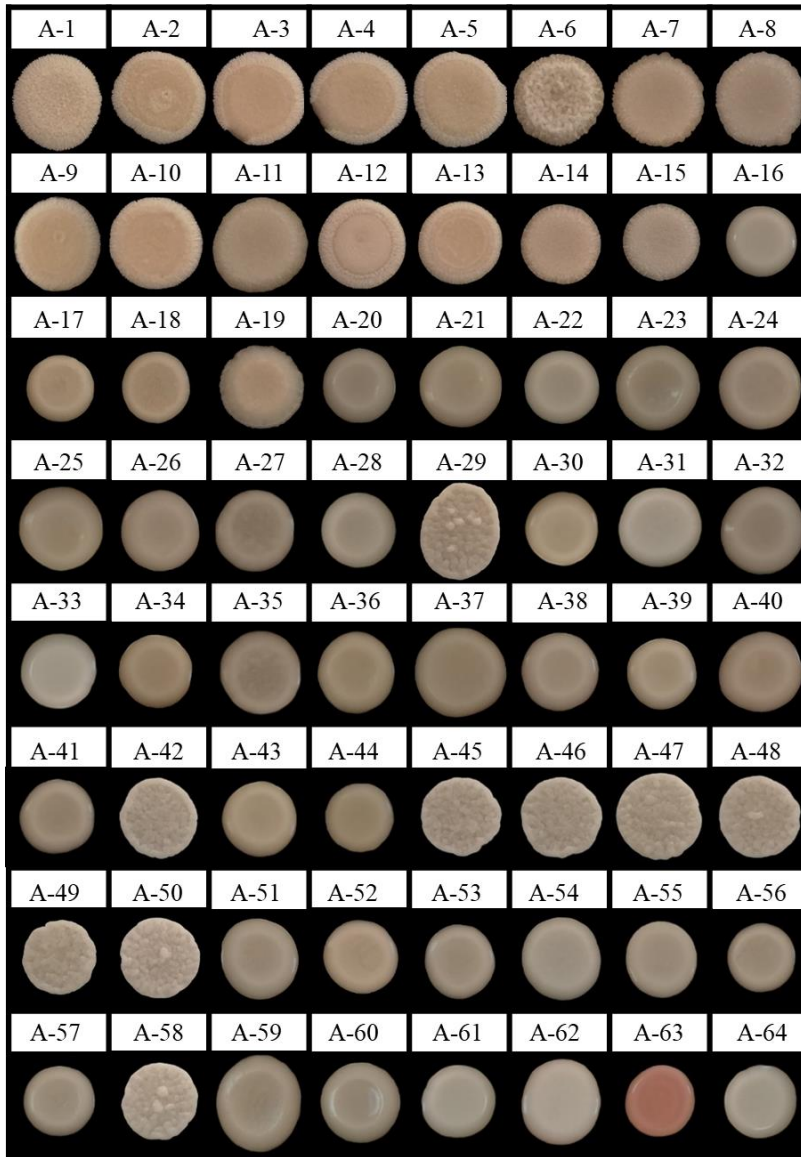
Maya Türü	%50 Glukoz
<i>C. parapsilosis</i>	Y-40
<i>C. tropicalis</i>	Y-11
<i>M. guilliermondii</i>	Y-30
<i>S. cerevisiae</i>	Y-26, Y-28, Y-29, Y-31, Y-32, Y-33, Y-38

**Üreme göstermeyen maya suşları tabloda verilmedi.

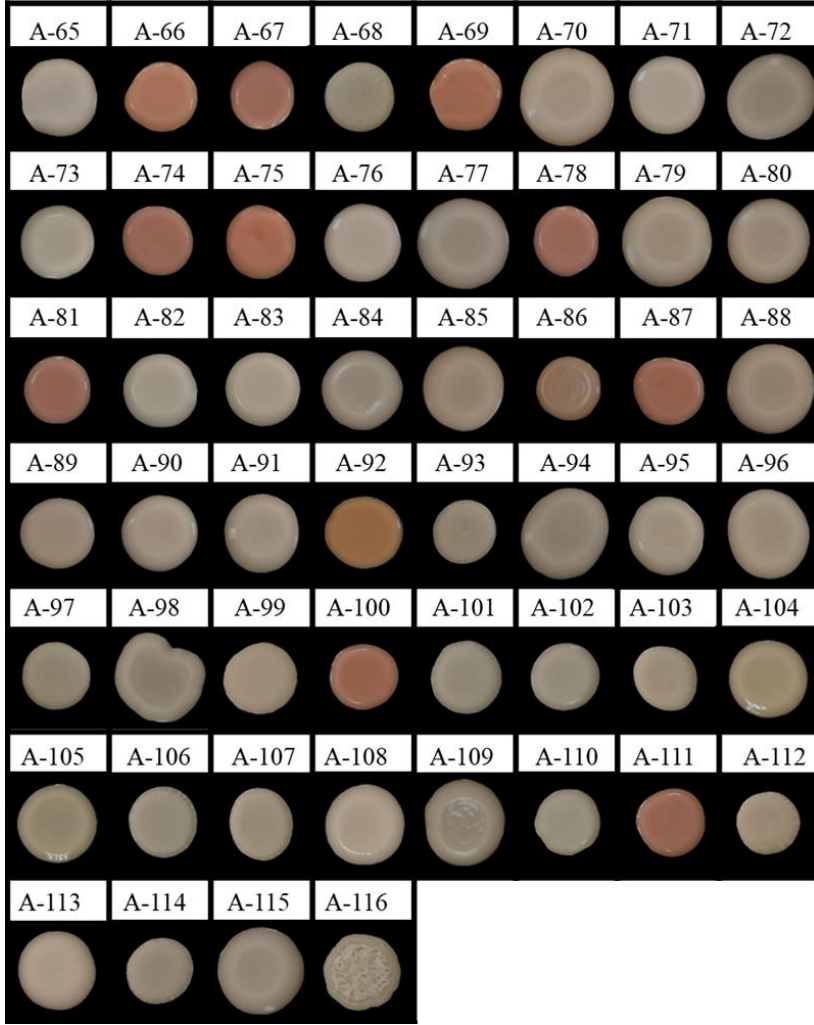
4.2. Ayrandan İzole Edilen Maya Suşları ile İlgili Çalışmalar

4.2.1. Maya Yoğunluğunun Belirlenmesi

Ayran örneklerinden izole edilerek stoklanan 118 maya suşundan 116 maya suşunun zengin besi ortamında çoğalabildiği gözlemlendi. Üreme gösteren maya suşlarının fotoğrafları Şekil 12’de verildi. Ayran örneklerinde maya yoğunluğu $2,53 \times 10^3$ CFU/mL olarak hesaplandı. Ayran örneklerinden izole edilen maya suşları “A” olarak kodlandırıldı.



Şekil 12. Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının zengin besi ortamında çoğaltılması



Şekil 12'nin devamı.

4.2.2. Maya Suşlarının Tanımlanması

API-ID32 Kit Sistemi ile Tanımlanması

Ayran örneklerinden izole edilen 116 maya suşunun API-ID32C kit sistemi kullanılarak tür tanımlaması sonrası *C. kefir*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Candida colliculosa*, *Candida holmii*, *Candida famata*, *Candida melibiosica*, *Candida pelliculosa*, *Candida sake*, *Geotricum capitatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* ve *S. cerevisiae* olmak üzere 15 maya türü tanımlandı. İzole edilen maya türlerinin API-ID32C sonuçlarına göre maya suşlarının asimilasyon profilleri oluşturuldu (Tablo 24).

Asimilasyon profillerine göre *C. kefir* olarak tanımlanan yirmi sekiz maya suşunun dokuz farklı asimilasyon profili oluşturduğu görüldü. On sekiz maya suşu (A-23, A-32, A-40, A-51, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-80, A-84, A-85, A-88, A-94, A-98, A-109) birinci profilde (G-1) yer alırken ikinci (G-2) ve üçüncü (G-3) profilde ikişer maya suşunun ve diğer asimilasyon profillerinde birer maya suşunun bulunduğu belirlendi. Benzer şekilde *C. parapsilosis* olarak tanımlanan on sekiz maya suşunun da dokuz farklı asimilasyon profili oluşturduğu tespit edildi. Birinci profilde (G-1) on maya suşu (A-93, A-116, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-112) bulunurken diğer sekiz profilin birer maya suşu içerdiği gözlemlendi. *C. lipolytica* olarak tanımlanan on maya suşu yedi farklı asimilasyon profili oluşturdu. Birinci profilin üç maya suşu ile (A-5, A-12 ve A-13), ikinci asimilasyon profilinin iki maya suşu ile (A-2 ve A-9) ve diğer profillerin birer maya suşu temsil edildiği tespit edildi. *C. lusitaniae* olarak tanımlanan on maya suşunun beş farklı asimilasyon profili oluşturduğu gözlemlendi. Asimilasyon profillerine göre A-22, A-31, A-91, A-96, A-97 ve A-108 maya suşlarının birinci profilde, diğer profillerde ise birer maya suşunun yer aldığı görüldü. *C. colliculosa* olarak tanımlanan 4 maya suşunun iki asimilasyon profili oluşturduğu, birinci profilde üç maya suşunun ikinci profilde ise bir maya suşunun bulunduğu belirlendi. *C. lambica* olarak tanımlanan tüm maya suşlarının (A-6, A-7, A-8, A-11, A-14 ve A-15) tek bir asimilasyon profiline sahip olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde *C. holmii* olarak tanımlanan maya suşlarının da (A-48 ve A-99) tek bir profile sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, *C. famata* maya suşu (A-83), *C. melibiosica* maya suşu (A-95), *C. pelliculosa* maya suşu (A-113) ve *C. sake* (A-16) maya suşunun ise diğer *Candida* türlerinden farklı profiller oluşturduğu gözlemlendi.

G. capitatum olarak tanımlanan sekiz maya suşunun dört farklı asimilasyon profili oluşturduğu gözlemlendi. Beş maya suşunun (A-42, A-45, A-46, A-47 ve A-50) birinci asimilasyon profilinde, diğer profillerde ise birer maya suşunun bulunduğu görüldü. *R. glutinis* olarak tanımlanan sekiz maya suşunun her birinin farklı asimilasyon profili oluşturduğu belirlendi. *R. musilaginosa* olarak tanımlanan beş maya suşunun ise asimilasyon testi sonuçlarına göre üç ayrı profil oluşturduğu birinci profilin üç maya suşu ile (A-63, A-66, A-87), diğer iki profilin ise birer maya suşu ile temsil edildiği tespit edildi.

S. cerevisiae olarak tanımlanan on üç maya suşu iki farklı asimilasyon profili oluşturdu. Birinci profil on bir maya suşu (A-25, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-41, A-43, A-53 ve A-57) ile temsil edilirken, ikinci profilde ise iki maya suşunun (A-52 ve A-56) yer aldığı görüldü. Asimilasyon testi sonuçlarına göre aynı türe ait maya suşlarının farklı asimilasyon profillerine sahip olduğu gözlemlendi.

Ayran örneklerinden izole edilen yüz on altı maya suşunun API-ID32C kit sistemi ile tanımlanması sonrasında ayran örneklerinde maya türlerinin dağılımı belirlendi ve Şekil 13'te verildi. Ayran örneklerinde *C. kefir* (%24,14) ve *C. parapsilosis* (%15,52) maya türlerinin yoğun olarak dağılım gösterdiği tespit edildi. *S. cerevisiae* maya türünün %11,21 oranında, *C. lipolytica* maya türünün %8,62 oranında, *C. lusitaniae* maya türünün %8,62 oranında, *G. capitatum* ve *R. glutinis* maya türlerinin %6,90 oranında, *C. lambica* maya türünün %5,17 oranında *R. mucilaginosa* maya türünün %4,31 oranında ve *C. colliculosa* maya türünün %3,45 oranında ayran örneklerinde dağılım gösterdiği belirlendi. Diğer dört maya türünün (*C. holmii*, *C. famata*, *C. pelliculosa* ve *C. sake*) ise %2'nin altında dağılım gösterdiği tespit edildi.

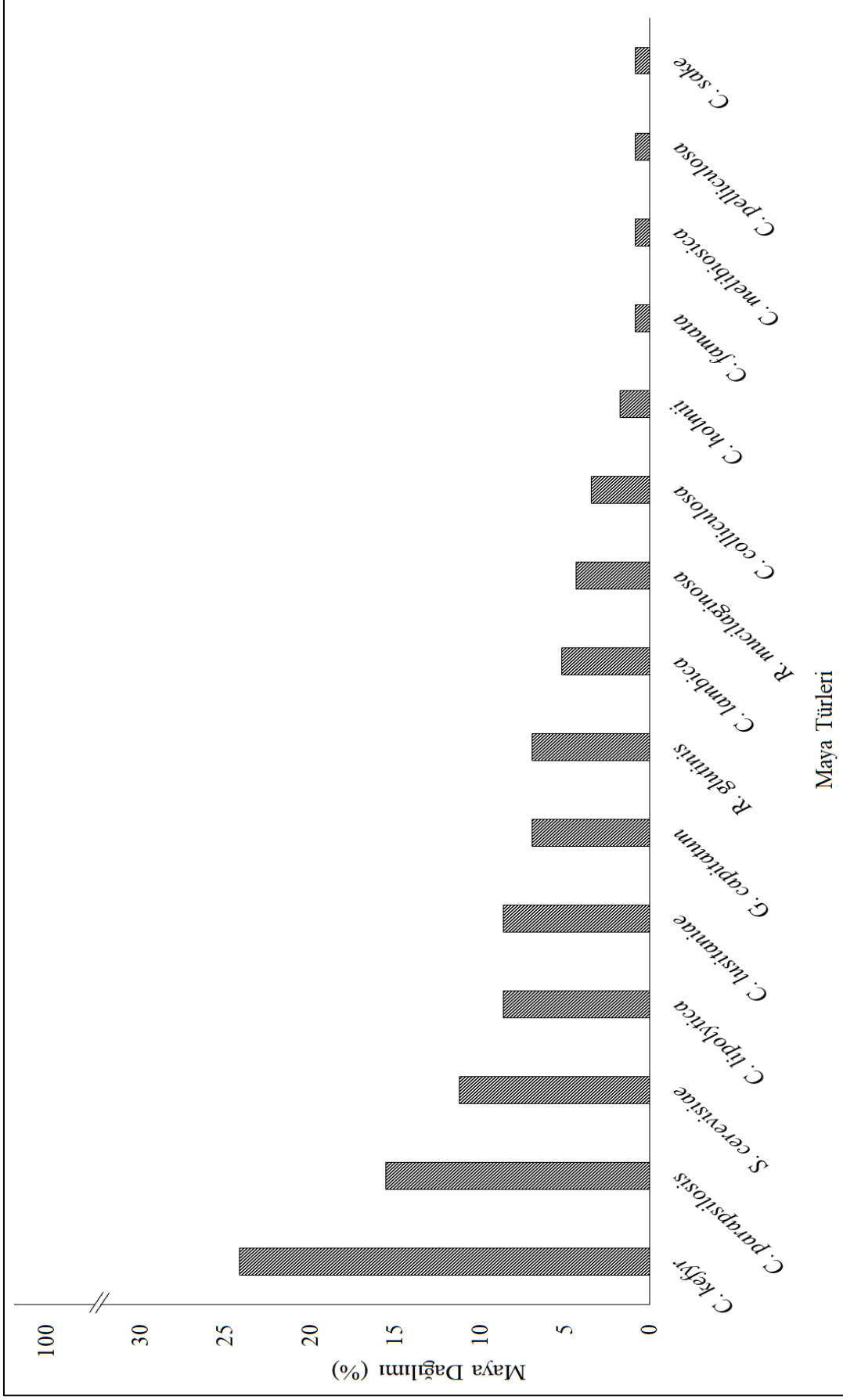
Tablo 24

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının asimilasyon sonuçlarına göre tanımlanması ve gruplandırılması

Tanımlanan Maya Türleri	Profil Numarası (G) ve Suş Kodu (A)
<i>C. kefir</i> (28)	G1: A-23, A-32, A-40, A-51, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-80, A-84, A-85, A-88, A-94, A-98, A-109
	G2: A-24, A-37
	G3: A-26, A-60
	G4: A-20
	G5: A-21
	G6: A-38
	G7: A-59
	G8: A-73
	G9: A-115
<i>C. parapsilosis</i> (18)	G1: A-93, A-116, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-112
	G2: A-44
	G3: A-62
	G4: A-65
	G5: A-68
	G6: A-76
	G7: A-89
	G8: A-110
	G9: A-114
<i>C. lipolytica</i> (10)	G1: A-5, A-12, A-13
	G2: A-2, A-9
	G3: A-1
	G4: A-3
	G5: A-4
	G6: A-10
	G7: A-19
<i>C. lusitaniae</i> (10)	G1: A-22, A-31, A-91, A-96, A-97, A-108
	G2: A-33
	G3: A-54
	G4: A-82
	G5: A-90

Tablo 24'ün Devamı

Tanımlanan Maya Türleri	Profil Numarası (G) ve Suş Kodu (A)
<i>C. lusitaniae</i> (10)	G1: A-22, A-31, A-91, A-96, A-97, A-108
	G2: A-33
	G3: A-54
	G4: A-82
	G5: A-90
<i>G. capitatum</i> (8)	G1: A-42, A-45, A-46, A-47, A-50
	G2: A-29
	G3: A-49
	G4: A-58
<i>R. glutinis</i> (8)	G1: A-67
	G2: A-69
	G3: A-74
	G4: A-75
	G5: A-78
	G6: A-86
	G7: A-100
	G8: A-111
<i>C. lambica</i> (6)	G1: A-6, A-7, A-8, A-11, A-14, A-15
<i>R. mucilaginoso</i> (5)	G1: A-63, A-66, A-87
	G2: A-81
	G3: A-92
<i>C. colliculosa</i> (4)	G1: A-17, A-18, A-28
	G2: A-55
<i>C. holmii</i> (2)	G1: A-48, A-99
<i>C. famata</i> (1)	G1: A-83
<i>C. melibiosica</i> (1)	G1: A-95
<i>C. pelliculosa</i> (1)	G1: A-113
<i>C. sake</i> (1)	G1: A-16

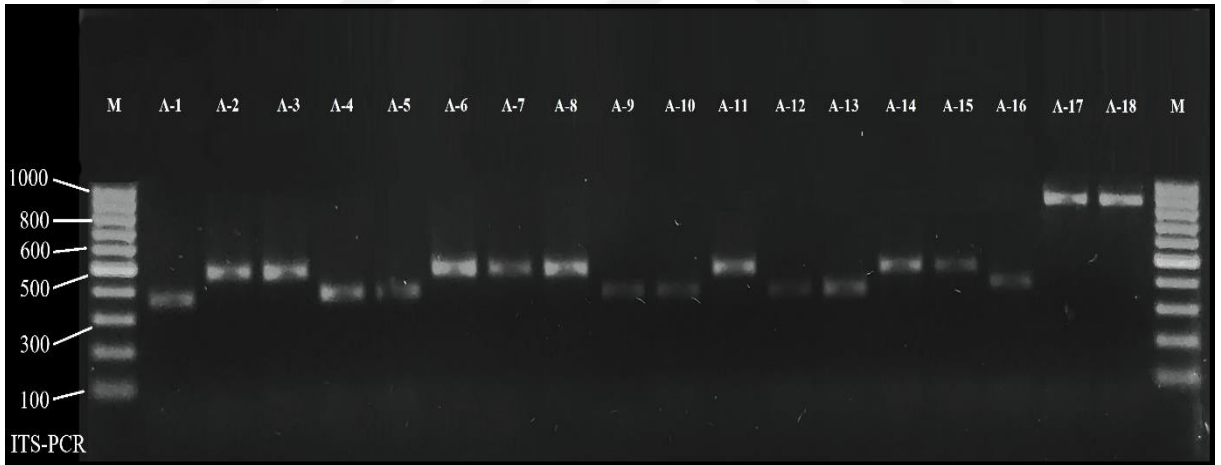


Şekil 13. Asimilasyon test sonucuna göre maya türlerinin ayrıran örneklerinde dağılımları

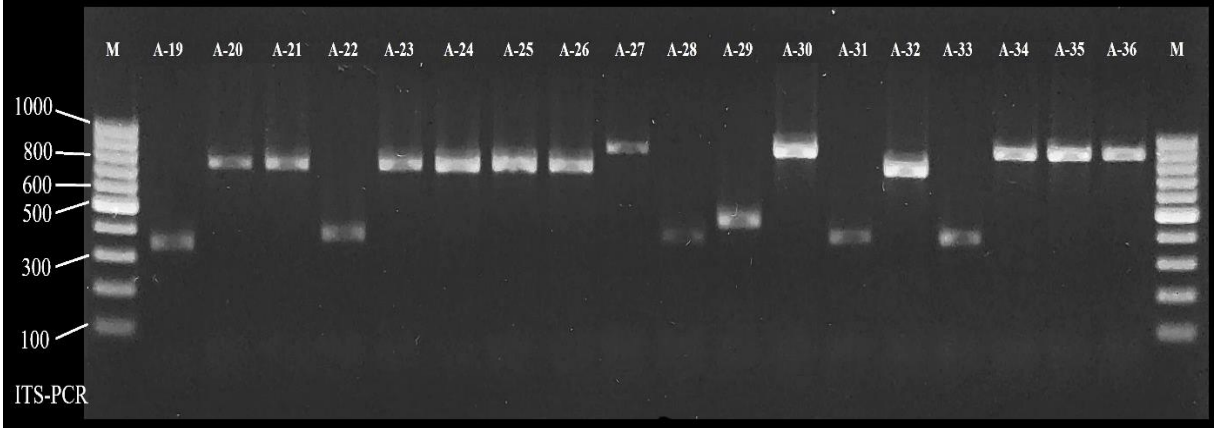
Moleküler Yöntemlerle Tanımlama

ITS-5.8S Bölgesinin PCR-RFLP Analizi

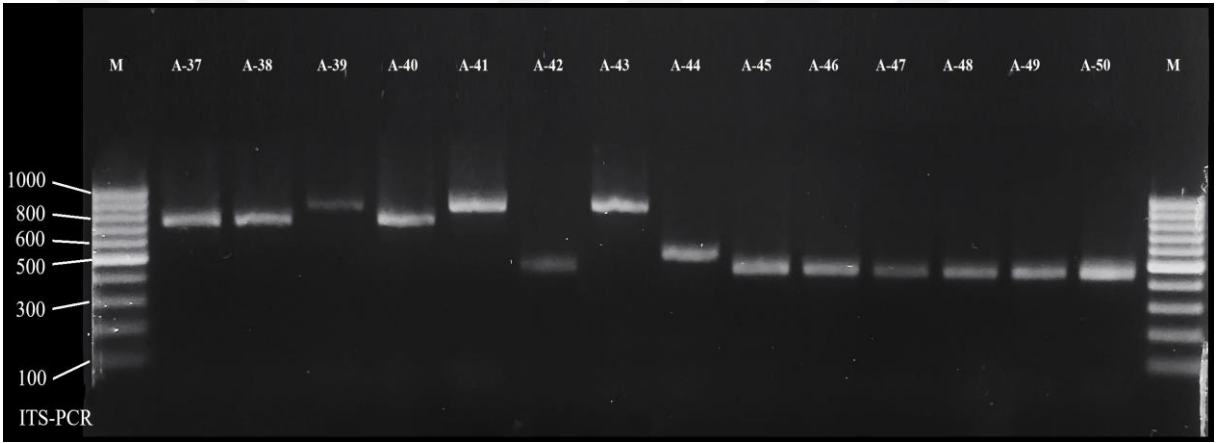
Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının genomik DNA izolasyonu sonrası ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesi ITS1 ve ITS4 primeri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Amplifikasyon sonrası A-1 ile A-18 arasında kodlu maya suşlarına ait PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri Şekil 14’te, A-19 ile A-36 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 15’te, A-37 ile A-50 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 16’da, A-51 ile A-67 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 17’de, A-68 ile A-85 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 18’de, A-86 ile A-99 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 19’da ve A-100 ile A-116 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 20’de verildi. Amplifikasyon sonrası PCR ürünlerinin bant uzunluğuna göre maya suşları gruplandırıldı.



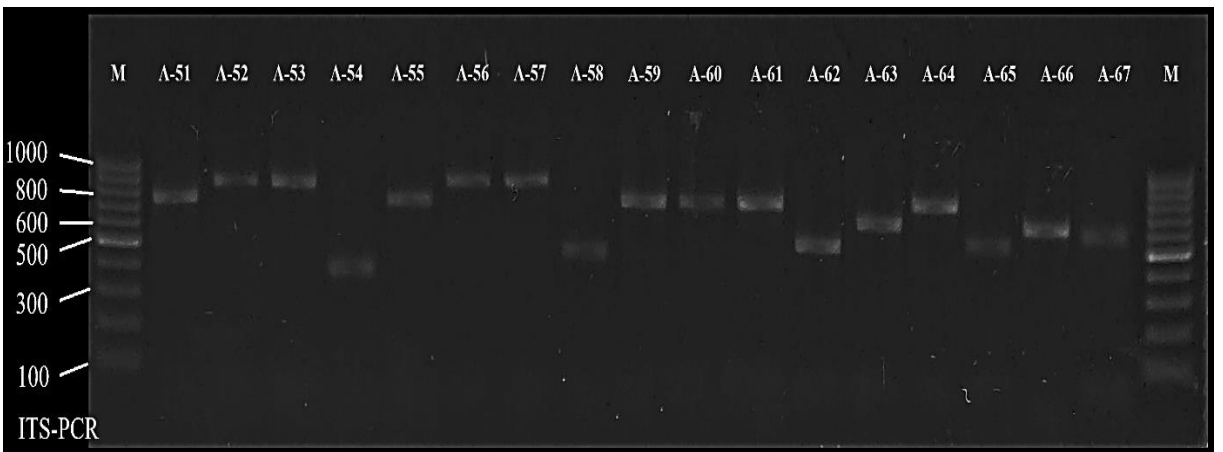
Şekil 14. Maya suşlarına (A-1 ile A-18) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu



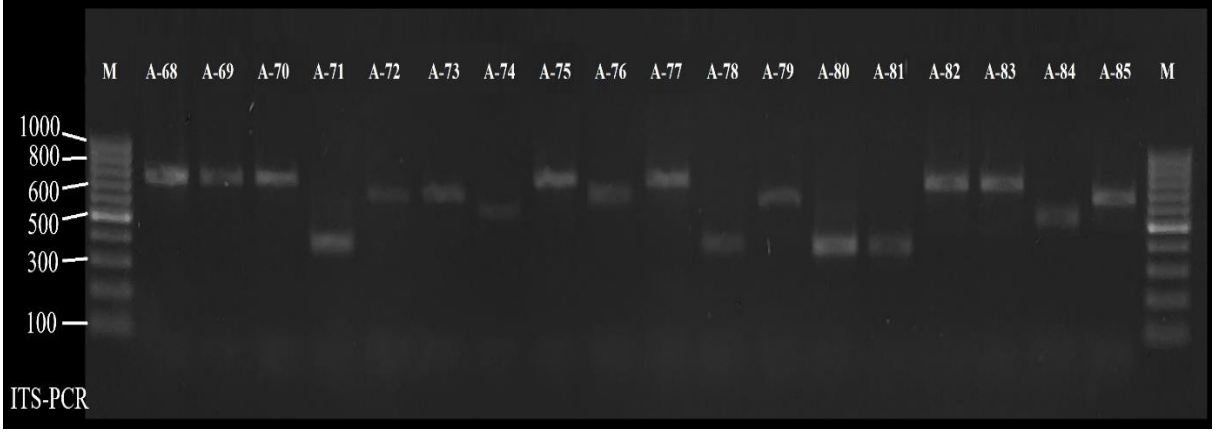
Şekil 15. Maya suşlarına (A-19 ile A-36) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu



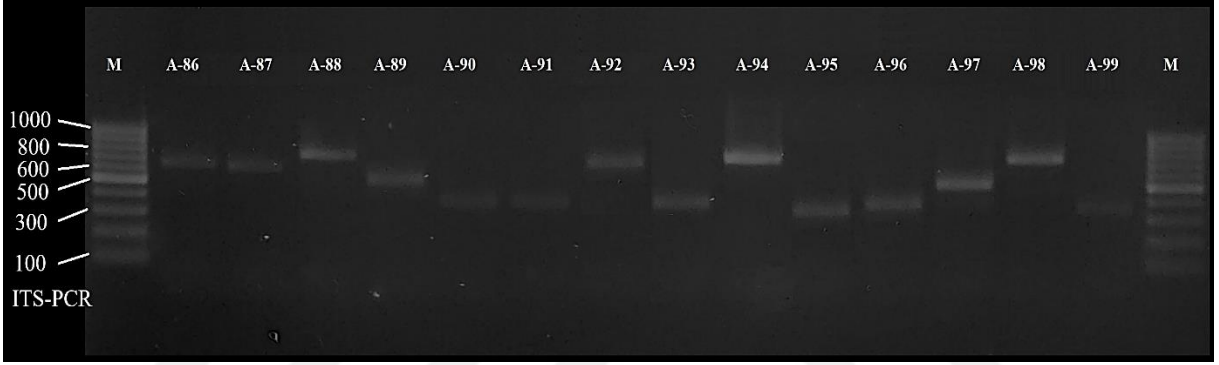
Şekil 16. Maya suşlarına (A-37 ile A-50) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 17. Maya suşlarına (A-51 ile A-67) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 18. Maya suşlarına (A-68 ile A-85) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 19. Maya suşlarına (A-86 ile A-99) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 20. Maya suşlarına (A-100 ile A-116) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu

Ayran örneklerinden izole edilen 116 maya suşu ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin PCR uzunluğuna göre altı gruba ayrıldı (Tablo 25). Birinci grupta (P-1) yer alan yirmi beş maya suşunun yaklaşık 350 ile 400 bp uzunluğunda PCR ürünü verildiği görüldü.

İkinci PCR grubunda (P-2) yer alan on yedi maya suşunun yaklaşık 450 ile 500 bç büyüklüğünde, üçüncü PCR grubunda (P-3) yer alan on dokuz maya suşunun yaklaşık olarak 550 ile 600 bç büyüklüğünde, dördüncü grubu (P-4) oluşturan on üç maya suşunun yaklaşık 650 ile 700 bç büyüklüğünde, beşinci grubu (P-5) oluşturan yirmi sekiz maya yaklaşık 800 bç büyüklüğünde ve altıncı grubu (P-6) oluşturan on dört maya suşunun yaklaşık 900 bç uzunluğunda PCR ürünü verdiği belirlendi.

Tablo 25

Ayran kaynaklı maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin PCR amplifikasyonu

PCR Grup No (PCR Uzunluğu bç)	Maya Suşları
P-1 (~350-400)	A-1, A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-16, A-19, A-22, A-28, A-31, A-33, A-54, A-73, A-80, A-82, A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A-99, A-108
P-2 (~450-500)	A-2, A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14, A-15, A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58
P-3 (~550- 600)	A-44, A-62, A-65, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-113, A-114, A-116
P-4 (~650- 700)	A-63, A-66, A-67, A-69, A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-100, A-111
P-5 (~800)	A-20, A-21, A-23, A-24, A-25, A-26, A-32, A-37, A-38, A-40, A-51, A-55, A-59, A-60, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-85, A-88, A-94, A-98, A-109, A-115
P-6 (~900)	A-17, A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57

Maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgelerine ait PCR ürünlerinin Hinfl, HaeIII, MspI, AluI ve HhaI restriksiyon enzimleri kesimi sonrasında elde edilen restriksiyon profillerine göre maya suşları tekrar gruplandırıldı.

