

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**BEYAZ PEYNİRLERDE BOZULMAYA NEDEN
OLAN *YARROWIA LIPOLYTICA* VE *DEBARYOMYCES*
HANSENI'NİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
İDENTİFİKASYONU**

H. Tansel ÖZTÜRK YALÇIN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.04

Sunuş Tarihi: 21\ 09 \2007

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Füsun UÇAR

Bornova-İzmir

III

H. Tansel ÖZTÜRK YALÇIN tarafından **Doktora Tezi** olarak sunulan “**Beyaz Peynirlerde Bozulmaya Neden Olan *Yarrowia lipolytica* ve *Debaryomyces hansenii*’nin Fenotipik ve Genotipik İdentifikasyonu**” başlıklı bu çalışma, E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 21/09/2007 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Füsun UÇAR

Raportör Üye : Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ

Üye : Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU

Üye : Prof. Dr. Abdurrahman Ü. TAMER

Üye : Doç. Dr. Ataç UZEL

ÖZET**BEYAZ PEYNİRLERDE BOZULMAYA NEDEN OLAN
YARROWIA LIPOLYTICA VE DEBARYOMYCES HANSENİİ'NİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK İDENTİFİKASYONU**

ÖZTÜRK YALÇIN, H.Tansel
Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Füsün UÇAR

Eylül 2007, 207 sayfa

Farklı beyaz peynirlerde bozulmaya neden olan 92 maya suşu izole edilmiş ve bu isolatların identifikasyonları Barnett ve ark.'na (2000) göre yapılmıştır. Tanılanan isolatların 8 genusa ait 13 farklı tür olduğu saptanmıştır. En yaygın olarak bulunan isolatlar *Debaryomyces hansenii* (%32,6), *Kluyveromyces marxianus* (%18,5) ve *Yarrowia lipolytica* (%17,4) olarak tanılanmıştır. Tanılanan diğer genuslar ise *Pichia*, *Torulasporea*, *Candida*, *Williopsis*, *Galactomyces*'dir. Fenotipik tanılamada en sık rastlanan bozulma etkeni türler olarak belirlenen *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* türleri, 5,8 S ribozomal DNA' daki türe spesifik internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin PCR amplifikasyonu (ITS-PCR) ile de genotipik olarak karakterize edilmiştir. Yapılan genotipik tanılama sonucunda, 15 *Y. lipolytica* straini ve 25 *D. hansenii* straini sırayla 360bp ve 640bp uzunluğunda karakteristik tek bir bant oluşturmuşlardır.

Biyokimyasal ve fizyolojik karakteristiklere dayalı konvansiyonel metodlar kullanıldığında, tanılama uzun zaman almakta ve çoğunlukla yanlış sonuçlanabilmektedir. Bu çalışmadaki *D. hansenii*'nin 5 straini ile

VI

Y. lipolytica'nın bir straini'nin konvansiyonel metodlarla yanlış tanılanması yukarıda belirtilen tezi doğrulamaktadır. O nedenle ITS-PCR, konvansiyonel metodlara göre daha hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir ve daha ekonomiktir.

Anahtar Kelimeler: *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, identifikasyon, ITS-PCR

ABSTRACT

**THE PHENOTYPIC AND GENOTYPIC IDENTIFICATION
OF CHEESE SPOILER YARROWIA LIPOLYTICA
AND DEBARYOMYCES HANSENIISOLATED FROM WHITE
CHEESE**

ÖZTÜRK YALÇIN H., Tansel

PhD in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Füsün UÇAR

September 2007, 207 pages

92 yeast strains causing spoilage on different kinds of white cheese were isolated and the isolates were identified according to Barnett et al (2000). It was determined that the identified isolates represented 13 species belonging to 8 genera. The most prevalent isolates belonged to the species *Debaryomyces hansenii* (%32,6), *Kluyveromyces marxianus* (%18,5) and *Yarrowia lipolytica* (%17,4). Other genera encountered were *Pichia*, *Torulaspora*, *Candida*, *Williopsis*, *Galactomyces*. *D. hansenii* and *Y. lipolytica* found to be the most frequent spoiling agent species at phenotypic identification were genotypically characterized with PCR amplification of the species-specific internally transcribed spacer (ITS) of 5,8 S ribosomal DNA (ITS-PCR). ITS-PCR resulted in single fragments of 360 and 640 bp respectively, from 15 strains of *Y.lipolytica* and 25 strains of *D. hansenii*.

Use of identification systems based on biochemical and physiological characteristics takes longer time and often results in

VIII

misidentifications. In this study, false identification of 5 strains of *D. hansenii* and 1 strain of *Y. lipolytica* using conventional methods confirmed the above mentioned statement. As a consequence, ITS-PCR was found to be more rapid, reliable, easy to perform and cost effective than biochemical approach.

Keywords: *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, identification, ITS-PCR

IX

TEŞEKKÜR

Öncelikle , güncel nitelik taşıyan bu çalışma konusunu öneren ve çalışmam süresince değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım, Sayın Prof. Dr. Füsün UÇAR'a ve diğer tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ ve Sayın Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım sırasında değerli yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Ataç UZEL'e, Sayın Dr. A.Akın DENİZCİ'ye şükranlarımı sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen ve sürekli desteğini gördüğüm arkadaşım Ebru UYAR'a , sonsuz sabrı ve anlayışı için eşim Fehmi YALÇIN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	V
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	10
2.1. Maya Taksonomisi	10
2.2. Mayaların Mikrobiyal Ekolojisi	12
2.3. Tanılamada Kullanılan Yöntemler	14
2.3.1. Konvansiyonel yöntemlerle mayaların tanılanması	14
2.3.2. Moleküler biyolojik teknikler ile mayaların tanılanması	18
2.4. Gıdalarda Mayaların Neden Olduğu Bozulmaların Etkileri.....	34
2.4.1. Peynirlerde Mayaların Neden Olduğu Bozulmanın Etkileri	36
2.5. Türkiye’de Yapılan Çalışmalar	38
3. MATERYAL VE METOTLAR	40
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Kullanılan örnekler.....	40
3.1.2. Mayaların izolasyonu ve tanılanmasında kullanılan besiyerleri.....	40

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa No</u>
3.1.3. Çözelti, Tampon ve Boyalar	48
3.2. Metod	53
3.2.1. Mayaların İzolasyonu.....	53
3.2.2. İzolatların Tanımlanmasında Kullanılan Mikroskopik ve Morfolojik Testler	53
3.2.3. İzolatların Tanımlanmasında Kullanılan Fizyolojik Testler	56
3.2.4. İzolatların Tribütirin Agarda Ekstrasellüler Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	63
3.2.5. İzolatların Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	64
3.2.6. DNA İzolasyonu	64
3.2.7. DNA'ları saflık kontrolü.....	65
3.2.8. ITS PCR	65
3.2.9. ITS PCR Ürünlerinin Elektroforezi	67
4. BULGULAR.....	70
4.1. İzolatların Elde Edilmesi.....	70
4.2. İzolatların Fenotipik Tanımlanması	71
4.3. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri.....	81
4.4. Fenotipik Olarak Tanımlanan İzolatların Dahil Olduğu Genusların Özellikleri.....	82
4.4.1. Debaryomyces generusu	82
4.4.2. Yarrowia generusu	85
4.4.3. Kluyveromyces generusu.....	86

XIII

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa No</u>
4.4.4. <i>Willopsis</i> genusu.....	87
4.4.5. <i>Torulaspora</i> genusu.....	87
4.4.6. <i>Pichia</i> genusu	88
4.4.7. <i>Candida</i> genusu.....	88
4.4.8. <i>Galactomyces</i> genu	89
4.5. Fenotipik Olarak <i>Y. lipolytica</i> ve <i>D. hansenii</i> Olarak Tanılanan İzolatların Tip Türler İle Birlikte Küme Analizi.....	144
4.6. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Fotoğrafları.....	148
4.7. İzolatların Tribütirin Agarda Büyüme Boyunca Oluşan Ekstraselüler Lipaz Aktivitesi.....	159
4.8. İzolatların Ekstraselüler Proteaz Aktivitesi.....	163
4.9. DNA İzolasyonu.....	165
4.10. ITS PCR	165
5. TARTIŞMA	170
KAYNAKLAR DİZİNİ	189
ÖZGEÇMİŞ	207

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Primer Hedef Bölgeleri İçeren Fungal Ribozomal Genlerin Şematik Gösterimi	32
4.1. Fenotipik olarak <i>Y. lipolytica</i> ve <i>D. hansenii</i> olarak tanımlanan izolatların tip türler ile beraber küme analizi	146
4.2. <i>Y. lipolytica</i> 'nin MYGP Broth'daki vejetatif hücrelerinin 27 °C'de 3 günlük görünümü (1000X)	148
4.3. <i>D. hansenii</i> 'nin MYGP Broth'daki vejetatif hücrelerinin 27 °C'de 3 günlük görünümü (1000X)	149
4.4. <i>D. hansenii</i> 'nin Asetat Agar'da askosporlarının 27 °C'de 10 günlük görünümü (1000X)	149
4.5. <i>Y. lipolytica</i> 'nın MYGP Agar'da 2 günlük genel koloni görünüşü.....	150
4.6. <i>D. hansenii</i> 'nin MYGP Agar'da 2 günlük genel koloni görünüşü.....	150
4.7. D-Glukoz içeren Yeast Extract Broth'da 27 °C'de 5 günlük fermentasyon testi	151
4.8. Sabouraud Dextroz Agar'da 27 °C' de 10 günlük kolonilerin DBB testi.....	151
4.9. Fenotipik tanılama testlerinde izolatların ekilmesinde izlenilen sıra.....	152
4.10. N- Base Agarda 27 °C'de kolonilerin 2 günlük görünümü (Negatif kontrol)	153
4.11. Glikoz içeren N- Base Agarda 27 °C'de kolonilerin 2 günlük görünümü (Pozitif kontrol)	153

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

4.12.Rhamnoz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	154
4.13.Sükroz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	154
4.14. Sellobioz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	155
4.15. Trehaloz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	155
4.16. Galaktoz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	156
4.17. Eritritol içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	156
4.18. %0,1 Sikloheksimid içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü.....	157
4.19. %0,01 Sikloheksimid içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü.....	157
4.20. %10 NaCl içeren Yeast Ekstrakt Agarda 27 °C’de kolonilerin 7 günlük görünümü.....	158
4.21. %16 NaCl içeren Yeast Ekstrakt Agarda 27 °C’de kolonilerin 7 günlük görünümü.....	158
4.22. Nitrat içeren C- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	159
4.23.Tip türlerin elektroforez sonuçları	166

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.24. Tip tür <i>Debaryomyces hansenii</i> ve fenotipik olarak <i>D. hansenii</i> olarak tanılanan izolatların elektroforez sonuçları	167
4.25. Fenotipik olarak <i>D. hansenii</i> olarak tanılanan 42 nolu izolatın elektroforez sonucu.....	167
4.26. Tip tür <i>Yarrowia lipolytica</i> ve fenotipik olarak <i>Y. lipolytica</i> olarak tanılanan izolatların elektroforez sonuçları.....	168
4.27. Fenotipik olarak <i>D.hansenii</i> ve <i>Y.lipolytica</i> olarak tanılanan fakat elektroforez sonucunda bu organizmalar çıkmayan izolatların tip türlerle birlikte elektroforez sonuçları	168

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Maya Karakterizasyonunda Kullanılan Geleneksel Kriterler	15
2.2. Maya İdentifikasyonu İçin Asimilasyon ve Fermentasyon Testlerinde Kullanılan Bileşikler	17
2.3. Çoklu Doymamış C18 Yağ Asidi Kompozisyonuna Göre 3 Gruptaki Mayaların Dağılımı.....	23
2.4. Önemli Bazı Mayaların ITS1 / 5,8S rDNA / ITS2 Bölgesinin Boyutları	33
2.5.Farklı Gıdalarda Mayaların Neden Olduğu Bozulmaların Etkileri.....	35
4.1. Mayaların İzole Edildiği Kaynaklara Göre Genus ve Türlerin Dağılımı	70
4.2. İzolatların Tanılanmasında Kullanılan Testler.....	73
4.3.Glukozu Fermente Edemeyen Mayaların Tayin Anahtarı	75
4.4.Glukozu Fermente Edebilen Mayaların Tayin Anahtarı.....	77
4.5.Mayaların İzole Edildiği Kaynaklara Göre Genus ve Türlerin Dağılımı	79
4.6. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri.....	81
4.7. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri.....	82
4.8. Fenotipik Olarak Tanılanan İzolatlara Ait Literatürde Verilen Özellikler İle Morfolojik ve Fizyolojik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	90
4.9. <i>D. hansenii</i> ve <i>Y. lipolytica</i> olarak tanılanan izolatlar ile tip türlerin fenotipik benzerliği	147

XVIII

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.10. İzolatların Tribütirin Agarda Büyüme Esnasında Oluşan Lipaz Aktivitesi (mm açık zon)	160
4.11. İzolatların Kazein İçeren YPG Agarda Büyüme Esnasında Oluşan Proteolitik Aktivitesi	163
4.12. ITS PCR Sonuçlarına Göre <i>Y.lipolytica</i> ve <i>D. hansenii</i> Olarak Tanılanan İzolatlar	169

1. GİRİŞ

Maya ve maya benzeri organizmalar funguslar içerisinde homojen ve çok büyük grup oluşturmaktadır. Bugüne kadar tanımlanmış yaklaşık 1500 tür bulunmaktadır (Verachtert and De Mot,1990; Barnett et al., 2000; Boekhout et al., 2003).

Mayaların taksonomisi moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesine bağlı olarak sürekli değişmektedir. 1970 yılında genus sayısı 39 iken 1984’de bu sayı 60’a tür sayısı da 239’dan 500’e yükselmiştir. “The Yeast: A Taxonomic Study” isimli tanılama kitabının 3. baskısında bu sayı yaklaşık 1500 olarak belirtilmiştir (Boekhout et al.,2003). Maya taksonomisindeki değişimin en büyük nedeni kromozom analizleri ve moleküler biyolojik yöntemlerin uygulanmasıdır. Ayrıca maya ve maya taksonomisine ilginin artması da tür sayısının yükselmesine neden olmuştur (Lieckfeldt et al.,1993; Jakobsen-Norvhus,1996).

Mayalar ticari amaçlar için kullanılan mikroorganizmaların en önemli grubudur. Bilindiği gibi en iyi fermantatif organizmalar olarak mayaların en yüksek aktiviteleri alkol üretimi olup; alkollü içeceklerin üretiminde ticari olarak kullanılmaktadır. Ayrıca mayalar ekmek yapımı, oriental besinlerin ve turşuların üretiminde, B12, β -karoten gibi vitaminlerin üretiminde, besinlerin tekstürünün ve içeriğinin düzenlenmesini sağlayan fosfomannan gibi endüstriyel polisakkaritlerin üretiminde, gliserol ve polihidroksi alkollerin üretilmesinde, protein açığının kapanması için tek hücre proteini olarak üretimde, lipidlerin

retiminde kullanılmaktadır (Phaff et al.,1966 ; Deak,1995 ; Jakobsen-Norvhus,1996; Hierro et al.,2004).

Mayalar günümüzde en kıymetli endüstriyel mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir. Kullanım alanları arasında gıda, kimya, ilaç ve zirai alanlar bulunmaktadır. Günümüzde moleküler biyoloji teknikleri ve maya hücreleri kullanılarak elde edilen ticari ürünler arasında endüstriyel enzimleri, interferonları ve çeşitli tıbbi ilaçların hammaddelerini saymak mümkündür. Bunlara ilave olarak potansiyel uygulama alanları da düşünülecek olursa yakın bir gelecekte kullanımının daha da artacağını tahmin etmek zor olmayacaktır (Jakobsen-Norvhus,1996; Dağaşan, 2005).

Maya endüstrisi en büyük fermentasyon endüstrilerinden biridir. Bugünkü bilgilerimize göre dünyada yılda ortalama 2 milyon ton ekmek mayası üretilmekte ve yaklaşık 2 milyar dolarlık bir ekonomik değer oluşturmaktadır. Oluşturulan bu ekonomik değerın yaklaşık %15-20 gibi oldukça önemli sayılabilecek bir miktarı ülkemizde gerçekleştirilmektedir (Hierro et al.,2004; Dağaşan, 2005).

Mayalar mkemml bir protein kaynağıdır ve kalite olarak soya proteinine eşdeğerdir. Zengin lizin içeriğinden dolayı lizin içeriği fakir tahılları destekleyici rolü vardır. Mayalar hayvan yemlerinde de kullanılmaktadır. Özellikle ABD’de bu amaçla çalışan fermentasyon tesisleri bulunmaktadır. Bu tesislerde üretilen çeşitli maya türleri (Torula gibi), üretildikleri ortamlarla beraber ya da ayrı olarak kurutulmakta ve hayvan yemi olarak satılmaktadır (Hierro et al., 2004; Dağaşan, 2005).

Mayalar çok eski zamanlardan beri iyi bir B vitamini kaynağı olarak tanınmaktadır. B vitaminleri maya sayesinde keşfedilmiş ve biotin, niasin, pantotenik asit ve timin gibi birçok B vitamini ilk olarak mayadan elde edilmiş ve tanınmıştır. Bu nedenle mayalar B vitamini eksiklikleri ve buna bağlı bozuklukların giderilmesine de yardımcı olmaktadır. Mayalardan elde edilen diğer önemli bir endüstriyel ürün ise “ yeast extract ” olarak da bilinen maya özütüdür. Dünya çapında yılda yaklaşık 40.000 ton üretilmektedir. Maya özütü ağırlıklı olarak Mono Sodyum Glutamat (MSG) alternatifi olarak gıdalarda doğal lezzet verici madde olarak kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda MSG’a getirilen yasal sınırlamalardan ve tüketici tarafından tercih edilememesi eğiliminden dolayı yeast extract’a olan talep süratle artmıştır. Bugün hazır çorbadan çikolataya , dondurma yapımına kadar çeşitli gıda maddelerinde maya özütü değişik oranlarda kullanılmaktadır. Mayalardan elde edilen ve ticari değere sahip diğer bir ürün ise invertaz enzimidir. İnvertaz enzimi gıda sanayinde özellikle de şekerleme endüstrisinde ortası yumuşak şeker ve çikolataların yapımında kullanılmaktadır (Verachtert and De Mot, 1990; Dağışan, 2005).

Mineral içeriği yüksek mayalar da özellikle son senelerde ticari bir ürün olarak görülmeye başlanmıştır. Maya hücreleri büyüdükleri ortamlarda bulunan makro ve mikro besin maddelerini bünyelerine katmaktadırlar. Bunlar içinde kalsiyum, magnezyum ve selenyum gibi mineraller bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda beslenme alışkanlıkları üzerine yapılan çalışmalar bazı iz elementlerin belirli diyetlerde ya da bölgelerde yetersiz düzeyde olduğunu göstermiştir. Bu iz elementlerin özel olarak üretilmiş kuru maya formunda tüketiminin bu tip beslenme

bozukluklarını önlediği bilinmektedir. Halen piyasada krom, selenyum ve molibden açısından zenginleştirilmiş mayalar satılmaktadır (Deak,1995 ; Jakobsen-Norvhus,1996; Dağışan, 2005).

Doğal gıda boyası olarak maya hücrelerine olan talep son yıllarda artış eğilimi göstermektedir. Bunlar içinde en yaygın olarak bilinen ve kullanılan boyar madde ise astaksantin pigmentidir. Diğer taraftan rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi ve yaygınlaşması ile birlikte insanoğlunun 5-6 bin yıllık dostu olan maya hücrelerine yeni görevler düşmeye başlamıştır. Ökaryotik hücreler içinde en iyi tanınan ve laboratuvar koşullarında manipulasyonu en kolay olan maya hücreleri en ideal konakçı olma özelliği göstermektedir. Ticari açıdan bakıldığında benzer şekilde maya hücreleri bakterilere oranla daha avantajlı görünmektedir. Maya hücrelerinin ürettikleri proteinleri bulundukları ortama salgılama yeteneklerinin de yüksek olması, ticari açıdan önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bütün bu faktörler göz önüne alındığında maya hücreleri katma değeri yüksek ileri teknoloji ürünlerinin elde edilmesinde ön plana çıkmaktadır. Bu ürünler içinde ergestrol, insülin, interferon ve hepatit-B aşısını saymak mümkündür. Son yıllarda *Pichia pastoris* adlı maya Philips Petroleum şirketi tarafından expression vektörü olarak patentlenmiş ve bu konuda son derece ciddi adımlar atılmıştır. Sözkonusu mikroorganizmayı kullanarak günümüzde bir çok yabancı proteini ticari olarak üretmek mümkün olabilmektedir (Hierro et al., 2004; Dağışan, 2005).

Mayalar bu kadar yararlı faaliyetlerinin dışında gıdalarda ve içeceklerde bozulmaya neden olmaktadır. Bundan 30-40 yıl öncesine

kadar maya konusundaki yayınlarda, gıda kaynaklı mayaların halk sağlığı için önemli olmadığı, tüketici için tehlikesinin bulunmadığı, hatta fermente gıdalarda (kefir, kıyma ve bira gibi) yüksek miktarlarda bulunmasının gerektiği bildirilmekteydi (Betts et al.,1999; Loureiro and Querol 1999; Hierro et al.,2004). Fakat 1980'den sonra yapılan araştırmalarda ilk defa olarak, gıda kaynaklı mayaların halk sağlığı ve güvenliği üzerinde durulmaya başlandı. Daha sonra bu konu çeşitli literatürlerde desteklenerek mayaların alerjik etkisinin bulunduğu hatta *S. cerevisiae*'nin barsak iltihabına sebep olduğu belirlenmiştir. (Fleet,1990; Jakobsen and Narvhus, 1996).