PCR ürünlerine göre birinci grupta (P-1) yer alan yirmi beş maya suşu (A-1, A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-16, A-19, A-22, A-28, A-31, A-33, A-54, A-73, A-80, A-82,

A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A-99 ve A-108) PCR-RFLP analizi sonucunda üç farklı profil oluşturdu (Tablo 26). Bu grupta yer alan tüm maya suşlarının Alu I enzimi için kesim bölgesi içermediği belirlendi. Maya suşlarının Hae III enzimi ile kesimi sonrasında birinci restriksiyon profilinde (R-1) yer alan maya suşlarının (A-1, A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-19 ve A-99) tek kesim bölgesi içerdiği, diğer iki profilde (R-2 ve R-3) yer alan maya suşlarının ise Hae III enzimi için kesim bölgesi içermediği gözlemlendi. PCR-RFLP sonuçlarına göre birinci profilde (R-1) yer alan dokuz maya suşunun Hinf I enzimi için kesim bölgesi içermediği görülürken, ikinci restriksiyon profilinde (R-2) yer alan on bir maya suşunun tek kesim bölgesi içerdiği görüldü. Üçüncü restriksiyon profilinde (R-3) yer alan A-22, A-28, A-31, A-33 ve A-54 maya suşlarının Hinf I enzimi için iki kesim bölgesi içerdiği gözlemlendi. Birinci PCR grubunda (P-1) yer alan maya suşlarından restriksiyon profiline göre birinci grupta (R-1) yer alan dokuz maya suşunun Hha I ve Msp I enzim kesimleri ile diğer iki restriksiyon profilinden (R-2 ve R-3) ayrıldığı tespit edildi. Restriksiyon profiline göre ikinci ve üçüncü grupta yer alan maya suşlarının ise Hinf I enzimi ile birbirinden ayrıldığı belirlendi.

Tablo 26
Birinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşu	RFLP- ITS-5.8S-ITS2				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-1 (~350-400 bç)	R-1	A-1, A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-19, A-99	223-138	-----	231-129	-----	245-138
	R-2	A-16, A-73, A-80, A-82, A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A-108	-----	188-160	212-97-83	-----	271-85
	R-3	A-22, A-28, A-31, A-33, A-54	-----	156-97-89	212-97-83	-----	271-85

PCR ürünlerine göre ikinci grupta (P-2) yer alan on yedi maya suşu PCR-RFLP analizi sonucunda üç farklı restriksiyon profili oluşturdu (Tablo 27). Dördüncü restriksiyon profilinde (R-4) yer alan dokuz maya suşunun Hae III ve Msp I enzimleri için kesim bölgesi içermediği, Hinf I enzimi için iki kesim bölgesi içerdiği, Hha I ve Alu I enzimleri için tek kesim bölgesi içerdiği gözlemlendi. Restriksiyon profiline göre beşinci grubu (R-5) oluşturan maya suşlarının (A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14 ve A-15) Hae III, Hinf I ve Alu I enzimleri için bir kesim bölgesi, Hha I enzimi için üç kesim bölgesi ve Msp I enzimi için iki kesim

bölgesi içerdiği tespit edildi. Altıncı restriksiyon profilinde (R-6) yer alan bir maya suşunun (A-2) Hae III ve Hinf I enzimleri için kesim bölgesi içermediği, Hha I enzimi için iki kesim bölgesi içerdiği, Alu I ve Msp I enzimleri için tek kesim bölgesi içerdiği görüldü.

Tablo 27

İkinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşu	RFLP - ITS-5.8S-ITS2				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-2 (~450-500 bç)	R-4	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58	-----	224-137-95	281-154	373-78	-----
	R-5	A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14, A-15	330-95	260-190	153-103-96-87	390-85	240-145-80
	R-6	A-2	-----	-----	305-72-65	402-59	421-60

PCR ürünlerine göre üçüncü grupta (P-3) yer alan on dokuz maya suşu PCR-RFLP analizi sonucunda üç farklı restriksiyon profili oluşturdu (Tablo 28). Restriksiyon profiline göre yedinci grubu (R-7) oluşturan A-62 ve A-65 kodlu maya suşlarının Alu I enzimi için kesim bölgesi içermediği, Hae III enzimi için iki, Hinf I, Hha I, ve Msp I enzimleri için tek kesim bölgesi içerdiği belirlendi. Restriksiyon profiline göre sekizinci grupta (R-8) yer alan on altı maya suşunun (A-44, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-113ve A-116) Alu I ve Msp I enzimi için kesim bölgesi içermediği, Hae III, Hinf I ve Hha I enzimleri için bir kesim bölgesi içerdiği gözlemlendi. Dokuzuncu restriksiyon profilinde (R-9) yer alan bir maya suşunun (A-114) Hae III ve Msp I enzimleri için kesim bölgesi içermediği, Alu I enzimi için iki kesim bölgesi, Hinf I ve Hha I enzimleri için tek kesim bölgesi içerdiği tespit edildi.

Tablo 28

Üçüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşu	RFLP - ITS-5.8S-ITS2				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-3 (~550-600bç)	R-7	A-62, A-65	391-132-60	281-248	325-290	-----	378-152
	R-8	A-44, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-113, A-116	412-113	273-238	315-218	-----	-----
	R-9	A-114	-----	318-273	526-72	383-137-86	-----

PCR ürünlerine göre dördüncü grupta (P-4) yer alan on üç maya suşunun (A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-63, A-66, A-67, A-69, A-100 ve A-111) restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasında tek bir profil (R-10) oluşturduğu belirendi (Tablo 29). Bu grupta yer alan maya suşlarının Hinf I ve Hha I enzimleri için iki kesim bölgesi ve diğer restriksiyon enzimleri için tek kesim bölgesi içerdiği gözlemlendi.

Tablo 29

Dördüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşu	RFLP - ITS-5.8S-ITS2				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-4 (~650-700 bç)	R-10	A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-63, A-66, A-67, A-69, A-100, A-111	392-185	322-219-63	305-191-97	422-118	515-71

PCR ürünlerine göre beşinci grupta (P-5) yer alan yirmi sekiz maya suşu PCR-RFLP analizi sonucunda iki farklı restriksiyon profili (R-11 ve R-12) oluşturdu (Tablo 30). Her iki profilde yer alan maya suşlarının Msp I enzimi için kesim bölgesi içermediği gözlemlendi. Ayrıca her iki profilde yer alan maya suşlarının Hae III, Hha I ve Alu I enzimleri ile kesimi sonrasında yaklaşık olarak benzer uzunlukta ürün oluşturduğu belirlendi. Her iki profilin (R-11 ve R-12) birbirinden Hinf I enzimi ile kesimi sonrasında ayrıştığı tespit edildi.

Tablo 30

Beşinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşu	RFLP - ITS-5.8S-ITS2				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
	R-11	A-20, A-24, A-37	659-104	310-190- 105-79	283-207- 125-87	435-189- 103	-----
P-5 (~800 bç)	R-12	A-21, A-23, A-25, A-26, A-32, A-38, A-40, A-51, A-55, A-59, A-60, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-85, A-88, A-94, A-98, A-109, A-115	601-88	252-197- 117-76- 70	291-203- 132-97	414-189- 112	-----

PCR ürünlerine göre altını grupta (R-6) yer alan on dört maya suşunun restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasında tek bir profil oluşturduğu görüldü (Tablo 31). On üçüncü restriksiyon profilinde (R-13) yer alan maya suşlarının Hae III enzimi için üç kesim bölgesi, Hha I ve Msp I enzimleri için iki kesim bölgesi, Hinf I ve Alu I enzimleri için bir kesim bölgesi içerdiği belirlendi.

Tablo 31

Altıncı PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşu	RFLP - ITS-5.8S-ITS2				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-6 (~900 bç)	R-13	A-17, A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57	311-217- 155-79	489-320	364-328- 157	730-108	583-135- 92

Elde edilen sonuçlara göre ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasında aynı PCR grubunda yer alan (P-1, P-2, P-3 ve P-4) maya suşlarının farklı restriksiyon profilleri oluşturduğu belirlendi. Ayran örneklerinden izole edilen 116 maya suşunun on üç farklı restriksiyon profili oluşturması bu suşların en fazla on üç farklı maya türüne ait olduğunu göstermektedir. Maya suşlarına ait restriksiyon kesim sonuçları Tablo 32’de özetlendi.

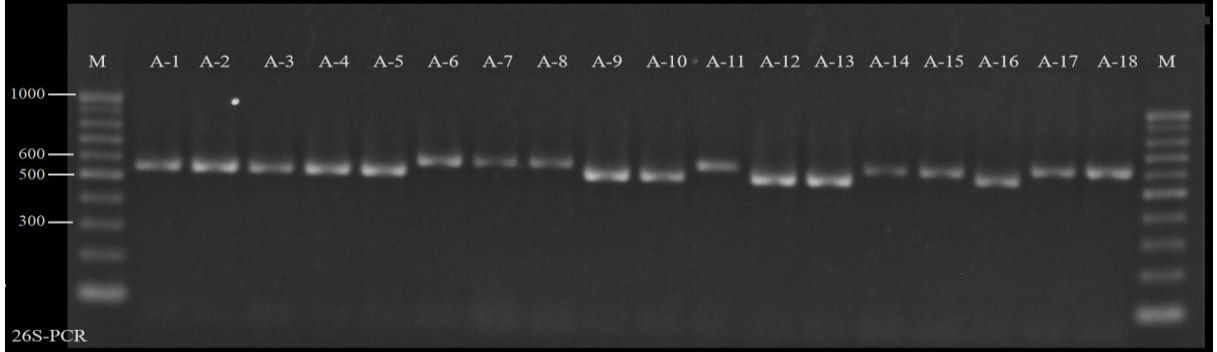
Tablo 32

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP sonucu

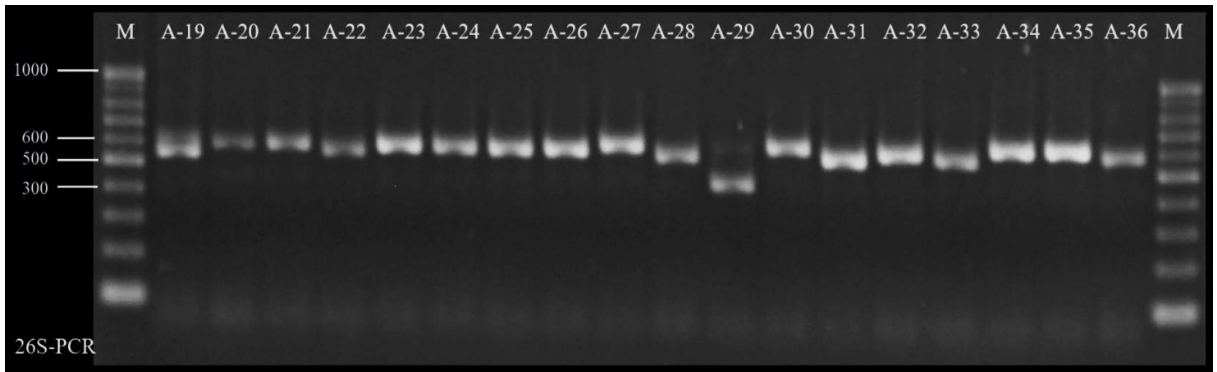
PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşu	RFLP - ITS-5.8S-ITS2				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
A-1 (~350-400 bç)	Rst-A-1	A-1, A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-19, A-99	223-138	-----	231-129	-----	245-138
	Rst-A-2	A-16, A-73, A-80, A-82, A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A-108	-----	188-160	212-97-83	-----	271-85
	Rst-A-3	A-22, A-28, A-31, A-33, A-54	-----	156-97-89	212-97-83	-----	271-85
	Rst-A-4	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58	-----	224-137-95	281-154	373-78	-----
A-2 (~450-500 bç)	Rst-A-5	A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14, A-15	330-95	260-190	153-103-96-87	390-85	240-145-80
	Rst-A-6	A-2	-----	-----	305-72-65	402-59	421-60
A-3 (~550-600bç)	Rst-A-7	A-62, A-65	391-132-60	281-248	325-290	-----	378-152
	Rst-A-8	A-44, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-114, A- 116	412-113	273-238	315-218	-----	-----
	Rst-A-9	A-114	-----	318-273	526-72	383-137-86	-----
A-4 (~650-700 bç)	Rst-A-10	A-63, A-66, A-67, A-69, A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-100, A-111	392-185	322-219-63	305-191-97	422-118	515-71
	Rst-A-11	A-20, A-24, A-37	659-104	310-190-105- 79	283-207-125- 87	435-189-103	-----
A-5 (~800 bç)	Rst-A-12	A-21, A-23, A-25, A-26, A-32, A-38, A-40, A-51, A-55, A-59, A-60, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-85, A-88, A-94, A-98, A-109, A-115	601-88	252-197-117- 76-70	291-203-132- 97	414-189-112	-----
	Rst-A-13	A-17, A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57	311-217-155- 79	489-320	364-328-157	730-108	583-135-92

26S rDNA Gen Bölgesine Ait D1/D2 Domainin PCR-RFLP Analizi

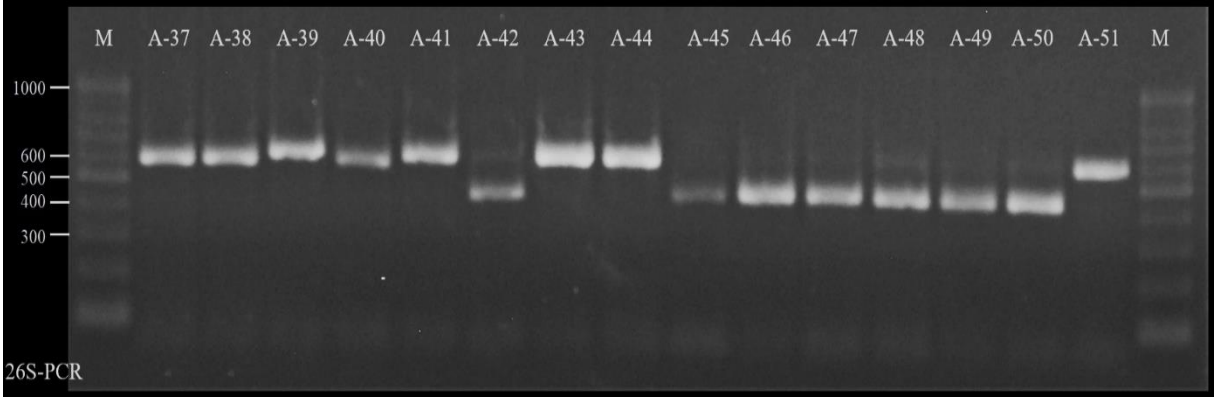
Maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR amplifikasyonu sonrası A-1 ile A-18 arasında kodlu maya suşlarına ait PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri Şekil 21’de, A-19 ile A-36 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 22’de, A-37 ile A-51 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 23’te, A-52 ile A-68 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 24’te, A-69 ile A-83 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 25’te, A-84 ile A-98 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 26’da ve A-99 ile A-116 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 27’de verildi. Maya suşları D1/D2 domainine ait PCR ürünlerinin büyüklüklerine göre iki gruba ayrıldı (Tablo 33). Birinci grupta (P-1) PCR uzunluğu yaklaşık olarak 450-500 bp olan dokuz maya suşu (A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58) yer alırken, ikinci grupta (P-2) PCR uzunluğu yaklaşık 550-650 bp büyüklüğünde olan yüz yedi maya suşu yer aldı.



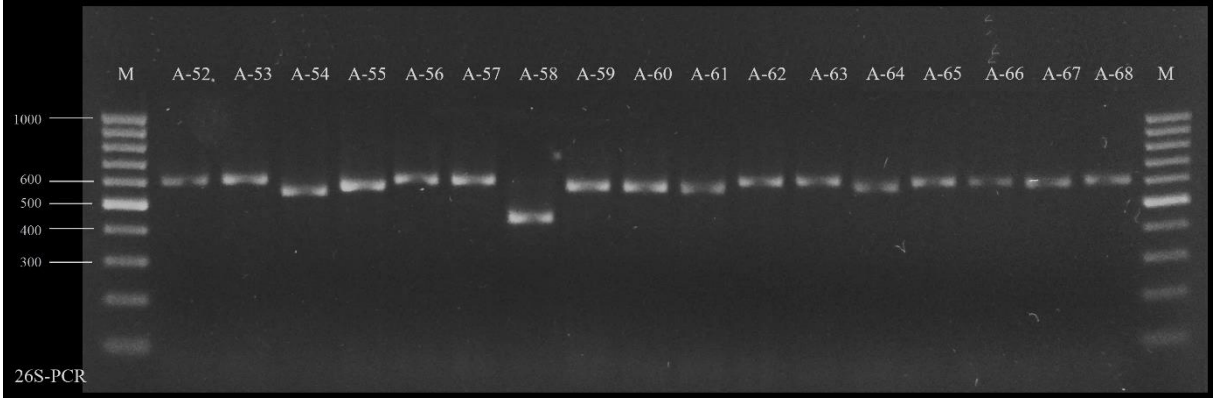
Şekil 21. Maya suşlarına (A-1 ile A-18) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



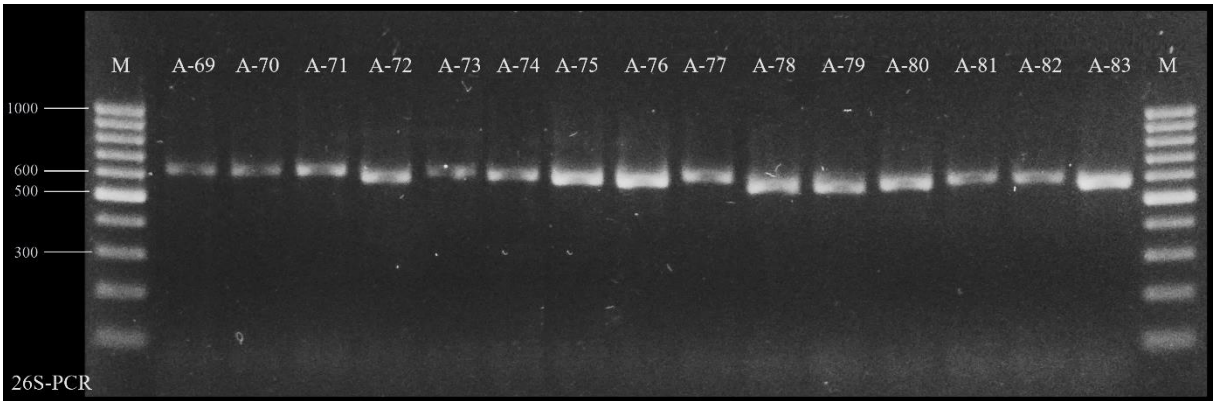
Şekil 22. Maya suşlarına (A-19 ile A-36) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



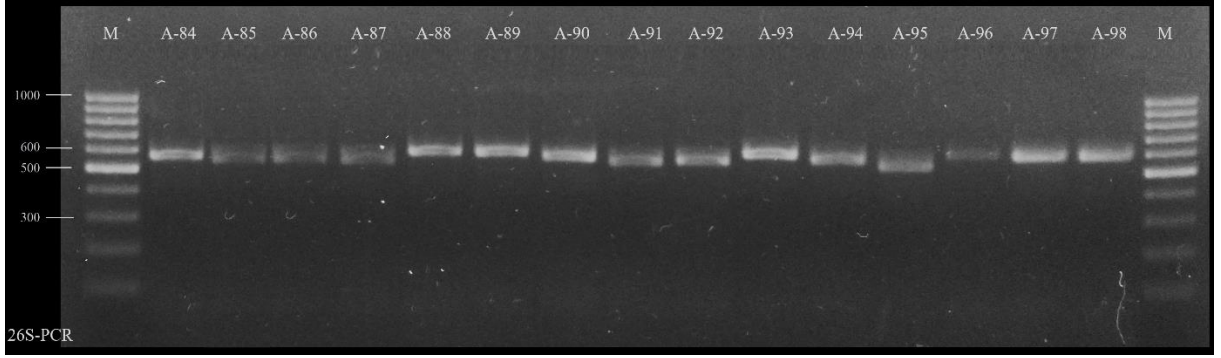
Şekil 23. Maya suşlarına (A-37 ile A-51) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



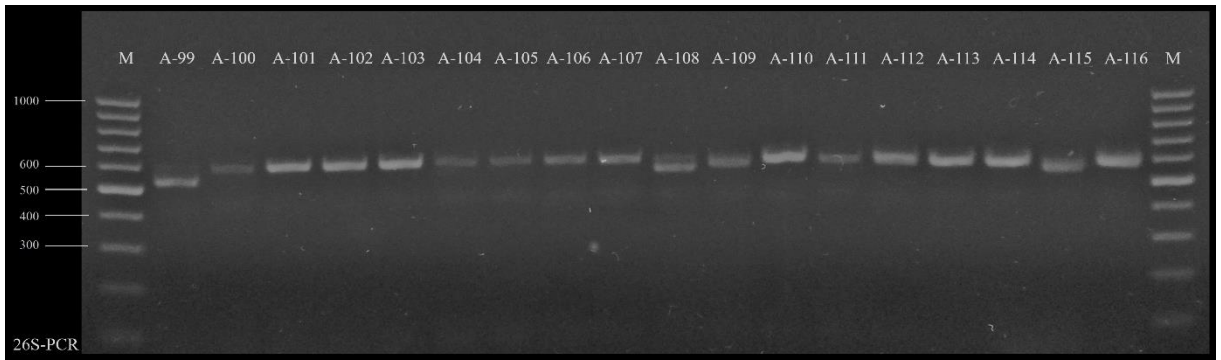
Şekil 24. Maya suşlarına (A-52 ile A-68) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 25. Maya suşlarına (A-69 ile A-83) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 26. Maya suşlarına (A-84 ile A-98) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 27. Maya suşlarına (A-99 ile A-116) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu

Tablo 33

Ayran kaynaklı maya suşlarının D1/D2 bölgesinin PCR amplifikasyonu

PCR Grup No (PCR Uzunluğu bç)	Maya Suşları
P-1 (~ 450-500)	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58
P-2 (~550-650)	A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, A-7, A-8, A-9, A-10, A-11, A-12, A-13, A-14, A-15, A-16, A-17, A-18, A-19, A-20, A-21, A-22, A-23, A-24, A-25, A-26, A-27, A-28, A-30, A-31, A-32, A-33, A-34, A-35, A-36, A-37, A-38, A-39, A-40, A-41, A-43, A-44, A-51, A-52, A-53, A-54, A-55, A-56, A-57, A-59, A-60, A-61, A-62, A-63, A-64, A-65, A-66, A-67, A-68, A-69, A-70, A-71, A-72, A-73, A-74, A-75, A-76, A-77, A-78, A-79, A-80, A-81, A-82, A-83, A-84, A-85, A-86, A-87, A-88, A-89, A-90, A-91, A-92, A-93, A-94, A-95, A-96, A-97, A-98, A-99, A-100, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-108, A-109, A-110, A-111, A-112, A-113, A-114, A-115, A-116

Maya suşlarının D1/D2 domain bölgesine ait PCR ürünleri HinfI, HaeIII, MspI, AluI ve HhaI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi ve elde edilen restriksiyon profillerine göre maya suşları tekrar gruplandırıldı (Tablo 34). PCR ürünlerine göre birinci grupta (P-1) yer alan dokuz maya suşu (A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50 ve A-58) tüm enzimler için ortak kesim profilini oluşturdu. Restriksiyon profiline göre birinci grubu (R-1) oluşturan bu maya suşlarının Msp I enzimi için kesim bölgesine sahip olmadığı, Alu I enzimi için iki kesim bölgesine, diğer restriksiyon enzimleri için tek kesim bölgesine sahip olduğu gözlemlendi.

PCR ürün büyüklüğüne göre ikinci grupta (P-2) yer alan yüz yedi maya suşunun on bir farklı restriksiyon profiline sahip olduğu belirlendi. R-2, R-4, R-5, R-7, R-8, R-11 ve R-12 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının Hae III enzimi ile kesim sonrasında iki kesim bölgesi içerdiği görüldü. R-6, R-9 ve R-10 restriksiyon profillerinde yer alan otuz yedi maya suşunun Hae III enzimi için iki kesim bölgesine ve R-3 restriksiyon profilinde yer alan bir maya suşunun tek kesim bölgesine sahip olduğu belirlendi. D1/D2 domain bölgesine ait PCR ürünlerinin Hinf I enzimi ile kesimi sonrasında R-3 ve R-10 restriksiyon profillerinde bulunan maya suşlarının üç kesim bölgesi, R-2, R-4, R-6, R-7, R-8 ve R-9 restriksiyon profillerinde bulunan maya suşlarının iki kesim bölgesi, R-5, R-11 ve R-12 profillerinde yer alan maya suşlarının bir kesim bölgesi içerdiği görüldü. R-2, R-4, R-5, R-9, R-11 ve R-12 restriksiyon grubunda yer alan maya suşlarının Hha I enzimi için kesim bölgesi içermediği belirlendi. R-6 ve R-10 restriksiyon profilinde yer alan yirmi üç maya suşunun Hha I enzimi için üç kesim bölgesi içerdiği, R-3 restriksiyon profilinde yer alan bir maya suşunun (A-2) iki kesim bölgesi içerdiği, R-7 ve R-8 restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının ise Hha I için bir kesim bölgesi içerdiği gözlemlendi.

D1/D2 domainin Alu I enzimi ile kesimi sonrası R-2, R-5, R-6, R-8 ve R-11 restriksiyon profillerinden yer alan maya suşlarının üç kesim bölgesine sahip olduğu, R-4, R-9, R-10 ve R-12 restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının iki kesim bölgesine sahip olduğu, R-3 ve R-7 restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının ise bir kesim bölgesine sahip olduğu belirlendi. İkinci restriksiyon profilinde (R-2) yer alan maya suşunun (A-114) Msp I enzimi için kesim bölgesine sahip olmadığı gözlemlendi. Üçüncü restriksiyon profilinde (R-3) yer alan bir maya suşunun (A-2) iki kesim bölgesine sahip olduğu, diğer restriksiyon

profillerinde yer alan yüz on dört maya suşunun ise tek kesim bölgesine sahip olduğu belirlendi.

ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP analizinde olduğu gibi D1/D2 domaininin PCR-RFLP analizi sonucunda da yüz on altı maya suşunun on iki farklı restriksiyon profili oluşturması bu suşların en fazla on iki farklı maya türüne ait olduğunu göstermektedir.



Tablo 34

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR-RFLP sonucu

PCR Grup No (~bp)	PCR-RFLP Grup No	Maya Suşu	RFLP-D1/D2 domain					
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I	
P-1 (~450-500 bc)	R-1	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58	399-53	249-200	259-140	205-151-73	-----	
	R-2	A-114	475-150	250-180-175	-----	250-190-110-80	-----	
	R-3	A-2	269-141-134-57	245-189-131- 103	275-170-105	403-193	385-128-117	
	R-4	A-62, A-65	438-110	349-188-48	-----	299-181-75	454-131	
	R-5	A-20, A-24, A-37	439-167	356-180	-----	230-120-65-60	543	
	R-6	A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14, A-15	237-204-130	353-135-84	224-117-103- 67	247-168-86-70	513-62	
	R-7	A-1, A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-19, A- 99	394-166	229-227-125	495-80	300-275	490-85	
	R-8	A-63, A-66, A-67, A-69, A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-100, A-111	427-152	339-191-43	373-206	209-180-118-72	444-135	
	R-9	A-17, A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57	354-178-143	221-188-185	-----	205-200-195	510-95	
	R-10	A-16, A-22, A-28, A-31, A-33, A-54, A-73, A-80, A-82, A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A- 108	282-129-100	289-120-70-53	300-150-125- 60	225-200-100	400-175	
	R-11	A-44, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A- 103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-113, A-116	427-161	414-191	-----	250-190-110-80	490-150	
	R-12	A-21, A-23, A-25, A-26, A-32, A-38, A-40, A-51, A-55, A-59, A-60, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-85, A-88, A-94, A-98, A- 109, A-115	465-177	389-198	-----	250-190-150	545-73	

DNA Dizi Analizi ve Filogenetik İlişkilerin Belirlenmesi

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S ile D1/D2 bölgesinin PCR-RFLP analizi sonrası elde edilen restriksiyon profillerinin her birinden rastgele iki maya suşu seçilerek DNA dizi analizi için MedSanTek firmasına gönderildi. ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 rDNA gen bölgelerinin restriksiyon profillerine göre A-2, A-3, A-5, A-11, A-16, A-17, A-19, A-20, A-22, A-33, A-36, A-37, A-38, A-44, A-46, A-58, A-60, A-62, A-65, A-67, A-78, A-93, A-106 ve A-114 olmak üzere yirmi dört maya suşu seçildi.

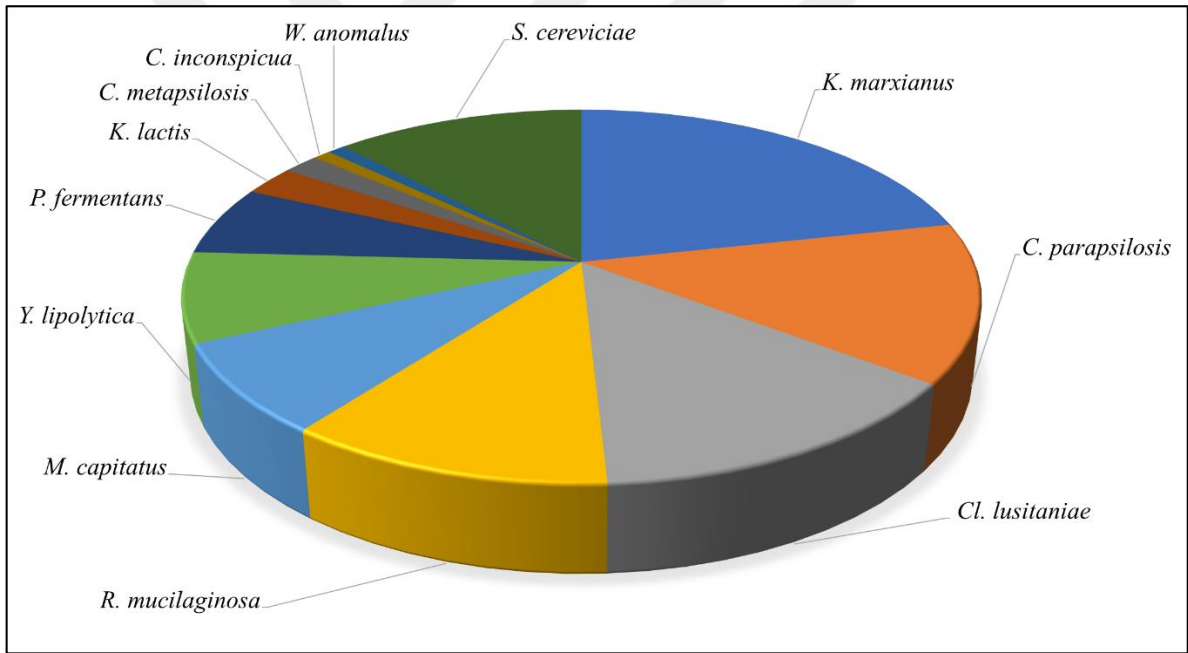
DNA dizi analizleri NCBI veri tabanı bünyesinde yer alan BLAST programı kullanılarak gerçekleştirildi. Yirmi dört maya suşuna ait DNA dizileri ile yüksek homoloji gösteren maya türleri belirlendi. BLAST analizi sonucunda tanımlanan maya suşları, benzerlik yüzdeleri ve referans alınan maya türlerinin GenBank erişim numaraları Tablo 35'te verildi. Moleküler tanımlama sonucunda A-2 maya suşu *C. inconspicua*, A-62 ve A-65 maya suşları *Candida metapsilosis*, A-44 ve A-106 maya suşları *C. parapsilosis*, A-16, A-22, A-33 ve A-93 maya suşlarının *Cl. lusitaniae*, A-20 ve A-37 maya suşları *Kluyveromyces lactis*, A-38 ve A-60 maya suşları *K. marxianus*, A-46 ve A-58 maya suşları *Magnusiomyces capitatus*, A-3 ve A-11 maya suşları *P. fermentans*, A-67 ve A-78 maya suşları *Rhodotorula mucilaginosa*, A-5 ve A-19 maya suşları *Y. lipolytica*, A-114 maya suşu *Wickerhamomyces anomalus*, A-17 ve A-36 maya suşları *S. cerevisiae* olarak tanımlandı. Ayran örneklerinden on bir farklı non-*Saccharomyces* maya türü tespit edildi.