Son yıllarda gıdalarda bozulmaya sebep olan mayaların gıda teknolojisindeki önemi artmış ve önemli ekonomik kayıplardan sorumlu tutulmuşlardır. Gıdalarda bulunan mayaların gıdalarda bozulmaya sebep olduğundan 20. yüzyılın ilk yarısında sıklıkla bahsedilmeye başlandı. Barnett ve arkadaşları (1983) gıdalarda 30 cinse ait 120'ye yakın maya türünün bulunabildiğini belirtmiştir. Pitt ve Hocking (1985), gıdalarda bozulmaya sebep olan mayalardan önemlilerini; *Dekkera bruxellensis*, *Issatchenkia orientalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides* ve *Candida holmii* şeklinde bildirmişlerdir. Mayaları yakın zamana kadar insan sağlığı için önemli olmadığı kanısı mayalar üzerinde durulmasını engellemiş ve bu sebeple meydana gelen ürün kayıplarından bahsedilmemiştir. Mayaların neden olduğu ekonomik kayıplar çok olmasına rağmen, ticari gizlilikten dolayı

maya bozulmalarındaki endüstriyel patlamaların ekonomisi ve sonuçları rapor edilmemiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda ve bildirilen raporlarda mayaların gıdalarda önemli bir bozulma etkeni olduğu belirtilmektedir (Fleet,1990 ; Jakobsen and Narvhus, 1996; Tempel and Jakobsen, 1998; Betts et al.,1999; Perez and ark.,2001; Deak, 2006).

Endüstride mayaların neden olduğu bozulmaların ana kaynağı koruyucu içeren gıdalar, zeytin, peynir, mayonez, süt gibi yağ oranı yüksek gıdalar ile sirke, şarap, bira, ekmek gibi fermente gıdalardır. Oldukça fazla sayıda maya türünün fermentasyon ve gıda sanayiinde istenmeyen kontaminantlar olduğu bilinmektedir. Bu tür mayalar saprofit özellikte olup gıdaların bozulmasına, üretimin istenmeyen şekilde sonuçlanmasına yol açmaktadır. Mayalar oldukça geniş pH aralığında (pH 2-9),düşük su aktivitesinde, düşük sıcaklıklarda, yüksek tuz ve yüksek şeker oranlarında çok rahatlıkla gelişebilmektedirler (Pitt and Hocking, 1985, Betts et al.,1999). Aynı zamanda pektin ve diğer kompleks karbonhidratları, organik asitleri, proteinleri ve lipitleri de kullanabilmektedirler. Fermente ve düşük pH'lı süt ürünlerinde depolama stabilitesini azaltan ve bozulma etmeni dominant mikroorganizmaların *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens* ve *Candida holmii*'den oluşan mayalar olduğu saptanmıştır (Fleet,1990; Westall and Filtenborg, 1998; Prillinger et al.,1999; Welthogen and Viljaen 1999), Cheddar peynirinden *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula glutinis*, *Torulasporea delbrückii* ve *Kluyveromyces marxianus* gibi mayaları izole etmişlerdir. Önceleri peynirlerde mayaların bulunuşunun önemsiz olduğu düşünülse de son yıllarda mayaların peynirlerde bozulmaya sebep olduğu

belirlenmiştir (Fleet, 1990; Prillinger et al.,1999). Gıda endüstrisinde en tehlikeli olan mayalar da asit koruyuculara ve osmatik strese dayanıklı olanlardır. Mayalar ya fermentasyon şartlarının kötü olması ya da üretim sonrası kontaminasyondan dolayı gıdaların bozulmasına yol açarlar. Bu bozulmalar gıdalarda acı tat ve kötü koku oluşumu, bulanıklık, sediment veya pellet oluşumu, gaz oluşturma özellikleri sayesinde bazı gıdalarda istenmeyen gözenekli yapı oluşumu gibi bir takım değişikliklerdir (Fleet, 1990; Westall and Fildenborg, 1998; Tempel and Jakobsen, 1998; Loureiro and Querol,1999).

Süt ürünlerinde mayaların bulunuşu önemlidir. Mayalar bozulmaya, gıda zehirlenmesine, alerjik reaksiyonlara ve sağlık için önemli bir çok olumsuz etkiye sebep olmaktadır Bakteriyal kültürlerle üretilen süt ürünlerinde mayaların bulunuşu, bozulmanın büyük bir kaynağıdır (Fleet,1990; Jakobsen and Narvhus,1996).

Mayaların sebep olduğu gıda bozulmalarının kontrolü için gıdalardaki toplam canlı maya popülasyonunun sayımı ve aranmasında etkili tekniklerin kullanılması gereklidir. Farklı tipteki gıdalarda muhtemelen predominant olan türlerin tanılanması zorunludur. Konvansiyonel yöntemlerle mayaların tanılanması için 60 ile100 morfolojik ve fizyolojik testin yapılması ve bu testlerin uzman kişiler tarafından değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu testler oldukça kompleks, zahmetli ve zaman alıcıdır. Gıda mikolojisinde genel uygulamalar konvansiyonel testlere dayalıdır. Mayaların sayımı ve rutin aranması canlı sayımının saptanması şeklindedir. Koloni sayım teknikleri basit, kullanışlı, kabul edilebilir olmasına karşın birçok dezavantajı da

vardır. O nedenle gıda mikolojisinde en önemli ihtiyaç hızlı, duyarlı, doğru ve otomatize olabilen prosedürlerle direkt veya indirekt bir şekilde canlı hücrelerin saptanabilmesidir (Török and King, 1991; Lopez et al.,2001; Arias et al.,2002).

Gıda üretim zincirindeki ve gıda fermantasyon prosesindeki kontaminasyonun kaynağı ve rotasının araştırılmasına olanak sağlayan basit ve hızlı teknikler ile gıdanın mikrobiyolojik kalitesi geliştirilmektedir. Özellikle son on yılda moleküler biyolojinin hızlı gelişmesiyle mikroorganizmaların identifikasyonu için yeni teknikler ortaya çıkmıştır. Bu teknikler gıda endüstrisinde kontaminasyonun kaynağı ve rotasını çizmesi açısından oldukça kullanışlı ve strain seviyesinde farklılıkları ortaya koyan tekniklerdir. Bu teknikler elektroforetik karyotiplendirme, mitokondrial DNA restriksiyon analizi, ribozomal DNA restriksiyon analizleri, DNA fingerprint , RAPD analizleri ve 5,8S rRNA genlerini (rDNA) ifade eden ITS dizilerinin restriksiyon analizleridir (Rohm and Lechner, 1990; Van der Vassen et al.,1996 ; Gomes et al.,2000; Couto et al.,1996; Deak et al., 2000 ; Perez et al., 2001).

Son yıllarda genetik tiplendirmede kullanılan yöntemlerin çok hızlı bir şekilde geliştiğine tanık olduk. İyi bir genotip tiplendirme methodu çoklu analize ve yüksek teknolojiye uygulanabilirliğinin yanısıra güçlü, hassas ve özgün, hızlı, kolay idare edilebilen ve de en önemlisi ortalama bir fiyata sahip olmalıdır. Gıda endüstrisinde bozulma problemlerinde en önemli nokta ise erken safhada spesifik bozunmanın hızlı bir şekilde araştırılmasıdır. Bu da ancak PCR'a dayalı tekniklerin kullanılmasıyla

gerçekleştirilecektir. İncelendiği kadarıyla ülkemizde mayaların genotipik olarak tanılanması ile yapılan araştırmaların oldukça az olmasının yanı sıra konunun son derece güncel ve önemli olması nedeni ile bu araştırmada beyaz peynirlerde bozulmaya neden olan *Y. lipolytica* ve *D.hansenii* suşlarının izolasyonu, konvansiyonel ve moleküler biyolojik yöntemlerle tanılanması ve moleküler biyolojik yöntemleri rutin maya tanılanmasında kullanabilme olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan moleküler teknikler morfolojik ve fizyolojik karakteristiklere dayanan konvansiyonel tekniklere göre daha duyarlı ve spesifik olduğundan gıda endüstrisinde istenmeyen kontaminasyonların kaynağı doğru olarak saptanabilecek ve bozulmaya neden olan mayaların tanısı kısa sürede güvenilir bir şekilde gerçekleştirilecektir. Böylece elde edilen kesin sonuçlarla daha iyi, etkili ve ucuz bir kalite kontrolü uygulanabilecektir. Ayrıca kullanılacak olan moleküler biyolojik teknikler rutin kalite kontrol uygulamaları için daha elverişli olduklarından, gıda endüstrisinde mikrobiyal aktivite sonucu oluşacak hammadde kaybı ve iş gücü kaybı da önlenebilecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Maya Taksonomisi

Fermentasyondan sorumlu olan bu organizmalar, 19. yüzyılın başına kadar yaşayan canlılar olarak fark edilememiştir (Acheampong, 2000). Morfolojik ve fizyolojik özellikler temel alınarak geliştirilen ilk karşılaştırmalı maya taksonomisi sistemi, 1896 yılında Emil Christian Hansen tarafından yapılmıştır. Bu taksonomide Hansen'in önem verdiği diğer kriterler, mayaların hayat döngüsü ve sistematik akrabalığı olmuştur. 1920 ve 1928'de Guilliermond, mayaların fizyolojisi ve üreme özelliklerine filogenetik akrabalığı da ekleyerek bu kriterleri genişletmiştir. 1931'de Stelling ve Dekker adlı araştırmacılar tarafından ilk sınıflandırma çalışması yapılarak yayınlanmıştır. 1934'de Diddens ve Lodder, 1941'de Lodder, mayalarla ilgili klasifikasyon şemalarını geliştirmişlerdir (Phaff et al., 1966). 1951'de Lynferd Wickerham, mayaların ekoloji ve taksonomisini yetersiz bularak bu kategorilerle ilgili çalışmalar yapmıştır. Asimilasyon ve/veya fermentasyon için test edilen karbon kaynaklarının sayısını 30'a çıkarmıştır (Acheampong, 2000). En son 1952'de Lodder ve Kreger tarafından mayaların temel gruplarına ilişkin taksonomi ortaya çıkmıştır. Bu araştırmacılar sporagenik ve asporagenik mayaları içeren en gelişmiş sınıflandırmayı sunmuşlardır (Phaff et al., 1966).

Phaff ve arkadaşları (1966) mayaları askosporogenik, ballistosporogenik, asporogenik ve maya benzeri organizmalar olarak dört gruba ayırmıştır. Askosporogenik mayalar, *Hemiascomycetidae*

subklassisi, *Saccharomycetales* ordosu altındaki *Saccharomycetaceae* familyası içersinde incelenmiştir. Ballistosporogenik mayalar aynı ordo altında *Sporobolomycetaceae* familyası içinde, asporagenik mayalar *Deuteromycetes* ve *Ascomycetes* sınıfları altında farklı ordo ve familyalarda incelenmiştir.

Alexopoulos ve Mims (1979) mayaları askomisetik, basidiomisetik ve deuteromisetik mayalar adı altında üç grupta incelemişlerdir. Askomisetik mayaları, *Ascomycetes* sınıfı, *Hemiascomycetidae* alt sınıfı, *Endomycetales* ordosu ve *Saccharomycetaceae* familyası altında, basidiomisetik mayaları ise *Ustilaginales* ordosu ve *Ustilaginaceae* familyası altında incelemişlerdir. Moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesinden sonra bu sistematikte birtakım değişiklikler olmuştur. 1996 yılında yine Alexopoulos ve arkadaşları tarafından yapılan sistematikte, askomisetik mayalar tekrar *Saccharomycetales* ordosu ve *Saccharomycetaceae* familyası altında incelenmekle beraber bazı genuslar aynı ordo altında farklı familyalara sokulmuştur. Daha önce yapılan sistematikte *Saccharomycetales* ordosunda yer almayan bazı mayalar bu ordo içersine alınmıştır. Örneğin *Hansenula* türleri, *Saccharomycetaceae* familyasında *Pichia* genusuna transfer edilmiştir. Keza *Lipomyces* genusu da, *Saccharomycetales* ve *Saccharomycetaceae* familyasına alınmasına karşın, Alexopoulos ve ark. (1996) bunları *Lipomycetaceae* familyasına dahil etmiştir. Ayrıca daha önceki sistematikte *Saccharomycetaceae* familyası altında incelenen *Schizosaccharomyces*, *Archioascomycetes* sınıfı ve *Schizosaccharomycetales* ordosu altına alınmıştır (Alexopoulos et al., 1996). Phaff ve ark (1966) tarafından daha önce maya benzeri

organizmalar içersinde incelenen *Taphrina*, *Archioascomycetes* sınıfında *Taphrinales* ordosu içerisine alınmıştır. Phaff ve ark. (1966) tarafından belirtilen ballistosporogenik ve askosporagenik mayalar yeni yapılan sistematikte, *Basidiomycetes* ve aseksüel *Ascomycetes* klasisi adı altında incelenmektedirler. Basidiomisetik mayalar, *Basidiomycetes* klasisinde *Tremellales* ve *Sporidiales* ordoları altında incelenmektedir (Alexopoulos et al.,1996). Barnett ve arkadaşları ise Askomisetik mayaları, *Archiascomycetes*, *Saccharomycetes* ve *Hemiascomycetes* sınıfları altında toplarken Basidiomisetik mayaları *Hymenomycetes*, *Urediniomycetes* ve *Ustilaginomycetes* sınıfları altında toplamıştır (Barnett et al.,2000). Tez kapsamındaki izole edilen türlerin sistematığı de hem Alexopoulos ve arkadaşlarına hem de Barnett ve arkadaşlarına göre yapılmıştır.

2.2. Mayaların Mikrobiyal Ekolojisi

Sıcaklık, su aktivitesi, pH, mevcut O₂, besin maddelerinin bulunması, inhibitörlerin varlığı gibi birçok çevresel faktör mayaların büyümesini etkilemektedir. Mayaların optimum büyüme sıcaklığı 24-48⁰C arasında olduğundan dolayı büyük çoğunluğu (%98) mezofil olarak dikkate alınmaktadır. Çevresel faktörler mayaların büyüme sıcaklığını etkilemektedir. Solute konsantrasyonda bir artış veya su aktivitesinde bir düşüş organizmanın optimum büyüme sıcaklığında 2-6 ⁰C kadar artışa neden olmaktadır (Deak, 2006).

Mikroorganizmanın metabolik aktivitesi için suyun bulunması (Aw) gıdalardaki mikroorganizmaların büyümesini etkileyen en önemli

faktörlerden biridir. Su aktivitesi çözelti konsantrasyonuna göre değişmektedir. Tuz ve şeker toleransı ile sükroz ve glukoz toleransı arasında farklılıklar vardır. Mayaların büyük çoğunluğu aynı su aktivitesinde tuza göre şekerin daha yüksek konsantrasyonlarına tolerans gösterebilmektedir. Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların büyük çoğunluğu minumum 0,90-0,95 arasındaki su aktivitesinde büyüebilmektedirler. Az sayıda osmotolerant maya genuslarına dahil türler oldukça düşük bir su aktivitesinde büyüebilmektedir. Örneğin, *Zygsaccharomyces rouxii* 0,62 gibi düşük su aktivitesine sahip yüksek şekerli gıdalarda büyüeyebilen osmotolerant bir mayadır (Deak,2006).

Gıdaların mikrobiyal ekolojisinde önemli bir diğer faktör pH'dır. Mayaların çoğu 3-10 arasındaki pH değerlerini tolere edebilir ve optimum pH aralıkları 4,5'dan 6,5'a kadar değişebilmektedir. pH'a tolerans asitin türüne bağlıdır. Genellikle organik asitler inorganik asitlerden daha inhibitör etkiye sahiptir. Propiyonik asit sitrik ya da laktik asite kıyaslandığında, propiyonik asit asetik asitten bile daha fazla inhibitör etkiye sahiptir. Örneğin *Pichia membranaefaciens*'in büyüeyebildiği minumum pH değeri asetik asit kullanıldığında 3; tartarik asit ve sitrik asit kullanıldığında 2,2 ve HCl için 1,9'dur

Mayanın canlılığını sürdürebilmesi ve büyüeyebilmesi için hücrenin plazma membranına karşı bir proton gradienti oluşturarak intraselüler pH'ı 6,5 civarında tutması gerekmektedir. Asit tolerant türler düşük pH'lı çevrelerde protonları hücre dışına aktif olarak pompalayan aktif transport sistemine sahiptir. Etanol konsantrasyonu membran geçirgenliğini etkiler ve bu nedenle maya hücrelerinin hücre içi pH'larını da etkilemektedir.

Saccharomyces türleri etanole karşı bir çok mayadan daha rezistandır (Loureiro and Querol, 1999; Deak, 2006) .

2.3. Tanılamada Kullanılan Yöntemler

2.3.1. Konvansiyonel yöntemlerle mayaların tanılanması

50 yılı aşkın süredir mayalar; morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve üreme karakteristikleri göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. Bu özelliklerine bağlı olarak mikroskopik, kültürel ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir (Montrocher et al.,1998; Loureiro and Querol, 1999; Hierro et al.,2004).

Askomisetik, Basidiomisetik ve imperfect mayaların morfolojik özellikleri, tanılamamanın ilk basamağında mikroskopik testlerle belirlenir. Hücre şekli, gerçek ve/veya pseudohif oluşturup oluşturumaması, eşeysiz çoğalmanın tomurcuklanma mı yoksa fisyonla mı gerçekleştiği, DBB testi, sporların yapısı, yüzey özellikleri, sayısı ve şekli mikroskopik karakteristikler arasında incelenmektedir (Casentino et al.,2001; Vaughan-Martini, 2003).

Deak ve Beuchat (1996) tarafından mayaların karakterizasyonunda kullanılan geleneksel kriterler Çizelge 2.1’ de özetlenmiştir. Sporların varlığı ve yokluğu ile şekilleri, konjugasyon tipi ve tomurcuklanma, boyut ve hücrenin şekli, hif ve /veya pseudohifin oluşumu, besiyerindeki koloni morfolojisi, karbon kaynaklarının fermentasyonu, karbon ve azot kaynakları üzerinde büyüebilme, vitamin gereksinimlerinin belirlenmesi, çeşitli sıcaklıklar ile yüksek şeker ve tuz

konsantrasyonlarında büyüebilme, üre hidrolizi ve antibiyotiklere dirençlilik, bugün kullanılan tipik identifikasyon prosedürlerindeki en genel testlerdendir (Loureiro and Querol, 1999; Acheampong, 2000; Barnett et al.,1983, 2000; Cosentino et al.,2001; Kurtzman and Robnett, 2003).

Çizelge 2.1. Maya Karakterizasyonunda Kullanılan Geleneksel Kriterler (Deak ve Beuchat, 1996)

Morfolojik Testler	Fizyolojik Testler	Biyokimyasal Testler
Eşeyli üreme Konjugasyon tipi Sporangiosporların şekli Basidiosporların oluşumu	Şekerlerin Fermentasyonu	DBB Reaksiyonu
Eşeysiz üreme Tomurcuklanma Fisyon Arthroconidia Ballistoconidia	Karbon kaynaklarının Asimilasyonu	Üreaz reaksiyonu
Mikroskobik büyüme Hücrelerin şekli ve boyu Gerçek hif veya pseudohif Klamidosporlar	Azot kaynaklarının Asimilasyonu	Coenzim Q tipi
Mikroskobik büyüme Besiyerindeki koloniler Sıvı kültürler	Vitamin gereksinimleri Nişasta oluşumu	DNA baz kompozisyonu
	Büyüme sıcaklığı Asetik asit üretimi Sikloheksimide dirençlilik	DNA dizi Homolojisi

Genel olarak tanılamada pek önemi olmayan kültürel testler içerisindeki en değerli parametreler, kolonilerin ürettiği pigmentler (sarı, kırmızı, pembe, turuncu, kahverengi gibi) ile koloninin tekstürüdür (düz, mukoid, gibi).

Geleneksel tanılamada kullanılan tekniklerin son grubunu biyokimyasal testler oluşturmaktadır. Mikroskopik karakterizasyonu takiben yapılan bu testler, taksonomistler tarafından mikroskopik gözlemlerle birlikte kullanılmaktadır (Verachtert and De Mot, 1990). Kurtzman ve arkadaşları bu grup içerisindeki en önemli testlerin, şekerlerin fermentasyonu ile karbon ve azot kaynaklarının asimilasyonu olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılara göre Çizelge 2.2' de gösterilen bileşiklerden, D-Glukoz, Galaktoz, Maltoz, Me- α -D-Glukozid, Sellobiyoz, Melibioz, Sükroz, Melezitoz, Rafinoz ve D-Ksiloz, hem asimilasyon hem de fermentasyon testlerinde kullanılan karbon kaynaklarıdır (Kurtzman, 1990; Verachtert and De Mot, 1990; Wolf, 1996; Barnett et al.,1983,2000; Boekhout et al.,2003).