Tablo 35

Ayran kaynaklı maya suşlarının BLAST analizi sonuçları

Maya Suşları	ITS-5.8S rDNA Gen Bölgesi				26S rDNA D1/D2 Domaini			
	Benzerlik	Tanımlanan		GenBank Erişim No	Benzerlik	Tanımlanan		GenBank Erişim No
		Maya Türü (Reff. Acc. No)	Maya Türü (Reff. Acc. No)			Maya Türü (Reff. Acc. No)	Maya Türü (Reff. Acc. No)	
A-2	96,32%	<i>Candida inconspicua</i> (NR_111116.1)	<i>Candida inconspicua</i> (KY106511.1)	OR534254	99,65%	<i>Candida inconspicua</i> (KY106511.1)	OR536325	
A-3	99,27%	<i>Pichia fermentans</i> (NR_130688.1)	<i>Pichia fermentans</i> (KY108815.1)	OR534269	99,27%	<i>Pichia fermentans</i> (KY108815.1)	OR536326	
A-5	99,79%	<i>Yarrowia lipolytica</i> (NR_111212.1)	<i>Yarrowia lipolytica</i> (KY1110180.1)	OR534276	99,60%	<i>Yarrowia lipolytica</i> (KY1110180.1)	OR536327	
A-11	99,64%	<i>Pichia fermentans</i> (NR_130688.1)	<i>Pichia fermentans</i> (KY108815.1)	OR534270	99,64%	<i>Pichia fermentans</i> (KY108815.1)	OR536328	
A-16	93,95%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NR_130677.1)	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NG_055408.1)	OR534260	92,24%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NG_055408.1)	OR536329	
A-17	87,23%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (MK680914.1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KY109284.1)	OR534273	99,82%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KY109284.1)	OR536330	
A-19	99,80%	<i>Yarrowia lipolytica</i> (NR_111212.1)	<i>Yarrowia lipolytica</i> (KY1110180.1)	OR534275	99,60%	<i>Yarrowia lipolytica</i> (KY1110180.1)	OR536331	
A-20	99,25%	<i>Kluyveromyces lactis</i> (NR_166044.1)	<i>Kluyveromyces lactis</i> (NG_055077.1)	OR534264	98,50%	<i>Kluyveromyces lactis</i> (NG_055077.1)	OR536332	
A-22	94,41%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NR_130677.1)	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NG_055408.1)	OR534261	93,80%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NG_055408.1)	OR536333	
A-33	95,65%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NR_130677.1)	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NG_055408.1)	OR534262	96,44%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NG_055408.1)	OR536334	
A-36	87,23%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NR_111007.1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KY109284.1)	OR534274	99,64%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KY109284.1)	OR536335	
A-37	99,10%	<i>Kluyveromyces lactis</i> (NR_166044.1)	<i>Kluyveromyces lactis</i> (NG_055077.1)	OR534263	99,25%	<i>Kluyveromyces lactis</i> (NG_055077.1)	OR536336	
A-38	100,00%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NR_111251.1)	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR534265	99,26%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR536337	
A-44	99,15%	<i>Candida parapsilosis</i> (NR_130673.1)	<i>Candida parapsilosis</i> (NG_054833.1)	OR534257	99,12%	<i>Candida parapsilosis</i> (NG_054833.1)	OR536338	
A-46	99,75%	<i>Magnusiomyces capitatus</i> (NR_164086.1)	<i>Magnusiomyces capitatus</i> (NG_055400.1)	OR534267	99,74%	<i>Magnusiomyces capitatus</i> (NG_055400.1)	OR536339	
A-58	99,04%	<i>Magnusiomyces capitatus</i> (NR_164086.1)	<i>Magnusiomyces capitatus</i> (NG_055400.1)	OR534268	99,48%	<i>Magnusiomyces capitatus</i> (NG_055400.1)	OR536340	
A-60	99,69%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NR_111251.1)	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR534266	99,25%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	OR536341	
A-62	98,78%	<i>Candida metapsilosis</i> (NR_165186.1)	<i>Candida metapsilosis</i> (NG_054815.1)	OR534255	99,81%	<i>Candida metapsilosis</i> (NG_054815.1)	OR536342	
A-65	98,78%	<i>Candida metapsilosis</i> (NR_165186.1)	<i>Candida metapsilosis</i> (NG_054815.1)	OR534256	99,81%	<i>Candida metapsilosis</i> (NG_054815.1)	OR536343	
A-67	99,48%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NR_073296.1)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG_055716.1)	OR534272	99,46%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG_055716.1)	OR536344	
A-78	100,00%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NR_073296.1)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG_055716.1)	OR534271	99,46%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG_055716.1)	OR536345	
A-93	94,72%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NR_130677.1)	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NG_055408.1)	OR534259	84,85%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (NG_055408.1)	OR536346	
A-106	99,79%	<i>Candida parapsilosis</i> (NR_130673.1)	<i>Candida parapsilosis</i> (NG_054833.1)	OR534258	99,64%	<i>Candida parapsilosis</i> (NG_054833.1)	OR536347	
A-114	97,61%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (NR_111210.1)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY110096.1)	OR534277	99,82%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY110096.1)	OR536348	

Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin ayran örneklerinde dağılımı Şekil 28’de verildi. Elde edilen sonuçlara göre ayran örneklerinde *K. marxianus* (%21,55) maya türünün yoğun olarak bulunan maya türü olduğu belirlendi. *C. parapsilosis* ve *Cl. lusitaniae* maya türlerinin eşit oranda (%13,79) dağılım gösterdiği tespit edildi. *R. mucilaginosa* maya türünün %11,21 oranında, *M. capitatus* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin benzer oranda (%7,76), *P. fermentans* maya türünün %6,03 oranında, *K. lactis* maya türünün %2,59 oranında, *C. metapsilosis* maya türünün %1,72 oranında, *C. inconspicua* ve *W. anomalus* maya türlerinin benzer oranda (%0,86) dağılım gösterdiği tespit edildi. Ayran örneklerinde non-*Saccharomyces* maya türlerinin yoğun olarak (%87,93) dağılım gösterdiği gözlemlendi. *S. cerevisiae* maya türünün ise ayran örneklerinde %12,07 oranında dağılım gösterdiği belirlendi.



Şekil 28. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin ayran örneklerinde dağılımı

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının API-ID32C kit sistemi ile yapılan tanımlama işlemi ile moleküler yöntemler ile yapılan tanımlama işlemi karşılaştırıldığında API-ID32 test sonuçlarında on beş farklı tür tanımlanırken, moleküler yöntemler kullanılarak on iki farklı tür tanımlandığı gözlemlendi. API-ID32C test sonucuna göre *C. kefyr* olarak tanımlanan yirmi sekiz maya türünden G-2 (ve G-4 asimilasyon profilinde yer alan üç maya suşunun (A-24, A-37 ve A-20) moleküler yöntemlerle *K. lactis* olarak tanımlandı. Bu

durum API kit sisteminin özellikle *K. lactis* maya türlerini *K. marxianus* türlerinden doğru bir şekilde ayırtamadığını göstermektedir. API-ID32C test sonucuna göre *C. kefyir* olarak tanımlanan A-80 ve A-73 maya suşlarının moleküler analizler sonucunda *Cl. lusitaniae* olarak tanımlandığı belirlendi. Benzer şekilde asimilasyon test sonucuna göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan A-25 maya suşunun ve *C. colliculosa* olarak tanımlanan A-55 maya suşunun moleküler analizler sonucunda *K. marxianus* olarak tanımlandığı tespit edildi. API-ID32C asimilasyonu sonucuna göre *C. kefyir* olarak tanımlanan diğer maya suşları ise moleküler yöntemlerle *K. marxianus* olarak tanımlandı.

API test sonucuna göre *C. parapsilosis* olarak tanımlanan on sekiz maya suşundan on beş tanesinin (A-44, A-68, A-76, A-89, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-113 ve A-116) moleküler yöntemlerle de *C. parapsilosis* olarak tanımlandığı görüldü. Ancak, API-ID32C kit sistemi ile *C. parapsilosis* olarak tanımlanan iki maya suşunun (A-62 ve A-65) *C. metapsilosis* olarak ve bir maya suşunun (A-93) *Cl. lusitaniae* olarak tanımlandığı tespit edildi. Daha önce yapılan bir çalışmada *C. parapsilosis* olarak tanımlanan türlerin *C. metapsilosis* ve *Candida orthopsilosis* olarak tanımlandığı belirlendi (Tavanti vd., 2005).

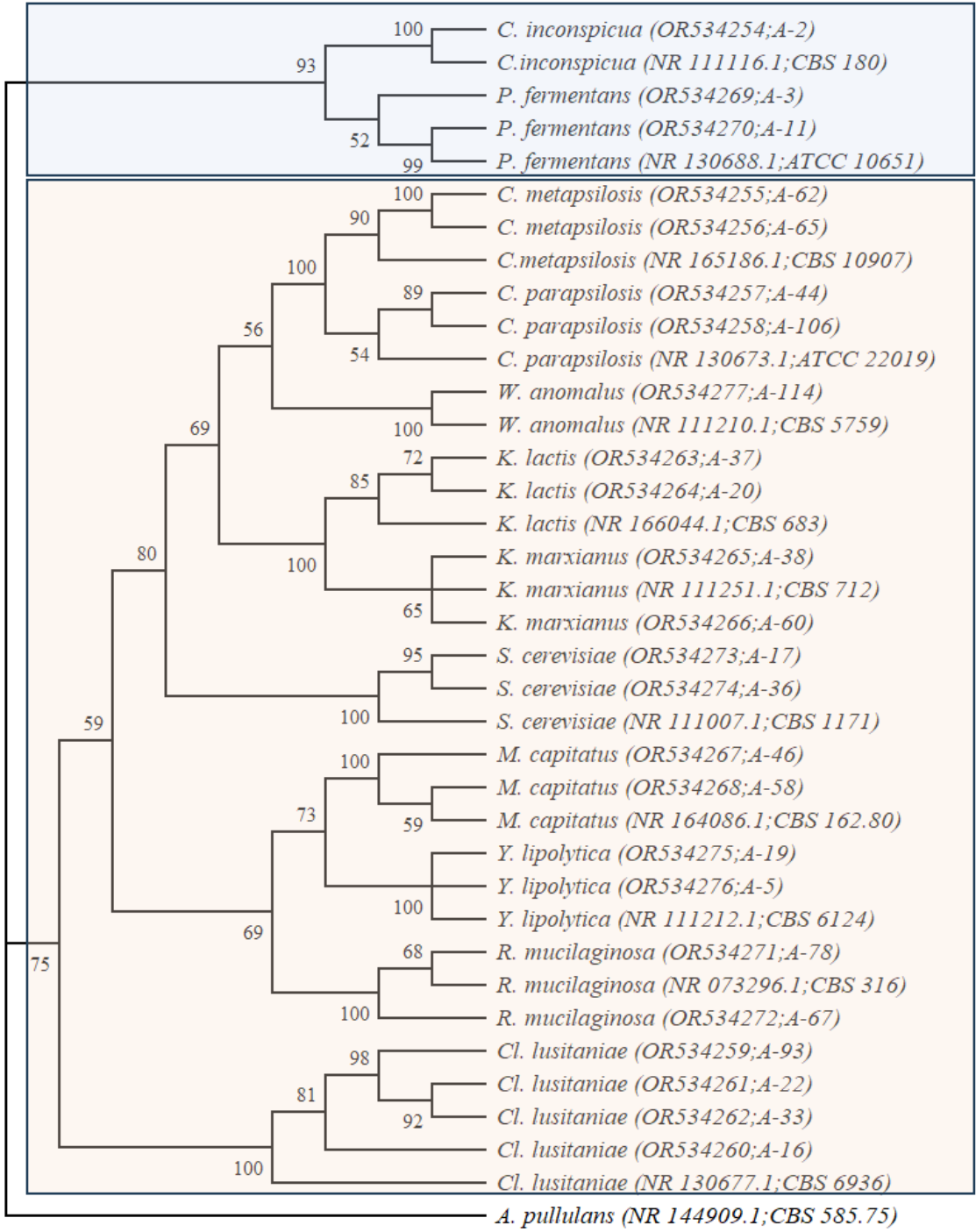
API-ID32C test sonucuna göre *C. lipolytica* olarak tanımlanan on maya suşundan sekiz tanesinin moleküler analizler sonucunda *Y. lipolytica* (Syn. *C. lipolytica*) olarak tanımlandığı gözlemlendi. Asimilasyon testi sonucuna göre *C. lipolytica* olarak tanımlanan iki maya suşunun (A-2 ve A-3) moleküler yöntemlerle *C. inconspicua* (A-2) ve *P. fermentans* (A-3) olarak tanımlandığı tespit edildi.

API-ID32 test sonucuna göre *C. lusitaniae* olarak tanımlanan on maya suşundan dokuz tanesinin moleküler yöntemlerle *Cl. lusitaniae* (Syn. *C. lusitaniae*) olarak tanımlandığı, bir maya suşunun ise (A-97) moleküler tanımlama sonucunda *C. parapsilosis* olarak tanımlandığı tespit edildi. Asimilasyon testi sonucuna göre *G. capitatum* olarak tanımlanan maya suşlarının tümü moleküler yöntemlerle *M. capitatus* (Syn. *G. capitatum*) olarak tanımlandığı görüldü. API-ID32C test sonuçlarına göre *R. mucilaginosa* olarak tanımlanan beş maya suşunun moleküler yöntemlerle de *R. mucilaginosa* olarak

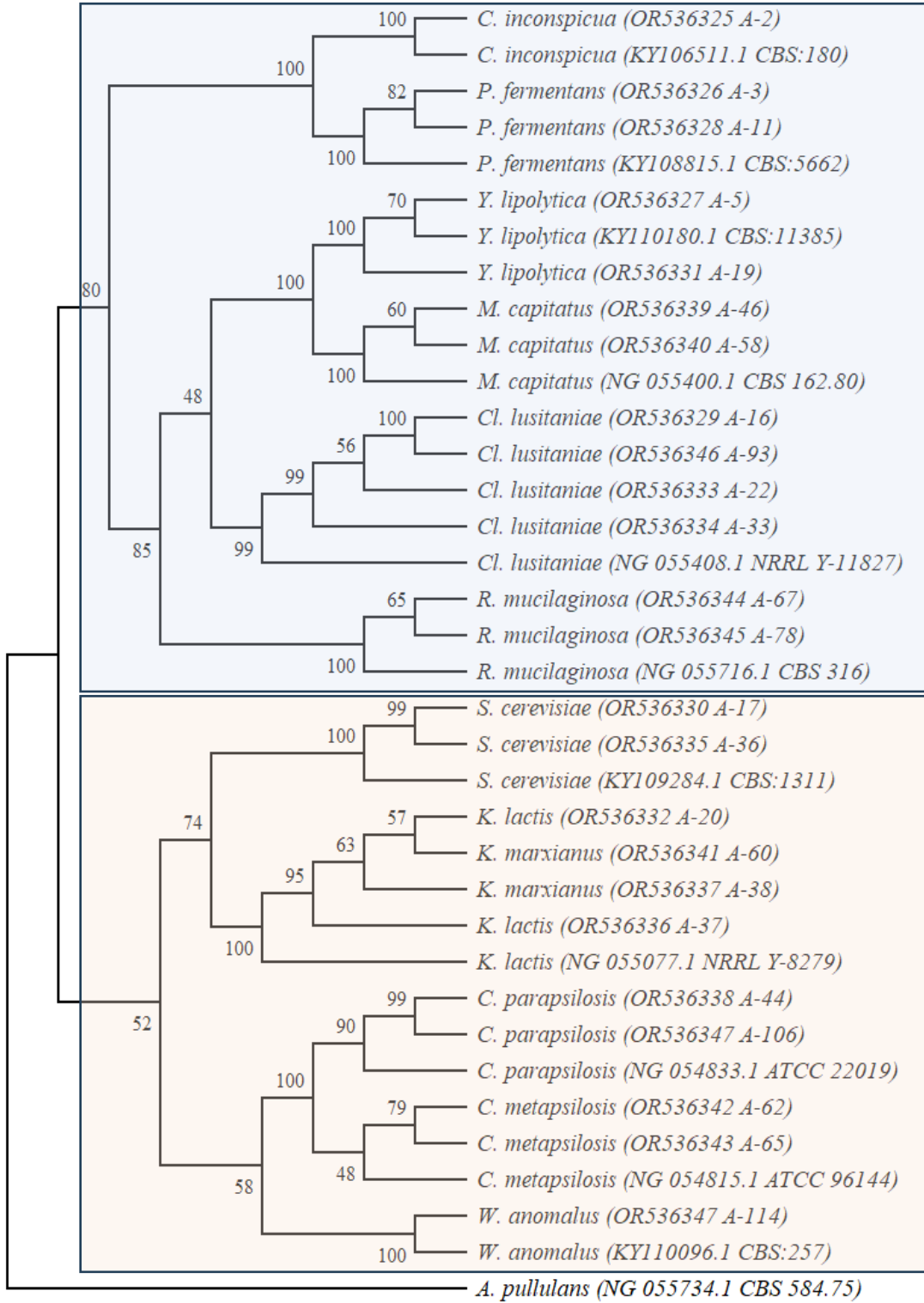
tanımlandığı belirlendi. Ancak, API-ID32C test sonucuna göre *R. glutinis* olarak tanımlanan tüm maya suşlarının moleküler tanımlama sonrası *R. mucilaginosa* maya türüne ait olduğu gözlemlendi. Bu durum API-ID32C kit sisteminin özellikle *Rhodotorula* türlerini ayırtmada yeterli olmadığını gösterdi.

Asimilasyon testi sonuçlarına göre *C. lambica* olarak tanımlanan altı maya suşu moleküler tanımlama sonucunda *P. fermentans* (Syn. *C. lambica*) olarak tanımlandı. API-ID32C tanımlama sistemine göre *C. colliculosa* olarak tanımlanan dört maya suşunun (A-17, A-18, A-28 ve A-55) moleküler analizler sonrasında *Cl. lusitaniae* (A-28), *K. marxianus* (A-55) ve *S. cerevisiae* (A-17 ve A-18) türleri ile eşleştiği belirlendi. API-ID32C kit sisteminin özellikle *C. colliculosa* olarak tanımlanan türlerde hatalı sonuçlar verdiği gözlemlendi. Benzer durum *C. holmi* olarak tanımlanan iki maya suşunda da tespit edildi. API-ID32C kit sistemi ile *C. holmi* olarak tanımlanan A-48 ve A-99 maya suşları moleküler yöntemlerle *M. capitatus* (A-48) ve *Y. lipolytica* (A-99) olarak tanımlandı. Kit sistemi ile *C. famata* (A-83) ve *C. mellibiosica* (A-95) olarak tanımlanan maya suşlarının moleküler yöntemler sonucunda *Cl. lusitaniae* türü ile eşleştiği görüldü. *C. pelliculosa* olarak tanımlanan maya türünün (A-114) ise moleküler yöntemlerle *W. anomalus* (Syn. *C. pelliculosa*) türü ile eşleştiği tespit edildi. Asimilasyon testi sonuçlarına göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan on üç maya suşundan on iki tanesi moleküler yöntemlerle de *S. cerevisiae* olarak tanımlanırken, bir tanesi (A-25) moleküler olarak *K. marxianus* olarak tanımlandı.

Ayran örneklerinden tanımlanan maya suşları arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için öncelikle her bir maya türüne ait referans maya türü seçildi ve bu türe ait ITS-1-5.8S-ITS2 rDNA ve D1/D2 domaini için DNA dizileri NCBI-Nükleotid veri tabanı üzerinden indirildi. Türler arası uzaklıkları belirlenmesi için ise dış grup olarak CBS Maya veri tabanından ITS-5.8S gen bölgesi için NR_144909.1 erişim numaralı *A. pullulans* maya suşu ve D1/D2 domaini için NG_055734.1 erişim numaralı *A. pullulans* maya türleri seçildi. Tüm maya suşlarına ait ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ve D1/D2 DNA dizileri MEGA-11 programı altında yer alan ClustalW v1.6 hizalama parametresi kullanılarak hizalandı. Maya türlerinin filogenetik ilişkileri tespit edebilmek için MEGA-11 programı kullanılarak maksimum parsimoni (MP) filogenetik ağacı oluşturuldu. ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesi için MP ağacı Şekil 29'da, D1/D2 domaini için MP ağacı Şekil 30'da gösterildi.



Şekil 29. Ayrı örneklerinden izole edilerek tanımlanan maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi ile oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı. %50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir.



Şekil 30. Maya suşlarının 26S rDNA bölgesi D1/D2 domaini için oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı. %50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir.

ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi için oluşturulan MP ağacı incelendiğinde, maya türleri iki ana gruba ayrıldığı görüldü. Birinci grupta *P. fermentas* ve *C. inconspicua* maya türlerinin bulunduğu görüldü. İkinci grupta yer alan maya türleri ise iki alt gruba ayrıldı ve birinci alt grupta *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis*, *W. anomalus*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *M. capitatus*, *Y. lipolytica*, *R. mucilaginosa* maya türlerinin, ikinci alt grupta da ise *Cl. lusitaniae* maya türünün yer aldığı görüldü. Aynı şekilde D1/D2 rDNA gen bölgesine göre oluşturulan MP ağacı incelendiğinde maya türlerinin benzer şekilde iki ana gruba ve her grup iki alt gruba ayrıldı. Birinci grubun ilk alt grubunda *C. inconspicua* ve *P. fermentas* maya türlerinin, ikinci alt grubunda ise *Y. lipolytica*, *M. capitatus*, *R. mucilaginosa* ve *Cl. lusitaniae* maya türlerinin yer aldığı belirlendi. İkinci grubun ilk alt grubunda *S. cerevisiae*, *K. lactis* ve *K. marxianus* maya türlerinin, ikinci alt grubunda ise *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis* ve *W. anomalus* maya türlerinin yer aldığı görüldü.

4.2.3. Maya Suşlarının Hücre Dışı Proteaz, Lipaz ve Üreaz Aktiviteleri

Ayran örneklerinden izole edilen yüz on altı maya suşundan altmışaltı tanesinin proteaz aktivitesine sahip olmadığı, kırk tanesinin düşük proteaz aktivitesine sahip olduğu ve on tanesinin yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi (Tablo 36). *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis*, *M. capitatus*, *W. anomalus*, *Y. lipolytica* ve *Cl. kusitaniae* (A-28 suşu hariç) maya türlerine ait tüm suşlarda proteolitik aktivite tespit edilmedi. *K. marxianus* türüne ait yedi maya suşunda proteaz aktivitesi gözlenmezken, on yedi maya suşunda (A-25, A-38, A-51, A-59, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-40, A-55, A-85, A-88 ve A-98) düşük oranda ve bir maya suşunda (A-60) yüksek oranda proteaz aktivitesi tespit edildi. *K. lactis* olarak tanımlanan A-20 maya suşunda proteaz aktivitesi gözlenmezken, A-24 maya suşunda düşük ve A-37 maya suşunda yüksek proteaz aktivitesi belirlendi. *R. mucilaginosa* maya türüne ait yedi maya suşunda (A-63, A-66, A-67, A-69, A-75, A-86 ve A-100) düşük seviyede proteaz aktivitesi gözlenirken diğer altı maya suşunda proteaz aktivitesine rastlanmadı. *C. inconspicua* olarak tanımlanan A-2 maya suşunda düşük seviyede proteaz aktivitesi belirlendi. *S. cerevisiae* maya türüne ait A-18 maya suşunda yüksek enzim aktivitesi gözlenirken diğer onüç maya suşunda düşük proteaz aktivitesi tespit edildi. Endüstriyel olarak önemli yüksek proteaz aktivitesine sahip maya suşlarının *K. lactis* (A-37), *K. marxianus* (A-60), *P. fermentans* (A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14 ve A-15) ve

S. cerevisiae (A-18) maya türlerine ait olduğu belirlendi. *P. fermentans* maya türüne ait tüm maya suşlarının yüksek proteaz aktivitesine sahip oldukları tespit edildi.

Tablo 36

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının proteolitik aktiviteleri

Maya Türleri	Yüksek Aktivite	Düşük Aktivite	Aktivite Göstermeyen
<i>C. inconspicua</i> (1)	-	A-2	-
<i>C. metapsilosis</i> (2)	-	-	A-62, A-65
<i>C. parapsilosis</i> (16)	-	-	A-44, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-113, A-116
<i>Cl.lusitaniae</i> (16)	-	A-28	A-16, A-22, A-31, A-33, A-54, A-73, A-80, A-82, A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A-108
<i>K. lactis</i> (3)	A-37	A-24	A-20
<i>K. marxianus</i> (25)	A-60	A-25, A-38, A-51, A-59, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-40, A-55, A-85, A-88, A-98	A-21, A-23, A-26, A-32, A-94, A-109, A-115
<i>M. capitatus</i> (9)	-	-	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58
<i>P. fermentans</i> (7)	A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14, A-15	-	-
<i>R. mucilaginosa</i> (13)	-	A-63, A-66, A-67, A69, A-75, A-86, A-100	A-74, A-78, A-81, A-87, A-92, A-111
<i>S. cerevisiae</i> (14)	A-18	A-17, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57	-
<i>W. anomalus</i> (1)	-	-	A-114
<i>Y. lipolytica</i> (9)	-	-	A-1, A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-19, A-99

Lipaz aktivitesi sonuçlarına göre izole edilen yüzonaltı maya suşundan seksenbir tanesinin lipaz aktivitesine sahip olmadığı, yirmisekiz tanesinin düşük ve yedi tanesinin yüksek lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi (Tablo 37). *C. inconspicua*, *C. metapsilosis*, *R. mucilaginosa* ve *W. anomalus* maya türlerine ait tüm suşlarda düşük lipaz aktivitesi tespit edildi. *C. parapsilosis* maya türüne ait dokuz maya suşu (A-44, A-63, A-66, A-67, A69, A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-100 ve A-111) düşük lipaz aktivitesi gösterirken diğer yedi maya suşunun lipaz aktivitesine sahip olmadığı gözlemlendi. Benzer şekilde, *Cl. lusitaniae* maya türüne ait A-93maya suşu düşük lipaz aktivitesine sahipken diğer on beş

maya suşunda enzim aktivitesi tespit edilmedi. *K. lactis*, *K. marxianus*, *M. capitatus* ve *S. cerevisiae* maya türlerine ait tüm suşların lipaz aktivitesine sahip olmadığı gözlemlendi. Benzer şekilde *Y. lipolytica* maya türüne ait A-1 suşunda düşük enzim aktivitesi belirlenirken diğer tüm suşlarda lipaz aktivitesi tespit edilmedi. *P. fermentans* türüne ait tüm maya suşlarında (A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14 ve A-15) yüksek lipaz aktivitesi tespit edildi. Endüstriyel olarak önemli yüksek proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip maya suşlarının özellikle *P. fermentans* maya türüne ait olduğu gözlemlendi.

Tablo 37

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının lipolitik aktiviteleri

Maya Türleri	Yüksek Aktivite	Düşük Aktivite	Aktivite Göstermeyen
<i>C. inconspicua</i> (1)	-	A-2	-
<i>C. metapsilosis</i> (2)	-	A-62, A-65	-
<i>C. parapsilosis</i> (16)	-	A-44, A-68, A-76, A-103, A-105, A-106, A-107, A-112, A-116	A-89, A-97, A-101, A-102, A-104, A-110, A-113
<i>Cl. lusitanae</i> (16)	-	A-93	A-16, A-22, A-28, A-31, A-33, A-54, A-73, A-80, A-82, A-83, A-90, A-91, A-95, A-96, A-108
<i>K. lactis</i> (3)	-	-	A-20, A-24, A-37
<i>K. marxianus</i> (25)	-	-	A-21, A-23, A-25, A-26, A-32, A-38, A-40, A-51, A-55, A-59, A-60, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-85, A-88, A-98 A-94, A-109, A-115
<i>M. capitatus</i> (9)	-	-	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58
<i>P. fermentans</i> (7)	A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14, A-15	-	-
<i>R. mucilaginosa</i> (13)	-	A-63, A-66, A-67, A-69, A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-100, A-111	-
<i>S. cerevisiae</i> (14)	-	-	A-17, A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57
<i>W. anomalus</i> (1)	-	A-114	-
<i>Y. lipolytica</i> (9)	-	A-1	A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-19, A-99

Üreaz aktivitesi sonuçlarına göre izole edilen yüz on altı maya suşundan kırk tanesinin üreaz aktivitesine sahip olmadığı, otuzsekiz tanesinin düşük ve otuzsekiz tanesinin yüksek üreaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi (Tablo 38). *C. inconspicua*, *C. metapsilosis* ve *Y. lipolytica* maya türlerine ait tüm suşlarda yüksek üreaz aktivitesi tespit edildi. *C. parapsilosis* olarak tanımlanan A-105 ve A-106 maya suşlarında yüksek üreaz aktivitesi gözlenirken, diğer ondört maya suşunda düşük üreaz aktivitesi belirlendi. *M. capitatus* maya türüne ait dokuz maya suşundan biri hariç (A-58, düşük üreaz aktivitesi) diğer maya suşlarında yüksek üreaz aktivitesi tespit edildi. Benzer şekilde, *R. mucilaginosa* olarak tanımlanan on bir maya suşunda (A-67, A69, A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-100 ve A-111) yüksek ve iki maya suşunda (A-63 ve A-66) düşük üreaz aktivitesi belirlendi. *Cl. lusitaniae* maya türüne ait A-80 maya suşunda yüksek ve altı maya suşunda (A-16, A-54, A-90, A-91, A-93 ve A-96) düşük üreaz aktivitesi gözlenirken, diğer dokuz maya suşunda üreaz aktivitesi gözlenmedi. *K. lactis* olarak tanımlanan A-24 maya suşunda düşük üreaz aktivitesi gözlenirken diğerlerinde (A-20 ve A-37) aktivite gözlenmedi. Benzer şekilde, *K. marxianus* maya türüne ait on maya suşunda (A-23, A-61, A-70, A-71, A-72, A-79, A-84, A-94, A-109 ve A-115) düşük üreaz aktivitesi belirlenirken diğer onbeş maya suşunda üreaz aktivitesi tespit edilmedi. *W. anomalus* olarak tanımlanan A-114 maya suşunda düşük üreaz aktivitesi gözlemlendi. *P. fermentans* maya türüne ait dört maya suşunda (A-3, A-7, A-8 ve A-11) yüksek, iki maya suşunda (A-6 ve A-14) düşük üreaz aktivitesi belirlenirken, A-15 maya suşunda üreaz aktivitesi belirlenmedi. *S. cerevisiae* maya türüne ait on dört maya suşundan A-17 (düşük üreaz aktivitesi) hariç diğer maya suşlarında üreaz aktivitesi tespit edilmedi. Endüstriyel olarak önemli üreaz aktivitesine sahip maya suşlarının *C. inconspicua*, *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis*, *Cl. lusitaniae*, *M. capitatus*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans* ve *Y. lipolytica* maya türlerine ait olduğu belirlendi. Özellikle *P. fermentans* maya türüne ait dört maya suşunun (A-3, A-7, A-8 ve A-11) ise yüksek hücre dışı enzim aktivitesine sahip olmasından dolayı endüstriyel olarak oldukça önemli suşlar olduğu tespit edildi.