Fenotipik olarak tür seviyesinde güvenilir bir maya tanısı yapabilmek için genellikle 60 ile 100 testin yapılması gerekli olup, nihai sonucun elde edilmesi en azından 3-4 hafta sürmektedir. Bu tanılama şeması rutin bir şekilde gıda endüstrisinde kullanılmadığı için mayaların bazı testlere vermiş oldukları yanıtlara dayanan çeşitli basitleştirilmiş tanılama yöntemleri geliştirilmiştir. Fakat bunlarda maya tanılanmasındaki klasik yöntemlerle aynı yaklaşım üzerine kurulu olduğundan, bilgisayarlarla otomatize edilmiş olsa dahi zaman kaybına sebep olup sıklıkla yanlış ya da belirsiz tanılamaya neden olmaktadır. Bu

zorlukların üstesinden gelebilmek için daha hızlı alternatif tanılama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler maya hücrelerinin toplam proteinlerinin veya uzun zincirli yağ asitlerinin analizi yahut izoenzim profilini temel almaktadır. Ayrıca moleküler biyolojideki son yaklaşımlar maya tanılması ve karakterizasyonunda yeni tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır (Loureiro and Querol, 1999; Senses-Ergul et al.,2005).

Çizelge 2.2. Maya İdentifikasyonu İçin Asimilasyon ve Fermentasyon Testlerinde Kullanılan Bileşikler

Bileşik Grubu	Bileşik Adı
Heksozlar	D-glikoz, D-galaktoz , L-ramnoz, L-sorboz
Pentozlar	D-ksiloz, D-riboz, L-arabinoz, D-arabinoz
Disakkaritler	sükroz, maltoz, sellobiyoz, trehaloz, laktoz, melibiyoz
Trisakkaritler	rafinoz, melezitoz
Polisakkaritler	çözünür nişasta, inulin
Glukozidler	α -Me-D-glukozid, arbutin, salisin
Organik asitler	süksinat, sitrat, DL-lactat, D-glukonat, D-glukuronat, D-galakturonat, 2-keto-D-glukonat,5-keto-D-glukonat
Alkoller	eritritol, ribitol(adonitol), D-mannitol, myo-Inositol, metanol, etanol, gliserol, propan 1,2diol, butan 2,3 diol, galaktitol(dulcitol), D-glusitol(sorbitol), ksilitol
Diğer bileşikler	Glukano- δ -lakton, D-glukozamin-HCl, N-asetil D-glukozamin, dekan, hegzadekan

2.3.2. Moleküler biyolojik teknikler ile mayaların tanılanması

Moleküler biyolojik yöntemler, bakteriler ve insanlar ile canlılığın diğer formları olmak üzere çeşitli organizmalar arasındaki ilişkinin netlik kazanmasını sağladığından maya taksonomisinde de önemi gittikçe artmaktadır. Mayaların tanılanması ve karakterizasyonunda fenotipik karakteristiklere dayanan yöntemlerle moleküler genetik yöntemler karşılaştırıldığında moleküler yöntemler oldukça etkili olmaya başlamıştır (Latouche et al.,1997; Fernandez-Espinar et al.,2000). Bu nedenle organizmaların karakterizasyonu, identifikasyonu ve sınıflandırmasında moleküler tekniklerin kullanımı gittikçe yaygınlaştırılmaktadır. Daha önceleri bu metodlar izoenzim profillemeye, nükleik asit tiplendirme analizleri, maya hücrelerinin uzun zincirli yağ asidi veya toplam protein analizleri üzerine dayanmaktaydı. Bu yöntemlerin çoğu tanılama ile ilişkili olarak taksonominin bir kısmını saptamak için kullanılmaktaydı ve endüstride uygulanabilmesi ayrıntılı bir şekilde geliştirilememiştir. Ayrıca bu yöntemler gıda ile ilişkili olan mayaları ayırt etmede yeterli derecede etkili olamamıştır. Son yıllarda proteine dayalı moleküler karakterizasyonların yanında moleküler biyolojideki son ilerlemeler maya tanılanması ve karakterizasyonunda yeni tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır. Bu teknikler elektroforetik karyotiplendirme, mitokondriyal DNA restriksiyon analizi, ribozomal DNA restriksiyon analizi, DNA fingerprint, RAPD analizleri ve 5,8S rRNA genlerini (rDNA) ifade eden ITS dizilerinin restriksiyon analizleridir (Van der Vassen et al.,1996 ; Gomes et al.,2000; Deak et al.,2000 ; Hierro et al.,2004).

2.3.2.1. Baz kompozisyonu analizi

Nükleer DNA'daki G-C içeriğinin belirlenmesi, maya taksonomisinde kullanılan moleküler kriterlerin ilkidir (Boekhout et al., 2003). %G-C içeriği, denatürasyonda uygulanacak sıcaklığı belirleyen kriter olması açısından da oldukça önemlidir. (Verachtert and De Mot, 1990; Vaughan-Martini, 2003). Benzer G-C içeriği strainlerin aynı türe ait olduğu anlamına gelmese de, iki strainin farklı türleri temsil edip etmediği baz kompozisyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntemle bağlı olarak bir dereceye kadar anlaşılabilir. G-C içeriğinin belirlenmesinde kullanılan Bouyant Density yönteminde, bir türün suşları arasındaki G-C oranı genellikle % 1' den azdır. Ancak Termal Denatürasyon yönteminde daha büyük farklılıklar gösterebilir ve tür içi G-C oranı %2'ye kadar çıkabilir (Boekhout et al., 2003)

Askomisetik mayaların DNA'larındaki G-C içeriği % 27- 50 mol civarında olmasına karşın Basidiomisetik mayalarda bu değer % 50-70 mol arasında olup % 48-52 mol arasındaki dar mesafede girişim meydana gelmektedir (Boekhout et al., 2003). G-C oranının taksonomik kullanımı, bilinen maya türlerindeki DNA'nın G-C içeriğinin yaklaşık % 27- 70 mol arasında bulunması ve akraba olmayan türlerde dahi girişim yapması nedeniyle özellikle genus ve tür seviyesinde tanılama yapmak için sakıncalıdır (Verachtert and De Mot, 1990). Maya taksonomisinde artık primer öneme sahip olmasa da, G-C oranının saptanmasına olan ilgi halen devam etmektedir (Boekhout et al., 2003).

2.3.2.2. DNA dizi homolojisi

G+C değerleri taksonların ayrılmasında önemli olmasına rağmen tür ayırımında kullanımı sınırlıdır. Akrabalık derecelerini belirlemede kullanılmak üzere geliştirilen bir diğer test, nükleer DNA ilişkilerinin saptanmasıdır. Tip strain ve izole edilen DNA'nın %80 ve üzerinde komplementeri olması, türlerin aynı genusa ait olduğunu göstermektedir.

Kurtzman ve arkadaşları heterotallik mayaların DNA karşılaştırmalarının fertilitite ile kuvvetli bir korelasyon gösterdiğini söylemişlerdir. Bu çalışmaların ilki *Pichia amylophila* ve *Pichia mississippiensis* türleri iyi bir şekilde eşleşmişler ama askospor oluşturmamışlardır. Bu iki tür sadece %25 DNA homolojisine sahiptir. Dolayısıyla eşeyli üremenin eksik olduğunu bulmuşlardır. DNA ilişkileri ve fertilitite arasında kuvvetli bir korelasyon olmasına karşılık bunun dışına çıkan olaylar da vardır. Yüksek oranda DNA homolojisi gösteren türler arasında fertilitesinde düşüklük gözlenmiştir. Kromozomdaki değişiklikler strainler arasındaki fertilititeyi etkilemektedir.

Pichia lindneri ve *Hansenula minuta* arasında %75 DNA homolojisi saptanmasına karşın bu 2 genus sadece nitrat asimilasyonu testiyle birbirinden ayrılmıştır. Dolayısıyla, G-C içeriğinin saptanmasında olduğu gibi DNA homolojisi de tek başına taksonomik bir kriter olarak kullanılamamaktadır (Verachtert and De Mot, 1990).

2.3.2.3. Uzun zincirli yağ asitleri

Yağ asitleri genel olarak çift karbon sayılı, cis konfigürasyonda, dallanmamış ve düz zincirli monokarboksilik asitlerdir. Az olmakla birlikte doğada trans konfigürasyonda (elaidik asit), tek karbon sayılı (propiyonik asit, valerik asit gibi) ve dallanmış yağ asitleri (tüberkülostearik asit veya laktobasillik asit metil grubu ile dallanma gösteren doymuş yağ asitleridir) ile siklik yağ asitleri (hidnokarpik asit ve şolmugrik asit) de bulunmaktadır. Yağ asitleri, hidrokarbon zincirdeki bağlara göre doymuş veya doymamış yağ asitleri olmak üzere iki grupta incelenebilir. Doymamış bağların sayısı bir veya daha fazla olabilir ve doymamış yağ asitleri kolaylıkla okside olabilirler. Özellikle çift bağ sayısının artması oksidasyonu kolaylaştırmaktadır. Isı, ışık oksidasyonu hızlandırmaktadır.

Bir biomarkır olarak membran yağ asitleri profilinin kullanımı gıda endüstrisinde bozulmaya neden olan mayaların tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. İlk başlarda bu konuda karşılaşılan bazı problemler şunlardır:

- Mayaların büyüme koşullarına bağlı olarak total yağ asidi kompozisyonlarının değişmesi.
- Mayaların yağ asidi kompozisyonundaki düşük varyasyonlar.
- Zaman alan yüksek maliyetli tekniklerin kullanılması.
- Bu tekniklerin uygulanmasında uzman personele ihtiyaç duyulması.

Fakat zamanla bu problemlerin de üstesinden gelinmiştir. Çünkü petride dahi büyüme koşullarını standardize edilip toplam lipid kompozisyonundaki varyasyonları en aza indirmek mümkündür. Maya strainleri eğer yavaş büyümüyorsa, izolasyon ve saflaştırma işlemlerinden sonraki iki gün içerisinde sonuçların alınabildiği, ayrıca bu tekniğin diğer kullanılan hızlı tiplendirme tekniklerinin çoğundan da daha pahalı olmadığı anlaşılmıştır. Bu yaklaşımın en önemli avantajı gıda kaynaklı mayaları linoleik C 18:2 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4 \text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$) ve linolenik C 18:3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$) yağ asitlerinin varlığına bağlı olarak 3 temel gruba ayırmasıdır. Bozulmaya sebep olan mayaların çoğunda hücrede büyük miktarlarda C 18:2 mevcut, C 18:3 yağ asitlerinin ise bulunmamaktadır. C 18:2 ve C 18:3 yağ asitlerinin maya hücrelerinde bulunmaması hijyenik şartların olmaması veya koruyucuların yetersiz kullanımını yansıtırken çoklu doymamış C 18 yağ asitlerinin yokluğu da *Saccharomyces* genusuna ait fermentatif strainler gibi bozulmaya neden olan organizmaların varlığını göstermektedir. Çeşitli gıda ürünlerinde dominant olan bu türlerin üç temel grubu çizelge 2.3. 'de gösterilmiştir. Bu şartlar altında morfolojik karakteristiklere bağlı olarak besiyeri üzerindeki maya kolonilerinin seçimi zor olmayıp verilen bir gıdadaki farklı maya türleri arasındaki ilişki tahmin edilebilmektedir. Gıda endüstrisinde en büyük güçlük temel gıdaların kontaminasyonunu gerçekleştiren mayalara ait uzun zincirli yağ asidi profillerini içeren bir veri bankasının olmayışıdır (Loureiro and Querol, 1999).

Çizelge 2.3. Çoklu Doymamış C18 Yağ Asidi Kompozisyonuna Göre 3 Gruptaki Mayaların Dağılımı

Grup I C18:2 (-);C18:3 (-)	Grup II C18:2 (+);C18:3(-)	Grup III C18:2 (+) ;C18:3 (+)
<i>Hanseniospora uvarum</i>	<i>Dekkera anamola</i>	<i>Candida catenulata</i>
<i>Hanseniospora quilliermondi</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Candida quilliermondii</i>
<i>Hanseniospora vineae</i>	<i>Dekkera naardenensis</i>	<i>Candida sake</i>
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Pichia etchellsii</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces dairensis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	<i>Torulaspora delbrückii</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Torulaspora globosa</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Zygasaccharomyces bailii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	<i>Zygasaccharomyces bisporus</i>	<i>Debaryomyces polymorphus</i>
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	<i>Zygasaccharomyces florentinus</i>	<i>Issachenkia orientalis</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Zygasaccharomyces mellis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	<i>Zygasaccharomyces microellipsoides</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	<i>Zygasaccharomyces rouxii</i>	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
		<i>Pichia anamola</i>
		<i>Pichia fermentans</i>
		<i>Pichia quilliermondii</i>
		<i>Pichia membranifaciens</i>
		<i>Rhodotorula glutinus</i>
		<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>
		<i>Saccharomyces kluyveri</i>

2.3.2.4. Elektroforetik karyotiplendirme (pulsed field elektroforez)

Kromozomal DNA'ların elektroforetik bantları maya sistemiği çalışmalarında potansiyel olarak kullanılan verileri sağlamaktadır. Pulsed-field teknikleri ile karyotiplerin analizi maya sistemiği ve

genetiğinde geniş kullanım alanına sahiptir. Bireysel kromozomların sayısı ve büyüklüğü, toplam genom boyutunun tahmini , kromozomlardaki yeni düzenlemeler ve gen değerlendirmesi çalışılan özellikler arasındadır. Taksonomik olarak bu veriler türler arasındaki farklılıkların ve/veya populasyonların ayırımında kullanılmaktadır (Querol et al.,1992; Deak, 1995).

Bu yöntemde sıvı veya katı besiyerinde üretilen hücreler, düşük erime ısıyla agoroza karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agoroz içine karıştırılan hücreler deterjan veya enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE’de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA’da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Liziz işlemini takiben agoroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein veya karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agoroz jel içinde tutulu kalır.Agoroz içindeki DNA nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve elektrik akıma tabi tutulmaktadır. Elektroforez sonucunda jel etidium bromürle boyanarak her bir izolata ait bant profili görünür hale gelmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımı ile değerlendirilerek suşların birbiriyle olan ilişkileri ortaya konulmaktadır.

Elektroforetik karyotiplendirme fungusların kromozomal DNA kompozisyonunun analizi için yararlı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca

fungusların taksonomisinde, medikal olarak önemli mayaların, bira ve şarap mayalarının spesifik strainlerinin saptanmasına olanak sağlamıştır (Deak, 1995).

Son 10 yılda pulsed jel elektroforezde (PFGE) önemli ilerlemeler yapılmıştır. Elektroforezin süresi, jel konsantrasyonu, elektrik alan şiddeti gibi çeşitli faktörlerin kromozomal DNA'nın ayrımı üzerine etkileri açıklanmıştır (Querol et al.,1992;Deak,1995).

6Mb'a kadar olan kromozomal DNA ayrımının yapılabilmesine karşın 10 Mb'a kadar olan ayrımlar da rapor edilmiştir. 6 Mb'dan daha büyük kromozomal DNA'nın ayrımı güç olup uzun yükleme ve çalışma süresine gereksinim duyulmaktadır. Boyut standartları için ; *Saccharomyces cerevisiae* , *Pichia canadensis* (= *Hansenula wingei*) ve *Schizosaccharomyces pombe*'nin kromozomal DNA'ları ticari olarak mevcuttur (Boekhout et al.,2003).

Bilinmeyen karyotipe sahip her bir maya türü için, elektroforez sırasında kullanılan parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir (Boekhout et al.,2003).

2.3.2.5. Elektroforetik izoenzim profilleri

Farklı organizmalardaki enzimlerin aminoasit sırasındaki farklılıklar, organizmalar arasındaki filogenetik farklılığı göstermektedir. Bir proteinin sentezlenmesi sırasında bir aminoasitin yerine başka bir aminoasitin geçmesi, elektroferetik jel üzerinde enzimlerin yürütülmesi ile anlaşılabilmektedir (Loureiro, 2000). Strainlerin saflaştırılmasını

takiben 48 saat süren bu yöntem, oldukça duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir. Maya türlerinin tanımlanmasında kullanılabilen bu yöntemin en büyük sakıncası, izoenzim bantlarını içeren geniş bir veri bankasının oluşturulmamış olmasıdır (Loureiro and Querol, 1999; Loureiro, 2000)

2.3.2.6. PCR'a dayalı teknikler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'a dayalı teknikler yüksek duyarlılıkta ve spesifiklikte DNA dizi değişikliklerinin aranmasına izin vermiştir. Temel PCR protokolü DNA sentezini başlatmak için DNA'nın her bir ipliği üzerinde hedef dizinin yanındaki diziye bağlanabilen iki oligonukleotid primerin kullanımını içermektedir. Hedef bölgenin çoğaltılmasını mümkün kılan PCR ' ın keşfiyle beraber tanılamada kullanılabilecek yeni moleküler teknikler geliştirilmiştir. PCR teknikleri ile genus ve tür seviyesinde ayırım yapılabilmektedir (Ness et al.,1993; Lopes et al.,1996).

Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) PCR, maya türlerinin ve bir türün bireysel strainlerinin ayırımında geniş bir kullanım alanına sahiptir. RFLP-PCR'da küçük alt birim rRNA'yı kodlayan bölge çoğaltılır ve değişik restriksiyon endonukleazları ile kesilerek oluşan fragmentler, aynı restriksiyon enzimleriyle tip tür DNA'sının kesimi sonucunda oluşan fragmentlerin agaroz jelde yürütülmesiyle karşılaştırılır. (Loureiro, 2000 ; Cappa and Cacconcelli, 2001). Uygun endonukleazların kullanıldığı durumlarda sonuçların tekrarlanabilirliğinin daha yüksek olması sebebiyle, türlerin ve strainlerin

tanılanmasında bu yöntem oldukça yararlıdır (Loureiro, 2000 ; Adrighetto et al.,2000; Boekhout et al., 2003).

PCR kullanılarak farklı yaklaşımlar denenmektedir. Rastgele (Random) Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniği 5-15 bazlık tesadüfi nükleotid dizisinin tekli ve kısa primerleri ile DNA'nın tesadüfi segmentlerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. RAPD ya da "Arbitrarily" keyfi başlatılan PCR (AP-PCR), DNA düzeyinde tüm genomda karşılaştırılan iki sistemin nitelik ve nicelik bakımından özelliklerinin saptanmasını sağlayan bir tekniktir. 1990 yılında Welsh ve Mc Cleland tarafından tanımlanan yöntem, her tür mikroorganizma analizinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine tesadüfi olarak seçilen bir veya daha fazla primerlerle DNA'daki bir çok bölgenin çoğaltılması hedeflenmektedir. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları, agoroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşmasına neden olur. Kullanılan primerler genellikle 5-15 bazlık kısa primerler olup G-C icerigi zengindir. (en az %40 mol G+C içermeli). Seçilen primerler, düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında kromozom üzerinde hem kendilerine özgü bölgelere hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından, agoroz jel elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılıklar gösterecektir. Amplifikasyon sonucunda jelde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır (Gomes et al., 2000).

Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilmesi açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntemin en önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olması ve stabilitesi düşük bantların oluşmasıdır. Bu sorunları gidermek için; kullanılan hedef DNA ekstraksiyon protokolü, DNA konsantrasyonu, primerlerin baz dizilimi ve konsantrasyonu, $MgCl_2$ konsantrasyonu, tampon ve Taq DNA polimeraz enzim miktarının çalışma süresince sabit tutulması gerekmektedir.

RAPD tekniği, özellikle organizmaların tiplendirilmesi ve maya türlerinin tanımlanmasında uygun bir yöntemdir. Bu teknik , *Candida lipolytica*, *C.valida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* ve *Z. rouxii* gibi bozunmaya sebep olan bazı tipik mayaları ayırt etmek için kullanılmıştır (Paffetti et al.,1995; Loureiro and Querol, 1999).

RAPD-PCR, RFLP-PCR yöntemine göre daha avantajlıdır. Bu yöntemde, DNA kolay bir şekilde ekstrakte edilir ve yüksek bir saflaştırmaya gerek yoktur. DNA'nın çok az bir miktarı analiz için yeterlidir. Ayrıca sonuçlar kolayla elde edilmektedir. Bütün RAPD analiz prosedürleri bir günde tamamlanmasına karşın RFLP analizi için en az üç gün gerekmektedir (Couto et al.,1994; Loureiro and Querol,1999 ; Adrighetto et al.,2000). Ancak RAPD-PCR'ın bütün basamakları esnasında çok dikkatli olunması gerekmektedir (Gomes et al.,2000). Kullanılan primerlere bağlı olarak RAPD analizleri değişkenlik gösterdiğinden, uygun primerin seçimi zor ve zaman almaktadır (Perez et al.,2001). Ayrıca RAPD-PCR analizinde oldukça kompleks veriler

oluşabildiğinden, taksonomik sonuçlar için verilerin toplanması ve okunması zor olabilmektedir (Couto et al.,1995).

Diğer bir PCR tabanlı yaklaşım ise, mikrosatellit olarak adlandırılan basit tekrarlayıcı DNA sekanslarının spesifik oligonukleotidlerle çoğaltılmasını kapsamaktadır. Genomda işlevleri bilinmeyen, yüzlerce hatta yüz binlerce kez tekrarlanan birçok DNA dizisi bulunur. Bunların bazıları genomda yaygın olarak bulunurlar; bazıları ise ardışık olarak tekrarlanırlar ve genomda sadece bazı özel bölgelerde bulunabilirler (satellit DNA). Tekrarlanan diziler genetik tiplendirme için kullanıma uygun çok kopyalı işaretlerdir. Satellit DNA dizileri içerdikleri tekrar birimleri sayısına göre iki grup altında toplanmaktadır. Minisatellitler ~ 10-200 bp boyutunda birimlerden oluşan tekrarlardır; mikrosatellitler ise ~ 2-6 bp boyutunda birimlerden oluşurlar. Mikrosatellit markırlar tekrar sayısı genellikle 30, oldukça polimorfik, genom boyunca dağılmış ve PCR ile kolaylıkla saptanabilen dizilerdir. Maya tanılaması ve karakterizasyonunda (GTC)₅ , (GAC)₅ , (GACA)₄ primerleri, M13 faj DNA'sı ve yalnızca M13 sekansı (GAGGTGGCCGGTTCT) kullanılmıştır. Bu teknik, birleşme sıcaklığının yüksek olması sebebiyle (37⁰C yerine 55⁰C) RAPD tekniğinden daha fazla tekrarlanabilir niteliktedir. Baleiras Couta ve arkadaşları bu tekniği kullanarak, mayonez ve salata soslarında mevcut olan *Z. bailii* ve *Z. bisporus*'un strainlerini tanılamışlardır (Loureiro and Querol,1999).

Mitokondriyal DNA (mtDNA) polimorfizmi, genomun organizasyonundaki değişikliklerin saptanmasında yaygın olarak

kullanıldığı gibi taksonomik çalışmalarda da önemli bir araç haline gelmiştir (Loureiro and Querol 1999; Lopez et al.,2001). Söz konusu yöntem, mitokondrial DNA'nın ekstrakte edilerek restriksiyon enzimleriyle kesimini takiben elektroforezde yürütülmesi ve mDNA profilinin çıkarılması şeklinde özetlenebilmektedir. Tüm genomla çalışmak zaman alan, hacimli ve zahmetli bir iş olduğundan mDNA ile çalışmak daha pratiktir. Mc Arthur ve Clarck Walker, mDNA restriksiyon yol izlerini perfect-imperfect ilişkileriyle korele etmek için *Dekkera* (Askomisetik) ve *Brettanomyces* (İmperfekt) genusları üzerinde çalışmışlardır. Sonuçta, *Dekkera bruxellensis* ve *Brettanomyces lambicus* çifti için identik yol izi bulmuşlardır. Başka türler arasında da benzer yol izleri bulunmasına karşın, elde edilen bu sonuçların DNA homolojilerinden elde edilen verilerden daha doğru olabildiği konusunda bir bilgi mevcut değildir. Ayrıca, maya türleri arasında mDNA'daki boyut farklılıkları sözkonusu yöntemin uygulanabilirliğini sınırlamaktadır (Verachtert and De Mot, 1990).

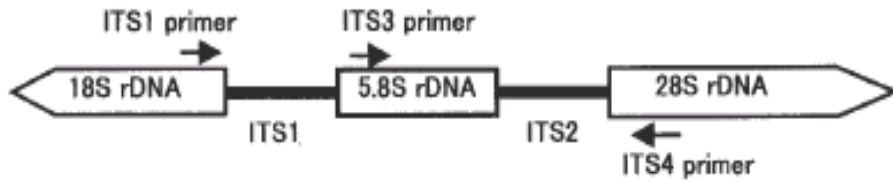
Son yıllarda ribozomal RNA (rRNA) genlerini hedefleyen PCR teknikleri oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bazı hemiaskomisetik mayaların rRNA genleri, 9 kb'lık bir fragmentin 100-150 ardışık tekrarından oluşan genomik bir bölgedir. Bu fragmentler 2 transkripsiyonel birim içermektedir. Bunlardan birincisi (7kb) 18S, 5,8 S ve 28S'lik rRNA'lar ile ITS1 ve ITS2 olarak adlandırılan iki internal transcribed spacer (ITS) için kod oluşturan gen kümelerinden oluşmaktadır. Zıt yönde transkribe edilen ikinci birim ise 5S'lik rRNA'ya ait kodu içermektedir (Loureiro and Querol,1999; Caggia et al.,2001; Martorell et al.,2005).

ITS bölgelerinin uzunluğu türe göre değişiklik göstermesine karşın bütün türlerde 18S , 5,8S ve 28S rRNA'ların boyutu esasen aynıdır (Fernandez et al.,1999) ITS1 bölgesi, 18S ve 5,8S rRNA genleri arasında bulunurken ITS2 bölgesi, 28S rRNA genleri arasında bulunmaktadır. ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgelerinin dizileri veya fragment boyutları türler arasında farklıdır (Çizelge 2.4). Bu nedenle ITS1 ve ITS2 bölgeleri, fungusların aranmasında ve identifikasyonunda kullanılmaktadır (Guillamon et al.,1998; Fujita et al.,2001).

ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanılmasıyla fungusların 5,8S rDNA bölgesi ile ITS1 ve ITS2 bölgeleri amplifiye olmaktadır. ITS3 ve ITS4 primer çiftinin kullanılmasıyla da ITS2 bölgesi amplifiye olmaktadır. ITS1 primeri 18S, ITS3 primeri 5,8S ve ITS4 primeri 28S rDNA bölgelerini kodlamaktadır (Şekil 2.1) ITS1 ve ITS4 primerleri ile test edilen bütün funguslar 350-880 bp. boyutunda fragment oluştururken ITS3 ve ITS4 primerleri ile 233-432 bp. boyutunda ürün oluşmuştur . Amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutları bazı türlerde hemen hemen aynıdır. Örneğin , *C. parapsilosis* ve *C.tropicalis* 'de yaklaşık 520 bp. , *C. saitoana* ve *P. anamola*'da yaklaşık 614 bp.'dir. Fakat bu organizmaların ITS3 ve ITS4 primer çifti ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu, türe spesifik farklılıklar göstermiştir. Bunun tam tersi ITS3 ve ITS4 primerleri ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu *C.utilis* ve *Stephanoascus ciferri* için yaklaşık 356 bp. iken ITS1 ve ITS4 primerleri ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu türe spesifik farklılıklar oluşturmuştur (Fujita et al.,2001).

Son zamanlarda Esteve-Zarzoso ve arkadaşları (1999), ITS ve 5,8S'lik rRNA geninin restriksiyon analizi üzerine kurulu rutin maya identifikasyonu için hızlı ve kolay bir yöntem önermişlerdir. 25 farklı genusa ait toplam 132 maya türünü tanılamak için başlangıç veri tabanı sunmuşlardır. Bu metodu kullanarak, izole edilmiş kolonileri ya da direkt olarak gıda örneğinden mayaları tanılamak mümkün olmuştur. Bu, çok sayıda maya türünün tanınması için bilgi sağlayan ilk moleküler metod olmuştur. Dlauchy ve arkadaşları aynı yöntemi kullanıp farklı bölgeleri çoğaltarak (18S rRNA ve ITS1) özellikle gıda, bira, şarap ve yumuşak içeceklerle bağlantılı 128 türün restriksiyon fragment bantlarının veri tabanını inşa etmişlerdir (Loureiro and Querol,1999).

Gıda endüstrisinde bozunmaya sebep olan mikroorganizmaların hızlı tanınması büyük önem taşımaktadır. PCR'a dayalı hızlı tarama teknikleri gıda endüstrisindeki mayaların saptanması ya da tanınması için kalite kontrolün önemli bir parçası olarak kullanılmaktadır (Loureiro and Quero,1999).



Şekil 2.1. Primer Hedef Bölgeleri İçeren Fungal Ribozomal Genlerin Şematik Gösterimi

Çizelge 2.4. Önemli Bazı Mayaların ITS1 / 5,8S rDNA / ITS2 Bölgesinin Boyutları

Tür	Boyut (bp)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	360
<i>Pichia pastoris</i>	380
<i>Candida sake</i>	450
<i>Candida tropicalis</i>	517
<i>Pichia anamola</i>	614
<i>Candida zeylanoides</i>	620
<i>Debaryomyces hansenii</i>	640
<i>Pichia farinosa</i>	700
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	725
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	740
<i>Candida boidinii</i>	750
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	775
<i>Torulaspora delbrückii</i>	800
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850

Genel olarak maya taksonomisinde kullanılan belli başlı testler yukarıda sıralanmıştır. Türlerin tanımlanmasında ilk olarak fizyolojik testler rol oynamaktadır (Loureiro and Querol, 1999). Moleküler teknikler yalnızca mayalar arasındaki bağlantıların açığa çıkarılmasında değil aynı zamanda evlasyonel ilişkilerin belirlenmesinde de kullanıldığı için sınıflandırmada önemli bir kriter olabilir. Fakat bu teknikler, rutin identifikasyon prosedürlerine kolaylıkla dahil edilemedikleri ve kullanılmaları halinde karşılaşılabilecek sakıncalar

nedeniyle mayaların identifikasyonu bugün halen fizyolojik testler ve üreme yapıları üzerine kuruludur. Dolayısıyla, moleküler biyolojik tekniklerin, konvansiyonel tanılama teknikleri ile desteklenmesi gerekmektedir (Acheampong, 2000).

2.4. Gıdalarda Mayaların Neden Olduğu Bozulmaların Etkileri

Her gıda türü, kompozisyonuna, işlenme ve korunma şekline, paketleme ve depolama koşullarına bağlı olarak, diğer mikroorganizmalarla uyum içerisinde büyüeyebilen spesifik bir nişi temsil etmektedir. Funguslar, gıda bozunmalarında etken organizma grubu oluşlarının yanı sıra insan patojenleri içerisinde de önemli bir grubu oluşturmaktadırlar. Özellikle fungal mikotoksinler ve uçucu bileşiklerin alerjik reaksiyonlara sebep olduğu bilinmektedir (Deak,2006).

Funguslar içerisinde küçük bir grupla temsil edilen ve bilinen fungal türlerin ancak %1' ini oluşturan mayaların insanlık için önemi, bu mayaların sebep olduğu gıda kaynaklı hastalıklarla karşılaştırıldığında daha baskın çıkmaktadır. Mayalanma, şarap ve bira fermentasyonu, günlük hayatımızın vazgeçilmez unsurlarından olmuştur. Birçok farklı gıda türü, besin değeri yüksek habitatlar olup büyümeyi teşvik eden en uygun ortamlar şeklinde nitelendirilebilirler. Büyümeyi kontrol eden faktörler yeteri kadar güçlü değilse, mayalar üremeye başlar ve sonuçta bozunma gerçekleşir. Mayalar aktiviteleri sonucu gıdanın fiziksel özelliklerinde ve tadında görülebilir veya hissedilebilir değişikliklere yol açmaktadırlar. Mayalar tarafından gerçekleştirilen bozunma; gaz çıkışı,

bulanıklık, maya kolonilerinin yerleşik hale gelmesi, film oluşumu, renk bozunması, tat ve aromadaki değişikliklerle kendini göstermektedir. Neyse ki hiçbir gıda kaynaklı maya, gıda enfeksiyonu ya da gıda zehirlenmesine neden olmamaktadır. Gıda tipine göre mayaların neden olduğu bozulmaların etkileri çizelge 2.5’de gösterilmiştir (Loureiro and Querol,1999, Deak, 2006).

Çizelge 2.5’de de görüldüğü gibi mayalar pek çok gıda maddesi için sorun teşkil ederken, üründe bulunan maya sayısı üretim teknolojisi gereği hava ile teması fazla olan, soğutma ya da dondurma gibi işlem gören gıdalar açısından önemli bir kalite kriteri olarak görülmektedir.

Çizelge 2.5.Farklı Gıdalarda Mayaların Neden Olduğu Bozulmaların Etkileri

BOZULMANIN ETKİLERİ								
GIDA	Yüzeyde Büyüme	Renk Değişimi	Gaz Üretimi	Bulanıklık	Sediment	Yüzeyde Film	Eksime	Tekstür Değişimi
TAZE SEBZELER	X	X						X
SALAMURA SEBZELER	X	X	X			X	X	X
PİŞMİŞ SEZELER	X		X				X	
TAZE MEYVELER		X	X				X	X
MEYVE SULARI			X	X	X	X	X	
DOĞRANMIŞ MEYVELER	X		X				X	
MAYONEZ,SALATA SOSLARI		X	X			X	X	X
ŞARAP,BİRA			X	X	X	X	X	
YUMUŞAK İÇECEKLER			X	X	X		X	
ŞEKERLEMELER,REÇELER, MARMELATLAR	X	X	X	X		X	X	X
ŞURUP,BAL,MEYVE KONSANTRELERİ			X	X		X	X	
TEREYAĞI,KREMA		X					X	
PEYNİR	X	X	X				X	X
YOĞURT			X			X	X	
DİLİMLENMİŞ EKMEK	X	X					X	
EKMEK HAMURU	X	X					X	
SOSİS,ET ÜRÜNLERİ	X	X					X	

2.4.1. Peynirlerde Mayaların Neden Olduğu Bozulmanın Etkileri

Peynirin buzdolabında saklanması, düşük pH, düşük nem içeriği ve yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olmasından dolayı mayaların bulunması beklenmemesine karşın, mayalar bir çok peynir çeşidinin mikroflorasının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Mayalar peynire göre iki taraflı bir rol oynamaktadır. Şöyle ki, bazı peynir türlerinin olgunlaştırılmasında tat ve tekstürün gelişimine pozitif bir şekilde katkıda bulunurken bazı peynirlerde de mayalar bozulmaya sebep olmaktadır. Bozulma peynirin yüzeyinde maya kolonilerinin oluşması, istenmeyen tat ve koku oluşumu, tekstür veya renk değişimi ile peynir paketlerinde deformasyon şeklinde oluşmaktadır. Deformasyon fermentatif mayaların sebep olduğu gaz oluşumundan kaynaklanmaktadır. Bir maya kontaminasyonunun kaynağı çiftlikten başlayıp final ürüne kadar üretim zincirinin tamamını kapsamaktadır. Maya büyümesi de peynirin final kalitesini etkilemektedir. Mayaların sebep olduğu bozulmalar özellikle peynirlerde ve fermente sütlerde temel bir problem olarak bilinmektedir. Şimdiye kadarki literatürlerde peynirlerdeki maya bozulmalarıyla ilgili raporların sayısı oldukça sınırlıdır. Bunun sebebi de muhtemelen bozulmaya sebep olan maya türü ile yararlı, özel bir maya türünün tayin edilmesinin zorluğundan kaynaklanmasıdır (Westall and Filtenborg, 1998; Prillinger et al.,1999; Corbo et al., 2001).

Mayaların peynirlerde oluşturduğu temel mekanizma, laktozun fermentasyonu, laktik ve sitrik asidin kullanımı, ekstraselüler lipolitik ve proteolitik enzimlerin üretimidir. Özellikle olgunlaştırma sırasında, daha

fazla olgunlaştırma bozulma olarak bilinmektedir. Şöyle ki, protein ve yağın sürekli hidrolizi acımsı ve ekşimsi bir tat oluşumuna neden olurken sürekli laktozun fermentasyonu asiditenin artmasına, gaz oluşumuna ve meyvemsi bir tat oluşumuna neden olmaktadır (Corbo et al.,2001; Hansen and Jakobsen, 2001; Suzzi et al., 2001).

Geotrichum candidum, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranaefaciens*, *Debaryomyces hansenii* ve *Yarrowia lipolytica* taze peynirlerde istenmeyen organoleptik değişimlere sebep olmaktadır. Mayaların peynirde istenmeyen tat ve koku oluşturabilmesi için her bir maya türünün belirli bir konsantrasyona ulaşması gerekmektedir. Örneğin, *Y. lipolytica* 10^5 - 10^6 cfu/g konsantrasyonda değişiklikler oluştururken, *Geotrichum candidum* 10^3 - 10^4 cfu/g konsantrasyonda bozulmaya sebep olmaktadır (Westall and Filtenborg, 1998; Prillinger et al.,1999).

Peynirlerde mayaların ve bakterilerin büyümesi peynirlerin raf ömrünün belirlenmesinde ana faktördür. Bozulma ambalajlarda şişkinlik, peynirin yüzeyinde gözle görülebilir maya kolonilerinin oluşması, maya benzeri bir koku ve alışılmamış bir tat olarak bilinmektedir. *Sporobolomyces roseus* ve *Trichosporon sp.* peynirin raf ömrü içinde peynir yüzeyinde bir film oluşumuna sebep olmaktadır (Vasdinyei and Deak, 2003).

Vivier ve ark. (1994) peynir örneklerindeki ilk bozulmayı şişme,kabarıklık oluşumu şeklinde tanımlamışlardır. *Kluyveromyces*

blattae, *Kluyveromyces thermotolerans* ve *Candida sphaerica*'nın gaz oluşumundan sorumlu mayalar olduğunu belirtmişlerdir.

Örneklerde şişkinlik ve alışılmamış maya kokusu peynirlerin raf ömrünü tespit etmektedir. Örneklerin kabarmasına *Torulaspora delbrüeckii* sebep olurken, *Debaryomyces hansenii*'nin yüksek konsantrasyonu güçlü bir maya kokusuna sebep olmaktadır. *Yarrowia lipolytica* yağ degradasyonu sonucu olarak peynirlerde istenmeyen tekstüre sebep olmaktadır (Suzzi et al.,2001).

2.5. Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde gıdalardaki mayaların fenotipik tanılanması ile ilgili çalışmalar mevcutken gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların genotipik tanılanması ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. Mayaların genotipik tanısıyla ilgili daha çok tıp fakültesinde yapılan klinik izolatların teşhisi ile ilgili çalışmalar olduğu görülmektedir. Akgül 2006 yılında klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* ayırımında fenotipik yöntemleri ve API PCR’ı kullanmışlardır. Koyuncu 2006 yılında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* ve *C. dubliniensis* suşlarının genotiplendirilmesi ve moleküler yöntemlerin tanıdaki yerini araştırmışlardır. Otlu 2004 yılında enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* suşları arasındaki genotipik farklılıkları pulsed field gel electrophoresis ve API PCR yöntemi ile belirlemişlerdir. Gıdalarda bulunan mayaların fenotipik tanısı ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalarda, daha çok maya tanısında kullanılan klasik metodlara benzer yaklaşımlara dayanan basitleştirilmiş

tanılama sistemlerini kullanmışlardır. Topçu 2006 yılında Ankara ve çevrelerinden toplanan 50 sokak sütü ve 50 peynir örneğinden maya izole etmiş ve bu mayaların fenotipik tanımlanmasını API 20 CAUX ile yapmışlardır. *Candida*, *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* ve *Saccharomyces* türlerini tanılamışlardır. Şenses-Ergül ve Özbaş 2006 yılında yüksek şeker içeren bazı gıdalardaki mayaların karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yüksek şeker içeren 129 farklı gıdadan 73 adet maya izole etmişlerdir. Bu izolatların tanımlanmasını API ID 32C (bioMeriux, France) ile yapmışlardır. Tanımlanan izolatlar *Candida*, *Rhodotorula*, *Zygosacharomyces*, *Cryptococcus*, *Sacharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia* ve *Torulaspora*'dır.

3. MATERİYAL VE METOTLAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan örnekler

Endüstride peynirlerde mayaların neden olduğu gıda bozulmaları, mayaların lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Organizmaların izolasyonunda farklı yerlerden alınan beyaz peynir örnekleri kaynak olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Mayaların izolasyonu ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri

Besiyeri 1: Tripton Glikoz Yeast Ekstrakt Kloramfenikol Agar (TGYCA)

Tripton	5 g
Yeast ekstrakt	5 g
Glukoz	100 g
Kloramfenikol	100 mg
Agar (Oxoid)	15 g
Distile su	1000 ml.

Bu besiyeri mayaların izolasyonunda kullanılmıştır (Deak et al.,1998; Welthogen and Viljaen, 1999; Beuchat et al.,2001).

Besiyeri 2: Tribütirin Agar

PDA	39 g
Tribütirin	10 ml.
Distile su	1000 ml.

Bu besiyeri mayaların lipolitik aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Rapp and Backhaus,1992).

Besiyeri 3: Yeast Carbon Base Agar

Bacto Yeast Carbon Base	11,7 g
Agar (Oxoid)	20 g
Distile su	1000 ml.

Bu besiyeri mayaların aerobik büyüme için azot kaynaklarını kullanma kapasitelerinin belirlenmesi testlerinde kullanılmıştır (Barnett et al.,1983, 2000). Yukarıdaki içeriğe ilave olarak aşağıda belirtilen azot kaynaklarından her defasında test edilecek azot kaynağının 5 gramı distile suda çözüldükten sonra filtre ile steril edilerek aseptik koşullarda petrilere dökülerek. hazırlanmıştır. Test edilecek azot kaynakları; nitrat, nitrit, etilamin, lizin, kadaverin, kreatinin, D-glukozamin ve D-triptofan'dır (Çizelge 4.1).

Besiyeri 4: Yeast Nitrogen Base Agar

Bacto Yeast Nitrogen Base	6,7 g
Agar (Oxoid)	20 g
Distile su	1000 ml.

Bu besiyeri mayaların aerobik büyüme için karbon kaynağı olarak organik bileşikleri kullanma kapasitelerinin ve sikloheksimid varlığında büyümenin belirlenmesi testlerinde kullanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000). Yukarıdaki içeriğe ilave olarak aşağıda belirtilen karbon kaynaklarından her defasında test edilecek karbon kaynağının 5 gramı distile suda çözündükten sonra filtre ile steril edilerek aseptik koşullarda petrilere dökülerek hazırlanmıştır. Test edilecek karbon kaynakları; D-galaktoz, L-sorboz, D-riboz, D-ksiloz, D-glukozamin, L-arabinoz, L-ramnoz, sükroz, maltoz, α,α -treholoz, Me α -D-glukosid, sellobioz, salisilin, arbutin, melibioz, laktoz, rafinoz, melezitoz, inulin, nişasta, gliserol, eritritol, ksilitol, D-glusitol, D-mannitol, galaktitol, myo-inositol, D-glukano-1,5-laktan, 2-keto-D-glukonat, 5-keto-D-glukonat, D-glukronat, D-galakturonik asit, DL-laktat, suksinat, sitrat, metanol, etanol, propan 1,2-diol, butan 2,3-diol, kuinik asit ve D-glutarat 'tır (Çizelge 4.1).