Tablo 38

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının üreaz aktivitesi

Maya Suşları	Yüksek Üreaz Akt	Düşük Üreaz Akt.	Üreaz Akt. Yok
<i>C. inconspicua</i> (1)	A-2	-	-
<i>C. metapsilosis</i> (2)	A-62, A-65	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (16)	A-105, A-106	A-44, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-107, A-110, A-112, A-113, A-116	-
<i>Cl.lusitaniae</i> (16)	A-80	A-16, A-54, A-90, A-91, A-93, A-96	A-22, A-28, A-31, A-33, A-73, A-82, A-83, A-95, A-108
<i>K. lactis</i> (3)	-	A-24	A-20, A-37
<i>K. marxianus</i> (25)	-	A-23, A-61, A-70, A-71, A-72, A-79, A-84, A-94, A-109, A-115	A-21, A-25, A-26, A-32, A-38, A-40, A-51, A-55, A-59, A-60, A-64, A-77, A-85, A-88, A-98
<i>M. capitatus</i> (9)	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50	A-58	-
<i>P. fermentans</i> (7)	A-3, A-7, A-8, A-11	A-6, A-14	A-15
<i>R. mucilaginosa</i> (13)	A-67, A69, A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-100, A-111	A-63, A-66	-
<i>S. cerevisiae</i> (14)		A-17	A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57
<i>W. anomalus</i> (1)	-	A-114	-
<i>Y. lipolytica</i> (9)	A-1, A-4, A-5, A-9, A-10, A-12, A-13, A-19, A-99	-	-

4.2.4. Maya Suşlarının Fermantatif Özellikleri

Ayran örneklerinden tanımlanan maya suşlarının fermentasyon kapasiteleri altı farklı karbon kaynağı (dekstroz, galaktoz, sükroz, laktoz, maltoz ve gliserol) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar Tablo 39’da verildi. *C. inconspicua* maya türüne ait A-2 maya suşunun yalnızca dekstroz ve gliserol içeren ortamlarda fermentasyon kapasitesinin olduğu, diğer karbon kaynaklarında fermentasyon yapamadığı gözlemlendi. *C. metapsilosis* olarak tanımlanan A-62 ve A-65 maya suşlarının iki farklı fermentasyon profili oluşturduğu belirlendi. A-62 *C.*

metapsilosis maya suşu tüm karbon kaynaklarında fermantatif özelliğe sahipken, A-65 maya suşunun laktoz hariç diğer karbon kaynaklarında fermantatif özelliğe sahip olduğu gözlemlendi.

C. parapsilosis olarak tanımlanan on altı maya suşu fermantasyon testi sonuçlarına göre beş farklı profil oluşturdu. Tüm *C. parapsilosis* maya suşlarının dekstroz, galaktoz ve sükröz içeren ortamlarda fermantasyon kapasitesinin bulunduğu, yedi maya suşunun (A-97, A-104, A-107, A-110, A-112, A-114 ve A-116) ise tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin yüksek olduğu tespit edildi. A-89 ve A-103 maya suşlarının laktoz ve gliserol içeren karbon kaynaklarında, A-102 maya suşunun laktoz ve maltoz içeren karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin olmadığı belirlendi. A-44, A-68, A-76, A-101, A-105 ve A-106 maya suşlarının ise laktoz dışında diğer karbon kaynaklarında fermantasyon yapabilme özelliğine sahip olduğu tespit edildi.

Cl. lusitaniae olarak tanımlanan on altı maya suşu fermantatif özelliğine göre üç profil oluşturdu. On maya suşunun (A-16, A-22, A-31, A-33, A-54, A-73, A-83, A-90, A-96 ve A-108) kullanılan tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin olduğu gözlemlendi. Tüm *Cl. lusitaniae* maya suşlarının dekstroz, galaktoz ve sükröz içeren ortamda fermantatif özellik gösterdiği belirlendi. Beş maya suşunun (A-28, A-82, A-91, A-93 ve A-95) laktoz içeren ortamda ve A-80 maya suşunun maltoz içeren ortamda fermantasyon kapasitesinin olmadığı, ancak diğer karbon kaynaklarını fermente edebildiği belirlendi.

K. lactis olarak tanımlanan A-24 ve A-37 maya suşlarının tüm karbon kaynaklarında ve A-20 maya suşunun maltoz hariç tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin olduğu gözlemlendi. Fermantasyon testi sonuçlarına göre *K. marxianus* olarak tanımlanan yirmi beş maya suşu fermantatif özelliklerine göre yedi farklı profil oluşturdu. On üç *K. marxianus* maya suşunun (A-21, A-26, A-32, A-40, A-51, A-59, A-61, A-64, A-71, A-72, A-77, A-84 ve A-88) fermantasyon kapasitesinin tüm karbon kaynaklarında yüksek olduğu belirlendi. *K. marxianus* olarak tanımlanan A-25 maya suşunun laktoz hariç, A-70, A-85 ve A-115 maya suşlarının maltoz hariç ve A-60, A-79, A-94, A-98 ve A-109 maya suşlarının gliserol hariç diğer tüm karbon kaynaklarında fermantatif özelliğe sahip olduğu tespit edildi. Benzer şekilde, A-23 maya suşunun maltoz ve gliserol hariç, A-55 maya suşunun laktoz ve gliserol

hariç ve A-38 maya suşunun galaktoz, sükröz, laktoz ve maltoz hariç diğer karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin bulunduğu belirlendi.

M. capitatus olarak tanımlanan dokuz maya suşunun fermantasyon yeteneklerine göre dört farklı profil oluşturduğu görüldü. *M. capitatus* (A-48) maya suşunun tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin yüksek olduğu tespit edildi. A-42 maya suşunun galaktoz ve laktoz içeren ortamlarda, A-29 ve A-58 maya suşlarının laktoz içeren ortamda ve A-45, A-46, A-47, A-19 ve A-50 maya suşlarının ise sükröz ve maltoz içeren ortamlarda fermantasyon kapasitesinin bulunmadığı gözlemlendi.

P. fermentans olarak tanımlanan yedi maya suşu fermantatif özelliklerine göre beş profil oluşturdu. *P. fermentans* (A-14) maya suşunun tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin olduğu, iki maya suşunun (A-6 ve A-8) maltoz hariç ve iki maya suşunun (A-11 ve A-15) laktoz hariç diğer tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin bulunduğu belirlendi. A-3 maya suşunun yalnızca dekstroz, galaktoz ve gliserol içeren ortamlarda, A-7 maya suşunun ise yalnızca dekstroz ve gliserol içeren ortamlarda fermantasyon yeteneğine sahip olduğu görüldü.

R. mucilaginosa olarak tanımlanan on üç maya suşu fermantasyon özelliklerine göre dört farklı profil oluşturdu. A-63, A-67, A-78, A-100 ve A-111 *R. mucilaginosa* maya suşlarının tüm karbon kaynaklarında fermantatif özelliğe sahip olduğu belirlendi. İki maya suşunun (A-74 ve A-87) gliserol hariç, beş maya suşunun (A-66, A-69, A-75, A-81 ve A-86) laktoz hariç ve bir maya suşunun (A-92) laktoz ve gliserol hariç diğer karbon kaynaklarında fermantasyon yeteneğine sahip olduğu görüldü.

S. cerevisiae olarak tanımlanan on dört maya suşu fermantasyon özelliklerine göre dört farklı profil oluşturdu. Yedi maya suşu (A-17, A-34, A-35, A-36, A-39, A-43 ve A-53) tüm karbon kaynaklarında fermantatif özellik gösterdi. A-18, A-27, A-30 ve A-52 maya suşlarının laktoz içeren ortam dışında diğer karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin bulunduğu tespit edildi. Benzer şekilde, A-41, ve A-56 maya suşlarının gliserol

hariç diğer tüm karbon kaynaklarında fermantatif özelliğe sahip olduğu belirlendi. A-57 maya suşunun ise laktoz ve gliserol hariç diğer karbon kaynaklarında fermantasyon yeteneğinin olduğu gözlemlendi.

Y. lipolytica olarak tanımlanan dokuz maya suşu fermantatif özelliklerine göre altı farklı profil oluşturdu. Tüm maya suşlarının dekstroz ve gliserol karbon kaynaklarında fermantasyon yeteneğinin olduğu belirlendi. A-4 ve A-9 maya suşlarının sükroz ve maltoz hariç, A-5 ve A-10 maya suşlarının maltoz hariç, A-13 maya suşunun laktoz hariç diğer karbon kaynaklarında fermantatif özellik gösterdiği tespit edildi. A-19 maya suşunun galaktoz, sükroz ve maltoz içeren ortamlarda ve A-99 maya suşunun galaktoz, sükroz ve laktoz içeren ortamlarda fermantasyon yeteneğinin olmadığı belirlendi. A-1 ve A-12 maya suşlarının ise dekstroz, galaktoz ve gliserol dışındaki karbon kaynaklarını fermente edemediği gözlemlendi.

W. anomalus olarak tanımlanan A-114 maya suşunun tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin yüksek olduğu tespit edildi.

Ayrı örneklerinden izole edilen maya suşlarının fermantasyon özellikleri ve enzim aktiviteleri birlikte değerlendirildiğinde *K. lactis* maya türüne ait A-37 suşu, *K. marxianus* maya türüne ait A-60 suşu, *P. fermentans* maya türüne ait A-6, A-8 ve A14 maya suşlarının ve *S. cerevisiae* maya türüne ait A-18 suşunun endüstriyel olarak önemli maya suşları olduğu belirlendi.

Tablo 39

Ayrılan örneklerinde tanımlanan maya suşlarının farklı karbon kaynaklarında fermentasyon kapasiteleri

Maya Türü	Maya Suşu	Glu	Gal	Suk	Lak	Mal	Gli
<i>C. inconspicua</i> (1)	A-2	+	-	-	-	-	+
<i>C. metapsilosis</i> (2)	A-62	+	+	+	+	+	+
	A-65	+	+	+	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i> (16)	A-89, A-103	+	+	+	-	+	-
	A-102	+	+	+	-	-	+
	A-44, A-68, A-76, A-101, A-105, A-106	+	+	+	-	+	+
	A-97, A-104, A-107, A-110, A-112, A-113, A-116	+	+	+	+	+	+
<i>Cl. lusitaniae</i> (16)	A-80	+	+	+	+	-	+
	A-28, A-82, A-91, A-93, A-95	+	+	+	-	+	+
	A-16, A-22, A-31, A-33, A-54, A-73, A-83, A-90, A-96, A-108	+	+	+	+	+	+
<i>K. lactis</i> (3)	A-20	+	+	+	+	-	+
	A-24, A-37	+	+	+	+	+	+
<i>K. marxianus</i> (25)	A-23	+	+	+	+	-	-
	A-25	+	+	+	-	+	+
	A-38	+	-	-	-	-	+
	A-55	+	+	+	-	+	-
	A-70, A-85, A-115	+	+	+	+	-	+
	A-60, A-79, A-94, A-98, A-109	+	+	+	+	+	-
<i>M. capitatus</i> (9)	A-21, A-26, A-32, A-40, A-51, A-59, A-61, A-64, A-71, A-72, A-77, A-84, A-88	+	+	+	+	+	+
	A-42	+	-	+	-	+	+
	A-48	+	+	+	+	+	+
	A-29, A-58	+	+	+	-	+	+
	A-45, A-46, A-47, A-19, A-50	+	+	-	-	+	+

Tablo 39'un devamı

Maya Türü	Maya Suşu	Glu	Gal	Suk	Lak	Mal	Gli
<i>P. fermentans</i> (7)	A-3	+	+	-	-	-	+
	A-7	+	-	-	-	-	+
	A-14	+	+	+	+	+	+
	A-6, A-8	+	+	+	+	-	+
	A-11, A-15	+	+	+	-	+	+
<i>R. mucilaginosa</i> (13)	A-92	+	+	+	-	+	-
	A-74, A-87	+	+	+	+	+	-
	A-66, A-69, A-75, A-81, A-86	+	+	+	-	+	+
	A-63, A-67, A-78, A-100, A-111	+	+	+	+	+	+
<i>W. anomalus</i> (1)	A-114	+	+	+	+	+	+
<i>Y. lipolytica</i> (9)	A-13	+	+	+	-	+	+
	A-19	+	-	-	+	-	+
	A-99	+	-	-	-	+	+
	A-1, A-12	+	+	-	-	-	+
	A-4-, A-9	+	+	-	+	-	+
	A-5, A-10	+	+	+	+	-	+
	A-57	+	+	+	-	+	-
<i>S. cerevisiae</i> (14)	A-41, A-56	+	+	+	+	+	-
	A-18, A27, A-30, A-52	+	+	+	-	+	+
	A-17, A-34, A-35, A-36, A-39, A-43, A-53	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+

Glu: Glukoz (Dekstroz), Gal: Galaktoz, Suk: Sükröz, Lak: Laktoz, Mal: Maltoz, Gli: Gliserol

4.2.5. Maya Suşlarının Termotolerans ve Osmotolerans Özellikleri

Ayran örneklerinden tanımlanan yüz on altı maya suşunun termotolerans ve osmotolerans özellikleri belirlendi. Maya türlerinin termotolerans özelliklerini içeren sonuçlar Tablo 40'ta verildi. A-28 *Cl. lusitaniae* maya suşunun, A-86 *R. mucilaginosa* maya suşunun, A4 ve A-5 *Y. lipolytica* maya suşlarının, A-17 ve A-18 *S. cerevisiae* maya suşlarının 37 °C ve 45 °C sıcaklıklarda üreme göstermediği tespit edildi. Bu suşlar Tablo 40'ta gösterilmedi. *C. insonspicua*, *P. fermentans*, *W. anomalus*, *R. mucilaginosa* (A-86 hariç), *S. cerevisiae* (A-17 ve A-18 hariç) ve *Y. lipolytica* (A4 ve A-5 hariç) türlerine ait maya suşlarının 37 °C sıcaklıkta üreme gösterdiği ancak 45 °C sıcaklıkta üreme göstermediği belirlendi. *C. metapsilosis*, *M. capitatus* ve *Cl. lusitaniae* (A-28 hariç) maya türlerine ait tüm suşların hem 37 °C hem de 45 °C sıcaklıklarda üreme gösterdiği tespit edildi. *C. parapsilosis*, *K. lactis* ve *K. marxianus* türlerine ait tüm maya suşlarının 37 °C sıcaklıkta üreme gösterdi. Ancak, *C. parapsilosis* maya türüne ait A-76 maya suşunun, *K. lactis* türüne ait A-24 ve A-37 maya suşunun ve *K. marxianus* türüne ait A-25 ve A-55 maya suşları hariç diğer tüm maya suşlarının 45 °C sıcaklıkta üreme gösterdiği tespit edildi. Genel olarak ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının termotolerans özelliklerinin yüksek olduğu gözlemlendi.

Maya türlerinin osmotolerans özelliklerini içeren sonuçlar Tablo 41'de verildi. *C. inconspicua*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *M. capitatus*, *P. fermentans*, *R. mucilaginosa* ve *Y. lipolytica* maya türlerine ait tüm maya suşlarının %50 dekstroz içeren ortamda üreyemediği, bu nedenle osmotik dirence sahip olmadıkları belirlendi. *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis*, *W. anomalus*, *Cl. lusitaniae* (A-73 ve A-80 suşları hariç) ve *S. cerevisiae* maya türlerine ait tüm maya suşlarının osmotolerans özelliğe sahip oldukları tespit edildi.

Tablo 40

Ayran örneklerinde tanımlanan maya suşlarının termotolerans özellikleri*

Maya Türü	37 °C Test	45 °C Test
<i>C. inconspicua</i> (1)	A-2	-
<i>C. metapsilosis</i> (2)	A-62, A-65	A-62, A-65
<i>C. parapsilosis</i> (16)	A-44, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-114, A-116	A-44, A-68, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-114, A-116
<i>Cl. lusitanae</i> (16)	A-16, A-22, A-31, A-33, A-54, A-73, A-80, A-82, A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A-108	A-16, A-22, A-31, A-33, A-54, A-73, A-80, A-82, A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A-108
<i>K. lactis</i> (3)	A-20, A-24, A-37	A-20
<i>K. marxianus</i> (25)	A-21, A-23, A-25, A-26, A-32, A-38, A-40, A-51, A-55, A-59, A-60, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-85, A-88, A-98 A-94, A-109, A-115	A-21, A-23, A-26, A-32, A-38, A-40, A-51, A-59, A-60, A-61, A-64, A-70, A-71, A-72, A-77, A-79, A-84, A-85, A-88, A-98 A-94, A-109, A-115
<i>M. capitatus</i> (9)	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58	A-29, A-42, A-45, A-46, A-47, A-48, A-49, A-50, A-58
<i>P. fermentans</i> (7)	A-3, A-6, A-7, A-8, A-11, A-14, A-15	-
<i>R. mucilaginosa</i> (13)	A-63, A-66, A-67, A-69, A-74, A-75, A-78, A-81, A-86, A-87, A-92, A-100, A-111	-
<i>W. anomalus</i> (1)	A-113	-
<i>Y. lipolytica</i> (9)	A-1, A-9, A-10, A-12, A-13, A-19, A-99	-
<i>S. cerevisiae</i> (14)	A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57	-

* A-4, A-5, A-17, A-18, A-28 ve A-86 maya suşları 37 ve 45 °C sıcaklıkta üreme göstermedikleri için tabloda verilmemiştir.

Tablo 41

Ayran örneklerinde tanımlanan maya suşlarının osmotolerans özellikleri*

Maya Türü	50% Dekstroz
<i>C. metapsilosis</i>	A-62, A-65
<i>C. parapsilosis</i>	A-44, A-68, A-76, A-89, A-97, A-101, A-102, A-103, A-104, A-105, A-106, A-107, A-110, A-112, A-113, A-116
<i>Cl. lusitaniae</i>	A-16, A-22, A-28, A-31, A-33, A-54, A-82, A-83, A-90, A-91, A-93, A-95, A-96, A-108
<i>W. anomalus</i>	A-114
<i>S. cerevisiae</i>	A-17, A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-41, A-43, A-52, A-53, A-56, A-57

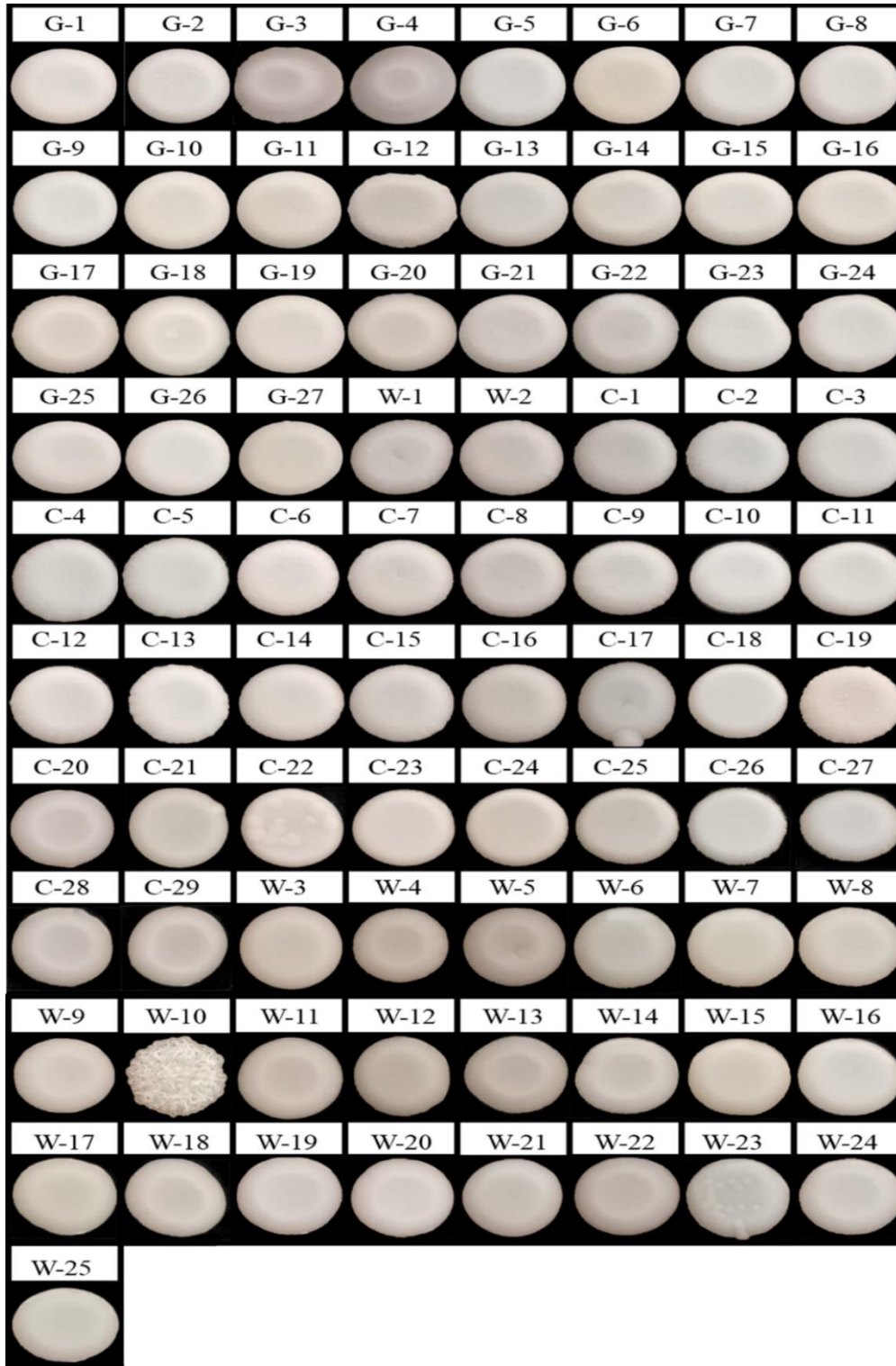
* Üreme göstermeyen maya türlerine ait maya suşları tabloda gösterilmedi.

Ayran örneklerinden izole edilen maya suşlarının fermantasyon kapasiteleri, termotolerans (ısı direnci) ve osmotolerans (osmotik direnç) özellikleri incelendiğinde *C. metapsilosis* türüne ait A-62 suşunun, *C. parapsilosis* türüne ait A-97, A-104, A-107, A-110, A-112, A-113 ve A-116 suşlarının, *Cl. lusitaniae* türüne ait A-16, A-22, A-31, A-33, A-54, A-83, A-90, A-96 ve A-108 suşlarının, *W. anomalus* türüne ait A-114 suşunun ve *S. cerevisiae* türüne ait A-17, A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-43, A-52 ve A-53 suşlarının tüm karbon kaynaklarındaki fermantasyon kapasitelerinin ve stres dirençlerinin yüksek olduğu tespit edildi. Bu nedenle bu maya suşlarının endüstriyel öneme sahip maya suşları olarak değerlendirildi. Ayrıca, fermantasyon kapasitesi ve stres direnci yüksek olan A-18 *S. cerevisiae* maya suşunun yüksek proteaz aktivitesine de sahip olmasından dolayı endüstriyel olarak oldukça önemli bir maya suşu olduğu belirlendi.

4.3. Peynir Çeşitlerinden İzole Edilen Maya Suşları ile İlgili Yapılan Çalışmalar

4.3.1. Maya Yoğunluğunun Belirlenmesi

Beyaz peynirden 25 maya suşu, çedar peynirinden 29 maya suşu ve keçi peynirinden 27 maya suşu olmak üzere toplam 81 maya suşu zengin besi ortamında canlandırıldı. Çoğaltılan maya suşlarının üremesi Şekil 31’de verildi. Beyaz peynir örneklerinde maya yoğunluğu $2,29 \times 10^5$ CFU/g, çedar peynirinde $1,3 \times 10^4$ CFU/g ve keçi peynirinde maya yoğunluğu $5,6 \times 10^4$ CFU/g olarak hesaplandı. Beyaz peynirden izole edilen maya suşları “W”, çedar peynirinden izole edilen maya suşları “C” ve keçi peynirinden izole edilen maya suşları “G” olarak ayrı ayrı kodlandırıldı.



Şekil 31. Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının zengin besi ortamında çoğaltılması

4.3.2. Maya Suşlarının Tanımlanması

API-ID32 Kit Sistemi ile Tanımlanması

Peynir örneklerinden izole edilen 81 maya suşu API-ID32C kit sistemi kullanılarak tanımlandı ve *C. kefir*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. famata*, *Candida intermedia*, *Candida krusei* ve *C. lusitaniae* olmak üzere yedi maya türü tespit edildi. İzole edilen maya türlerinin API-ID32C sonuçlarına göre maya suşlarının asimilasyon profilleri Tablo 42’te verildi.

C. kefir olarak tanımlanan on dört maya suşunun yedi farklı asimilasyon profili oluşturduğu görüldü. İlk dört asimilasyon profilinde (G1, G2, G3 ve G4) yer alan on bir maya suşunun (W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-22 ve W-24) beyaz peynirden ve diğer üç asimilasyon profilinde (G5, G6 ve G7) maya suşunun (C-20, C-28 ve C-29) ise çedar peynirinden izole edildiği belirlendi. *C. parapsilosis* olarak tanımlanan on iki maya suşunun yedi farklı asimilasyon profili oluşturduğu ve tüm maya suşlarının beyaz peynirden izole edildiği tespit edildi. *C. pelliculosa* olarak tanımlanan otuz dokuz maya suşunun altı asimilasyon profili oluşturduğu belirlendi. Keçi peynirinden izole edilen maya suşlarının üç farklı asimilasyon profili (G-2, G-4 ve G-6) oluşturduğu, çedar peynirinden izole edilen maya suşlarının ise diğer üç profilde (G-1, G-3 ve G-5) yer aldığı, beyaz peynirden tanımlana bir maya suşunun (W-2) ise birinci profilde (G-1) yer aldığı gözlemlendi. *C. famata* olarak tanımlanan yedi maya suşunun tümünün çedar peynirinden izole edildiği ve üç farklı asimilasyon profili oluşturduğu belirlendi. *C. intermedia* olarak tanımlanan üç maya suşundan C-17 ev C-27 maya suşlarının çedar peynirinden ve W-1 maya suşunun ise beyaz peynirden izole edildiği, her iki peynirden izole edilen maya suşlarının iki ayrı profilde gruplandığı tespit edildi. *C. krusei* olarak tanımlanan iki maya suşunun keçi peynirinden izole edildiği ve iki farklı asimilasyon profili oluşturduğu belirlendi. Benzer şekilde *C. lusitaniae* olarak tanımlanan dört maya suşunun keçi peynirinden izole edildiği ve iki farklı asimilasyon profili oluşturduğu gözlemlendi.

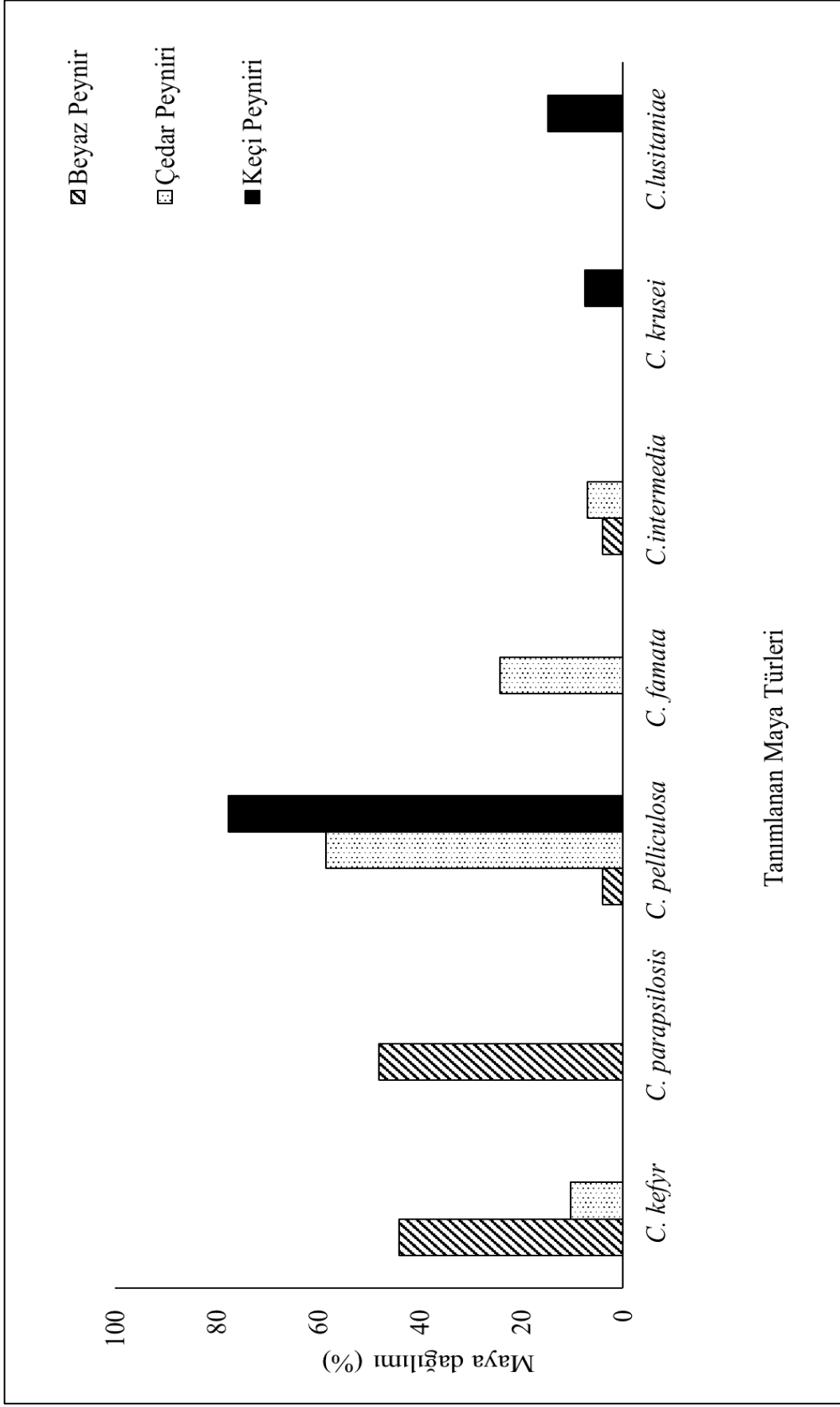
API-ID32C test sonuçlarına göre tanımlanan maya türlerinin peynir çeşitlerine göre dağılımı Şekil 32’de verildi. Beyaz peynirde *C. parapsilosis* (%48), *C. kefir* (%44), *C.*

pelliculosa (%4) ve *C. intermedia* (%4) olmak üzere dört farklı maya türünün dağılım gösterdiği belirlendi. Çedar peynirinde izole edilen *C. kefyf* (%10), *C. pelliculosa* (%59), *C. famata* (%24) ve *C. intermedia* (%7) olmak üzere dört maya türünün dağılım gösterdiği tespit edildi. Keçi peynirinden izole edilen *C. pelliculosa* (%78), *C. lusitaniae* (%15) ve *C. krusei* (%7) olmak üzere üç farklı maya türünün dağılım gösterdiği gözlemlendi. Genel olarak *C. kefyf* maya türünün beyaz peynir ve çedar peynirinde, *C. parapsilosis* maya türünün yalnızca beyaz peynirde, *C. pelliculosa* maya türünün beyaz peynir, çedar peyniri ve keçi peynirinde, *C. famata* maya türünün çedar peynirinde, *C. intermedia* maya türünün beyaz peynir ve çedar peynirinde, *C. lusitaniae* ve *C. krusei* maya türlerinin yalnızca keçi peynirinde bulunduğu tespit edildi. Beyaz peynirde ağırlıklı olarak *C. kefyf* ve *C. parapsilosis* maya türlerinin, çedar peynirinde ağırlıklı olarak *C. pelliculosa* ve *C. famata* türlerinin, keçi peynirinde ise *C. pelliculosa* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu tespit edildi.