Besiyeri 5: Malt Yeast Glukoz Pepton Broth / Agar

Malt ekstrakt	3 gr
Malt Yeast ekstrakt	3 gr
D-glukoz	10 g
Peptone	5 g
(Agar)	10 g
Distile su	1000ml

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri saf kültürlerin stoklanmasında, testlerde

kullanılmak üzere taze kültürlerin hazırlanmasında, pseudomisel oluşturmayan vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi, DBB testinde ve farklı sıcaklıklarda büyüme testlerinde kullanılmıştır (Wickerham, 1951; Beech and Davenport, 1971; Rechcigl, 1978; Kirsop, 1984 ; Kirsop and Kurtzman, 1988 ; Barnett et al.,1983, 2000).

Besiyeri 6: Malt Extract Broth / Agar

Malt Extract	30 g
Pepton	5 g
(Agar)	10 g
Distile Su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121 °C’de 15 dakika süre ile steril edilmiş ve pH 5.4’e ayarlanmıştır (Kreger-van Rij, 1984; Tamer ve ark.1989; Rechcigl, 1978). Bu ortam pseudomisel oluşturmayan vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi, ballistosporların mikroskopik olarak incelenmesi için kullanılmıştır (Barnet et al.,1983, 2000).

Besiyeri 7: Gorodkova Agar

D-Glukoz	1 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	10 g
Distile Su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121 °C’de 15 dakika süre ile steril edildikten sonra askosporların incelenmesinde kullanılmıştır (Phaff

et al.,1966; Van der Walt,1970; Rechcigl, 1978; Barnet et al.,1983, 2000; Tamer ve ark.,1989; Atlas and Parks, 1997; Atlas, 2004).

Besiyeri 8: Asetat Agar

Potasyum Asetat	9.8 g
D-Glukoz	1 g
NaCl	1.2 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.7 g
Yeast Extract	2.5 g
Agar	10 g
Distile Su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edildikten sonra askosporların incelenmesinde kullanılmıştır (Phaff et al.,1966; Van der Walt, 1970; Rechcigl, 1978; Barnet et al., 1983, 2000).

Besiyeri 9: Yeast Extract Broth

Yeast Extract	3 g
Pepton	5 g
Distile Su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edildikten sonra şekerlerin fermentasyon testlerinde kullanılmıştır (Rechcigl, 1978; Tamer ve ark.1989; Barnet et al.,1983, 2000).

Besiyeri 10. Vitamin Free Agar

Bacto Vitamin Free Yeast Base 16.7 g

Agar (Oxid) 20 g

Distile su 1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri hücrelerin vitamin ihtiyacının belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnet et al., 1983, 2000).

Besiyeri 11: Osmofilik Yeast Ekstrakt Agar

Yeast Ekstrakt 3 g

Pepton 5 g

Agar (Oxid) 20 g

Distile su 1000 ml

Ortama %50 ve %60 (w/w) olacak şekilde D glukoz eklenerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların yüksek şeker konsantrasyonlarında büyüebilme kapasitesinin test edilmesinde kullanılmıştır (Barnet et al., 1983, 2000).

Besiyeri 12: Yeast Extract Agar

Yeast Ekstrakt 3 g

Pepton 5 g

Agar (Oxoid) 20 g

Distile su 1000 ml

Ortama % 10 ve % 16 (w/w) olacak şekilde NaCl eklenerek, mayaların yüksek tuz konsantrasyonlarında büyüyebilme kapasitesinin test edilmesinde kullanılmıştır. (Barnett et al., 1983, 2000).

Besiyeri 12: Rice Extract Agar

Difco Bacto Rice Extract Agar 25 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Hazırlanan ortamlar pseudomisel varlığının mikroskopik olarak incelenmesinde kullanılmıştır (Van der Walt, 1970; Rechcigl, 1978 ; Atlas and Parks, 1997; Barnet et al., 1983, 2000; Atlas, 2004).

Besiyeri 13: Üre Agar

KH₂PO₄ 2 g

Pepton 1 g

Fenol Kırmızısı 0,012 g

NaCl 5 g

Agar 20 g

Distile su 1000 ml

Dekstroz (Glikoz) 2 g

Üre solusyonu (%20) * 20 ml

*Üre solusyonu, membran filtre ile steril edildikten sonra, otoklavda 121 °C' de, 15 dakika sterilize edilen ortama, steril koşullarda

ilave edilmiştir. İzolatlarda ayırt edici bir özellik olan üreaz aktivitesinin bulunup bulunmadığını saptamak amacıyla kullanılmıştır (Van der Walt,1970; Rechcigl, 1978; Barnett et al.,1983, 2000; Atlas and Parks, 1997; Atlas, 2004).

Besiyeri 14: Sabouraud Dekstroz Agar

Bacto Neopepton	10 g
Bacto Dekstroz	20 g
Agar (Oxoid)	20 g
Distile Su	1000 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Hazırlanan ortamlar basidiomisetik mayaların ayırdedilmesinde Diazonyum Blue B (DBB) testinde kullanılmıştır (Van der Walt,1970; Rechcigl, 1978; Atlas, 2004).

Besiyeri 15: Yeast Pepton Glukoz Agar

Yeast Extract	10 g
Pepton	20 g
D-Glukoz	20 g
Agar (Oxoid)	20 g
Distile Su	1000 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların asetik asit üretiminin ve proteaz aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Strauss et al.,2001; Buzzini and Martini, 2002).

3.1.3. Çözelti, Tampon ve Boyalar

Çalışmalarımızın çeşitli safhalarında kullanılan çözelti ve diğer kimyasallar aşağıda verilmiştir.

* Diazonyum Blue B (DBB) Çözeltisi

pH 7'deki soğuk 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltisinin her ml'si için 1mg DBB tuzu eklenmektedir. Bu çözelti, Basidiomisetik mayaların ayırdedilmesinde kullanılmaktadır (Van der Walt, 1970; Barnett et al.,1983, 2000).

Tris-HCl Tampon Çözeltisi

A: 0.2 M Tris Çözeltisi (0.0242 g hidroksimetil aminometan / ml dH₂O)

B: 0.2 M HCl

50 ml A ve 47 ml B çözeltisinden alınarak distile su ile 200 ml'ye tamamlanır (Colowick and Kaplan,1955).

* Vitamin Çözeltisi

p-aminobenzoik asit	200µg
Biotin	20µg
Folik asit	2µg
myo_inositol	10mg
Nikotinik asit	400µg
Pantotenat (Ca)	2mg
Pyridoksin HCl	400µg

Riboflavin	200µg
Tiamin HCl	400µg
Distile su	1000ml

Belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan vitamin çözeltilerini, her defasında bir yada bir kaç eksik tutulacak şekilde Vitamin Free Agar (For Medium) ortamına aktarılarak izolatların vitamin ihtiyaçlarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnet et al., 1983, 2000).

*** Lugol İyot Çözeltisi**

İyot	5 g
KI	10 g
Distile Su	100ml.

Kullanım için çözeltinin 1:5 oranında seyreltilmesi gerekmektedir. Bu çözeltiden özellikle *Cryptococcus* genusuna ait belli türlerin ayırdedilmesi amacı ile kullanılmakta olan hücre dışı nişasta benzeri bileşiklerin üretilmesi testinde indikatör olarak yararlanılmıştır (Barnet et al., 1983, 2000).

*** Peptonlu Su**

Pepton	1 g
Distile Su	1000 ml.

Örneklerden dilüsyonların hazırlanması için izolasyon aşamasında kullanılmıştır.

* **Lizis Solüsyonu**

2mM	Tris-HCl
10mM	KCl
0,3mM	MgCl ₂
%0,02	Triton-x-100
10mg/l	Proteinaz K
0,917g/l	Dithiothreitol

* **Kloroform / İzoamilalkol ; 24:1 v/v**

24 kısım kloroform ve bir kısım izoamilalkol karıştırılarak hazırlanır.

* **Tris-borate-EDTA tamponu (TBE)**

Stok solüsyon (5x/ lt)

54g Tris base

27,5g Borik asit

20ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

1x Çalışma solüsyonu

89 mM Tris base

89 mM Borik asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

* **Tris-asetik asit- EDTA tamponu (TAE)**

Stok solüsyon

242g Tris base

57,1g Glasiyel asetik asit

100ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

1x Çalışma solüsyonu

0,04 M Tris asetat

0,001 M EDTA

* **dNTP karışımı** (Sigma; her deoksinükleotidtrifosfattan 100 mM)

* **Primerler** (Sigma)

ITS1 – 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3'

ITS4 – 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'

* **Tag DNA Polimeraz** (Pharmacia 500 U)

* **MgCl₂ Solüsyonu** (Pharmacia 500 U)

* **Marker DNA'lar** (Fermentans)

* **Jel yükleme tamponu**

% 0,25 Bromfenol mavisi

% 0,25 Ksilen siyanol FF

% 15 Ficoll suda (Tip 400; Pharmacia)

* **Etidyum bromür solüsyonu**

Stok solüsyon; 10 mg Etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlanır.

* **Malaşit Yeşili**

Malaşit Yeşili	5 g
Distile Su	100 ml.

Bu boya askosporların incelenmesi için kullanılmıştır (Van der Walt, 1970).

* **Safranin**

Safranin	0.5 g
Distile Su	100 ml.

Bu boya askosporların incelenmesi için malaşit yeşili ile birlikte kullanılmıştır (Van der Walt, 1970).

3.1.4. Kullanılan Başlıca Cihazlar

- Mikro santriüj (14.000g) (Hettich EBA 12R)
- Spektrofotometre (Varian 50)
- Yatay elektroforez (Consart HU 13)
- Güç Kaynağı (1500 V) (Sigma)
- Thermal Cyclor (Techne)
- U.V. Transilüminatör (254nm)

3.2. Metod

3.2.1. Mayaların İzolasyonu

Mayaların izolasyonu için beyaz peynir örneklerinden 20gr. alınarak içerisinde 180ml. steril peptonlu su bulunan erlenlere aktararak 10 dakika homojenize edilmiştir. Karışımın homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra bu 10^{-1} 'lik seyreltmeden içerisinde 9ml. fizyolojik su bulunan tüplere 1'er ml. alınarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} 'lık seyreltmeler yapılmıştır. Bu son dört seyreltmeden 1'er ml. alınarak petrilere konulmuştur. İzolasyon besiyeri olarak TGYCA (Trypton Glikoz Yeast Ekstrakt Kloramfenikol Agar) kullanılarak dilüsyonlar için paralel ekimler yapılmıştır. 27 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılan petrilere gelişen maya kolonileri sayılarak toplam maya sayıları bulunmuştur. Daha sonra bu maya kolonilerinden farklı görünüşte olanlar seçilerek saf kültürler elde etmek üzere yatık olarak hazırlanmış TGYCA ortamlarına aseptik koşullarda alınarak 27 °C'de 2 gün inkübasyondan sonra stok olarak kullanılmıştır.

3.2.2. İzolatların Tanımlanmasında Kullanılan Mikroskopik ve Morfolojik Testler

İzolatların genus ve tür düzeyinde tanımlanması Barnett ve ark.'na göre yapılmıştır. Glukozu fermente edemeyen mayaların tanımlanması için 1 nolu tayin anahtarı, fermente edebilen mayaların tanımlanması için ise 2 nolu tayin anahtarı kullanılmıştır (Barnett et al.,2000).Barnett ve ark.(1983, 2000) ile Kurtzman (1990) tarafından maya tanımlamasında

kullanılan morfolojik testler aşağıda belirtilmiştir (Barnett et al., 1983, 2000; Kurtzman, 1990)

3.2.2.1. Pseudomisel oluşturmayan vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi

Vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesinin amaçları; **i)** mayanın tomurcuklanmayla mı, fisyonla mı yoksa her iki yöntemle mi çoğaldığını, **ii)** tomurcuk oluşturunca bunun ana hücredeki yeri ve şekli, ile tomurcuk-ana hücre arasındaki bağlantı bölgesinin (geçitin) genişliğini **iii)** vejetatif hücrelerin şekil ve boyutunu belirlemektir. Bu incelemenin yapılabilmesi için, 100ml'lik erleninde bulunan 30ml. steril sıvı besiyerine (MYGP broth) bir günlük genç kültürden inokulasyon yapılarak, kültür 25-28°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda mikroskopik olarak incelenmiştir (Van der Walt, 1970; Barnett et al., 2000).

3.2.2.2. Pseudomiselli büyümenin mikroskopik olarak incelenmesi

Eğer bir maya tomurcuklanma ile çoğalıyorsa, olgunlaşmış tomurcuk ya hemen ana hücreden kendini ayırır ya da ana hücreye bağlı kalarak hücre zincirleri oluşmasını sağlar. Bazı mayaların hücre zincirleri oluşturma eğilimleri, pseudohif ya da pseudomisel (yalancı misel) oluşmasına neden olmaktadır (Van der Walt, 1970). Bu testin amacı, pseudomiselli büyümenin olup olmadığı, eğer varsa pseudomiselin tipi ve pseudomiselden büyüyen ancak filament oluşturmayan hücre tiplerinin incelenmesidir (Barnett et al., 2000). Bu inceleme için slide kültür tekniği

kullanılmıştır. İçinde U şeklinde cam çubuk ve lam bulunan petriler sterilize edildikten sonra, eritilmiş Rice Agardan lam üzerine bir damla damlatılıp üzerine steril lamel kapatılarak, lamelin dört kenarından maya kültürü iğne ile inokule edilmiştir. Kuruma olmaması için içine bir miktar steril su eklenen petriler 25 °C’de inkübe edilmiş ve preparat iki hafta boyunca iki günde bir mikroskop altında incelenmiştir (Van der Walt, 1970 ; Barnett et al.,2000).

3.2.2.3. Askosporların mikroskopik olarak incelenmesi

Askomisetik mayaların taksonomik sınıflandırmasında homotallik ve heterotallik eşem sistemleri önemlidir. Bu eşem sistemleri konjugasyonun tipi ile ilgilidir. Homotallik türlerde askus ve askospor hemen oluşur, heterotallik türlerde ise karşılıklı habloid türlerin karşılaştırılması yapılır. Homotallik türlerde α ve α gibi eşem farklılaşması yoktur. Bu testin amaçları; **i)** mayanın askospor oluşturup oluşturmadığını saptamak, **ii)** eğer oluşturuyorsa konjugasyon olmadan doğrudan vejetatif hücrelerden mi; iki vejetatif hücrenin konjugasyonundan sonra mı ya da ana hücre ile onun tomurcuğu arasındaki konjugasyondan sonra mı oluşturuyor sorularının cevabını almak, **iii)** askospor ve askusların şekil ve boyutlarını saptamaktır.

Bu test için bir gecelik maya kültüründen Asetat Agara inokulasyon yapılmış ve kültür 25°C’de 3 gün inkübe edildikten sonra mikroskop altında incelenmiştir. Askospor oluşumu gözlenmeyen kültürler 20°C’de 6 hafta boyunca inkübe edilmiş ve askospor oluşumu

için birer hafta ara ile incelenmiştir (Phaff et al., 1966; Van der Walt, 1970 ; Barnett et al.,2000).

Schaeffer ve Fulton'a göre (1933), askosporların boyama prosedürü ise şu şekildedir: Isıyla fıkse edilmiş preparatlar, 30-60 saniye boyunca %5'lik malaşit yeşilinden geçirilerek buharlaşma olana kadar 3-4 defa ısıtılmakta ve fazla boya 30 saniye kadar, akan suyun altında durulandıktan sonra preparat 30 saniye boyunca % 0,5'lik safraninle boyanmaktadır. Olgun askosporlar mikroskopta mavi-yeşil, vejetatif hücreler ise kırmızı renkte gözlenmektedir (Van der Walt, 1970).

3.2.3. İzolatların Tanılanmasında Kullanılan Fizyolojik Testler

3.2.3.1. Aerobik büyüme için karbon kaynağı olarak organik bileşikleri kullanma kapasitesi

Maya türlerini, organik bileşikleri tek karbon kaynağı olarak kullanma yeteneklerine göre ayırdetmek mümkündür. Bu organik bileşikler; şekerler, alditoller ve organik asitlerden oluşmaktadır. Bu testler “asimilasyon testleri” olarak adlandırılmakta ve mayaların aerobik büyümesi için bu bileşikleri kullanma kapasitesinin değerlendirmesinde kullanılmaktadır. Bu testlerde en yaygın olarak kullanılan yöntemler, tüplerde sıvı besiyeri kullanımı, agarlı besiyerinde oksonogram ve replika plate yöntemidir.

Replika plate (baskı ekim) yönteminde, bir “kalıp“ plaktaki MYGP agarının yüzeyi, iğne öze ile yaklaşık 25 maya suşuyla belli bir plana

göre inokule edildikten sonra, ayrı küçük kolonilerin oluşması için petri inkübasyona bırakılır. Petri üzerine işaret konularak belli bir yön oluşturulmalıdır. Baskının yapılacağı petrilerin her biri 25 mM karbon kaynağı ve nitrogen-base agar içermelidir. Baskı işleminin yapılacağı kadife bez ve bezin sarılı olduğu, petri kabına sığacak boyutta tahta blok, sterilize edilmelidir. “kalıp” plak, bu bloğa bastırılarak kolonilerin kadife üzerine çıkması sağlandıktan sonra, bloklar sırayla diğer petrilere baskı ekim yapılarak, petriler inkübasyona bırakılmalıdır (Barnett et al.,2000).

Denemelerde replika plate yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Yeast nitrogen base agara % 0,5 oranında test edilecek karbon kaynağı ilave edilmiş ve steril petrilere dökülmüştür. MYGP agarda büyütülmüş bir gecelik kültürden birer öze ile alınarak %0.85 fizyolojik su içine konulan maya izolatları petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra her petriye 26 maya suşu belli bir plana göre 4-5 µl inokule edilmiş ve petriler inkübasyona bırakılmıştır. Tanılama için test edilen C kaynakları: D-galaktoz, L-sorboz, D-riboz, D-ksiloz, D-glukozamin, L-arabinoz, L-ramnoz, sükroz, maltoz, α,α -treholoz, Me α -D-glukosid, sellobioz, salisilin, arbutin, meliobioz, laktoz, rafinoz, melezitoz, inulin, nişasta, gliserol, eritritol, ksilitol, D-glusitol, D-mannitol, galaktitol, myo-Inositol, D-glukano-1,5-laktan, 2-keto-D-glukonat, 5-keto-D-glukonat, D-glukrunat, D-galakturonik asit, DL-laktat, suksinat, sitrat, metanol, etanol, propan 1,2-diol, butan 2,3-diol, kuinik asit ve D-glukarat’tır.

3.2.3.2. Aerobik büyüme için azot kaynaklarının kullanma kapasitesinin belirlenmesi

Nitrati tek azot kaynağı olarak kullanma kapasitesinin belirlenmesi oldukça önemli bir testtir çünkü türlerin yaklaşık dörtte biri nitrati kullanabilmektedir. Nitrit, etilamin L-lisin gibi diğer bazı azot kaynaklarının da test substratı olarak faydalı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Azot kaynakları üzerinde aerobik büyüme testi, karbon kaynakları için kullanılan yöntemle aynı şekilde yapılmıştır. Tek fark, Yeast Nitrogen Base yerine Yeast Carbon Base ile hazırlanmış besiyerinin kullanılmasıdır. Test edilen azot kaynakları nitrat, nitrit, etilamin ve L-lisin kadaverin, kreatinin, D-glukozamin ve D-triptofan'dır (Barnett et al.,1983, 2000).

3.2.3.3. Şekerleri anaerobik olarak (fermentasyon) kullanma kapasitesinin belirlenmesi

Karbonhidrat fermentasyonu, bir organizma tanısının kesin olarak yapılmasının zorunlu olduğu durumlarda karbonhidratı kullanma testine ilave olarak yapılabildiği için yararlıdır (Sandven, 1990). Maya türlerinin yarısından fazlası, en azından D-glukozu anaerobik olarak fermente etmektedir. Bu testte, 13 bileşiği (heksozlar ve heksoidler) kullanma kapasitesi, CO₂ gazı oluşumu gözlenerek değerlendirilmektedir (Barnett et al.,2000). Karbonhidratların çözündürüldüğü bazal ortam, azot ve diğer besin maddelerini, iz elementleri ve vitaminleri içermelidir. Böylece karbonhidratların sentezi ve taşınmasında görevli olan enzim sistemlerinin sentezi için optimum koşullar sağlanmış olur. Bazal

ortamda, diğ er fermente edilebilir şekerler bulunmamalıdır (Van der Walt, 1970). Tüplere 10 ml Yeast Extract Broth ve 50 mM test şekeri eklenmiştir. Negatif kontrol tüplerine şeker konulmamıştır. Ayrıca her t  be ters çevrilmiş Durham t  b   konulmuştur. Her t  p, aktif olarak Yeast Extract Broth' da büyümekte olan kültürden alınmış yaklaşık 10^7 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan maya süspansiyonun 100   l 'si ile inokule edilmiştir.