Tablo 42

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının asimilasyon sonuçlarına göre tanımlanması ve gruplandırılması

Maya Türleri	Maya Kodları
<i>C. kefir</i>	G1: W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-22, W-24 G2: W-4, W-5 G3: W-9 G4: W-11 G5: C-28 G6: C-29 G7: C-20
<i>C. parapsilosis</i>	G1: W-15, W-21 G2: W-6, W-7, W-12 G3: W-17 G4: W-3, W-8, W-25 G5: W-10 G6: W-16 G7: W-23
<i>C. pelliculosa</i>	G1: W-2, C-2, C-3, C-7, C-8, C-10, C-11, C-16 G2: G-1, G-13, G-27 G3: C-1, C-5, C-6 G4: G-2, G-16 G5: C-4, C-9, C-12, C-13, C-14, C-15, C-21 G6: G-5, G-6, G-7, G-8, G-9, G-10, G-11, G-12, G-14, G-15, G-19, G-21, G-23, G-24, G-25, G-26
<i>C. famata</i>	G1: C-18, C-22, C-23 G2: C-24, C-25, C-26 G3: C-19
<i>C. intermedia</i>	G1: C-17, C-27 G2: W-1
<i>C. krusei</i>	G1: G-3 G2: G-4
<i>C. lusitaniae</i>	G1: G-17, G-18 G2: G-20, G-22

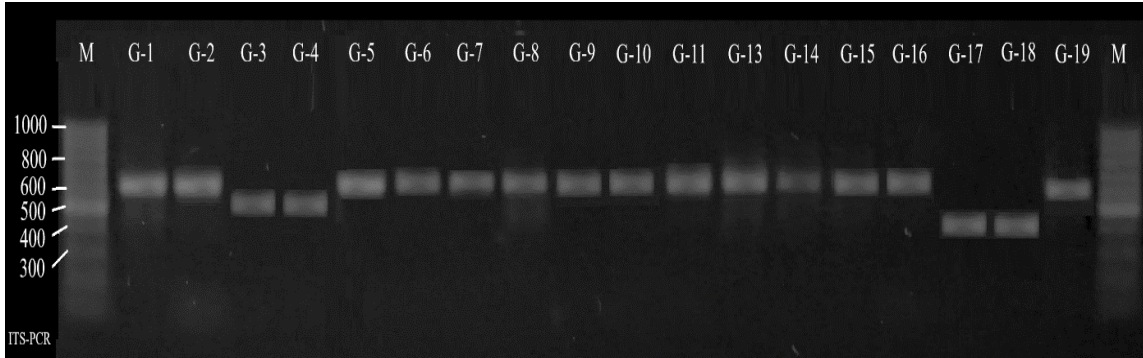


Şekil 32. Asimilasyon test sonucuna göre maya türlerinin peynir örneklerinde dağılımları

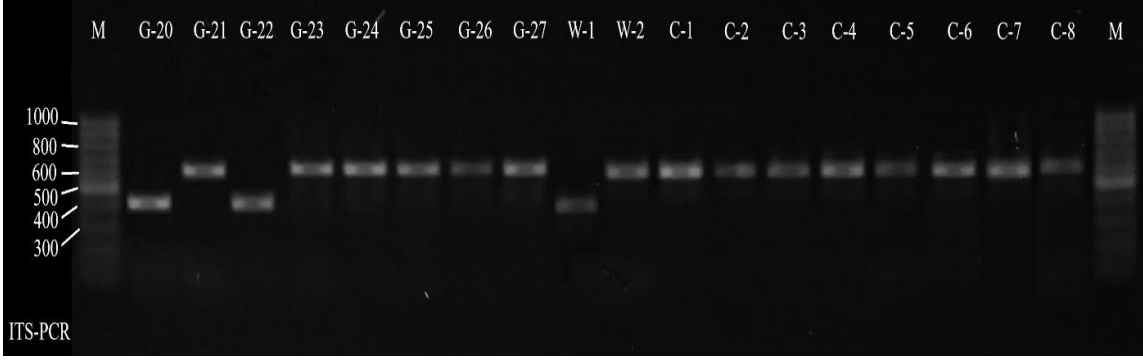
Moleküler Yöntemlerle Tanımlama

ITS-5.8S Bölgesinin PCR-RFLP Analizi

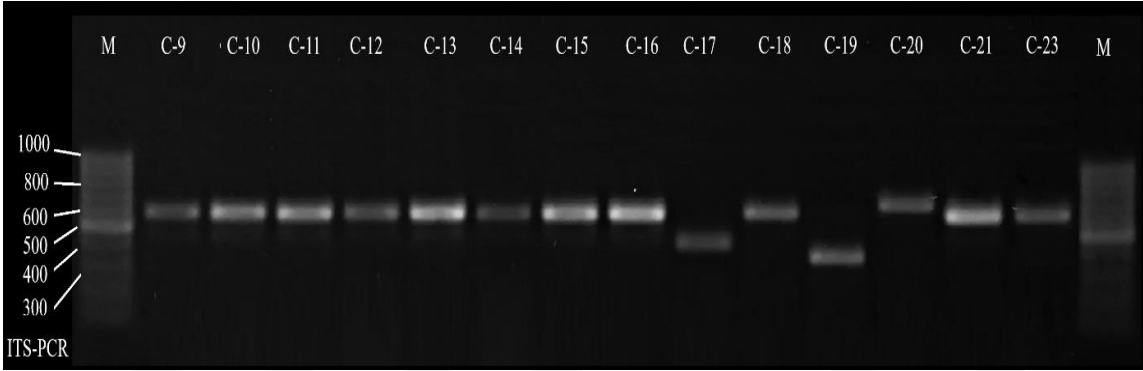
Beyaz peynir, çedar peyniri ve keçi peyniri örneklerin izole edilen maya suşlarının genomik DNA izolasyonu sonrası ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesi ITS1 ve ITS4 primeri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Amplifikasyon sonrası G-1 ile G-11 ve G-9 ile G-19 arasında kodlu maya suşlarına ait PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri Şekil 33'te verildi. G-20 ile G-27 arasında, C-1 ile C-8 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler ile W-1 ve W-2 maya suşlarına ait görüntüler Şekil 34'te sunuldu. C-9 ile C-21 arasında kodlu maya suşlarına ve C-23 maya suşuna ait PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri Şekil 35'te verildi. G-12 maya suşuna, C-24 ile C-29 arasında kodlu maya suşlarına ait ve W-3 ile W-14 arasında kodlu maya suşlarına ait görüntüler Şekil 36'da sunuldu. W-15 ile W-22 arasında kodlu maya suşlarına, W-24 ve W-25 maya suşlarına ait görüntüler Şekil 37'de verildi. C-22, C-27 ve W-23 maya suşlarına ait görüntüler ise Şekil 38'de sunuldu. Amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünlerinin bant uzunluğuna göre maya suşları gruplandırıldı.



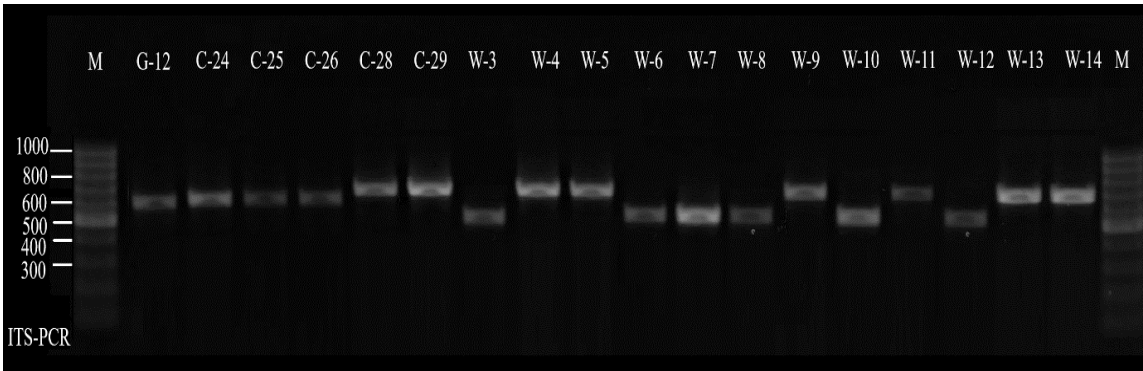
Şekil 33. Maya suşlarına (G-1 ile G-19) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu



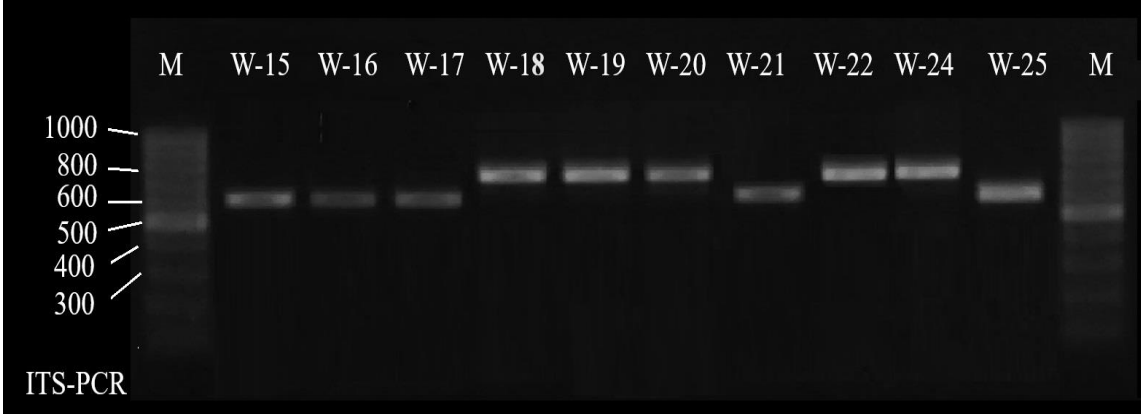
Şekil 34. Maya suşlarına (G-20 ile G-27; W-1, W-219; C-1 ile C-8) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu



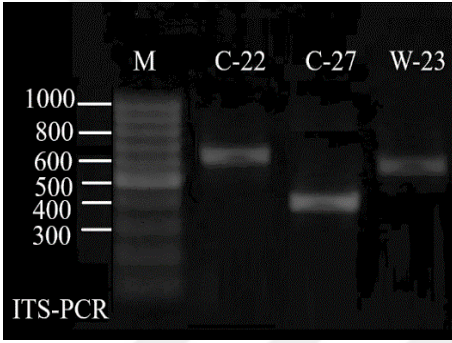
Şekil 35. Maya suşlarına (C-9 ile C-21, C-23) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 36. Maya suşlarına (G-12; C-24 ile C-26, C-28, C-29; W-3 ile W-14) ait ITS-5.8S gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 37. Maya suşlarına (W-15 ile W-22, W-24, W-25) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 38. Maya suşlarına (C-22, C-23, W-23) ait ITS-5.8Sgen bölgesinin PCR sonucu

Peynir örneklerinden izole edilen seksen bir maya suşu ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesinin PCR uzunluğuna göre beş gruba ayrıldı (Tablo 43). Birinci grupta (P-1) yer alan 7 maya suşunun yaklaşık 400 bç uzunluğunda, ikinci PCR grubunda (P-2) yer alan 3 maya suşunun yaklaşık 500 bç büyüklüğünde, üçüncü PCR grubunda (P-3) yer alan 12 maya suşunun yaklaşık 600 bç büyüklüğünde, dördüncü PCR grubunda (P-4) yer alan 45 maya suşunun yaklaşık 650 bç büyüklüğünde ve beşinci PCR grubunda (P-5) yer alan 14 maya suşunun yaklaşık 750 bç büyüklüğünde PCR ürünü verdiği gözlemlendi.

Tablo 43

Peynir kaynaklı maya suşlarının ITS-5.8S bölgesinin PCR amplifikasyonu

PCR Bant Büyüküğü (bp)	Maya Suşları
P-1 (~400)	C-17, C-27, G-17, G-18, G-20, G-22, W-1
P-2 (~500)	C-19, G-3, G-4
P-3 (~600)	W-3, W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W-21, W-23, W-25
P-4 (~650)	C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-18, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26, G-1, G-2, G-5, G-6, G-7, G-8, G-9, G-10, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-19, G-21, G-23, G-24, G-25, G-26, G-27, W-2
P-5 (~750)	C-20, C-28, C-29, W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-22, W-24

Maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgelerine ait PCR ürünleri Hinfl, HaeIII, MspI, AluI ve HhaI restriksiyon enzimleri kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde kesildi ve elde edilen restriksiyon ürünlerine göre maya suşları tekrar gruplandırıldı. PCR ürünlerine göre birinci grupta (P-1) yer alan yedi maya suşu PCR-RFLP analizi sonucunda iki farklı (R-1 ev R-2) profil oluşturdu (Tablo 44). Bu grupta yer alan tüm maya suşlarının Hae III ve Alu I enzimleri için kesim bölgesi içermediği belirlendi. Maya suşlarının Hinf I ve Msp I enzimleri için bir kesim bölgesine sahip olduğu ve benzer profil verdiği tespit edildi. Birinci restriksiyon profilinde (R-1) yer alan maya suşlarının Hha I enzimi için bir kesim bölgesi ve ikinci restriksiyon profilinde (R-2) yer alan maya suşlarının iki kesim bölgesine sahip olduğu gözlemlendi. Her iki grubun (R-1 ve R-2) birbirinden Hha I enzim kesimiyle ayrıştığı tespit edildi.

Tablo 44

Birinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-1 (~400 bç)	R-1	W-1, C-17, C-27	-----	200-200	190-180	-----	300-100
	R-2	G-17, G-18, G-20, G-22	-----	200-200	200-190-90	-----	275-110

PCR ürünlerine göre ikinci grupta (P-2) yer alan üç maya suşu PCR-RFLP analizi sonucunda iki farklı profil (R-3 ve R-4) oluşturdu. (Tablo 45). Üçüncü ve dördüncü restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının tüm enzimler için kesim bölgesine sahip olduğu tespit edildi. Her iki restriksiyon profilinde bulunan maya suşlarının Hae III, Hinf ve Hha I enzimleriyle kesimi sonrası benzer profil verdiği tespit edildi. R-3 restriksiyon profilinde yer alan maya suşunun Alu I ve Msp I için iki kesim bölgesine, R-4 restriksiyon profilinde yer alan maya suşlarının ise tek kesim bölgesine sahip olduğu belirlendi. PCR büyüklüğüne göre ikinci grupta yer alan bu maya suşlarının Alu I ve Msp I enzim kesimleri ile birbirinden ayrıldığı gözlemlendi. PCR ürünlerine göre üçüncü grupta (P-3) yer alan on iki maya suşu PCR-RFLP analizi sonucunda tek bir profil (R-5) oluşturdu (Tablo 46). R-5 restriksiyon profiline sahip tüm maya suşlarının tüm enzimler için tek kesim bölgesine sahip olduğu gözlemlendi.

Tablo 45

İkinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-2 (~500 bç)	R-3	C-19	390-95	280-210	200-190-90	290-95-90	245-145-95
	R-4	G-3, G-4	390-95	260-210	200-190-90	390-95	250-215

Tablo 46

Üçüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-3 (~600 bç)	R-5	W-3, W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W-21, W-23, W-25	450-125	300-300	320-240	540-50	500-90

PCR ürünlerine göre dördüncü grupta (P-4) yer alan kırk beş maya suşunun PCR-RFLP analizi sonucunda iki farklı profil (R-6 ve R-7) oluşturduğu tespit edildi. (Tablo 47). R-6 ve R-7 restriksiyon profilinde yer alan tüm maya suşlarının Msp I enzimi için kesim bölgesi içermediği, Hinf I enzimi için tek kesim bölgesi içerdiği ve benzer profil verdiği gözlemlendi. R-6 restriksiyon profilinde yer alan altı maya suşunun Alu I enzimi için kesim bölgesi içermediği, Hae III ve Hha I enzimi için iki kesim bölgesi içerdiği belirlendi. R-7 restriksiyon profilinde yer alan 39 maya suşunun Hae III enzimi için kesim bölgesi içermediği, Hha I enzimi için bir, Alu I enzimi için iki kesim bölgesi içerdiği tespit edildi. PCR büyüklüğüne göre dördüncü grupta yer alan kırk beş maya suşunun Hae III, Hha I ve Alu I enzim kesimleri ile birbirinden ayrıldığı gözlemlendi.

PCR ürünlerine göre beşinci grupta (P-5) yer alan 14 maya suşu PCR-RFLP analizi sonucunda tek profil (R-8) oluşturdu (Tablo 48). Bu profilinde bulunan maya suşlarının Msp I enzimi için kesim bölgesi içermediği, Hae III enzimi için bir, Alu I enzimi için iki, Hha I enzimi için üç ve Hinf I enzimi için dört kesim bölgesi içerdiği görüldü.

Tablo 47

Dördüncü PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-4 (~650 bç)	R-6	C-18, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26	425- 140-85	315-310	290- 290-60	-----	-----
	R-7	W-2, C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-21, G-1, G-2, G-5, G-6, G-7, G-8, G-9, G-10, G-11, G- 12, G-13, G-14, G-15, G- 16, G-19, G-21, G-23, G- 24, G-25, G-26, G-27	-----	315-310	575-60	500-105- 50	-----

Tablo 48

Beşinci PCR grubuna ait maya suşlarının ITS-5.8S rDNA bölgesine ait restriksiyon profilleri

PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-5 (~750 bç)	R-8	W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W- 19, W-20, W-22, W-24, C-20, C-28, C-29	650-90	280-190- 110-90-90	290-175- 150-90	375- 175-170	-----

Elde edilen sonuçlara göre ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasında aynı PCR grubunda yer alan (P-1, P-2 ve P-4) maya suşlarının farklı restriksiyon profilleri oluşturduğu belirlendi. Peynir örneklerinden izole edilen seksen bir maya suşunun sekiz farklı restriksiyon profili oluşturması bu suşların en fazla sekiz farklı maya türüne ait olduğunu göstermektedir. Maya suşlarına ait restriksiyon kesim sonuçları Tablo 49'da özetlendi.

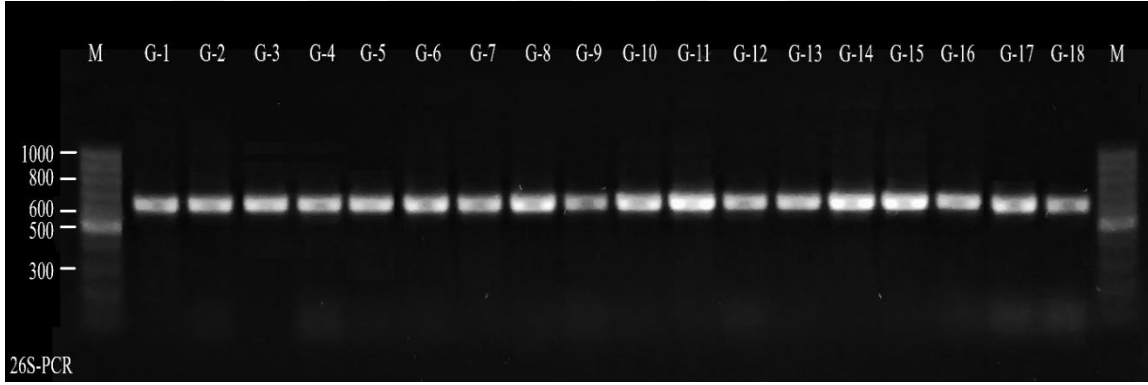
Tablo 49

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S rDNA gen bölgesinin PCR-RFLP sonucu

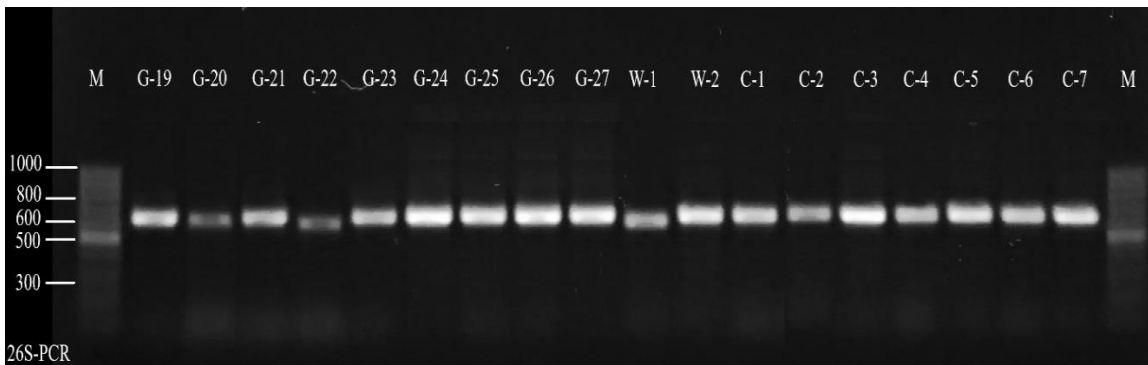
PCR Grup No	RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / ITS1-5.8S-ITS2 rDNA				
			Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I
P-1 (~400 bç)	R-1	W-1, C-17, C-27	-----	200-200	190-180	-----	300-100
	R-2	G-17, G-18, G-20, G-22	-----	200-200	200-190-90	-----	275-110
P-2 (~500 bç)	R-3	C-19	390-95	280-210	200-190-90	290-95-90	245-145-95
	R-4	G-3, G-4	390-95	260-210	200-190-90	390-95	250-215
P-3 (~600 bç)	R-5	W-3, W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W- 21, W-23, W-25	450-125	300-300	320-240	540-50	500-90
		C-18, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26	425-140-85	315-310	290-290-60	-----	-----
P-4 (~650 bç)	R-7	W-2, C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C- 11, C-12, C-13, C-14, C-15, C- 16, C-21, G-1, G-2, G-5, G-6, G-7, G-8, G-9, G-10, G-11, G- 12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-19, G-21, G-23, G-24, G-25, G-26, G-27	-----	315-310	575-60	500-105- 50	-----
		W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W- 22, W-24, C-20, C-28, C-29	650-90	280-190-110- 90-90	290-175- 150-90	375-175- 170	-----

26S rDNA Bölgesinin PCR-RFLP Analizi

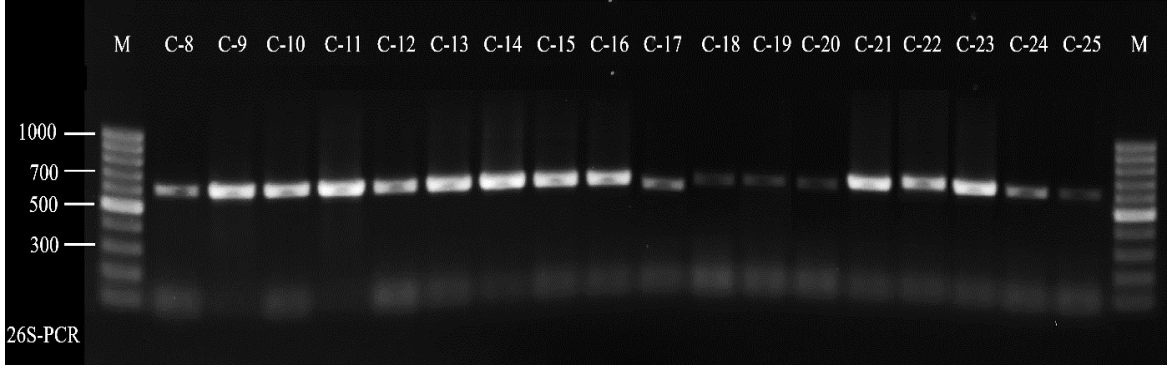
Maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR amplifikasyonu sonrası elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri G-1 ile G-18 arasında kodlu maya suşları için Şekil 39’da, G-19 ile G-27 arasında kodlu maya suşları, W-1, W-2 ve C-1 ile C-7 arasında kodlu maya suşları için Şekil 40’da, C-8 ile C-25 arasında kodlu maya suşları için Şekil 41’de, C-26 ile C-29 ve W-3 ile W-16 arasında kodlu maya suşları için Şekil 42’de ve W-17 ile W-25 arasında kodlu maya suşları için Şekil 43’te verildi. Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının D1/D2 domainine ait PCR ürünlerinin yaklaşık uzunluğu 600-650 bp olduğu tespit edildi. Bu nedenle D1/D2 domaininin PCR ürünleri için gruplama yapılmadı.



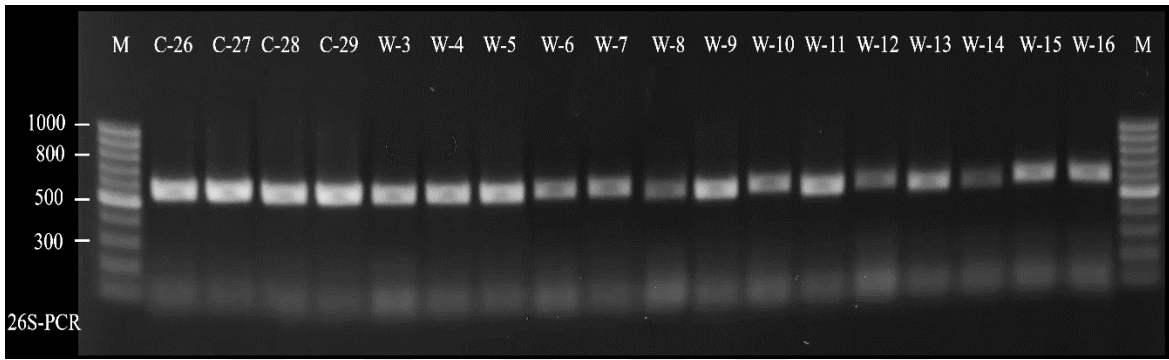
Şekil 39. Maya suşlarına (G-1 ile G-18) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 40. Maya suşlarına (G-19 ile G-27; W-1, W-2 ve C-1 ile C-7) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 41. Maya suşlarına (C-8 ile C-25) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 42. Maya suşlarına (C-26 ile C-29; W-3 ile W-16) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu



Şekil 43. Maya suşlarına (W-17 ile W-25) ait 26S rDNA gen bölgesinin PCR sonucu

Maya suşlarının D1/D2 domainine gen bölgesine ait PCR ürünleri *Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I, *Alu*I ve *Hha*I restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi sonrasında elde edilen restriksiyon ürünlerine göre maya suşları tekrar gruplandırıldı (Tablo 50).

PCR-RFLP analizi sonucuna göre seksen bir maya suşunun 12 farklı restriksiyon profili oluşturduğu gözlemlendi. Hae III enzimi ile yapılan restriksiyon kesimi sonucuna göre birinci restriksiyon profilinde (R-1) yer alan on üç maya suşunun, ikinci profilde (R-2) yer alan bir maya suşunun, üçüncü profilde (R-3) yer alan 38 maya suşunun, beşinci profilde (R-5) yer alan 12 maya suşunun, altıncı profilde (R-6) yer alan 6 maya suşunun ve dokuzuncu profilde (R-9) yer alan bir maya suşunun Hae III enzimi için benzer profil verdiği belirlendi. Benzer şekilde dördüncü restriksiyon profilinde (R-4) yer alan G-5 maya suşu ile onuncu restriksiyon profilinde (R-10) yer alan G-3 maya suşunun Hae III enzimi için aynı restriksiyon profiline sahip olduğu, R-11 restriksiyon profilinde yer alan G-4 maya suşu ile ve R-12 restriksiyon profilinde yer alan C-19 maya suşunun Hae III enzimi için aynı restriksiyon profiline sahip olduğu tespit edildi. Yedinci restriksiyon profilinde (R-7) yer alan dört maya suşunun Hae III enzimi için üç kesim bölgesine, sekizinci restriksiyon profilinde (R-8) yer alan iki maya suşunun Hae III enzimi için iki kesim bölgesine sahip olduğu ve diğer suşlardan farklı profiller oluşturduğu tespit edildi.

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının D1/D2 domaininin Hinf I enzimi ile kesimi sonucunda, birinci restriksiyon profilinde (R-1) yer alan 13 maya suşu, ikinci restriksiyon profilinde (R-2) yer alan C-20 maya suşu, beşinci profilde (R-5) yer alan 12 maya suşu, altıncı profilde (R-6) yer alan 6 maya suşu, sekizinci profilde (R-8) yer alan iki maya suşu ve dokuzuncu profilde (R-9) yer alan bir maya suşunun Hinf I enzimi ile benzer kesim profili oluşturduğu gözlemlendi. On birinci restriksiyon profilinde (R-11) yer alan G-4 maya suşu ile on ikinci profilde (R-12) yer alan G-19 maya suşunun da Hinf I enzimi için benzer kesim profili verdiği belirlendi. Diğer restriksiyon profillerinde (R-3, R-4, R-7 ve R-10) yer alan maya suşlarının Hinf I enzimi için diğer restriksiyon profillerinden farklı profil oluşturduğu tespit edildi.