Eğ er maya, tüpteki şekeri aerobik olarak kullanıyorsa, besiyerinin üst kısmında büyüyerek o şekere adapte olur. Adapte olmuş yani indüklenmiş hücreler, tüpün oksijen konsantrasyonunun düşük olduğ u dip kısmına iner. Burada maya hücreleri, anerobik bir mekanizmayla şekeri katabolize ederek ters çevrilmiş durumdaki durham tüpleri içinde toplanacak olan CO₂ gazının a  ığ a çıkmasına neden olabilirler.

Bu testte, inokule edilen tüpler 25   C' de yaklaşık bir hafta inkübe edilmiş, mayanın dibe çökmesini kolaylaştırmak için her gün çalkalanarak tüplerde gaz oluşumu gözlenmiştir (Barnett et al.,1983, 2000).

3.2.3.4. Vitamin ihtiya ının belirlenmesi

Mayalar, belli vitaminleri dışarıdan sağ lama gereksinimleri açısından birbirlerinden farklılık gösterirler. Diyagnostik bir özellik olarak, vitamin içermeyen bir ortamda büyüyebilme yeteneğ inin kullanılması, Wickerham (1951) tarafından geliştirilmiştir (Van der Walt, 1970). Bu test için Vitamin Free Agar kullanılmıştır. Bir seri petride hiçbir vitamin bulunmazken, diğ er petrilerde her seferinde bir veya

birkaç vitamin eksik tutulup diğerleri eklenerek testler gerçekleştirilmiştir (Barnett et al.,1983, 2000).

3.2.3.5. Hücre dışı nişasta bezeri bileşiklerin üretiminin belirlenmesi

Bu testin amacı, karakteristik olarak, iyotla mavi renk veren nişasta benzeri ekstraselüler polisakkarit oluşturan türlerin belirlenmesidir. MYGP broth bulunan tüplerde büyüyen kültürlerle bir damla Lugol iyot çözeltisi damlatılıp çalkalandıktan sonra renk değişimi olup olmadığına bakılmıştır. Mavi, mor veya yeşil renk sonucun pozitif olduğunu göstermektedir (Barnett et al.,1983, 2000).

3.2.3.6. Yüksek D-Glikoz ve NaCl konsantrasyonlarında büyümenin belirlenmesi

Maya türlerinin birçoğunun, ağırlıkça %40'a kadar glukoz konsantrasyonlarında iyi büyüme göstermektedir. Bazı mayalar yüksek şeker ve tuz konsantrasyonun olduğu ortamlarda büyüebilme yeteneğine sahiptir(Van der Walt, 1970). Bu test için, %50 ve %60 D-glukoz ile %10 ve %16 NaCl (w/v) içeren Yeast Ekstrakt Agar tüplerine ekim yapılmış ve tüpler 25°C'de 4 haftaya kadar inkübasyona bırakılarak incelenmiştir (Barnett et al.,2000).

3.2.3.7. Sikloheksimid varlığında büyümenin belirlenmesi

Sikloheksimid, 80S ribozomlarda protein sentezini inhibe ederek ökaryotların büyümesini durduran bir antibiyotiktir. Sikloheksimide

dirençli olan mayaların ribozomları modifiye edilmiş olabilmektedir (Barnett et al.,2000).

Bu test için D-glukoz içeren Yeast Nitrogen Base Agar'a %0,1 (1000 ppm) ve %0,01 (100 ppm) konsantrasyonlarında sikloheksimid (actidione) ilave edilmiştir. Petrilere maya suşları inokule edilerek inkübasyona bırakılmıştır (Wolf, 1996; Barnett et al.,2000).

3.2.3.8. Üreaz testi

Pratikte yeterli vitamin sağlandığı zaman bütün mayalar tek azot kaynağı olarak düşük konsantrasyonlarda üreden yaralanabilmekle beraber, pepton gibi bir organik azot kaynağı içeren ortamda yüksek konsantrasyonlardaki üreyi amonyağa hidroliz etme yeteneği açısından farklılık göstermektedirler. Üreaz aktivitesi çoğunlukla nişasta oluşumuna bağlanmasına rağmen, bu kesin bir kural değildir çünkü üreaz (+) / nişasta (-) ve üreaz (-) / nişasta (+) olan mayalar da bilinmektedir.

Bu test için, maya kültürü Üre Agar'a inokule edilerek 25°C'de inkübe edilmiştir. Koyu pembe renk oluşumu reaksiyonun pozitif olduğunu göstermektedir (Barnett et al.,1983, 2000)

3.2.3.9. Diazonium blue B (DBB) testi

Çeper yapısındaki farklılığı ortaya koyan DBB testi, basidiomisetik mayaların askomisetik mayalardan ayırılması amacıyla kullanılmaktadır. Van der Walt (1970), basidiomisetik mayaların bütün suşlarını DBB'nin tamponlanmış çözeltisi ile koyu kırmızı renk verdiğini göstermiştir. Bu renk reaksiyonu, askomisetik mayaların hiçbirinde

gözlenmemiştir. Bu renk değişiminin hücre çeperinde gerçekleştiği bilinmekle birlikte (Kurtzman, 1990), reaksiyonun mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Bu reaksiyon, bazı İmperfect maya türleri ile Askomisetik ve Basidiomisetik maya türlerinin ayırdedilmesi için kullanılmaktadır (Van der Walt, 1970; Wolf, 1996; Vaughan-Martini, 2003). Literatürde bu test için farklı yöntemler önerilmektedir. Bunlar ya 10 günlük kültürün birkaç saat 55°C’de tutulması (Barnett et al., 1983, 2000) ya 3 hafta 25°C’de inkübe edilen kültüre DBB çözeltisi eklenmesi (Van der Walt, 1970) ya da inkübasyon 5-7 güne indirilip daha sonra kültürün 16 saat boyunca 55-60°C’de tutularak üzerine DBB çözeltisi eklenmesi (Van der Walt, 1970) şeklinde olmaktadır (Lodder, 1970; et al., 1983, 2000).

Bu test için Sabouraud Dekstroz Agar kullanılmıştır. Sabouraud Dekstroz Agar tüplerinde büyütülen en az 10 günlük kültür birkaç saat 55°C’de tutularak daha sonra soğuk DBB çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2dk içinde oluşacak renk değişimine göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Reaktif kullanılacağı zaman hazırlanmalı ve soğuk olarak tutulmalıdır. Basidiomisetik mayaların oluşturduğu koloniler, DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk almakta, Askomisetik mayalarda ise herhangi bir renk değişimi olmamaktadır (Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.3.10. 37°C’de ve diğer sıcaklıklarda büyüme

Birçok maya türü için, 20-28°C arasındaki sıcaklıklar optimaldir. Sıcaklık testleri Malt Ekstrakt Agar kullanılarak yapılmıştır (Van der Walt, 1970). Genç kültürler ile inoküle edilen petriler, test edilecek

sıcaklıkta 4 gün boyunca inkübe edilirler. Psikrofilik maya türleri için daha uzun bir inkübasyon periyoduna gereksinim duyulabilir (Wolf, 1996).

3.2.3.11. Asetik asit üretiminin belirlenmesi

Yatık olarak tüpte ya da petride hazırlanmış %0.5 oranında (w/v) CaCO_3 içeren Yeast Extract Pepton Glukoz Agar (YPGA) üzerine az miktardaki inokulumun çizgi ekimi yapılır. Kültür etrafında görülen şeffaf zon, asetik asit üretiminin pozitif olduğunu göstermektedir (Wolf,1996; Boekhout et al.,2003).

3.2.4. İzolatların Tribütirin Agarda Ekstrasellüler Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzolatların tribütirine karşı lipaz aktivitesi Arima ve ark.'a göre yapılmıştır. Potato Dekstroz Agar'a % 1 oranında tribütirin ilave edilerek hazırlanan aktivasyon ortamı iyice karıştırılıp tribütirinin emülsüfikasyonu sağlandıktan sonra steril petrilere aseptik koşullarda yaklaşık 4 mm kalındığında dökülmüştür. Petriler oda sıcaklığında soğuduktan sonra yaklaşık 7mm çapında ve 4 mm derinliğinde kesilerek çukurlar açılmıştır. Aseptik koşullar altında açılan bu çukurlara bir gece önce Malt Yeast Glukoz Pepton Broth'da aktive edilen maya süspansiyonu 50 µl ilave edilmiştir. 27° C'de inkübasyona bırakılan petrilerin 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerdeki açılma zonları ölçülerek mayaların lipaz aktivitesi belirlenmiştir (Brockhoff and Jensen, 1974; Sztajer et al.,1988., Rapp and Backhaus, 1992; Suzzi et al.,2001).

3.2.5. İzolatların Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzolatların proteaz aktivitesinin belirlenmesinde %2 kazein içeren Yeast Ekstrakt Pepton Glukoz Agara kullanılmıştır. 27° C’de 3 gün inkübasyona bırakılan petrilerdeki kolonilerin etrafındaki açılma zonları ölçülerek mayaların proteaz aktivitesi belirlenmiştir (Ahearn et al.,1968; Tempel and Jakobsen, 2000; Strauss et al.,2001; Buzzini and Martini, 2002; Gonzales et al.,2004).

3.2.6. DNA İzolasyonu

Fenotipik tanılamaları yapılan izolatlardan ITS-PCR tiplendirilmesinde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İşlemler aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir.

1. Malt Yeast Glukoz Pepton Agarda çoğalan 5 günlük kültürlerden alınan bir öze dolusu hücre, 1,5ml’lik bir ependorf tüpünün içindeki 100µl. lizis solüsyonuna transfer edilir. Süspansiyon dikkatlice karıştırılarak 37°C’de 60 dakika inkübe edilir (İnkübasyon sırasında tüpler dikkatlice karıştırılırlar).

2. Tüpler 100°C’lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra 14.000g’de 15 dakika santrifüjleme yapılır.

3. Üstteki sıvı faz dikkatlice toplanır ve yeni bir ependorf tüpünün içine alınır.

4.Nükleik asitlerin çöktürülmesi için eşit hacimde soğuk etanol ilave edilir. (-20°C’de 30 dakika)

5. Karışım 14.000g'de, 4°C'de, 15 dakika santrifüjlenir ve üst faz atılarak pellet liyofilizatörde kurutulur.

6. Son olarak, pellet 100 µl distile suda tekrar süspanse edilir (Fernandez et al.,1999; Chen et al.,2000; Petersen et al.,2001).

3.2.7. DNA'ları saflık kontrolü

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agoroz jel elektroforezde kontrol edildikten sonra , saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapılmıştır (Sambrook et al.,1989; Ausubel et al.,1997).

Agoraz jel elektoroforezi, 5µg/ml eridyum bromid'li % 1 agoroz (Applichem) içeren mini jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde TBE tamponu kullanılmış, 5µl DNA solüsyonu, 2µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 50V'ta 45 dakika süreyle yürütülmüştür. Elektroforezde marker olarak O' Gene Ruler 100bp DNA ve O'RangeRuler 100bp DNA kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Sambrook et al.,1989 ; Ausubel et al.,1997)

3.2.8. ITS PCR

DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak

şekilde , aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2ml'lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur.

- Ultra saf su	10,65 µl
-PCR reaksiyon tamponu	2,5 µl
- MgCl ₂	3,6 µl
-dNTP karışımı	1,0 µl
- Primer ITS 1	1,0 µl
-Primer ITS 4	1,0 µl
- Tag Polimeraz	0,25 µl
- Kalıp DNA	5,0 µl (20-50 ng DNA)

Reaksiyon karışımı buharlaşmayı engellemek için ince bir tabaka steril mineral yağ ile kaplanmış ve amplifikasyon programlanabilir bir Thermal Cycler'da (Techne) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

-İlk denatürasyon 95°C'de 5 dakika

- 40 döngü, her döngüde;

I. 95°C'de 1 dakika

II. 58°C'de 2 dakika

III. 72 °C'de 3 dakika

- PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C'de 10 dakika inkübe edilirler.

- Tüpler reaksiyon bittikten sonra 4°C’de tutulurlar.

Her PCR denemesinde DNA kalıbı haricinde (bunun yerine steril distile su konulur) bütün bileşenleri içeren bir reaksiyon körü (negatif kontrol) de kullanılmıştır (Petersen et al.,2001; Chen et al.,2000; Fernandez et al.,1999).

3.2.9. ITS PCR Ürünlerinin Elektrofrez

PCR ürünlerinin elektrofrezinde Consort marka 13x15 cm boyutlarında bir cihaz kullanılmıştır. Aynı ya da farklı agoroz jellerdeki bant izlerinin karşılaştırılabilmesi için elektrofrez koşulları standardize edilmiş ve bütün elektrofrez işlemleri aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elektrofrez, 80V’ta 3 saat boyunca sürdürülmüş, Bromfenol mavisini başlangıç noktasından 11cm uzaklığa ulaşınca sonlandırılmıştır. Tampon olarak TAE kullanılmış ve elektrofrez %1,5’luk agoroz jelde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca jel hazırlanırken içerisine, 10mg/ml’lik Etidyum bromür solüsyonundan son konsantrasyon 0,5µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir (Ausubel et al.,1997; Petersen et al.,2001; Chen et al.,2000; Fernandez et al.,1999).

Elektrofrez için 8 µl PCR ürünü ve 3 µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektrofrez işleminde örneklerle beraber DNA markerı da (O’ Gene Ruler 100bp DNA ve O’RangeRuler 100bp DNA) jelde yürütülmüştür.

PCR ürünlerinin elektrofrez ile ayrılımları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

1. Elektroforez cihazının tepsisi iyice temizlenerek açık uçları bir otoklav bandı ile kapatılır.
2. Cihazın tankları TAE ile uygun seviyeye kadar doldurulur.
3. 250ml'lik temiz bir erlen içerisine 100 ml TBE konulur ve 1,5g agoroz TAE'de süspanse edilir.
4. Agoroz süspansiyonu tamamen berraklaşıncaya kadar mikrdalga fırında ısıtılarak, agorozun erimesi sağlanır.
5. Solüsyon 60°C'a kadar soğutulur ve 10mg/ml'lik stok Etidyum bromür solüsyonundan son konsantrasyon 0,5 g/ml olacak şekilde solüsyona ilave edilir.
6. Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilerek yükseklikleri 0,5-1mm olacak şekilde ayarlanır.
7. 60°C'a soğutulan agoroz solüsyonu jelde hava kabarcığı kalmayacak şekilde tepsiye dökülür.
8. Jel oda sıcaklığında tamamen donduktan sonra (60-90 dakika) bantlar ve taraklar dikkatlice çıkarılır.
9. Tanka jelin yüzeyini yaklaşık 1 mm kaplayacak şekilde TAE ilave edilir.
10. PCR rnleri ve Marker DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılır.

11. Brofenol mavisi başlangıç noktasından 11 cm uzaklaşınca (yaklaşık 3 saat) elektroforez sonlandırılır.
12. UV translüminatörde, jelde ayrılan bantlar incelenerek poloroid bir kamerayla jelin fotoğrafı çekilir.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Elde Edilmesi

Bölüm 3.2.1 de belirtilen yöntemle 14 farklı beyaz peynir örneğinden farklı görünüşteki maya kolonileri seçilerek toplam 92 izolat elde edilmiştir.. Beyaz peynir örneklerinin hepsinde toplam maya sayıları 10^7 - 10^8 arasında bulunmuştur. İzolatların elde edildiği kaynağa göre toplam maya sayıları ile izolat numaraları Çizelge 4.1' de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Mayaların İzole Edildiği Kaynaklara Göre Genus ve Türlerin Dağılımı

Örnek	Toplam maya sayısı	İzolat numaraları
1	9×10^7	1,2
2	2×10^8	3,4,5
3	$1,5 \times 10^8$	6,7,8
4	5×10^7	9,10,11,12
5	6×10^7	13,14,15,16,17
6	1×10^7	18,19,20,21,22
7	$1,3 \times 10^8$	23,24,25,26
8	2×10^8	27,28,29
9	8×10^8	30,31,32,33,34
10	$2,2 \times 10^7$	35,36,37,38,39
11	2×10^8	40,41,42
12	9×10^7	43,44,45,46
13	2×10^8	47,48
14	1×10^8	49,50,51,52,53
15	$3,6 \times 10^7$	54,55,56
16	$2,2 \times 10^7$	57
17	$1,4 \times 10^7$	61,62,63,64
18	2×10^7	65,66,67,68,69

Çizelge 4.1 (Devam)

19	1×10^8	70,71,72,73,74
20	3×10^7	75,76,77,78,79
21	$8,5 \times 10^8$	80,81,82,83
22	7×10^7	84,85,86
23	2×10^7	87,88,89
24	5×10^7	90,91,92

4.2. İzolatların Fenotipik Tanılanması

Mayaların genus düzeyinde fenotipik olarak tanılanmasında kullanılan testler DBB ve üre hidrolizi testi ile nitrat asimilasyonu ve glukoz fermantasyonu testidir (Barnett et al.,1983, 2000). O nedenle izolatlara öncelikle bu testler yapılmıştır.

DBB testinin uygulanmasında Sabouraud Dekstroz Agar kullanılarak, 10 günlük kültüre DBB çözeltisi eklenip test gerçekleştirilmiş ve incelenen bütün mayaların negatif tepki verdiği, dolayısıyla askomisetik maya oldukları gözlenmiştir.

Mayaların üreyi amonyağa hidroliz etme yeteneklerinin farklı olması, bu özelliğin mayaları ayırdetmede kullanılabilmesini sağlamaktadır. İncelenen bütün mayaların üreaz enzimine sahip olmadığı dolayısıyla üreyi hidroliz edemedikleri saptanmıştır.(Barnett et al.,1983, 2000).

İzolatların genus ve tür düzeyinde tanılanması, Barnett ve ark. (2000)'na göre 1 ve 2 numaralı tayin anahtarları kullanılarak yapılmıştır. Bu tayin anahtarında yer alan testler Çizelge 4.2 ' de verilmiştir. 6, 7, 8,

11, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 42, 48, 50, 52, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 73, 74, 75, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 ve 92 numaralı izolatların glukoz fermentasyonu negatif olduğundan bu izolatların tanımlanmasında Çizelge 4.3' de verilen glukozu fermente edemeyen mayaların tayin anahtarı kullanılmış, diğer izolatların glukoz fermentasyonu pozitif olduğundan Çizelge 4.4'de verilen glukozu fermente edebilen mayaların tayin anahtarı kullanılarak yapılmıştır. 1, 2, 3, 4, 5, 14, 21, 23, 45, 51, 54, 55, 58, 67, 68, 70 ve 72 numaralı izolatlar *Kluyveromyces* genusunun *K. marxianus* türü; 6, 7 ve 8 numaralı izolatlar *Williopsis* genusunun *W. saturnus* türü; 9, 10, 16, 17, 19 ve 69 numaralı izolatlar *Torulospira* genusunun *T. delbrückii* türü; 11, 12, 15, 18, 20, 25, 35, 36, 41, 46, 47, 49, 53, 59, 84 ve 85 numaralı izolatlar *Yarrowia* genusunun *Y. lipolytica* türü; 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 39, 42, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 73, 74, 81, 82, 83, 86, 87, 88, 89, 90, 91 ve 92 numaralı izolatlar *Debaryomyces* genusunun *D. hansenii* türü ; 48, 75 ve 79 numaralı izolatlar da *Galactomyces* genusunun *G. geotrichum* türü olarak tanımlanmıştır. *Pichia* genusuna ait izolat numaraları ve türler ise 13, 24, 26, 76, 77 ve 78 numaralı izolatlar *P. anamola*, 43, 44, 56 ve 57 numaralı izolatlar *P. quilliermondii*, 80 numaralı izolat *P. jadinii* olarak tanımlanmıştır.. *Candida* genusuna ait izolat numaraları ve türler ise, 37, 38 numaralı izolatlar *C. versatilis*, 22, 50 numaralı izolatlar *C. sake* , 40 numaralı izolat *C. zeylanoides*, 52 numaralı izolat *C. diddensiae* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2. İzolatların Tanılanmasında Kullanılan Testler

F1	D-Glukoz Fermentasyonu	C10	Me- α -D-Glukozid Asimilasyonu
F2	D-Galaktoz Fermentasyonu	C11	Sellobiyoz Asimilasyonu
F3	Maltoz Fermentasyonu	C12	Salicin Asimilasyonu
F4	Me- α -D-Glukozid Fermentasyonu	C13	Arbutin Asimilasyonu
F5	Sükroz Fermentasyonu	C14	Melibiyoz Asimilasyonu
F6	α,α -Trehaloz Fermentasyonu	C15	Laktoz Asimilasyonu
F7	Melibiyoz Fermentasyonu	C16	Rafinoz Asimilasyonu
F8	Laktoz Fermentasyonu	C17	Melezitoz Asimilasyonu
F9	Sellobiyoz Fermentasyonu	C18	İnulin Asimilasyonu
F10	Melezitoz Fermentasyonu	C19	Niştasta Asimilasyonu
F11	Rafinoz Fermentasyonu	C20	Gliserol Asimilasyonu
F12	İnulin Fermentasyonu	C21	Eritritol Asimilasyonu
F13	Niştasta Fermentasyonu	C22	Ksilitol Asimilasyonu
F14	Ksiloz Fermentasyonu	C23	D-Glunitol Asimilasyonu
C1	D-Galaktoz Asimilasyonu	C24	D- Mannitol Asimilasyonu
C2	L-Sorboz Asimilasyonu	C25	Galaktitol Asimilasyonu
C3	D-Riboza Asimilasyonu	C26	myo-İnositol Asimilasyonu
C4	D-Ksiloz Asimilasyonu	C27	D-Glukano1,5Lactone Asimilasyonu
C5	L-Arabinoz Asimilasyonu	C28	2-Keto- D-Gluconate Asimilasyonu
C6	L- Rhamnoz Asimilasyonu	C29	5-Keto-D-Glukonate Asimilasyonu
C7	Sükroz Asimilasyonu	C30	D-Glukuronate Asimilasyonu
C8	Maltoz Asimilasyonu	C31	D-Galakturonik Asit Asimilasyonu
C9	α,α -Trehalose Asimilasyonu	C32	DL-Lactat Asimilasyonu