Maya suşlarının Hha I enzimi ile kesimi sonrasında R-1, R-2, R-3, R-4, R-5 ve R-6 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının Hha I enzimi için kesim bölgesi içermediği belirlendi. Sekizinci (R-8), dokuzuncu (R-9) ve on ikinci (R-12) restriksiyon profillerinde yer alan bir maya suşlarının Hha I enzimi için iki kesim bölgesi içerdiği ve aynı kesim profilini verdiği gözlemlendi. Benzer şekilde onuncu (R-10) ve on birinci (R-11) restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının benzer kesim profiline sahip olduğu tespit

edildi. Yedinci restriksiyon profilinde (R-7) yer alan maya suşlarının ise diğer maya suşlarından farklı olarak Hha I enzimi için üç kesim bölgesine sahip olduğu belirlendi.

Maya suşlarının Alu I enzimi ile kesimi sonrasında onuncu (R-10) ve on birinci (R-11) restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının benzer kesim profil verdiği ve bu enzim için tek kesim bölgesi içerdiği tespit edildi. Diğer restriksiyon profillerinde (R-1, R-2, R-3, R-4, R-5, R-6, R-7, R-8, R-9 ve R-12) yer alan tüm maya suşlarının Alu I enzimi için üç kesim bölgesine sahip olduğu ve benzer kesim profili gösterdiği belirlendi.

Maya suşlarının Msp I enzimi ile kesimi sonrasında R-1, R-3, R-4 ve R-6 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının Msp I için kesim bölgesi içermediği gözlemlendi. R-11, R-11 ve R-12 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının Msp I enzimi için tek kesim bölgesine sahip olduğu ve benzer kesim profili oluşturduğu belirlendi. R-8 ve R-9 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının Msp I enzimi için iki kesim bölgesi içerdiği ve aynı kesim profili verdiği görüldü. R-2, R-5 ve R-7 restriksiyon profillerinde yer alan maya suşlarının Msp I enzimi için diğer restriksiyon profillerinden farklı profil oluşturduğu gözlemlendi.

Elde edilen sonuçlara göre 26S rDNA D1/D2 gen bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasında peynir örneklerinden izole edilen seksen bir maya suşunun on iki farklı restriksiyon profili oluşturması maya suşlarının en fazla on iki farklı maya türüne ait olduğunu göstermektedir.

Tablo 50

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının 26S rDNA gen bölgesinin D1/D2 domainine ait PCR-RFLP sonucu

RFLP Grup No	Maya Suşları	PCR-RFLP / D1/D2 Domaini						
		Hae III	Hinf I	Hha I	Alu I	Msp I		
R-1	W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-22, W-24, C-28, C-29	475-150	400-200	-----	240-150-120-90	-----		
R-2	C-20	475-150	400-200	-----	240-150-120-90	-----	540-90	
R-3	W-2, C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-21, G-1, G-2, G-6, G-7, G-8, G-9, G-10, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-19, G-21, G-23, G-24, G-25, G-26, G-27	475-150	250-180-175	-----	250-190-110-80	-----		
R-4	G-5	290-200-125	390-175-80	-----	250-190-110-80	-----		
R-5	W-3, W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W-21, W-23, W-25	475-150	400-200	-----	250-190-110-80	-----	490-150	
R-6	C-18, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26	475-150	400-200	-----	225-200-100-90	-----		
R-7	G-17, G-18, G-20, G-22	290-110-100-85	300-115-100-80	290-125-120-75	225-200-100-90	225-200-100-90	400-175-60	
R-8	W-1, C-17	390-95-90	380-225	340-150-100	250-190-110-80	250-190-110-80	290-180-140	
R-9	C-27	475-150	400-200	340-150-100	225-200-100-90	225-200-100-90	290-180-140	
R-10	G-3	290-200-125	300-300	250-240-150	430-190	430-190	420-200	
R-11	G-4	225-220-90-90	400-120-75	250-240-150	430-190	430-190	420-200	
R-12	C-19	225-220-90-90	400-120-75	340-150-100	225-200-100-90	225-200-100-90	420-200	

DNA Dizi Analizi ve Filogenetik İlişkilerin Belirlenmesi

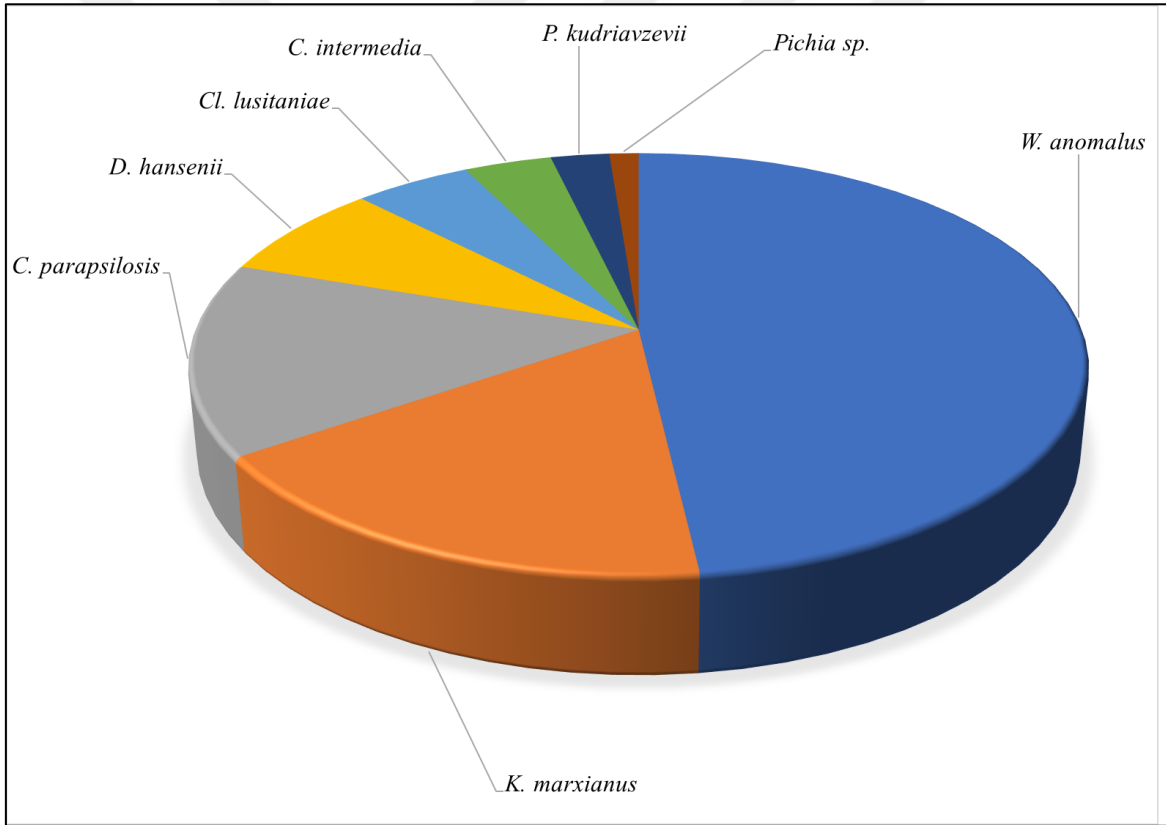
Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS-5.8S ve D1/D2 bölgesinin PCR-RFLP analizi sonrası elde edilen restriksiyon profillerinin her birinden rastgele iki maya suşu seçilerek DNA dizi analizi için kullanıldı. ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 rDNA gen bölgelerinin restriksiyon profillerine göre W-3, W-16, W-22, W-24, C-4, C-17, C-19, C-20, C-21, C-22, C-25, C-27, G-3, G-4, G-5, G-7 ve G-18 olmak üzere on yedi maya suşu seçildi. MEGA-11 programı ile “.fasta” formatına çevrilen DNA dizilerinin analizleri NCBI veri tabanı bünyesinde yer alan BLAST programı kullanılarak gerçekleştirildi. BLAST analizi sonucunda tanımlanan maya suşları, benzerlik yüzdeleri ve referans alınan maya türlerinin GenBank erişim numaraları Tablo 51’de verildi. BLAST analizi sonucunda C-17 ve C-27 maya suşları *Candida intermedia*, W-3 ve W-10 kodlu maya suşları *Candida parapsilosis*, C-4, C-21, G-5 ve G-7 maya suşları *Wickerhamomyces anomalus*, C-22 ve C-25 maya suşları *Debaryomyces hansenii*, G-3 ve G-4 maya suşları *Pichia kudriavzevii*, G-18 maya suşu *Clavispora lusitaniae* ve C-20, W-22 ve W-24 maya suşları *Kluyveromyces marxianus* maya türü olarak tanımlandı. C-19 maya suşu ise DNA dizi analizi sonucunda tanımlanamadı. Ancak, restriksiyon profilleri ve BLAST analizi sonucunda *Pichia* cinsine yakın olduğu görüldü. Bu nedenle bu maya türü Tablo 51’de *Pichia* sp. olarak verildi.

Tablo 51

Peynir kaynaklı maya suşlarının BLAST analizi sonuçları

Maya Suşları	ITS-5.8S rDNA Gen Bölgesi				26S rDNA D1/D2 Domaini			
	Benzerlik	Tanımlanan Maya Türü (Ref. Acc. No)	GenBank Eriim No	Benzerlik	Tanımlanan Maya Türü (Ref. Acc. No)	GenBank Eriim No		
G-3	99.40%	<i>Pichia kudriavzevii</i> (KY104581.1)	MT321265	100.00%	<i>Pichia kudriavzevii</i> (KY108847.1)	MT334435		
G-4	99.16%	<i>Pichia kudriavzevii</i> (KY104581.1)	MT321167	100.00%	<i>Pichia kudriavzevii</i> (KY108847.1)	MT334449		
G-5	100.00%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY105880.1)	MT321168	99.12%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY110106.1)	MT334450		
G-7	100.00%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY105880.1)	MT321266	99.64%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY110106.1)	MT334436		
G-18	99.41%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (KY102565.1)	MT321169	99.60%	<i>Clavispora lusitaniae</i> (KY106931.1)	MT334451		
C-4	98.40%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY105880.1)	MT321170	99.64%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY110106.1)	MT334452		
C-17	100.00%	<i>Candida intermedia</i> (NR_111248.1)	MT321171	99.01%	<i>Candida intermedia</i> (KY106524.1)	MT334453		
C-20	99.12%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY103798.1)	MT321271	99.62%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	MT334456		
C-21	99.82%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY105868.1)	MT321272	99.82%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY110106.1)	MT334442		
C-22	99.83%	<i>Debaryomyces hansenii</i> (KY103209.1)	MT321273	100.00%	<i>Debaryomyces hansenii</i> (KY107525.1)	MT334443		
C-25	100.00%	<i>Debaryomyces hansenii</i> (KY103209.1)	MT321172	99.12%	<i>Debaryomyces hansenii</i> (KY107525.1)	MT334454		
C-27	95.41%	<i>Candida intermedia</i> (NR_111248.1)	MT321275	99.01%	<i>Candida intermedia</i> (KY106524.1)	MT334445		
W-1	95.71%	<i>Candida intermedia</i> (NR_111248.1)	MT321268	97.98%	<i>Candida intermedia</i> (KY106524.1)	MT334438		
W-3	100.00%	<i>Candida parapsilosis</i> (NR_130673.1)	MT321173	99.82%	<i>Candida parapsilosis</i> (KY106666.1)	MT334455		
W-10	100.00%	<i>Candida parapsilosis</i> (NR_130673.1)	MT321276	99.82%	<i>Candida parapsilosis</i> (KY106666.1)	MT334446		
W-22	99.70%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY103798.1)	MT321174	99.62%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	MT334456		
W-24	99.85%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY103821.1)	MT321278	99.81%	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (KY108103.1)	MT334448		
C-19	-	<i>Pichia sp.</i>	-	-	<i>Pichia sp.</i>	-		

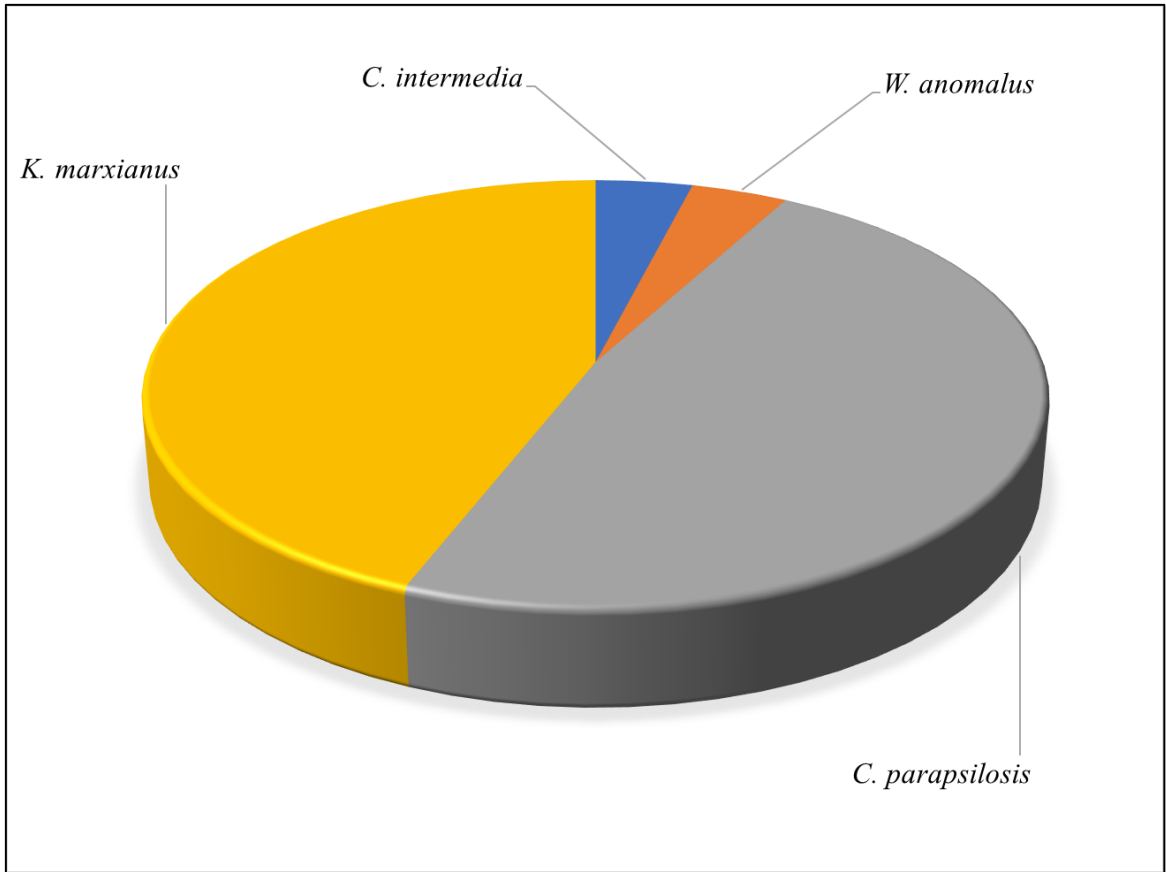
Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin peynir örneklerinde dağılımı Şekil 44'te verildi. Elde edilen sonuçlara göre peynir örneklerinde *W. anomalus* (%48,2) maya türünün yoğun olarak bulunan maya türü olduğu belirlendi. *K. marxianus* maya türünün %17,3 oranında, *C. parapsilosis* maya türünün %14,8 oranında, *D. hansenii* maya türünün %7,4 oranında, *Cl. lusitaniae* maya türünün %5 maya türünün, *C. intermedia* maya türünün %3,7 oranında ve *P. kudriavzevii* maya türünün %2,5 oranında dağılım gösterdiği tespit edildi. *Pichia sp.* olarak tanımlanan maya türünün ise %1,2 oranında peynir örneklerinde bulunduğu belirlendi. Peynir örneklerinde non-*saccharomyces* maya türlerinin yoğun olarak (% 100) dağılım gösterdiği gözlenirken *Saccharomyces* cinsine ait maya türü tespit edilemedi.



Şekil 44. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin peynir örneklerinde dağılımı

Beyaz peynir örneklerinde dağılım gösteren maya türleri Şekil 45'te verildi. *C. parapsilosis* (%48) ve *K. marxianus* (%44) maya türlerinin beyaz peynirde yoğun olarak dağılım gösterdiği, *C. intermedia* ve *W. anomalus* maya türlerinin ise eşit oranda (%4) dağılım gösterdiği belirlendi. Beyaz peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının API-

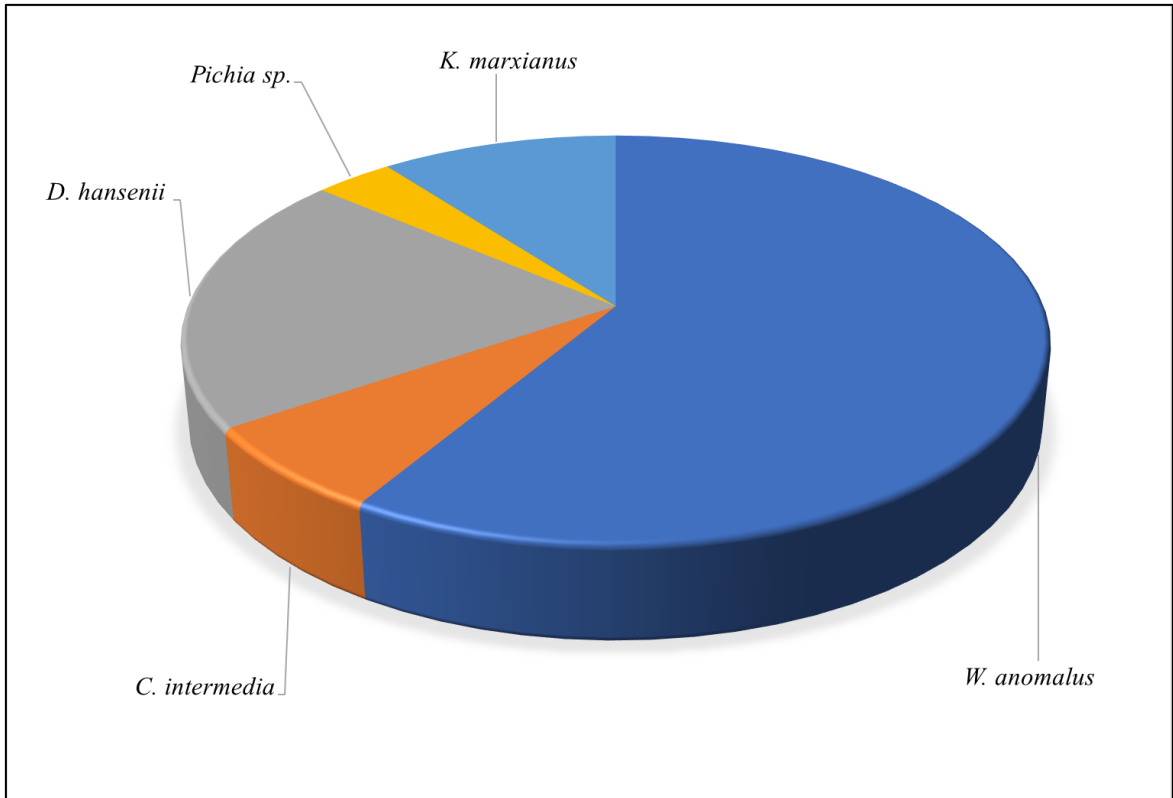
ID32C kit sistemi ile yapılan tanımlama işlemi ile moleküler yöntemlerle yapılan tanımlama işlemi karşılaştırıldığında, test sistemiyle altı farklı maya türü tanımlanırken, moleküler yöntemler kullanılarak beş farklı tür tanımlandığı gözlemlendi. Asimilasyon test sonucuna göre *C. parapsilosis* olarak tanımlanan 12 maya suşu ve *C. intermedia* olarak tanımlanan bir maya suşu moleküler yöntemlerle de aynı türler olarak tanımlandı. Asimilasyon test sonucuna göre *C. kefir* olarak tanımlanan 11 maya suşu *K. marxianus* olarak (Syn. *C. kefir*) ve *C. pelliculosa* olarak tanımlanan W-2 maya suşu *W. anomalus* (Syn. *C. pelliculosa*) olarak test sistemi ile paralel şekilde tanımlandığı belirlendi.



Şekil 45. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin beyaz peynirde dağılımı

Çedar peyniri örneklerinde dağılım gösteren maya türleri Şekil 46'da verildi. *W. anomalus* (%59) maya türünün çedar peynirinde yoğun olarak dağılım gösterdiği, *D. hansenii* maya türünün %21 oranında, *K. marxianus* maya türünün %10 oranında, *C. intermedia* maya türünün %7 oranında ve *Pichia* sp. maya türünün %3 oranında dağılım gösterdiği tespit edildi. API-ID32C kit sistemi ile yapılan tanımlama işlemi sonrasında çedar

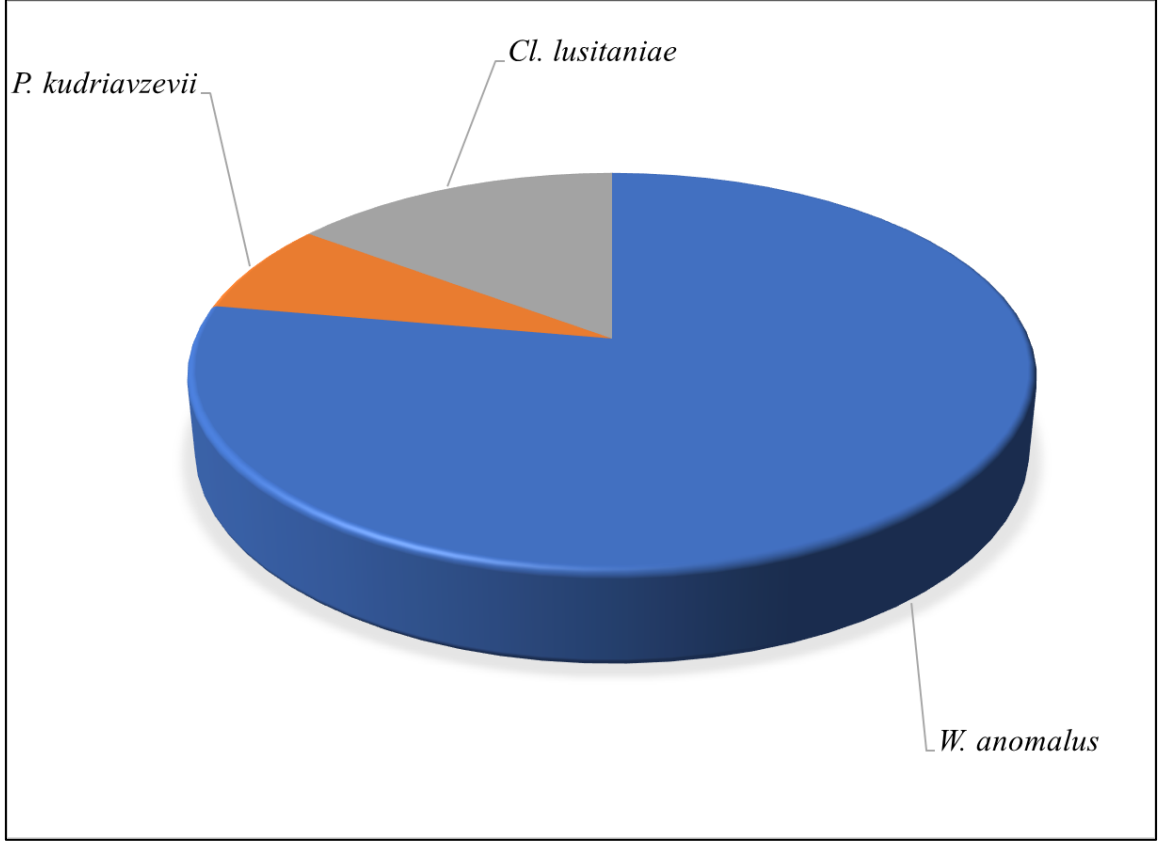
peynirinde üç farklı maya türü tanımlanırken, moleküler yöntemlerle altı farklı maya türünün tanımlandığı gözlemlendi. Asimilasyon test sonucuna göre *C. pelliculosa* olarak tanımlanan on yedi maya suşu moleküler yöntemlerle *W. anomalus* (Syn. *C. pelliculosa*), *C. kefyri* olarak tanımlanan üç maya suşu moleküler yöntemlerle *K. marxianus* (Syn. *C. kefyri*) ve *C. famata* olarak tanımlanan altı maya suşu moleküler yöntemlerle *D. hansenii* (Syn. *C. famata*) olarak tanımlandı. Asimilasyon test sonucuna göre *C. intermedia* olarak tanımlanan üç maya suşundan iki tanesi (C-17 ve C-27) moleküler yöntemlerle *C. intermedia* ve bir tanesi (C-19) *Pichia* sp. olarak tanımlandı.



Şekil 46. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin çedar peynirinde dağılımı

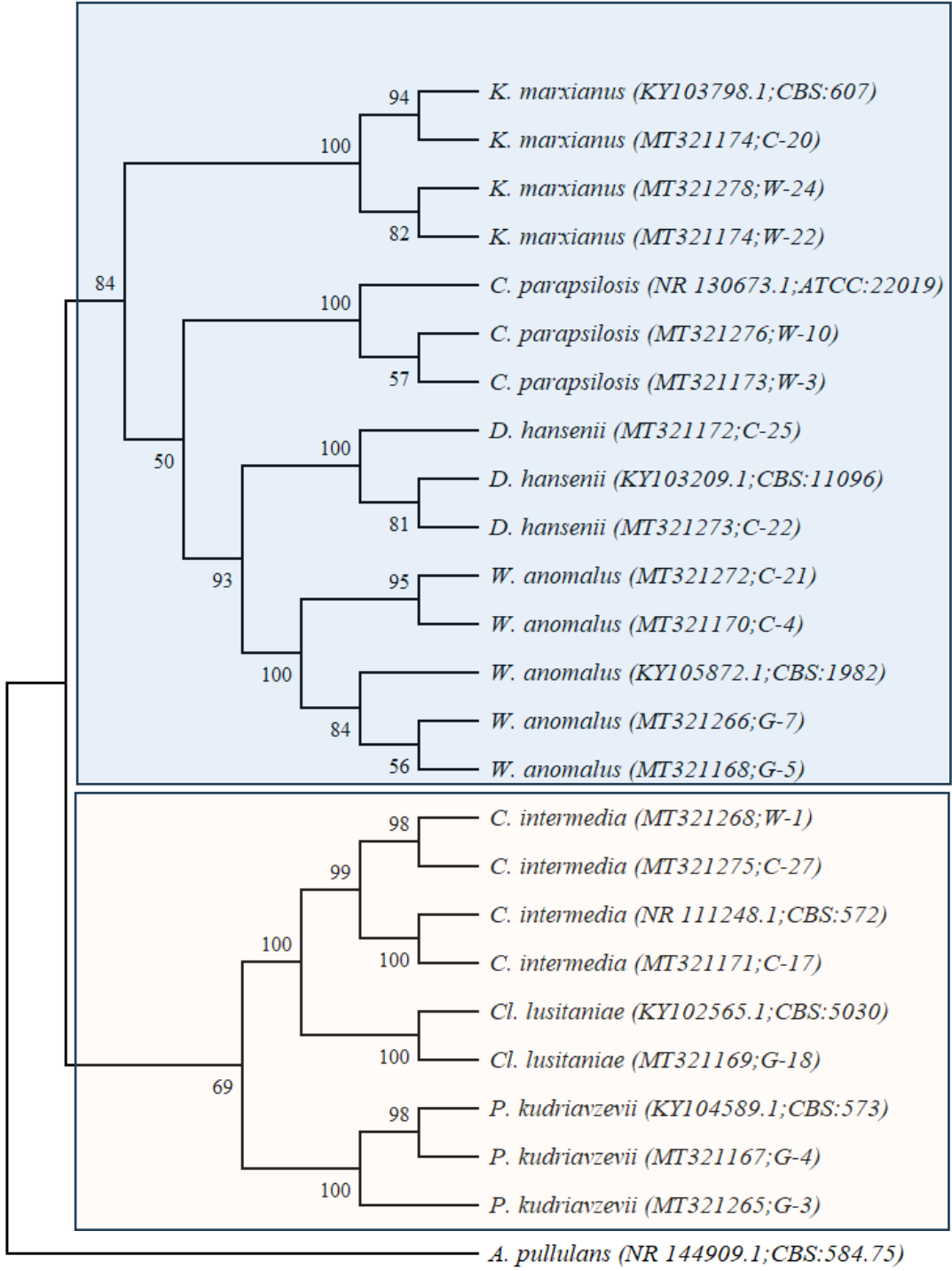
Keçi peyniri örneklerinde dağılım gösteren maya türleri Şekil 47’de verildi.Çedar peynirinde olduğu gibi, keçi peynirinde de *W. anomalus* (%78) maya türünün yoğun olarak dağılım gösterdiği gözlemlendi. Dağılım gösteren diğer maya türleri ise *Cl. lusitaniae* (%15) ve *P. kudriavzevii* (%7) olarak belirlendi. Asimilasyon test sonucuna göre *C. pelliculosa* olarak tanımlanan 21 maya suşunun moleküler yöntemlerle *W. anomalus* (Syn. *C. pelliculosa*), *C. lusitaniae* olarak tanımlanan 4 maya suşunun moleküler yöntemlerle *Cl. lusitaniae* (Syn. *C.*

lusitaniae) ve *C. krusei* olarak tanımlanan iki maya suşunun moleküler yöntemlerle *P. kudriavzevii* (Syn. *C. krusei*) olarak tanımlandığı tespit edildi.

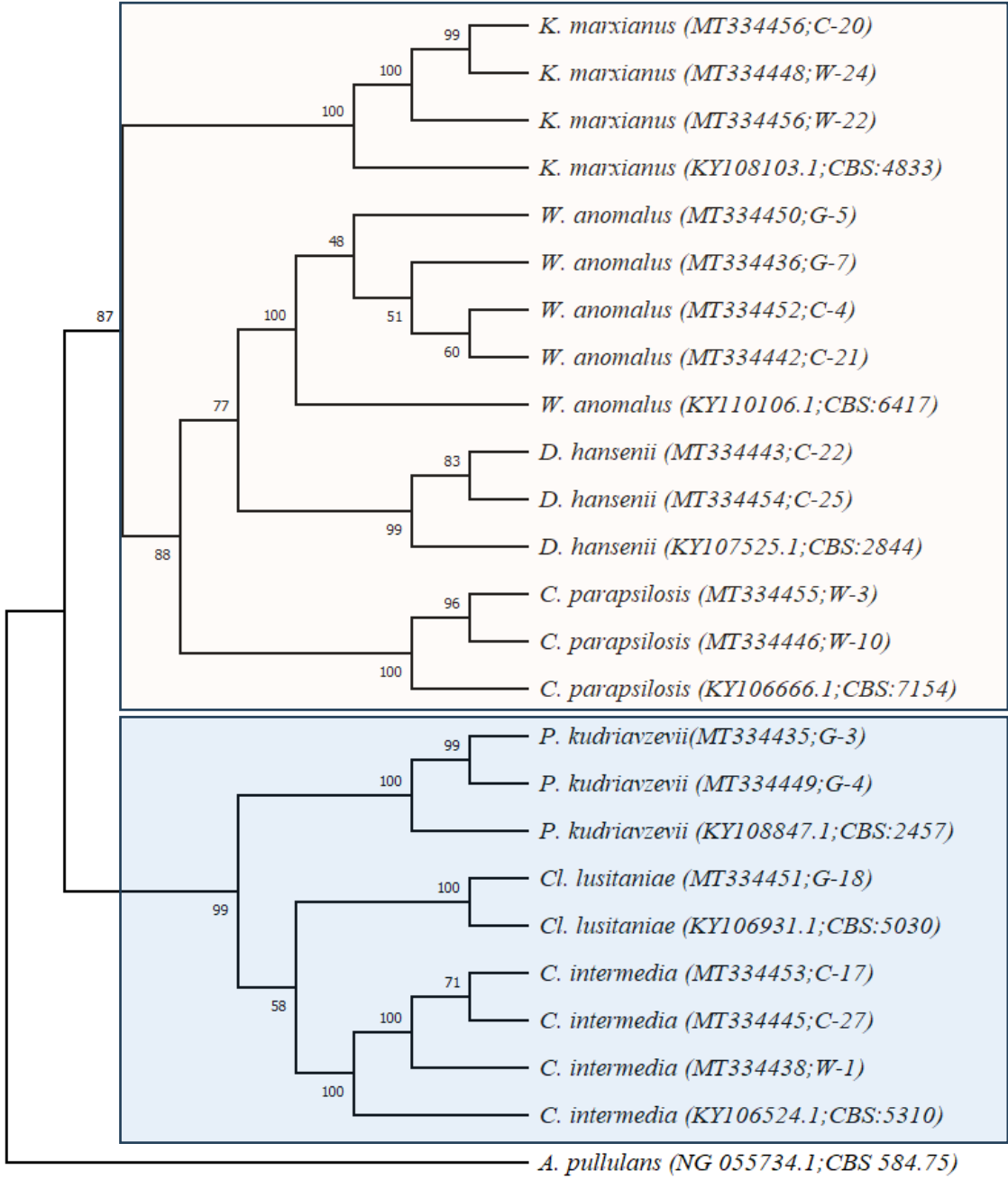


Şekil 47. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türlerinin keçi peynirinde dağılımı

Peynir örneklerinden tanımlanan maya suşları arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için öncelikle her bir maya türüne ait referans maya türü seçildi ve bu türe ait ITS-1-5.8S-ITS2 rDNA ve D1/D2 domaini için DNA dizileri NCBI-Nükleotid veri tabanı üzerinden indirildi. Türler arası uzaklıkların belirlenmesi için dış grup olarak CBS maya veri tabanından ITS-5.8S gen bölgesi için NR_144909.1 erişim numaralı *A. pullulans* maya suşu ve D1/D2 domaini için NG_055734.1 erişim numaralı *A. pullulans* maya türlerine ait diziler kullanıldı. Tüm maya suşlarına ait ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ve D1/D2 domaini DNA dizileri MEGA-11 programı altında yer alan ClustalW v1.6 hizalama parametresi kullanılarak hizalandı. Maya türlerinin filogenetik ilişkileri tespit edebilmek için MEGA-11 programı kullanılarak maksimum parsimoni (MP) ağacı oluşturuldu. ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesi için MP ağacı Şekil 48’de, D1/D2 domaini için MP ağacı Şekil 49’da gösterildi.



Şekil 48. Maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi için oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı. %50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir.



Şekil 49. Maya suşlarının 26S rDNA bölgesi D1/D2 domaini için oluşturulan Maksimum Parsimoni filogenetik ağacı. %50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir.

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesine göre oluşturulan MP ağacı incelendiğinde, maya suşlarının 2 ana gruba ayrıldığı görüldü. Birinci grupta *P. kudriavzevii*, *C. intermedia* ve *Cl. lusitaniae* maya türlerinin yer

aldığı görüldü. İkinci grupta yer alan maya suşları ise iki alt gruba ayrıldı ve ilk alt grupta sadece *K. marxianus* maya türünün bulunduğu, ikinci alt grupta ise *W. anomalus*, *D. hansenii*, *C. parapsilopsis* maya türlerinin yer aldığı tespit edildi. Maya suşlarının D1/D2 domaini dizilerine göre oluşturulan MP ağacın incelendiğinde, maya türleri ITS-5.8S bölgesindeki gibi iki ana gruba ayrıldı. Birinci grupta içerisinde *P. kudriavzevii*, *C. intermedia* ve *Cl. lusitaniae* maya türlerinin yer aldığı görüldü. İkinci grupta yer alan maya türleri de benzer şekilde iki alt gruba ayrıldı ve ilk alt grupta sadece *K. marxianus* maya türü bulunurken, diğer alt grupta *W. anomalus*, *D. hansenii*, *C. parapsilopsis* maya türlerinin yer aldığı tespit edildi.

4.3.3. Maya Suşlarının Hücre Dışı Proteaz, Lipaz ve Üreaz Aktiviteleri

Proteaz aktivitesi sonuçlarına göre izole edilen 81 maya suşundan 39 tanesinin yüksek ve 11 tanesinin düşük proteaz aktivitesine sahip olduğu gözlenirken 31 maya suşunda proteaz aktivitesi gözlenmedi (Tablo 52). *W. anomalus* olarak tanımlanan G-10, G-23 ve G-25 (düşük proteaz aktivitesi) maya suşları dışındaki tüm *W. anomalus* maya suşlarında yüksek proteaz aktivitesi belirlendi. Benzer şekilde *P. kudriavzevii* türüne ait maya suşlarının ve *C. intermedia* maya türüne ait W-1 suşunun yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi. Diğer iki *C. intermedia* maya suşunda (C-17 ev C-27) ise düşük proteaz aktivitesi tespit edildi. *D. hansenii* olarak tanımlanan 3 maya suşunda (C-24, C-25 ve C-26) düşük proteaz aktivitesi gözlenirken diğer suşlarda aktiviteye rastlanmadı. Benzer şekilde *K. marxianus* olarak tanımlanan 14 maya suşundan üç tanesinde (W-4, W-9 ve W-11) düşük proteaz aktivitesi gözlenirken diğer suşlarda aktivite gözlenmedi. *C. parapsilopsis* ve *Cl. lusitaniae* maya türlerine ait tüm suşlarda ve *Pichia* sp. olarak tanımlanan maya suşunda proteaz aktivitesine rastlanmadı. Proteaz aktivitesine sahip maya suşlarının ağırlıklı olarak keçi (20 maya suşu) ve çedar peynirinden (17 maya suşu) izole edildiği gözlemlendi. Beyaz peynirden ise iki maya suşunun (W-1 ve W-2) proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Endüstriyel olarak önemli yüksek proteaz aktivitesine sahip maya suşlarının ağırlıklı olarak *W. anomalus* maya türüne ait olduğu, diğer suşların ise *C. intermedia* (W-1) ve *P. kudriavzevii* (G-3 ev G4) maya türlerine ait olduğu belirlendi. Bu maya türlerine ait suşların yüksek proteolitik aktivitesi nedeniyle endüstriyel olarak önemli olduğu tespit edildi.

Tablo 52

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının proteolitik aktiviteleri

Maya Suşları	Yüksek Aktivite.	Düşük Aktivite	Aktivite Göstermeyen
<i>W. anomalous</i> (39)	C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-21, G-1, G-2, G-5, G-6, G-7, G-8, G-9, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-19, G-21, G-24, G-26, G-27 W-2	G-10, G-23, G-25	-
<i>K. marxianus</i> (14)	-	W-4, W-9, W-11	C-20, C-28, C-29, W-5, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-22, W-24
<i>C. parapsilosis</i> (12)	-	-	W-3, W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W-21, W-23, W-25
<i>D. hansenii</i> (6)	-	C-24, C-25, C-26	C-18, C-22, C-23
<i>Cl. lusitaniae</i> (4)	-	-	G-17, G-18, G-20, G-22
<i>C. intermedia</i> (3)	W-1	C-17, C-27	-
<i>P. kudriavzevi</i> (2)	G-3, G-4	-	-
<i>Pichia sp.</i> (1)	-	-	C-19

Peynir örneklerinde izole edilen maya suşlarından üç tanesi dışında lipaz aktivitesine rastlanmadı (Tablo 53). Düşük lipaz aktivitesine sahip üç maya suşunun (W-7, W-17 ve W-21) ise *C. parapsilosis* maya türüne ait olduğu ve beyaz peynirden izole edildiği belirlendi. Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarında endüstriyel olarak önemli lipaz aktivitesine rastlanmadı.

Tablo 53

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının lipolitik aktiviteleri

Maya Suşları	Yüksek Aktivite.	Düşük Aktivite	Aktivite Göstermeyen
<i>W. anomalus</i> (39)	-	-	C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-21, G-1, G-2, G-5, G-6, G-7, G-8, G-9, G-10, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-19, G-21, G-23, G-24, G-25, G-26, G-27, W-2
<i>K. marxianus</i> (14)	-	-	C-20, C-28, C-29, W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-22, W-24
<i>C. parapsilosis</i> (12)	-	W-7, W-17, W-21	
<i>D. Hansenii</i> (6)	-	-	C-18, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26
<i>Cl. lusitaniae</i> (4)	-	-	G-17, G-18, G-20, G-22
<i>C. intermedia</i> (3)	-	-	W-1, C-17, C-27
<i>P. kudriavzevi</i> (2)	-	-	G-3, G-4
<i>Pichia sp.</i> (1)	-	-	C-19

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarından 18 tanesinde yüksek ve 26 tanesinde düşük üreaz aktivitesi belirlenirken 37 maya suşunda üreaz aktivitesi belirlenemedi (Tablo 54). *D. Hansenii* ve *C. intermedia* maya türlerine ait tüm suşlarda ve *Pichia sp.* cinsine ait bir maya suşunda (C-19) yüksek üreaz aktivitesi gözlemlendi. Ayrıca, *C. parapsilosis* türüne ait iki maya suşunun (W-3 ve W-21), *K. marxianus* türüne ait bir maya suşunun (W-22) ve *W. anomalus* maya türüne ait beş maya suşunun (G-1, G-2, G6, G-7 ve G-11) yüksek üreaz aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. *K. marxianus* türüne ait diğer 13 maya suşunda üreaz aktivitesi tespit edilmedi. *C. parapsilosis* maya türüne ait diğer maya suşlarında ve *W. anomalus* türüne ait 12 maya suşunda düşük üreaz aktivitesi gözlenirken *W. anomalus* türüne ait kalan 22 maya suşunda suşunda üreaz aktivitesine rastlanmadı. Tanımlanan tüm *P. kudriavzevi* maya suşlarının (G-3 evG-4) düşük üreaz aktivitesine sahip

olduğu görüldü. *Cl. lusitaniae* olarak tanımlanan dört maya suşundan iki tanesi (G-17 ve G-18) düşük üreaz aktivitesi gösterirken, diğer iki suşun (G-20 ve G-22) üreaz aktivitesi olmadığı tespit edildi. Yüksek üreaz aktivitesine sahip maya suşlarının dokuz tanesinin çedar peynirinden, beş tanesinin keçi peynirinden ve dört tanesinin beyaz peynirden izole edildiği belirlendi. Endüstriyel olarak önemli üreaz aktivitesine sahip maya suşlarının *D. hansenii*, *W. anomalous*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *K. marxianus* ve tanımlanamayan *Pichia* sp. maya türleri olduğu belirlendi. *W. anomalous* maya türüne ait beş maya suşunun (G-1, G-2, G-6, G-7 ve G-11) ve *C. intermedia* maya türüne ait bir maya suşunun (W-1) yüksek proteaz ve üreaz aktivitesine sahip olmasından dolayı endüstriyel olarak önemli olduğu gözlemlendi.

Tablo 54

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının üreaz aktiviteleri

Maya Suşları	Yüksek Aktivite.	Düşük Aktivite	Aktivite Göstermeyen
<i>W. anomalous</i> (39)	G-1, G-2, G-6, G-7, G-11	G-10, G-12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-19, G-21, G-23, G-24, G-25, G-27	C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-21, G-26, G-5, G-8, G-9, W-2
<i>K. marxianus</i> (14)	W-22	-	C-20, C-28, C-29, W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-24
<i>C. parapsilosis</i> (12)	W-3, W-21	W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W-25	W-23
<i>D. hansenii</i> (6)	C-18, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26	-	-
<i>Cl. lusitaniae</i> (4)	-	G-17, G18	G-20, G-22
<i>C. intermedia</i> (3)	W-1, C-17, C-27	-	-
<i>P. kudriavzevi</i> (2)	-	G-3, G-4	-
<i>Pichia</i> sp. (1)	C-19	-	-

4.3.4. Maya Suşlarının Fermantatif Özellikleri

Peynir örneklerinden tanımlanan seksen bir maya suşunun dekstroz, galaktoz, sükkroz, laktoz, maltoz ve gliserol içeren ortamlarda fermantasyon kapasitesi belirlenerek elde edilen sonuçlar Tablo 55’te verildi. *K. marxainus* maya türüne ait sekiz maya suşunun, *W. anomalus* maya türüne ait yirmi altı maya suşunun, *C. parapsilosis* maya türüne ait bir maya suşunun, *D. hansenii* türüne ait dört maya suşunun, *Cl. lusitaniae* türüne ait iki maya suşunun ve *C. intermedia* maya türüne ait iki maya suşunun tüm karbon kaynaklarında fermantasyon kapasitesinin yüksek olduğu tespit edildi.

K. marxainus maya türüne ait dört maya suşunun (W-14, W-24, C-20 ve C-29) gliserolde, bir maya suşunun (C-28) maltozda ve bir maya suşunun (W-18) maltoz ve gliserolde fermantasyon kapasitesinin bulunmadığı, ancak diğer karbon kaynaklarında fermantatif özelliğe sahip olduğu tespit edildi. *W. anomalus* türüne ait on üç maya suşunun laktoz içeren ortamda fermantasyon kapasitesinin bulunmadığı ancak diğer karbon kaynaklarında fermantatif özelliğe sahip olduğu tespit edildi. *C. parapsilosis* maya türüne ait yedi maya suşunun laktoz içeren ortamda, iki maya suşunun (W-1 ve W-25) gliserol içeren ortamda ve iki maya suşunun (W-7 ve W-15) laktoz ve maltoz içeren ortamlarda fermantasyon yeteneğinin olmadığı diğer karbon kaynaklarında ise fermantatif özellik gösterdiği belirlendi. *D. hansenii* maya türüne ait iki maya suşunun (C-18 ve C-22) maltoz içeren ortamda, *Cl. lusitaniae* maya türüne ait iki maya suşunun laktoz içeren ortamda (G-20 ve G-22), *C. intermedia* maya türüne ait bir maya suşunun (C-17) gliserol içeren ortamda ve *Pichia* sp. maya suşunun (C-19) maltoz içeren ortamda fermantasyon kapasitesinin bulunmadığı, ancak bu maya suşlarının diğer karbon kaynaklarında fermantatif özelliğe sahip olduğu gözlemlendi. *P. kudriavzevii* maya türüne ait G-3 maya suşunun laktoz içeren ortamda, G-4 maya suşunun ise sükkroz, maltoz ve laktoz içeren ortamlarda fermantatif özelliğinin bulunmadığı tespit edildi.

Tablo 55

Peynir örneklerinde tanımlanan maya suşlarının farklı karbon kaynaklarında fermentasyon kapasiteleri

Maya Türü	Maya Suşu	Glu	Gal	Suk	Lak	Mal	Gli
<i>K. marxianus</i>	W-4, W-11, W-13, W-20, W-5, W-9, W-19, W-22	+	+	+	+	+	+
	W-14, W-24, C-20, C-29	+	+	+	+	+	-
	W-18	+	+	+	+	-	-
	C-28	+	+	+	+	-	+
<i>W. anomalous</i>	W-2, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-16, G-5, G-6, G-7, G-9, G-10, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-21, G-23, G-26, G-27	+	+	+	+	+	+
	C-1, C-3, C-8, C-12, C-15, C-21, G-1, G-2, G-8, G-16, G-19, G-24, G-25	+	+	+	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	W-3, W-6, W-12, W-17, W-23, W-8, W-16	+	+	+	-	+	+
	W-7, W-15	+	+	+	-	+	-
	W-10, W-25	+	+	+	+	+	-
	W-21	+	+	+	+	+	+
<i>D. hansenii</i>	C-23, C-24, C-25, C-26	+	+	+	+	+	+
	C-18, C-22	+	+	+	+	-	+
<i>Cl. lusitaniae</i>	G-17, G-18	+	+	+	+	+	+
	G-20, G-22	+	+	+	-	+	+
<i>C. intermedia</i>	W-1, C-27	+	+	+	+	+	+
	C-17	+	+	+	+	+	-
<i>P. kudriavzevii</i>	G-3	+	+	+	-	+	+
	G-4	+	+	-	-	-	+
<i>Piciha sp.</i>	C-19	+	+	+	+	-	+

Glu: Glukoz (Dekstroz), Gal: Galaktoz, Suk: Sükroz, Lak: Laktoz, Mal: Maltoz, Gli: Gliserol

4.3.5. Maya Suşlarının Termotolerans ve Osmotolerans Özellikleri

Peynir örneklerinden tanımlanan maya suşlarının termotolerans ve osmotolerans özellikleri belirlendi. Maya suşlarının termotolerans özelliklerini içeren sonuçlar Tablo 56'da verildi. Peynir örneklerinde tanımlanan *D. hansenii* (C-18, C-22, C-23, C-24, C-25 ve C-26), *C. intermedia* (C-17, C-27 ve W-1) ve *Pichia* sp. (C-19) maya türlerine ait tüm maya suşlarının 37 °C ve 45 °C sıcaklıkta üreme göstermediği belirlendi. *W. anomalus* maya türüne ait tüm maya suşlarının 37 °C sıcaklıkta üreme gösterirken 45 °C sıcaklıkta üreme göstermediği tespit edildi. *C. parapsilosis*, *Cl. lusitaniae* ve *P. kudriavzevii* maya türlerine ait tüm maya suşlarının hem 37 °C hem de 45 °C sıcaklıkta üreme gösterdiği gözlemlendi. *K. marxianus* maya türüne ait W-11 maya suşu hariç diğer tüm maya suşlarının 37 °C ve 45 °C sıcaklıklarda üreme gösterdiği tespit edildi.

Maya türlerinin osmotolerans özelliklerini içeren sonuçlar Tablo 57'de verildi. *C. parapsilosis*, *W. anomalus*, *D. hansenii*, *C. intermedia*, *Cl. lusitaniae*, *P. kudriavzevii* ve *Pichia* sp. maya türlerine ait tüm maya suşlarının %50 dekstroz içeren ortamda üreyebildiği ve bu nedenle osmotik dirence sahip oldukları tespit edildi. Peynir örneklerinden izole edilen *K. marxianus* maya türüne ait tüm maya suşlarının ise %50 dekstroz içeren ortamda üreme göstermedikleri görüldü.

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının fermentatif özellikleri, termotolerans ve osmotolerans özellikleri incelendiğinde, *C. parapsilosis* maya türüne ait W-21 maya suşunun, *W. anomalus* maya türüne ait C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-16, G-5, G-6, G-7, G-9, G-10, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-21, G-23, G-26, G-27 ve W-2 maya suşlarının ve *Cl. lusitaniae* maya türüne ait G-17 ve G-18 maya suşlarının fermentasyon kapasitelerinin ve stres dirençlerinin yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca, elde edilen sonuçlar enzim aktiviteleri ile birlikte değerlendirildiğinde W-1 *C. intermedia* maya suşunun, G-6, G-7 ve G-11 *W. anomalus* maya suşlarının hem fermentatif özelliklerinin, stres dirençlerinin yüksek olması hem de yüksek proteaz ve üreaz aktivitesine sahip olmaları nedeniyle endüstriyel olarak oldukça önemli maya suşları olduğu belirlendi. Ayrıca, *P. kudriavzevii* maya türüne ait G-3 ve G-4 maya suşlarının ve *W. anomalus* maya

türüne ait G-1 ve G-2 maya suşlarının hem stres direncinin yüksek olması hem de yüksek proteaz aktivitesine sahip olmasından dolayı endüstriyel olarak önemli maya suşları olduğu tespit edildi.

Tablo 56

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının termotolerans özellikleri*

Maya Türü	37 °C Test	45 °C Test
<i>C. parapsilosis</i>	W-3, W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W-21, W-23, W-25	W-3, W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W-21, W-23, W-25
<i>K. marxianus</i>	C-20, C-28, C-29, W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-22, W-24	C-20, C-28, C-29, W-4, W-5, W-9, W-11, W-13, W-14, W-18, W-19, W-20, W-22, W-24
<i>W. anomalous</i>	C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-21, G-1, G-2, G-5, G-6, G-7, G-8, G-9, G-10, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-19, G-21, G-23, G-24, G-25, G-26, G-27, W-2	-
<i>Cl. lusitaniae</i>	G-17, G-18, G-20, G-22	G-17, G-18, G-20, G-22
<i>P. kudriavzevii</i>	G-3, G-4	G-3, G-4

* *D. hansenii*, *C. intermedia* ve *Pichia* sp. maya türlerinin tamamı 37 ve 45°C sıcaklıkta üreme göstermediği için tabloda verilmedi.

Tablo 57

Peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının osmotolerans özellikleri*

Maya Türü	%50 Dekstroz
<i>C. parapsilosis</i>	W-3, W-6, W-7, W-8, W-10, W-12, W-15, W-16, W-17, W-21, W-23, W-25
<i>W. anomalus</i>	C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-21, G-1, G-2, G-5, G-6, G-7, G-8, G-9, G-10, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-19, G-21, G-23, G-24, G-25, G-26, G-27, W-2
<i>D. hansenii</i>	C-18, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26
<i>C. intermedia</i>	W-1, C-17, C-27
<i>Cl. lusitaniae</i>	G-17, G-18, G-20, G-22
<i>P. kudriavzevii</i>	G-3, G-4
<i>Pichia</i> sp.	C-19

* *K. marxianus* maya suşları üreme göstermediği için tabloda verilmedi.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Özellikle fermente gıdaların üretiminde mikroorganizmaların rolü oldukça önemlidir. Son yıllarda farklı stres direnci ve fermantasyon kapasitesi yüksek, farklı hücre dışı enzim aktivitelerine sahip maya suşları doğal habitatlardan izole edilerek endüstriyel alanda kullanımı hız kazanmıştır. Bu nedenle çalışmada yoğurt, ayran ve peynir örneklerinden izole edilen maya suşları tanımlanarak, stres direnci, fermantasyon kapasitesi ve hücre dışı enzim aktivitesi yüksek maya suşlarının belirlenmesi amaçlandı. İzole edilen maya suşları asimilasyon test kiti (API-ID32C) kullanılarak ve ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesi ve 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin PCR-RFLP ve DNA dizi analizi ile tanımlandı. Ayrıca, izole edilen maya suşlarının proteaz, lipaz ve üreaz aktiviteleri, farklı karbon kaynakları altındaki fermantatif özellikleri ve stres dirençleri (ısı ve osmotik stres) belirlendi.

Araştırmada, yoğurt örneklerinden 41, ayran örneklerinden 116 ve peynir örneklerinden 81 maya suşu canlandırıldı. Yoğurt örneklerinde maya yoğunluğu 6×10^3 CFU/g, ayran örneklerinde maya yoğunluğu $5,53 \times 10^3$ CFU/mL, beyaz peynirde maya yoğunluğu 5,34 CFU/g, çedar peynirinde maya yoğunluğu 4,44 CFU/g ve keçi peynirindeki maya yoğunluğu 4,74 CFU/gr olarak hesaplandı.

Daha önce yapılan çalışmalarda yoğurt örneklerinde maya yoğunluğu $0,6-1,8 \times 10^8$ CFU/g arasında, ev yapımı ayranlarda $1,7 \times 10^3$ CFU/mL, endüstriyel olarak üretilen ayranlarda ise $9,0 \times 10^7$ CFU/mL olduğu, peynirin olgunlaşma sürecine bağlı olarak maya yoğunluğunun 10^2 ile 10^6 CFU/g olduğu belirlenmiştir (Moreira vd., 2001; Kılıç vd., 2019; Patir vd., 2006; Fleet ve Mian, 1987; Welthagen ve Vijoen, 1996; Tofalo vd., 2014). Süt ürünlerindeki maya yoğunluğundaki bu farklılığın neden üretiminde kullanılan sütlerin çiğ ya da pastörize olmasıyla, kullanılan süt çeşidine göre besin içeriklerinin farklı olmasıyla ve üretim aşamasındaki çevresel faktörlerin (pH, tuz, vb.) değişken olmasıyla açıklanabilir.

Maya türlerinin geleneksel yöntemlerle tanımlanmasında, mayaların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri kullanılmaktadır. Ancak geleneksel yöntemlerin uzun zaman alması ve iş yükünün çok olması nedeni ile API-ID32C gibi hızlı tanı kitleri geliştirilmiştir. Ticari olarak hazırlanan bu tanı kitlerinin de maya türlerinin tanımlanmasında hatalı sonuçlar verebilmektedir. Son yirmi yıldır DNA temelli tanımlama yöntemleri, geleneksel yöntemler ve ticari kit sistemlerinin yerini almıştır (Kurtzman vd., 2011; Pincus vd., 2007; Spencer vd., 2011; Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008). Bu nedenle çalışmada süt ürünlerinden izole edilen maya suşları ticari tanı kiti (API-ID32C) ve ITS-5.8S ve 26S rDNA gen bölgelerinin PCR-RFLP analizleri sonrasında DNA dizi analizleri kullanılarak tanımlaması yapıldı.

Yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşlarının moleküler yöntemlerle *C. inconspicua*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *K. marxianus*, *M. guilliermondii*, *P. fermentans*, *Y. lipolytica* ve *S. cerevisiae* maya türlerine ait olduğu belirlendi. Yoğurt maya mikrobiyotasında *P. fermentans* ve *K. marxianus* maya türünün baskın olarak yer aldığı tespit edildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda, yoğurt örneklerinin barındırdığı maya biyotası belirlenmiş, *C. kefir* ve *S. cerevisiae* maya türünü yoğun olarak bulunduğu belirtilmiştir (Kılıç vd., 2019). Yürütülen başka bir çalışmada ise yoğurt örneklerinden izole edilen maya suşları geleneksel yöntemler kullanılarak tanımlanmış, *D. hansenii* ve *S. cerevisiae* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Schwan vd., 2001). Benzer şekilde başka bir çalışmada da yoğurt örneklerinden on üç maya türü tanımlanmış, *G. candidum*, *C. parapsilosis*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae/paradoxus* ve *K. marxianus* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (Maïworé vd., 2019). Yoğurdun barındırdığı maya biyotasında *S. cerevisiae*, *Mrakia frigida*, *Hansenula* spp., *C. parapsilosis*, *Debaryomyces castellii* ve *Candida maltosa* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu, sayıca daha az olsa da *Schizosaccharomyces pombe*, *D. hansenii*, *Candida mogii* ve *K. marxianus* maya türlerinin de yoğurt biyotasında yer aldığı rapor edilmiştir (Moreira vd., 2001). Çalışmamızda ise önceki çalışmalardan farklı olarak *P. fermentans* maya türünün yoğurt örneklerinde yoğun olarak bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *C. inconspicua*, *M. guilliermondii* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin ilk defa yoğurt örneklerinde dağılım gösterdiği çalışmamız ile

belirlenmiştir.

Ayran örneklerinde moleküler yöntemlerle *K. marxianus*, *C. parapsilosis*, *Cl. lusitaniae*, *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa*, *M. capitatus*, *Y. lipolytica*, *P. fermentans*, *K. lactis*, *C. metapsilosis*, *C. inconspicua* ve *W. anomalus* maya türleri tanımlanmıştır. Ev yapımı ayranlarda *Klyveromyces* ve *Saccharomyces* cinsine ait maya türlerinin bulunduğu, *K. lactis*, *S. cerevisiae* ve *Geotrichum* spp. maya türlerinin ise daha az bulunduğu rapor edilmiştir (Koçak and Avşar, 2009). Diğer bir çalışmada endüstriyel olarak üretilen ayranlarda *C. tropicalis*, *Geotrichum* spp., *Issatchenkia* spp., *Kluyveromyces* spp., *P. anomala*, *P. kluyveri*, *D. hansenii*, *Galactomyces* spp., *S. cerevisiae* ve *T. delbrueckii* maya türleri, ürdün tereyağı ile yapılan ayranlarda ise *G. geotrichum*, *I. orientalis*, *T. delbrueckii*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *P. kluyveri* ve *Trichosporon ovoides* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Büchl ve Seiler, 2011). Diğer bir çalışmada ise ayran mikrobiyotasında *C. parapsilosis* ve *Galactomyces geotrichum* maya türlerinin yer aldığı rapor edilmiştir (Mounier vd., 2017). Benzer şekilde çalışmamızda da *K. marxianus* ve *C. parapsilosis* maya türleri ayran örneklerinde yoğun olarak tespit edilmiştir. *Cl. lusitaniae*, *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica*, *R. mucilaginosa*, *M. capitatus*, *K. lactis* ve *C. metapsilosis* maya türleri ilk defa ayran örneklerinde çalışmamız ile tanımlanmıştır.

Peynir örneklerinde moleküler yöntemlerle *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *Cl. lusitaniae*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *P. kudriavzevii*, *W. anomalus* maya türleri tanımlanmıştır. C-19 maya suşu ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gen bölgesi ve D1/D2 domaininin DNA dizi analizi sonucunda tam olarak tanımlanamamış, ancak maya suşunun restriksiyon profilleri incelendiğinde ve dizi analizi sonucunda *Pichia* cinsine yakın olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmada bu maya türü *Pichia* sp. olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *W. anomalus* maya türünün peynir mikrobiyotasının baskın türü olduğu belirlenmiştir. Beyaz peynirde *C. parapsilosis*, *K. marxianus*, *C. intermedia* ve *W. anomalus* maya türleri, çedar peynirinde *W. anomalus*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *C. intermedia* ve *Pichia* sp. maya türleri ve keçi peynirinde *W. anomalus*, *Cl. lusitaniae* ve *P. kudriavzevii* maya türlerinin dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

Sert peynirlerin maya biyotasının belirlendiği çalışmalarda *C. catenulate*, *Candida etchellsii*, *Candida glabrosa*, *C. lambica*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *G. candidum*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *Kodamaea ohmeri*, *P. kudriavzevii*, *Rhodotorula* spp., *S. cerevisiae*, *Tr. cutaneum* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin sert peynirlerde yaygın olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Corbo vd., 2001; Fadda vd., 2004; Gardini vd., 2006; Capece ve Romano, 2009; Tofalo vd., 2014; Cardoso vd., 2015; Chombo-Morales vd., 2016). Sürülebilir peynirlerde ise *Candida xylophora*, *C. inconspicua*, *D. hansenii*, *G. candidus*, *K. marxianus*, *Pichia kudriavzevii*, *Trichosporon lactis* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin; peynir altı suyu ile yapılan yumuşak peynirlerde *D. hansenii* ve *Pichia membranefasciens* maya türlerinin baskın olarak bulunduğu, *T. delbrueckii*, *Pichia farinosa*, *Candida mogii*, *Candida intermedia*, *Zygosaccharomyces rouxii* ve *S. cerevisiae* maya türlerinin ise bu peynirlerde dağılım gösterdiği rapor edilmiştir (Pangallo vd., 2014; Lioliou vd., 2001). *D. hansenii*, *T. delbrueckii*, *C. zeylanoides*, *C. sake*, *C. famata*, *C. kefyra*, *Candida sphaerica*, *C. colliculosa*, *C. boidinii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *Cr. laurentii*, *C. krusei* ve *S. cerevisiae* maya türleri beyaz peynirden izole edilerek tanımlanmıştır (Özmen Togay vd., 2020; Uçar Gelen ve Ceylan, 2021). Çalışmamızda da beyaz peynirlerde *C. parapsilosis* ve *K. marxianus* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu gözlenmiştir.