Çizelge 4.2 (devam)

C33	Süksinate Asimilasyonu	V7	Pridoksin'siz Büyüme
C34	Sitrat Asimilasyonu	V8	Pridoksin ve Tiamin'siz Büyüme
C35	Metanol Asimilasyonu	V9	PABA'siz Büyüme
C36	Etanol Asimilasyonu	V10	Niasin'siz Büyüme
C37	Propan 1,2-diol Asimilasyonu	T1	25 °C'de Büyüme
C38	Butan 2,3-diol Asimilasyonu	T2	30 °C'de Büyüme
C39	Kuinik Asit Asimilasyonu	T3	35 °C'de Büyüme
C40	D-Glukarat Asimilasyonu	T4	37 °C'de Büyüme
C41	D-Glukozamin Asimilasyonu	T5	40 °C' de Büyüme
C42	D-Arabinöz Asimilasyonu	T6	42 °C'de Büyüme
C43	D-Glukonat Asimilasyonu	O1	%0,01 Sikloheksimid Büyüme
C44	Ribitol Asimilasyonu	O2	%0,1 Sikloheksimid Büyüme
C45	L-Arabinitol Asimilasyonu	O3	%1 Asetik Asit'te Büyüme
N1	Nitrat Asimilasyonu	O4	%50 D-Glukoz'da Büyüme
N2	Nitrit Asimilasyonu	O5	%60 D-Glukoz'da Büyüme
N3	Etilamin Asimilasyonu	O6	%10 NaCl' de Büyüme
N4	L-Lizin Asimilasyonu	O7	%16 NaCl'de Büyüme
N5	Kadaverin Asimilasyonu	M1	Nişasta Oluşumu
N6	Kreatinin Asimilasyonu	M2	Asetik Asit Üretimi
N7	D-Glukozamin Asimilasyonu	M3	Üre Hidrolizi
N8	D-Triptofan Asimilasyonu	M4	DBB Reaksiyonu
V1	Vitaminsiz Büyüme	E1	Pembe Koloni
V2	myo-İnositol'süz Büyüme	E2	Tomurcuklanma
V3	Pantotenat'sız Büyüme	E3	Filament Oluşumu
V4	Biotin'siz Büyüme	E4	Septat Hif
V5	Tiamin'siz Büyüme	E5	Ballistoconidia
V6	Biotin ve Tiamin'siz Büyüme		

C: Karbon Kaynağı **N:** Azot Kaynağı **M:** Makroskobik Karakteristikler

T: Sıcaklık **V:** Vitamin **O:** Ozmatik Basınç **E:** Ekstra Karakteristikler

Çizelge 4.3.Glukozu Fermente Edemeyen Mayaların Tayin Anahtarı

TESTLER	NEGATİF	POZİTİF
1 Nitrat Asimilasyonu	2	952
2 Üre Hidrolizi	3	621
3 Sükroz Asimilasyonu	4	360
4 Eritritol Asimilasyonu	5	312
5 Etilamin Asimilasyonu	6	90
90 2-Keto-D-Glukonat Asimilasyonu	91	247
91 D-Galaktoz Asimilasyonu	92	200
200 Tomurcuklanma	201	213
201 D-Ksiloz Asimilasyonu	202	206
206 Vitaminsız Büyüme	207	211
211 L-Sorboz Asimilasyonu	<i>Dipodascus armillaria</i>	212
212 Sellobiyoz Asimilasyonu	<i>Galactomyces geotrichum</i>	<i>Dipodascus macrosporus</i>
312 % 0,01 Sikloheksimid'de Büyüme	325	353
324 Vitaminsız Büyüme	1022	1048
353 Filamentöz	354	357
357 370 C'de Büyüme	358	<i>Pichia farinosa</i>
358 α,α -Trehalose Asimilasyonu	359	<i>Candida schatavii</i>
359 Sellobiyoz Asimilasyonu	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Dipodascus macrosporus</i>
360 Eritritol Asimilasyonu	361	552
361 % 0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	362	492
362 %10 NaCl' de Büyüme	363	417
363 Filamentöz	364	387
364 myo-İnositol Asimilasyonu	365	382
365 % 60 D-Glukoz'da Büyüme	366	381
381 Nitrit Asimilasyonu	<i>Candida sake</i> <i>Zygosaccharomyces mellis</i>	<i>Williopsis californica</i>
417 L-Ramnoz Asimilasyonu	418	483
418 Maltoz Asimilasyonu	419	434
434 Nitrit Asimilasyonu	435	475
475 DBB Reaksiyonu	476	482

Çizelge 4.3 (devam)

476 D-Galaktoz Asimilasyonu	477	479
479 Pembe Koloni	480	<i>Kondoa malvinella</i>
480 Butan 2,3-diol Asimilasyonu	<i>Debaryomyces hansenii</i>	481
483 myo-inositol Asimilasyonu	484	490
484 Pridoksin'siz Büyüme	485	487
487 Pembe Koloni	488	<i>Kondoa malvinella</i>
488 DBB Reaksiyonu	489	<i>Cryptococcus albidus</i>
489 D-Galaktoz Asimilasyonu	<i>Candida ernobii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
492 myo-inositol Asimilasyonu	493	541
493 D-Galaktoz Asimilasyonu	494	510
510 % 10 NaCl'de Büyüme	511	527
527 2-Keto-D-Glukonat Asimilasyonu	528	531
531 Sellobiyoz Asimilasyonu	532	536
532 Pridoksin ve Tiamin'siz Büyüme	533	535
535 Biotisiz Büyüme	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Pichia quilliermondii</i>
536 DBB Reaksiyonu	537	<i>Rhodotorula minuta</i>
537 Butan 2,3-diol Asimilasyonu	538	540
538 Biotinsiz Büyüme	539	<i>Pichia quilliermondii</i> <i>Debaryomyces wanrijae</i>
539 L-Ramnoz Asimilasyonu	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
552 Filamentöz	553	573
553 % 10 NaCl'de Büyüme	554	565
565 myo-inositol Asimilasyonu	566	572
566 DBB Reaksiyonu	567	571
567 Rafinoz Asimilasyonu	568	570
568 Kuinik Asit Asimilasyonu	569	<i>Debaryomyces maramus</i>
569 D-Glukozamin (N) Asimilasyonu	<i>Candida diddensiae</i>	<i>Candida diddensiae</i>
573 D-Galaktoz Asimilasyonu	574	583
583 D-Glukuronat Asimilasyonu	584	613
613 D-Glukozamin (N) Asimilasyonu	614	620
614 Tiaminsiz Büyüme	615	617

Çizelge 4.3 (devam)

617 myo-inositol Asimilasyonu	<i>Debaryomyces hansenii</i>	620
952 Üre Hidrolizi	953	1020
953 D-Glukuronat Asimilasyonu	954	1004
954 %0.01 Sikloheksimid'de Büyüme	955	984
955 Propan 1,2-diol Asimilasyonu	956	971
971 DBB Reaksiyonu	972	982
972 Melezitoz Asimilasyonu	973	977
973 % 60 D-Glukoz'da Büyüme	974	<i>Williopsis californica</i>

Çizelge 4.4. Glukozu Fermente Edebilen Mayaların Tayin Anahtarı

TESTLER	NEGATİF	POZİTİF
1 Maltoz Asimilasyonu	2	530
2 Etilamin Asimilasyonu	3	187
187 %0.1 Sikloheksimid'de Büyüme	188	422
234 D-Glukozamin Asimilasyonu	235	405
235 Rafinoz Asimilasyonu	236	376
236 %10 NaCl' de Büyüme	237	305
237 Salisin Asimilasyonu	238	288
238 Biotin ve Tiaminsiz Büyüme	239	278
278 Tomurcuklanma	279	280
280 Sitrat Asimilasyonu	281	287
281 %1 Asetik Asit Asimilasyonu	282	286
282 D-Triptofan Asimilasyonu	283	284
283 Pridoksin ve Tiamin'siz Büyüme	<i>Candida ernobii</i>	<i>Torulasporea delbrückii</i>
376 % 10 NaCl'de Büyüme	377	388
388 Tomurcuklanma	378	389
389 Nitrat Asimilasyonu	390	401
390 Sitrat Asimilasyonu	391	397
391 Salisin Asimilasyonu	392	396
392 D-Galaktoz Fermentasyonu	393	<i>Torulasporea delbrückii</i>
422 Methanol Asimilasyonu	423	513
423 Sükroz Asimilasyonu	424	485

Çizelge 4.4 (devam)

485 D-Glukozamin Asimilasyonu	486	510
486 D-Galaktoz Asimilasyonu	487	491
4912 -Keto-D-glukonat Asimilasyonu	492	501
501 Nitrat Asimilasyonu	502	509
509 % 50 D-Glukoz'da Büyüme	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Candida versatilis</i>
510 D-Galaktoz Asimilasyonu	<i>Candida anatomiae</i> <i>Candida ernobii</i>	511
511 Etanol Asimilasyonu	<i>Dipodascus magnusii</i>	512
512D -Galaktronik Asit Asimilasyonu	<i>Pichia quilliermondii</i>	<i>Zygoascus hellenicus</i>
530 Eritritol Asimilasyonu	531	960
531 %0.1 Sikloheksimid'de Büyüme	532	827
532 Sellobiyoz Asimilasyonu	533	656
656 Pridoksinsiz Büyüme	657	692
692 %10 NaCl'de Büyüme	693	735
693 Nitrit Asimilasyonu	694	718
718 Propan 1,2-diol Asimilasyonu	719	725
719 30 ⁰ C'de Büyüme	720	722
722 Kuinik Asit Asimilasyonu	723	<i>Filobasidium capsuligenum</i>
723 Sitrat Asimilasyonu	544	724
724 Rafinoz Asimilasyonu	<i>Candida ernobii</i>	<i>Pichia Jadinii</i>
827 L-Ramnoz Asimilasyonu	828	942
828 D-Galaktoz Asimilasyonu	829	854
854 Rafinoz Asimilasyonu	855	916
916 Niasinsiz Büyüme	917	919
917 Melibioz Asimilasyonu	918	<i>Candida solmanticensis</i>
918 Melezitoz Fermentasyonu	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>
960 Nitrat Asimilasyonu	961	1046
1046 Biotin ve Tiaminsiz Büyüme	1047	1058
1058 Kuinik Asit Asimilasyonu	1059	<i>Hansenula anamola</i>

Çizelge 4.5. Mayaların İzole Edildiği Kaynaklara Göre Genus ve Türlerin Dağılımı

Örnek	İzolat numaraları	İzolatın Genus ve Türü
1	1,2	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
2	3,4,5	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
3	6,7,8	<i>Williopsis californica</i>
4	9,10	<i>Torulaspora delbrüeckii</i>
4	11,12	<i>Yarrowia lipolytica</i>
5	13	<i>Pichia anamola</i>
5	14	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
5	15	<i>Yarrowia lipolytica</i>
5	16,17	<i>Torulaspora delbrüeckii</i>
6	18,20	<i>Yarrowia lipolytica</i>
6	19	<i>Torulaspora delbrüeckii</i>
6	21	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
6	22	<i>Candida sake</i>
7	23	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
7	24,26	<i>Pichia anamola</i>
7	25	<i>Yarrowia lipolytica</i>
8	27,28,29	<i>Debaryomyces hansenii</i>
9	30,31,32,33,34	<i>Debaryomyces hansenii</i>
10	35,36	<i>Yarrowia lipolytica</i>
10	37,38	<i>Candida versatilis</i>
10	39	<i>Debaryomyces hansenii</i>
11	40	<i>Candida zeylanoides</i>
11	41	<i>Yarrowia lipolytica</i>
11	42	<i>Debaryomyces hansenii</i>
12	43,44	<i>Pichia quilliermondii</i>
12	45	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

Çizelge 4.5.(devam)

Örnek	İzolot numaraları	İzolatin Genus ve Türü
12	46	<i>Yarrowia lipolytica</i>
13	47	<i>Yarrowia lipolytica</i>
13	48	<i>Galactomyces geotrichum</i>
14	49,53	<i>Yarrowia lipolytica</i>
14	50	<i>Candida sake</i>
14	51	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
14	52	<i>Candida diddensiae</i>
15	54,55	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
15	56	<i>Pichia quilliermondii</i>
16	57	<i>Pichia quilliermondii</i>
16	58	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
16	59	<i>Yarrowia lipolytica</i>
16	60	<i>Debaryomyces hansenii</i>
17	61,62,63,64	<i>Debaryomyces hansenii</i>
18	65,66	<i>Debaryomyces hansenii</i>
18	67,68	<i>Kluyveromyces marxianu</i>
18	69	<i>Torulaspora delbrückii</i>
19	70,72	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
19	71,73,74	<i>Debaryomyces hansenii</i>
20	75,79	<i>Galactomyces geotrichum</i>
20	76,77,78	<i>Pichia anamola</i>
21	80	<i>Pichia jadinii</i>
21	81,82,83	<i>Debaryomyces hansenii</i>
22	84,85	<i>Yarrowia lipolytica</i>
22	86	<i>Debaryomyces hansenii</i>
23	87,88,89	<i>Debaryomyces hansenii</i>
24	90,91,92	<i>Debaryomyces hansenii</i>

4.3. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri

Alexopoulos ve arkadaşları (1996) mayaları askomisetik, basidiomisetik ve deuteromisetik mayalar adı altında üç grupta incelemişlerdir. Askomisetik mayalar *Saccharomycetales* ordosu ve *Saccharomycetaceae* ve *Dipodascaceae* familyası altında incelenmektedir. Barnett ve arkadaşları ise askomisetik mayaları, *Archiascomycetes*, *Saccharomycetes* ve *Hemiascomycetes* sınıfları altında toplamıştır (Barnett et al.,2000). Tez kapsamındaki izole edilen türlerin sistematigi de hem Alexopoulos ve ark. hem de Barnett ve ark.'na göre yapılmıştır. İzolatların sistematik kategorileri çizelge 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri (Barnett et al.,2000)

Kingdom : <i>Fungi</i>	
Phylum : <i>Ascomycota</i>	
Classis : <i>Hemiascomycetes</i>	Classis : <i>Hemiascomycetes</i>
Ordo : <i>Saccharomycetales</i>	Ordo : <i>Saccharomycetales</i>
Familya 1: <i>Saccharomycetaceae</i>	Familya 3 : <i>Candidaaceae</i>
Genus 1: <i>Debaryomyces</i>	Genus 1 : <i>Candida</i>
Species 1: <i>hansenii</i>	Species 1 : <i>sake</i>
Genus 2: <i>Kluyveromyces</i>	Species 2 : <i>diddensiae</i>
Species 1: <i>marxianus</i>	Species 3 : <i>versatilis</i>
Genus 3: <i>Pichia</i>	Species 4 : <i>zeylanoides</i>
Species 1: <i>anamolae</i>	
Species 2: <i>quilliermondii</i>	
Species 3: <i>jadinii</i>	
Genus 4: <i>Torulaspora</i>	
Species 1: <i>delbrückii</i>	
Genus 5: <i>Williopsis</i>	
Species 1: <i>californica</i>	
Familya 2: <i>Dipodascaceae</i>	
Genus 1: <i>Yarrowia</i>	
Species 1: <i>lipolytica</i>	
Genus 2: <i>Galactomyces</i>	
Species 1: <i>geotrichum</i>	

Çizelge 4.7. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri (Alexopoulos et al., 1996)

Kingdom	: <i>Fungi</i>	
Phylum	: <i>Ascomycota</i>	
Classis	: <i>Ascomycetes</i>	
Ordo	: <i>Saccharomycetales</i>	
Familya	: <i>Saccharomycetaceae</i>	Familya 2 : <i>Dipodascaceae</i>
Genus 1	: <i>Debaryomyces</i>	Genus 1 : <i>Yarrowia</i>
Species 1	: <i>hansenii</i>	Species 1 : <i>lipolytica</i>
Genus 2	: <i>Candida</i>	Genus 2 : <i>Galactomyces</i>
Species 1	: <i>sake</i>	Species 1 : <i>geotrichum</i>
Species 2	: <i>versatilis</i>	
Species 3	: <i>diddensiae</i>	
Genus 3	: <i>Kluyveromyces</i>	
Species 1	: <i>marxianus</i>	
Genus 4	: <i>Torulaspora</i>	
Species 1	: <i>delbrückii</i>	
Genus 5	: <i>Pichia</i>	
Species 1	: <i>anamola</i>	
Species 2	: <i>quilliermondii</i>	
Species 3	: <i>jadinii</i>	
Genus 1	: <i>Williopsis</i>	
Species 1	: <i>californica</i>	

4.4. Fenotipik Olarak Tanılanan İzolatların Dahil Olduğu Genusların Özellikleri

4.4.1. *Debaryomyces* genusu

Debaryomyces hansenii; deniz suyundan, tuzlu besinlerden ve salamuralardan izole edilebilen halo-, osmo-, ve xerotolerant askomisetik bir mayadır. *Candida vini*, *Candida zeylanoides*, ve *Pichia*

membranaefaciens gibi maya türlerinin aksine *D.hansenii* bütün peynir çeşitlerinde en sık rastlanan bir türdür.30 yıldan daha uzun süredir de, *D.hansenii*'nin yüksek NaCl konsantrasyonundan en az etkilenen tür olduğu bilinmektedir. Bunların yanı sıra, *Pichia guilliermondi*, *Yarrowia lipolytica* ve *Candida parapsilosis* gibi düşük su aktiviteli çeşitli besinlerde kontaminant bir tür olarak bilinmektedir. Peynir, süt, yoğurt, dondurma, reçel, pasta, sucuk gibi bir çok besin maddesinin bozulmasından sorumlu bir türdür (Prista et al.,2005; Breuer and Harms, 2006;).

Genellikle non-patojenik olarak bilinmektedir ama; bu maya tarafından kemik enfeksiyonlarının olduğu, immun sistemi baskılanmış hastalarda subkutonik çıbanlara, osteitislere ve keratitislere ,allerjik alveolitise sebep olduğu rapor edilmiştir (Breuer and Harms,2006).

D.hansenii yüksek heterogenik bir türdür. Bu çok yönlülük; strainler arasında ki çeşitli karbon kaynaklarını asimile ve fermente etme kapasitelerinde çeşitlilik, farklı lipaz ve proteaz aktivitelerinin ifadesinde değişkenlik, çeşitli optimum büyüme koşullarında üreme gibi fenotipik farklılıklar şeklinde gösterilmiştir (Breuer and Harms,2006).

Debaryomyces genusunun üyeleri fizyolojik olarak; fermantasyon kapasitelerinin ya çok az ya da hiç olmaması, nitrata asimile edememeleri, kemotaksonomik olarak koenzim Q-9'ü ifade edememeleri ile karakterize olurlar. Ayrıca, % 10 NaCl ve % 5 glukoz konsantrasyonlarında büyüme yetenekleri ile diğer askomisetik mayalardan ayrılırlar. Glukoz, galaktoz, sükroz, maltoz, rafinoz ve

trehalozun fermantasyonu *D. hansenii* tarafından zayıftır ve laktoz fermantasyonu gözlenmemektedir. Bu anaerobik büyümenin zayıf olduğunun bir göstergesidir. *D. hansenii*'nin optimum büyüme sıcaklığının 20-25 °C arası olduğu ama 5-10 °C hatta 0 °C de de büyüdüğü rapor edilmiştir. *D. hansenii* yüksek kemostres toleransına sahiptir, bu da kültürasyonda kullanılan birçok substratın yüksek konsantrasyona karşı toleransı anlamına gelmektedir. *D. hansenii*'nin en önemli fizyolojik özelliği doğada yaygın olarak bulunan sodyumun yüksek konsantrasyonlarına karşı oldukça güçlü direnç göstermesidir. 4M NaCl konsantrasyonunda bile büyüme gösterebilmektedir. Yüksek tuz seviyelerine bu kadar direnç göstermelerinden dolayı ökaryotlarda osmoregülasyon mekanizmalarının aydınlatılması için model organizma olarak önem kazanmıştır (Martorell et al.,2005; Breuer and Harms,2006).

Hücreler multilateral tomurcuklanma ile çoğalırlar. Primitif, bazen gelişmiş bir pseudomisel oluşumu gözlenmektedir. Bir hücre ile tomurcuğu arasındaki konjugasyon genellikle askus formasyonundan öncedir. Her askusta 1-4 askospor oluşur. (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kreger van Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al.,1966; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988; Breuer and Harms, 2006).

27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 39, 42, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 73, 74, 81, 82, 83, 86, 87, 88, 89, 90, 91 ve 92 numaralı izolatalar *Debaryomyces* genusunun özelliklerini göstermişlerdir. *D. hansenii*'nin

fermentasyon ve asimilasyon testlerindeki özellikleri çizelge 4.7' de verilmiştir.