Çedar peynirinde *D. hansenii* ve *Cr. albidus* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu, *Y. lipolytica*, *Rhodotorula minuta*, *T. delbrueckii*, *R. glutinis* ve *K. marxianus* maya türlerinin de çedar peynirinin biyotasında yer aldığı; *D. hansenii* maya türünün ise keçi peynirinin biyotasında baskın olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Özmen Togay vd., 2020; Welthagen ve Viljoen, 1999). Keçi peynirinin olgunlaşma sürecindeki maya biyotasının belirlendiği diğer bir çalışmada *K. lactis*, *D. hansenii* ve *Candida mesenterica* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (Padilla vd., 2014). Çalışmamızda çedar peynirinde *W. anomalus* ve *D. hansenii* maya türlerinin, keçi peynirinde ise *W. anomalus* ve *Cl. lusitaniae* maya türlerinin yoğun olarak bulunduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda peynir örneklerinde genel olarak *D. hansenii*, *K. marxianus*, *C. parapsilosis* maya türleri yoğun olarak bulunurken, çalışmamızda *W. anomalus* çedar ve keçi peynirinde yoğun olarak maya biyotasını oluşturduğu belirlenmiştir.

Maya türlerinin hızlı tanımlanmasında, bir asimilasyon testi olan API-ID32C kit sistemi özellikle klinik izolatların tanımlanması için kullanılmaktadır (Bayram vd., 2012; Osuntokun vd., 2018). Çalışmada, yoğurt, ayran ve peynir örneklerinden izole edilen maya suşlarının API-ID32C kit sistemi ve moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında, moleküler yöntemlerin API-ID32C kit sistemi ile gerçekleştirilen tanımlamaya göre daha güvenilir sonuçlar vermiştir. Daha önce yürütülen bir çalışmada, Vitek MS ile tanımlanmış olan klinik maya izolatlarının API-ID32C kit sistemi ile tanımlanması karşılaştırılmıştır. Çalışmada, 175 farklı maya suşunun 160 tanesi API-ID32C kit sistemi ile doğru olarak tanımlanmış ve maya türlerinin doğru tanımlama oranını %91,42 olarak belirlenmiştir (Duran-Valle vd., 2014). Başka bir çalışmada ise ticari tanı sistemleri olan API-ID32C, Vitek ve Auxacolor yöntemleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yaygın olarak bilinen maya türlerini API-ID32C kit sistemi %94 oranında doğru tanımlarken, daha az bilinen maya türleri için bu oranın %54 olduğu rapor edilmiştir (Meletiadis vd., 2011). Çalışmamızda izole edilen toplam 238 maya suşundan 35 tanesi API-ID32C test sonuçlarına göre farklı tanımlanmıştır. Moleküler yöntemler ile yapılan tanımlamaya oranla API-ID32C tanı kitinin doğruluk oranı %85,3 olarak belirlenmiştir. Maya türlerinin moleküler yöntemlerle tanımlanmasında sıklıkla PCR-RFLP analizi ve rDNA genlerinin dizileme analizleri kullanılmaktadır. 5.8S ve ITS rDNA bölgelerinin PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle maya türlerinin kısa sürede tanımlanması yapılmaktadır (Clemente-Jimenez vd., 2004; Combina vd., 2005; Nisiotou ve Nychas, 2007; Zott vd., 2008).

Mikrobiyal enzimler biyoyakıt üretimi, tıp ve ilaç endüstrisi, gıda endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle, fermente süt ürünlerinin eldesinde, bira ve şarap gibi alkollü içeceklerin yapımında ve fırıncılık alanında yaygın olarak mikrobiyal enzimlerden yararlanılmaktadır. Fermente ürünlerin üretiminde ürünlerin besin değerlerinin artırılmasında ve tat, koku ve şekilsel özelliklerinin oluşturulmasında mikrobiyal enzimler oldukça etkilidir (Wang vd., 2012). Bu nedenle çalışmada izole edilen maya suşlarının endüstriyel olarak önemli olan proteaz, lipaz ve üreaz aktiviteleri araştırılmıştır.

Proteazlar, alkalik ve asidik proteazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır ve deterjan sanayisi, deri işleme, tıp, gıda işleme sürecinde, hayvan yemi üretiminde ve bir dizi kimyasal

uygulamalarda kullanılmaktadır (Yang vd., 2013). Daha önce yapılan çalışmalarda maya suşlarının proteolitik aktiviteleri incelenmiş ve *P.membranifaciens*, *Pichia spartinae*, *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *C. palmioleophila*, *Cr. albidus*, *Candida* sp., *Trichosporon montevideense*, *Pseudozyma* sp., *T. delbrueckii*, *Y. lipolytica* maya türlerinin proteaz *A. pullans* maya türlerinde proteaz aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (Yang vd., 2013; Chi vd., 2009). Çalışmamızda *W. anomalus* türüne ait 36 maya suşu, *P. fermentans* türüne ait 2 maya suşu, *K. marxianus* türüne ait 3 maya suşu, *S. cerevisiae* türüne ait 2 maya suşu, *P. kudriavzevii* türüne ait 2 maya suşu, *Y. lipolytica*, *C. intermedia* türlerine ait birer maya suşunun proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, *W. anomalus*, *C. intermedia* türleri ile *Pichia* ve *Candida* cinsinde ait türlerde proteaz aktivitesinin olduğu, ayrıca *D. hansenii* maya türünün proteolitik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Jakobsen ve Narvhus, 1996; Capece ve Romano, 2009; Özlü vd., 2022; Yang vd., 2013). Enzim aktivitelerinin aynı maya türüne ait suşlar arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Lipazlar, proteaz ve karbonhidrazlardan sonra üçüncü büyük enzim olarak birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Yang vd., 2013). Lipazlar, endüstride ve biyoteknolojik çalışmalarda potansiyel bir biyokatalist olarak görev yapmaktadır. Lipaz enzimi dericilik, tekstil, kozmetik, biyoyakıt üretimi, deterjan üretimi, tıp ve eczacılıkta, süt ürünlerinin oluşumu ve olgunlaşmasında, biyosurfaktan üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kumar vd., 2023). Daha önce yapılan çalışmalarda *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *Cr. curvatus*, *T. delbrueckii*, *Tr. montevideense*, *Filobasidium uniguttulatum*, *Pichia antarctica*, *Candida cylindracea*, *C. rugosa*, *G. candidum*, *Sporidiobolus* spp., *Trichosporon beigeli*, *Trichosporon fermentans* ve *Y. lipolytica* maya türlerinin lipaz aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Yang vd., 2013; Kurtzman vd., 2011). Ayrıca, *Yarrowia* sp., *Cryptococcus* sp., bazı *Candida* türleri, *M. guiliermondii*, *Candida utilis*, *M. capitatus*, *C. rugosa*, *C. utilis*, bazı *Pichia* türleri ve bazı *Rhodotorula* türlerine ait suşların lipaz üretiminde kullanıldığı rapor edilmiştir (Kumar vd., 2023). Çalışmamızda ayran örneklerinden izole edilen *P. fermentans* türüne ait yedi maya suşunda lipolitik aktivite belirlenmiştir. Diğer maya suşlarında lipolitik aktivite belirlenmemesinin nedeni süt ürünlerinin üretim aşamalarındaki çevresel etmenlerin, pastörizasyon süreçlerinin, kullanılan substrat çeşidinin etkili olduğu düşünülmektedir.

Üreaz (amidohidrolaz) bitki, alg, mantar ve bakteriler tarafından üretilen bir enzimdir. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından da üretilebilen üreaz enzimi, ürenin amonyum iyonlarına ve karbondioksite hidrolizini sağlamaktadır. Ayrıca, mikrobiyal üreazlar biyoteknolojik uygulamalarda, tarımsal uygulamalarda, tıp alanında, biyosensör olarak kullanılmaktadır (Mekonnen vd., 2021). Üreaz maya hücreleri tarafından da üretilmekte olup, özellikle bazidiyomiset maya türleri üreaz aktivitesine sahipken, askomiset maya türlerinin üreaz aktivitesine sahip olmadığı rapor edilmiştir (Peter ve Daek, 1991). Çalışmamızda *Y. lipolytica* türüne ait 12 maya suşu, *R. mucilaginosa* maya türüne ait 11 maya suşu, *M. capitatum* türüne ait 8 maya suşu, *D. hansenii* maya türüne ait 6 maya suşu, *W. anomalus* maya türüne ait 5 maya suşu, *C. parapsilosis* maya türüne ait 4 maya suşu, *C. intermedia* maya türüne ait 3 maya suşu, *K. marxianus* maya türüne ait 2 maya suşu ile *C. inconspicua*, *Cl. lusitaniae* ve *Pichia* sp. türlerine ait 1'er maya suşunun üreaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Fermente gıda üretiminde kullanılan mikroorganizmaların fermentatif özelliklerinin bilinmesi kaliteli fermente ürün eldesi için oldukça önemlidir. Yoğurt, peynir, ekmeğe, biyoyakıt üretimi gibi birçok endüstriyel alanda mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Sıcaklık, pH, besi ortamının içeriği, çözülmüş oksijen ve karbondioksit vb.) gibi bazı çevresel faktörler mikroorganizmaların fermentasyon yeteneklerini etkilemektedir. Bu nedenle fermente ürünlerin tat, koku, lezzet, kimyasal özellikleri ve besin kalitesi gibi özellikleri değişkenlik göstermektedir (Vilela, 2019; Maicas, 2020). Mayalar fermentatif özelliklerinin yanında yaşadıkları habitatlara göre ekstremofilik özellik gösterebilir. Maya hücreleri sıcaklık, pH, osmotik stres, basınç ve radyasyon gibi olumsuz koşullar altında da hayatlarını sürdürebilmektedir (Buzzini vd., 2017; Segal-Kischinevsky vd., 2022). Ekstrem koşullarda yaşayan mayaları biyoremediasyon, biyokontrol, ilaç araştırmaları, biyolojik temel araştırmalar, protein üretimi, gıda, enzim ve biyoyakıt üretimi gibi alanlarda biyoteknolojik uygulamaların geliştirilmesi için imkan sağlamıştır (Segal-Kischinevsky vd., 2022). Bu nedenle izole edilen maya suşlarının fermentasyon yetenekleri, osmotolerans ve termotolerans özellikleri belirlenmiştir. Yoğurt örneklerinden izole edilen 3 maya suşunun ayran örneklerinden 29 maya suşunun ve peynir örneklerinden 18 maya suşunun ekstremofilik özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. *C. famata*, *C. parapsilosis*, *D. hansenii*, *P. kudriavzevii* ve *W. anomalus* maya türlerinin osmotolerans özelliğe, *D. hansenii*, *K.*

marxianus ve *P. kudriavzevii* maya türlerinin ise termofilik ve osmofilik özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Breuer ve Harms 2006; Yamamoto vd., 2015; Choi vd., 2017). Yürütülen diğer bir çalışmada *K. marxianus*, *Lachancea thermotolerans*, *Ogataea thermophila* ve *Ogataea polymorpha* maya türlerinin de termofilik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Buzzini vd., 2017). Çalışmamızda *C. parapsilosis*, *D. hansenii*, *P. kudriavzevii*, *C. tropicalis*, *Cl. lusitaniae* ve *M. guilliarmondii* maya türlerinin ekstremofilik özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Yoğurttan izole edilen *Y. lipolytica* maya türüne ait üç maya suşu (Y-17, Y-25 ve Y-27), *S. cerevisiae* maya türüne ait dört maya suşunun (Y-28, Y-31, Y-33 ve Y-38), *K. marxianus* maya türüne ait beş maya suşunun (Y-9, Y-16, Y-18, Y-24 ve Y-41), *P. fermentans* maya türüne ait Y-5 maya suşunun ve *C. parapsilosis* maya türüne ait Y-40 maya suşunun endüstriyel olarak önemli maya suşları olduğu belirlenmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen *C. parapsilosis* maya türüne ait W-21 maya suşunun, *W. anomalus* maya türüne ait C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-16, G-5, G-6, G-7, G-9, G-10, G-11, G-12, G-13, G-14, G-15, G-21, G-23, G-26, G-27 ve W-2 maya suşlarının, *Cl. lusitaniae* maya türüne ait G-17 ve G-18 maya suşlarının yüksek fermantatif özelliğe sahip olduğu ve stres direncinin (osmotik ve ısı stresi) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen sonuçlara göre *C. intermedia* maya türüne ait W-1 maya suşunun, *W. anomalus* türüne ait G-6, G-7 ve G-11 maya suşlarının fermantatif özelliklerinin ve stres dirençlerinin yüksek olması ve yüksek enzim (proteaz ve üreaz) aktivitesine sahip olması nedeniyle endüstriyel olarak oldukça önemli maya suşları olduğu belirlenmiştir. *P. kudriavzevii* maya türüne ait G-3 ve G-4 maya suşlarının stres direncinin yüksek olması ve yüksek proteaz aktivitesine sahip olması nedeniyle, *W. anomalus* maya türüne ait G-1 ve G-2 maya suşlarının yüksek proteaz ve üreaz aktivitesine sahip olmasının yanında stres direncinin de yüksek olması nedeniyle endüstriyel olarak önemli maya suşları olduğu tespit edilmiştir.

Ayrandan *C. metapsilosis* maya türüne ait A-62 suşunun, *C. parapsilosis* maya türüne ait A-97, A-104, A-107, A-110, A-112, A-113 ve A-116 suşlarının, *Cl. lusitaniae* maya türüne ait A-16, A-22, A-31, A-33, A-54, A-83, A-90, A-96 ve A-108 suşlarının, *W. anomalus* maya türüne ait A-114 suşunun ve *S. cerevisiae* türüne ait A-17, A-18, A-27, A-30, A-34, A-35, A-36, A-39, A-43, A-52 ve A-53 maya suşlarının tüm karbon

kaynaklarındaki fermantasyon kapasitelerinin ve stres dirençlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. *S. cerevisiae* maya türüne ait A-18 maya suşu fermentasyon yeteneğinin yüksek olması ve proteolitik aktiviteye sahip olması nedeni ile endüstriyel olarak önemlidir. Sonuç olarak, yoğurt, ayran ve peynirden izole edilen ve *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *P. kudriavzevii*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis*, *W. anomalous*, *Cl. lusitaniae*, *C. intermedia* ve *C. metapsilosis* olarak tanımlanan maya suşlarının endüstriyel olarak önemli maya suşları olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda endüstriyel olarak önemli olduğu belirlenen bu maya suşları için patent alma çalışmaları yapılması, enzim aktiviteleri baz alınarak enzim üretimi için çalışmalar yapılması uygun olacaktır. Ayrıca, maya suşlarının endüstriyel alanda fermente ürün eldesinde ürün oluşumuna etkisinin incelenmesi, sağlık alanında ise bu maya suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ileriki çalışmalar için önerilebilir.

KAYNAKÇA

- Aehle, W. (Ed.) (2004). *Enzymes in Industry. Production and Applications*, Wiley VCH, Weinheim.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., ve Lipman, D. J. (1990). “Basic local alignment search tool”. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Bilinski, C. A., Russell, I., ve Stewart, G. G. (1987). “Applicability of yeast extracellular proteinases in brewing: physiological and biochemical aspects.” *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (3), 495–49. <https://doi.org/10.1128/aem.53.3.495-499.1987>.
- Breuer, U. ve Harms, H. (2006). “*Debaryomyces hansenii* -an extremophilic yeast with biotechnological potential”. *Yeast*, 23 (6), 415-437. <http://doi.org/10.1002/yea.1374>.
- Brink, B., (2010). *Urease Test Protocol*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Briones, A. I., Ubeda, J. F., ve Fernández, M. (2000). “Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making”. *International Journal of Food Microbiology*, 59 (1-2), 29–36. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00283-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00283-x).
- Büchl, N. R., ve Seiler, H. (2011). “Yeasts and molds — Yeasts in milk and dairy products”. J.W. Fuquay (ed.). in: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 744–753). Academic Press, San Diego.
- Capece, A., ve Romano, P. (2009). “Pecorino di Filiano" cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*”. *International Journal of Food Microbiology*, 132 (2-3), 180–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.007>.
- Cardoso, V. M., Borelli, B. M., Lara, C. A., Soares, M. A., Pataro, C., Bodevan, E. C., ve Rosa, C. A. (2015). “The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese”. *Food Research International*, 69, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>.
- Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J. ve Wang, X., (2009). “Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their

potential applications”. *Biotechnology Advances*, 27 (3), 236–255.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.002>

Choi, D. H., Eun-Hee Park, E. H. ve Kim, M. D. (2017). “Isolation of thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* from nuruk”. *Food Science and Biotechnology*, 26, 1357–1362.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s10068-017-0155-6>.

Chombo-Morales, P., Kirchmayr, M., Gschaedler, A., Lugo-Cervantes, E., ve Villanueva-Rodríguez, S. (2016). “Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE”. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 1153–1161.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.044>.

Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martinez-Rodriguez, S., Las Heras-Vazquez, F. J., and Rodriguez-Vico, F. (2004). “Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must”. *Food Microbiology*, 21 (2), 149–155.
[https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-7).

Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C., ve Catania, C. (2005). “Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina”. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (5), 1055–1061.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02540.x>.

Corbo, M. R., Lanciotti, R., Albenzio, M., ve Sinigaglia, M. (2001). “Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region”. *International Journal of Food Microbiology*, 69 (1-2), 147–152.
[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00585-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00585-2).

Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Mulargia, A. F. ve Palmas F. (2001). “Yeasts associated with Sardinian ewe’s dairy products”. *International Journal of Food Microbiology*, 69 (1-2), 53–58. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00572-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00572-4).

Duran-Valle, M. T., Sanz-Rodríguez, N., Muñoz-Paráiso, C., Almagro-Moltó, M., ve Gómez-Garcés, J. L. (2014). “Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32C”. *Medical Mycology*, 52 (4), 342–349.
<https://doi.org/10.1093/mmy/myt036>.

- Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Deplano, M., ve Cosentino, S. (2004). “Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese”. *International Journal of Food Microbiology*, 95 (1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001>.
- Fleet, G. ve Mian, M. A. (1987). “The occurrence and growth of yeasts in dairy products”. *International Journal of Food Microbiology*., 4 (2), 145-155. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90021-3).
- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M. E., ve Lanciotti, R. (2006). “Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese”. *Food Microbiology*, 23 (7), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.005>.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., ve Mounier, J. (2017). “Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products”. *International journal of food microbiology*, 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>.
- Gibson, B.R., Pham, T., Wimalasena, T., Box, W.G., Koivuranta, K., Storgards, E., ve Smart, K. A. (2011). “Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery ‘wild’ yeast contaminants.”, *Journal of The Institute of Brewing*, 117 (4), 556–568. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00504.x>
- Godfrey, T., ve West, S. I., (1996). “Introduction to Industrial Enzymology”. Godfrey, T., West S. (eds.). in: *Industrial Enzymology*, (pp.1-8). Macmillan Press, London
- Hasan, F., Shah, A. A., ve Hameed, A., (2006). “Industrial Applications of Lipases”. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (2), 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>.
- Helmy, E. A., Soliman, S. A., Abdel-Ghany, T. M. ve Ganash, M. (2019). “Evaluation of potentially probiotic attributes of certain dairy yeast isolated from buffalo sweetened Karish cheese”. *Heliyon*, 5(5), e01649. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01649>.
- Hou, J., Tyo, K. E., Liu, Z., Petranovic, D., ve Nielsen, J. (2012). “Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*”. *FEMS Yeast Research*, 12 (5), 491–510. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00810.x>

- Jakobsen, M., ve Narvhus, J. (1996). “Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products”. *International Dairy Journal*, 6 (8-9), 755–768. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00071-2](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00071-2).
- Johnson E. A. (2013). “Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts--the ascomycetes”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 503–517. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4497-y>.
- Johnson, E.A. ve Echavarri-Erasun, C., (2011). “*Yeast Biotechnology*”, Kurtzman, P.C., Fell, J.W., ve Boekhout, T. (eds.). in: *The Yeasts, a Taxonomic Study*, (pp. 22-44) Elsevier B.V.
- Kabak, B., ve Dobson, A. D. (2011). “An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 248–260. <https://doi.org/10.1080/10408390903569640>.
- Karaduman, A., Özaslan, M., Kılıç, I. H. ve Oğuzkan, S. B. (2019). “Identification and isolation of the yeasts in traditional yogurts collected from villages in Gaziantep, Turkey”. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, 13(5),10325-10328. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.13.002478>
- Karasu-Yalcin, S., Senses-Ergu, ve S., Ozbas Z. Y. (2017). “Enzymatic characterization of yeast strains originated from traditional mihalic cheese”. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 6(5), 1152-1156. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.5.1152-1156>.
- Karki, T. B., Timilsina, P. M., Yadav, A., Pandey, G. R., Joshi, Y., Bhujel, S., Adhikari, R., ve Neupane, K. (2017). “Selection and characterization of potential baker’s yeast from indigenous resources of Nepal.”, *Biotechnological Research International*, Article ID: 1925820, <https://doi.org/10.1155/2017/1925820>.
- Kılıçoğlu, M. Ç. ve Özkoç, İ., (2008). “Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler”. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(1), 65-72.
- Kirk, O., Borchert, T. V., ve Fuglsang, C. C. (2002). “Industrial enzyme applications”. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345–351. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00328-2).

- Koçak, C. C. ve Avşar, Y. K. (2009). "Ayran: Microbiology and technology" F. Yıldız (ed.). in: *Development and Manufacture of Yogurt and Functional Dairy Products*. (pp. 123-141). CRC Press, Boca Raton, U.S.
- Kumar, A., Verma, V., Dubey, V. K., Srivastava, A., Garg, S. K., Singh, V. P., ve Arora, P. K. (2023). "Industrial applications of fungal lipases: a review." *Frontiers in Microbiology*, 14, 1142536. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142536>.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., ve Tamura, K. (2018). "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms". *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kurtzman, C. P., ve Robnett, C. J. (1998). "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences". *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. ve Robert, V. (2011). "Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts". P. Kurtzman, J. W. Fell ve T. Boekhout (eds.). in: *The Yeasts, a Taxonomic Study*. (pp. 87-110). Elsevier, USA.
- Lioliou, K., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., ve Robinson, R. K. (2001). "Changes in the microflora of Manouri, a traditional Greek whey cheese, during storage". *International Journal of Dairy Technology*, 54(3), 100–106. <https://doi.org/10.1046/j.1364-727x.2001.00017.x>.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., ve Kristjuhan, A. (2011). "Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications". *BioTechniques*, 50(5), 325–328. <https://doi.org/10.2144/000113672>.
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., ve Prillinger, H. (2006). "Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques". *Food Microbiology*, 23(4), 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.05.001>.
- Maicas, S. (2020). "The role of yeasts in fermentation processes". *Microorganisms*, 8 (8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>.

- McMahon, H., Zoecklein, B.nW., Fugelsang, K., ve Jasinski Y. (1999). “Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 198–203. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900720>.
- Mekonnen, E., Kebede, A., Nigussie, A., Kebede, G., ve Tafesse, M. (2021). “Isolation and characterization of urease-producing soil bacteria”. 2021, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2021/8888641>.
- Meletiadis, J., Arabatzis, M., Bompola, M., Tsiveriotis, K., Hini, S., Petinaki, E., Velegraki, A., ve Zerva, L. (2011). “Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates.” *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7): 2722–2727. <https://doi.org/10.1128/JCM.01253-10>.
- Merchana, A. V., Benito, M. J., Galvána, A. I. ve Seco de Herrera, S. R. M. (2020). “Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese”. *LWT - Food Science and Technology*, 124, 2020, 109173. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109173>
- Moreira, S. R., Schwan, R. F., de Carvalho, E. P. ve Wheals, A. E. (2001). “Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil”. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 (2), 117-122. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000200009>.
- Moubasher, A. A. H., Abdel-Sater, M. A. ve Soliman, Z. S. M. (2017). “Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt”. *Journal de Mycologie Médicale*, 28 (1) 76—86. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.003>.
- Osuntokun, O. T., Thonda, O. A., ve Ige, O. O. (2018). “Use of the biomereux ID32C fungal identification system for fungal isolated from mother & child hospital dump site in akure, Ondo State Nigeria”. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*. 6 (1), 12-17. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00168>.
- Ozturkoglu Budak, S., Figge, M. J., Houbraken, J. ve de Vries, R. P. (2016a). “The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening”. *International Dairy Journal*, 58, 50-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.09.011>.

- Ozturkoglu-Budak S., Wiebenga, A., Peter A. Bron, P. A. ve de Vries, R. P. (2016b). "Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese". *International Journal of Food Microbiology*, 237, 17–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007>.
- Özlü, B. G., Terzi, Y., Uyar, E., Shatila, F. ve Tansel Yalçın, H. (2022). "Characterization and determination of the potential probiotic yeasts isolated from dairy products". *Biologia*, 77, 1471–1480. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01032-8>.
- Özmen Togay, S., Capece, A., Siesto, G., Aksu, H., Sandıkçı Altunalmaz, S., Yılmaz Aksu, F., Romano, P., ve Karagül Yüceer, Y. (2020). "Molecular characterization of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses". *Food Science Technology*, 40 (4), 871-876. <https://doi.org/10.1590/fst.24319>.
- Padilla, B., Manzanares, P. ve Belloch, C. (2014) "Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses". *Food Microbiology*, 38, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.002>.
- Pandey, A., Webb, C., Coccol, C. R., ve Larroche, C., (Eds). (2006). *Enzyme Technology*. Springer. Asiatech Publishers, New Delhi.
- Pangallo, D., Saková, N., Koreňová, J., Puškárová, A., Kraková, L., Valík, L., ve Kuchta, T. (2014). "Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese". *International Journal of Food Microbiology*, 170, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.015>.
- Patir, B., Öksüztepe, G., Seker, P. ve Dikici, A. (2006). "Elazığ' da tüketimi sunulan açık ayranlar ile orijinal ambalajlı ayranların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi". *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20(5), 357- 363.
- Peter, G. ve Daek, T. (1991). "On the false positive urease activity of *Yarrowia lipolytica*". *Antonie van Leeuwenhoek*, 60, 55-59. <https://doi.org/10.1007/BF00580442>.
- Pincus, D. H., Orenge, S. ve Chatellier, S., (2007). "Yeast identification past, present, and future methods". *Medical Mycology*. 45 (2), 97-121. <https://doi.org/10.1080/13693780601059936>.

- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., ve Kapadnis, B. (2013). "Actinomycetes: A repertory of green catalysts with a potential revenue resource". *BioMed Research International*, 2013, 264020. <https://doi.org/10.1155/2013/264020>.
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., ve Brauer, M., (1992). "Diversity of yeasts in selected dairy products". *Journal of Applied Bacteriology*, 72 (5), 370-376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01848.x>
- Rosi, I., Vinella, M., ve Domizio, P., (1994). "Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin". *Journal of Applied Bacteriology*, 77 (5) 519-527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04396.x>.
- Sanchez, S., ve Demain, A. L., (2011). "Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance". *Organic Process Research & Development*, 15(1), 224-230. <https://doi.org/10.1021/op100302x>
- Schwan, R. F., Moreira, S. R., de Carvalho, E. P., ve Wheals, A. E. (2001). Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 (2), 117-122. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000200009>.
- Spencer, J., Rawling, S., Stratford, M., Steels, H., Novodvorska, M., Archer, D. B. ve Chandra, S., (2011). "Yeast identification: reassessment of assimilation tests as sole universal identifiers". *Letters in Applied Microbiology*, 53 (5), 503-508. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03130.x>
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Picca Nicolino, M., Voordeckers, K., ve Verstrepen, K. J. (2014). "Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity". *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 947–995. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12073>.
- Strauss, M. L., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., ve van Rensburg, P. (2001). "Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts". *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 182–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x>

- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., ve Odds, F. C. (2005). “*Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 284–292. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>.
- Tofalo, R., Fasoli, G., Schirone, M., Perpetuini, G., Pepe, A., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2014). “The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese”. *International Journal of Food Microbiology*, 187, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.029>.
- Uçar Gelen, S. ve Ceylan, Z. (2021). “Isolation and identification of yeasts in white cheese”. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6 (2), 100-105. <https://doi.org/10.31797/vetbio.907007>.
- Vakhlu, J., ve A. Kour, (2006). “Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning”. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9 (1), 69–85. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-9>.
- Van den Tempel, T., ve Jakobsen, M., (1998). “Yeasts associated with Danablu”. *International Dairy Journal*, 8 (1), 25-31. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00013-2)
- Vasdinyei, R., ve Deak, T., (2003). “Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques”. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 123– 130. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00251-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00251-4).
- Vilela, A. (2019). “The importance of yeasts on fermentation quality and human health-promoting compounds”. *Fermentation*, 5 (2), 46. <https://doi.org/10.3390/fermentation5020046>.
- Viljoen, B. C., ve Greyling, T. (1995). “Yeasts associated with Cheddar and Gouda making”. *International Journal of Food Microbiology*, 28 (1), 79–88. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00114-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00114-1)
- Wang, X., Li, S., Yang, X., Yang, S., ve Zhu, M. (2012). “Technology prospecting on enzymes: application, marketing, and engineering”. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2 (3), 1-11. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>.

- Welthagen, J. J. ve Viljoen, B. C. (1999). “The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese”. *Food Microbiology*, 16, 63-73. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0219>.
- Welthagen, J. J., ve Viljoen, B. C. (1996) “The presence of yeasts in different cheese types”. Jakobsen, M., Narvhus, J., ve Viljoen B.C. (eds.) in: *Yeasts in The Dairy Industry: Positive and Negative Aspects*. (pp. 78-87) Copenhagen, Denmark.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., ve Taylor, J. (1990). “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, ve T. J. White (eds.). in: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. (pp. 315-322). Academic Press Inc. San Diego.
- Wojtatowicz, M., Chrzanowska, J., Juszczak, P., Skiba, A. ve Gdula, A. (2001). “Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese”. *International Journal of Food Microbiology*, 69 (1-2), 135-140. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00582-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00582-7).
- Yamamoto, H., Shima, T., Yamaguchi, M., Mochizuki, Y., Hoshida, H, Kakuta, S., Kondo-Kakuta, C., Noda, N. N., Inaqaki, F., Itoh, T., Akada, R. ve Ohsumi, Y. (2015). “The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* is a useful organism for structural and biochemical studies of autophagy”. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (49), 29506–29518. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.684233> .
- Yang, Q., Zhang, H., Li, X., Wang, Z., Xu, Y., Ren, S., Chen, X., Xu, Y., Hao, H., ve Wang, H. (2013). “Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems”. *Bioresource Technology*, 129, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.101>