4.4.2. *Yarrowia* genusu

Dipodascaceae familyasına ait askomisetik bir mayadır. Hidrofobik substratların parçalanması, dimorfizm, protein sekresyonu çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır. Bu maya sosis, peynir, süt ve süt ürünleri gibi lipid ve proteince zengin gıdalarda bulunmaktadır. Camambert ve mavi peynirde predominant olarak bulunan mayalardan biridir ve bu peynirlerde 10^6 - 10^7 cfu/g konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu kadar yüksek konsantrasyonda bulunması 5 - 10^0 C'de büyüebilmesi ve ekstrasellüler lipaz ve proteaz aktivitesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Çoğu strain 32^0 C'nin üzerinde büyüebilmekte ve zorunlu aerobiktir. Laktozu ve galaktozu asimile edemezler ayrıca tuza karşı *D. hansenii*'ye göre daha duyarlıdırlar. *D. hansenii* kazeini hidrolizleyemezken *Y. lipolytica* ise kazeinin bütün bileşenlerini parçalayabilmektedir (Tempel and Jakobsen, 2000; Fickers et al.,2005).

Multilateral tomurcuklanma ile çoğalan hücreler globoz, elipsoid veya silindiriktir. Askosporlar oval, şapka veya satürn şeklindedir. Her askusta 1-4 askospor oluşur. Genellikle pseudomisel ve septat hif oluşumu gözlenmektedir. Şekerler fermente edilmez. Nitrat ve DBB reaksiyonu negatiftir. Üreaz (+)'tir. (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kregervan Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et

al.,1966; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

11, 12, 15, 18, 20, 25, 35, 36, 41, 46, 47, 49, 53, 59, 84 ve 85 numaralı izolatlar *Yarrowia* genusunun özelliklerini göstermiştir. *Y.lipolytica*'nın fermentasyon ve asimilasyon testlerindeki özellikleri çizelge 4.7' de verilmiştir.

Debaryomyces ve *Yarrowia* genusu dışında izole edilen genusların özellikleri de aşağıda belirtilmiştir.

4.4.3. *Kluyveromyces* genusu

Vejetatif hücreler ovoid, elipsoid silindirik veya elongattır. Aseksüel çoğalma tomurcuklanma ile gerçekleşir. Askosporlar dairesel oval veya reniform şeklindedir. Her askusta 1-60 askospor oluşur. Fermentasyon gözlenir. Nitrata asimile etmezler. Üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir. Eksternal vitamin kaynağına gerek duymazlar (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kregervan Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al.,1966; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Barnett et al., 1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987 ; Frazier and Westhoff, 1988).

1, 2, 3, 4, 5, 14, 21, 23, 45, 51, 54, 55, 58, 67, 68, 70 ve 72 numaralı izolatlar *Kluyveromyces* genusunun özelliklerini göstermiştir. *K. marxianus*' un fermentasyon ve asimilasyon testlerindeki özellikleri çizelge 4.7' de verilmiştir.

4.4.4. *Willopsis* genusu

Aseksüel çoğalma tomurcuklanma ile gerçekleşir. Bazı türler hif oluşturabilir. Her ascusta 1-4 olan askosporlar şapka, satürn şeklindedir. Şekerlerin fermentasyonu pozitifdir. Nitrat, üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kreger van Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al., 1966; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

6, 7 ve 8 numaralı izolatlar *Williopsis* genusunun özelliklerini göstermiştir. *W. californica*'nın fermentasyon ve asimilasyon testlerindeki özellikleri çizelge 4.7' de verilmiştir.

4.4.5. *Torulaspora* genusu

Multilateral tomurcuklanma ile çoğalan hücreler globoz veya elipsoiddir. Bazı hücreler pseudomisel oluşturabilir. Vejetatif faz başlangıçta haploiddir. Konjugasyon bir hücreyle onun tomurcuğu arasında veya nadiren askus oluşumundan önce bağımsız hücreler arasında gerçekleşir. Fermentasyon güçlüdür. Nişasta benzeri bileşikler üretilmez. Azot kaynağı olarak nitratı asimile etmezler. Üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kregervan Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al.,1966; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

9, 10, 16, 17, 19, ve 69 numaralı izolatlar *Torulaspora* genusunun özelliklerini göstermiştir. *T. delbrueckii*'nin fermentasyon ve asimilasyon testlerindeki özellikleri çizelge 4.7' de verilmiştir.

4.4.6. *Pichia* genusu

Multilateral tomurcuklanma ile çoğalan hücreler çeşitli şekillerdedir ve bazı türleri pseudomisel oluşturur. Askosporlar küresel, şapka veya satürn şeklindedir. Her askusta 1-4 (bazen daha fazla) askospor oluşur. Şekerlerin fermentasyonu türlere göre değişmektedir. Nitrat asimilasyonu, üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kregervan Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al.,1966; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987 ; Frazier and Westhoff, 1988; Wolf,1996; Barnett et al., 1983, 2000;).

13, 24, 26, 76, 77, 78, 43, 44, 56, 57 ve 80 numaralı izolatlar *Pichia* genusunun özelliklerini göstermiştir. *P.anamola*, *P. quilliermondii* ve *P. jadinii*'nin fermentasyon ve asimilasyon test sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

4.4.7. *Candida* genusu

Multilateral tomurcuklanma ile çoğalan hücreler ovoid, silindirik, elongat nadiren apikulat şeklindedir. Bazı türleri pseudomisel oluştururken bazı türlerde gerçek misel mevcuttur. Genellikle inositol pozitif olan strainler pseudomisel oluşturur. Askus ve askospor oluşumu gözlenmektedir. Bazı türler ekstra polisakkaritler üretebilir. Üreaz,

şekerlerin fermentasyonu ve nitrat asimilasyonu türlere göre değişmektedir. (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder ve Kregervan Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al., 1966; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke andStevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

37, 38, 40, 50 ve 52 numaralı zolatlar *Candida* genusunun özelliklerini göstermiştir. *C. versatilis*, *C. zeylanoides*, *C. sake* ve *C.diddensiae*' nin fermentasyon ve asimilasyon testlerindeki özellikleri çizelge 4.7' de verilmiştir.

4.4.8. Galactomyces genusu

Eşeysiz üreme fasyon bölünme ile gerçekleşir. Septalı hif oluşturabilirler. Fermentasyon türlere göre değişir. Nitrat asimilasyonu, üreaz ve DBB reaksiyonu negatiftir. Nişasta üretimi yoktur (Wickerham, 1951,1852,1970; Lodder ve Kreger var Rij, 1952; Wickerhom and Burton, 1962; Phaff et al.,1966; Lodder, 1970; Bonwart, 1981; Frazier and Westhoff, 1982; Barnett et al.,1983,2000; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987).

48, 75 ve 79 numaralı izolatlar *Galactomyces* genusunun özelliklerini göstermiştir. *G. geotrichum*' un fermentasyon ve asimilasyon testlerindeki özellikleri çizelge 4.8' de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Fenotipik Olarak Tanımlanan İzolatlara Ait Literatürde Verilen Özellikler İle Morfolojik ve Fizyolojik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		27 28 29 30 31 32 33 34 39
D-Glukoz	+, -	- - - - - - - -
Galaktoz	-	- - - - - - - -
Maltoz	D, -	- - - - - - - -
Me- α -D-Glukozid	-	- - - - - - - -
Sükroz	+, -	- - - - - - - -
α , α -Trehaloz	D, -	- - - - - - - -
Melibioz	D, -	- - - - - - - -
Laktoz	-	- - - - - - - -
Sellobiyoz	D, -	- - - - - - - -
Melezitoz	D, -	- - - - - - - -
Rafinoz	D, -	- - - - - - - -
İnulin	-	- - - - - - - -
D-Ksiloz	-	- - - - - - - -
Nişasta	-	- - - - - - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + + + + + + +
D-Galaktoz	+	+ + + + + + + +
L-Sorboz	+, -	+ + + + + + - +
D-Glikozamin	+, -	- - - - - - - -
D-Riboz	+, -	- - - - - - - -
D-Ksiloz	+, D	+ + + + + + + +
L-Arabinoz	+, -	+ + + + + + - -
D- Arabinoz	+, -	+ + + + + + + +
L-Rhamnoz	+, -	- - - - - + - -
Sükroz	+	+ + + + + + + +
Maltoz	+	+ + + + + + + +
α , α -Trehaloz	+	+ + + + + + + -
Me α -D-Glukozid	+, -	+ + + + + + + -
Sellobiyoz	+, -	+ + + + + + + -
Salisin	+, -	- - - - - - + -
Arbutin	+, -	+ + + + + + + -
Melibiyoz	+, -	- - - - - - - -
Laktoz	+, -	+ + + + + + + +
Rafinoz	+	+ + + + + + - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Melezitoz	+, -	+++++
Inulin	+, -	+++++
Nişasta	+, -	-----
Gliserol	+, D	++-++-+
Eritritol	+, -	+++ +- -
Ribitol	-	-----
Ksilitol	+	+++++
L-Arabinitol	-	-----
D-Glucitol	+, D	+++++
D-Mannitol	+	+++++
D-Galaktitol	+, -	-----
myo-Inositol	-	-----
D-Glukano 1,5 Lakton	-	-----
2-keto-D-Glukonat	+	+++++
5-keto-D-Glukonat	-	-----
D-Glukonat	+, -	+++++
D-Glukronat	+, -	+++++
D-Galakturnik Asit	-	-----
DL-Lactat	+, -	+++++
Suksinat	+	-----
Sitrat	+, -	-----
Methanol	-	-----
Etanol	+, -	+++++
Propan 1,2 – diol	D, -	-----
Butan 2,3 – diol	-	-----
Kuinik Asit	+, -	-----
D-Glukarat	-	-----
D-Galaktonat	-	-----
Nitrat	-	-----
Nitrit	+, -	- - - + + - + +
Etilamin	+, -	- - - - + - - +
L-Lizin	+, -	- - - + + - - +
Kadaverin	+, -	-----
Kreatin	-	-----
Kreatinin	+, -	+++++
D-Triptofan	-	-----

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	- - - - - - - +
myo-inositol'süz	+	+ + + + + + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + + + + + +
Biotin'siz	-	- - - - - - - -
Tiamin'siz	+	+ + + + + + + +
Biotin ve Tiamin'siz	-	- - - - - - - -
Piridoksinsiz	+	+ + + + + + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+ + + + + + + +
Niasin'siz	+	+ + + + + + + +
PABA'sız	+	+ + + + + + + +
25 °C'de	+	+ + + + + + + +
30 °C'de	+, -	+ + + + + + + +
35 °C'de	+, -	- - - - - - - +
37 °C'de	+, -	- - - - - - - +
40 °C'de	+, -	- - - - - - - -
42 °C'de	-	- - - - - - - -
45 °C'de	-	- - - - - - - -
% 0.01 Sikloheksimid	+, -	- - - - - - - +
% 0.1 Sikloheksimid	+, -	- - - - - - - +
%1 Asetik Asit	-	- - - - - - - -
%50 D-Glukoz	+, -	+ + + + + + + +
%60 D-Glukoz	+, -	+ + + + + + + +
%10 NaCl	+	+ + + + + + + +
%16 NaCl	+, -	+ + + + + + + -
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - - - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + + + + + +
Filament Oluşumu	-	- - - - - - - -
Septat hif	-	- - - - - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		42 60 61 62 63 64 65 66
D-Glukoz	+, -	- - - - - - - -
Galaktoz	-	- - - - - - - -
Maltoz	D, -	- - - - - - - -
Me- α -D-Glukozid	-	- - - - - - - -
Sükroz	+, -	- - - - - - - -
α , α -Trehaloz	D, -	- - - - - - - -
Melibioz	D, -	- - - - - - - -
Laktoz	-	- - - - - - - -
Sellobiyoz	D, -	- - - - - - - -
Melezitoz	D, -	- - - - - - - -
Rafinoz	D, -	- - - - - - - -
İnulin	-	- - - - - - - -
D-Ksiloz	-	- - - - - - - -
Nişasta	-	- - - - - - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + + + + + + +
D-Galaktoz	+	+ + + + + + + +
L-Sorboz	+, -	+ + + + + + + +
D-Glikozamin	+, -	- - - - + - - -
D-Riboz	+, -	- + - - + - - -
D-Ksiloz	+, D	+ - + + + + + +
L-Arabinoz	+, -	- - + - - + + +
D- Arabinoz	+, -	+ + + + + + + +
L-Rhamnoz	+, -	- - + + - - - -
Sükroz	+	+ + + + + + + +
Maltoz	+	+ + + + + + + +
α , α -Trehaloz	+	- - - + + + - +
Me α -D-Glukozid	+, -	- - - - - + - +
Sellobiyoz	+, -	+ - + + + + + +
Salisin	+, -	- - + + + - - +
Arbutin	+, -	+ - + + - + + -
Melibiyoz	+, -	- - - - - - - -
Laktoz	+, -	+ + + - + + + +

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Rafinoz	+	++++++
Melezitoz	+,-	+ - + + + - +
Inulin	+,-	+ - + + + + +
Nişasta	+,-	- - - - - - -
Gliserol	+,D	+++++ - - +
Eritritol	+,-	++++ - - -
Ribitol	-	- - - - - - -
Ksilitol	+	+++++ + + +
L-Arabinitol	-	- - - - - - -
D-Glucitol	+,D	+++++ + + +
D-Mannitol	+	+++++ + + +
D-Galaktitol	+,-	- - - - - - -
myo-Inositol	-	- - - - - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	-	- - - - - - -
2-keto-D-Glukonat	+	+++++ + + +
5-keto-D-Glukonat	-	- - - - - - -
D-Glukonat	+,-	+ - + + + - - +
D-Glukronat	+,-	- - - - - - -
D-Galakturnik Asit	-	- - - - - - -
DL-Lactat	+,-	+++++ + + +
Suksinat	+	+++++ - + + -
Sitrat	+,-	- - - - + + - -
Methanol	-	- - - - - - -
Etanol	+,-	+++++ + + +
Propan 1,2 – diol	D,-	- - - - - - -
Butan 2,3 – diol	-	- - - - - - -
Kuinik Asit	+,-	- - - - - - -
D-Glukarat	-	- - - - - - -
D-Galaktonat	-	- - - - - - -
Nitrat	-	- - - - - - -
Nitrit	+,-	+++++ + + +
Etilamin	+,-	+++++ + + +
L-Lizin	+,-	+++++ + + +
Kadaverin	+,-	- - - - - - -
Kreatin	-	- - - - - - -
Kreatinin	+,-	+++++ + + +
D-Triptofan	-	- - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	+ + + + + + - +
myo-inositol'süz	+	+ + + + + + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + + + + + +
Biotin'siz	-	- - - - - - - -
Tiamin'siz	+	+ + + + + + + +
Biotin ve Tiamin'siz	-	- - - - - - - -
Piridoksinsiz	+	+ + + + + + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+ + + + + + + +
Niasin'siz	+	+ + + + + + + +
PABA'sız	+	+ + + + + + + +
25 °C'de	+	+ + + + + + + +
30 °C'de	+, -	+ + + + + + + +
35 °C'de	+, -	+ + + + + + + +
37 °C'de	+, -	+ + + + + + + +
40 °C'de	+, -	- - - - - - - -
42 °C'de	-	- - - - - - - -
45 °C'de	-	- - - - - - - -
% 0.01 Sikloheksimid	+, -	- + + - + - + -
% 0.1 Sikloheksimid	+, -	- + + - + - + -
%1 Asetik Asit	-	- - - - - - - -
%50 D-Glukoz	+, -	+ + + + + + + +
%60 D-Glukoz	+, -	+ + + + + + + +
%10 NaCl	+	+ + + + + + + +
%16 NaCl	+, -	- - - - - + - +
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - - - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + + + + + +
Filament Oluşumu	-	- - - - - - - -
Septat hif	-	- - - - - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		71 73 74 81 82 83 86 87 88
D-Glukoz	+, -	- - - - - - - -
Galaktoz	-	- - - - - - - -
Maltoz	D, -	- - - - - - - -
Me- α -D-Glukozid	-	- - - - - - - -
Sükroz	+, -	- - - - - - - -
α , α Trehaloz	D, -	- - - - - - - -
Melibioz	D, -	- - - - - - - -
Laktoz	-	- - - - - - - -
Sellobiyoz	D, -	- - - - - - - -
Melezitoz	D, -	- - - - - - - -
Rafinoz	D, -	- - - - - - - -
İnulin	-	- - - - - - - -
D-Ksiloz	-	- - - - - - - -
Nişasta	-	- - - - - - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + + + + + + +
D-Galaktoz	+	+ + + + + + + +
L-Sorboz	+, -	- + + - - - + + +
D-Glikozamin	+, -	+ + - + + + - - -
D-Riboz	+, -	- - - - - - - -
D-Ksiloz	+, D	+ + - + + + + + +
L-Arabinoz	+, -	+ + + + + + - - -
D- Arabinoz	+, -	+ + + + + + + + +
L-Rhamnoz	+, -	- - - + - + + + +
Sükroz	+	+ + + + + + + + +
Maltoz	+	+ + + + + + + + +
α , α Trehaloz	+	+ + + + + + + + +
Me α -D-Glukozid	+, -	+ + + + + + + + +
Sellobiyoz	+, -	+ + + + + + + + +
Salisin	+, -	- + - - - - - - -
Arbutin	+, -	- + + + - - - - -
Melibiyoz	+, -	- - - - - - - - -
Laktoz	+, -	+ + + + + + + + +
Rafinoz	+	- + - + + + + + +
Melezitoz	+, -	+ + + + + + + + +

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	+, -	+++++
Nişasta	+, -	-----
Gliserol	+, D	+++++
Eritritol	+, -	++---++
Ribitol	-	-----
Ksilitol	+	+++++
L-Arabinitol	-	-----
D-Glucitol	+, D	+++++
D-Mannitol	+	+++++
D-Galaktitol	+, -	-----
myo-Inositol	-	-----
D-Glukano 1,5 Lakton	-	-----
2-keto-D-Glukonat	+	+++++
5-keto-D-Glukonat	-	-----
D-Glukonat	+, -	+++++
D-Glukronat	+, -	+++++
D-Galakturnik Asit	-	-----
DL-Lactat	+, -	+++++
Suksinat	+	- - - + + + + +
Sitrat	+, -	- + - - - + + + +
Methanol	-	-----
Etanol	+, -	+++++
Propan 1,2 - diol	D, -	-----
Butan 2,3 - diol	-	-----
Kuinik Asit	+, -	-----
D-Glukarat	-	-----
D-Galaktonat	-	-----
Nitrat	-	-----
Nitrit	+, -	- + - - - + + + +
Etilamin	+, -	- + - + + + + + +
L-Lizin	+, -	- + - - - + + + +
Kadaverin	+, -	+++++
Kreatin	-	-----
Kreatinin	+, -	+++++
D-Triptofan	-	-----

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	- + - - - + + +
myo-inositol'süz	+	+ + + + + + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + + + + + +
Biotin'siz	-	- - - - - - - -
Tiamin'siz	+	+ + + + + + + +
Biotin ve Tiamin'siz	-	- - - - - - - -
Piridoksinsiz	+	+ + + + + + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+ + + + + + + +
Niasin'siz	+	+ + + + + + + +
PABA'sız	+	+ + + + + + + +
25 °C'de	+	+ + + + + + + +
30 °C'de	+, -	+ + + + + + + +
35 °C'de	+, -	- - - - - + + +
37 °C'de	+, -	- - - - - + + +
40 °C'de	+, -	- - - - - - - -
42 °C'de	-	- - - - - - - -
45 °C'de	-	- - - - - - - -
% 0.01Sikloheksimid	+, -	- - - - - + - + +
% 0.1Sikloheksimid	+, -	- - - - - + - + +
%1 Asetik Asit	-	- - - - - - - -
%50 D-Glukoz	+, -	+ + + + + + + +
%60 D-Glukoz	+, -	+ + + + + + + +
%10 NaCl	+	+ + + + + + + +
%16 NaCl	+, -	+ + + + + + + +
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - - - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + + + + + +
Filament Oluşumu	-	- - - - - - - -
Septat hif	-	- - - - - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		89 90 91 92
D-Glukoz	+, -	- - - -
Galaktoz	-	- - - -
Maltoz	D, -	- - - -
Me- α -D-Glukozid	-	- - - -
Sükroz	+, -	- - - -
α , α Trehaloz	D, -	- - - -
Melibioz	D, -	- - - -
Laktoz	-	- - - -
Sellobiyoz	D, -	- - - -
Melezitoz	D, -	- - - -
Rafinoz	D, -	- - - -
İnulin	-	- - - -
D-Ksiloz	-	- - - -
Nişasta	-	- - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+
D-Galaktoz	+	+
L-Sorboz	+, -	+
D-Glikozamin	+, -	- - - -
D-Riboz	+, -	- - - -
D-Ksiloz	+, D	+
L-Arabinoz	+, -	- - - -
D- Arabinoz	+, -	- - - -
L-Rhamnoz	+, -	+
Sükroz	+	+
Maltoz	+	+
α , α Trehaloz	+	+
Me α -D-Glukozid	+, -	- - - -
Sellobiyoz	+, -	+
Salisin	+, -	- - - -
Arbutin	+, -	- - - -
Melibiyoz	+, -	- - - -
Laktoz	+, -	- - - -
Rafinoz	+	+
Melezitoz	+, -	+

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	+, -	- - - -
Nişasta	+, -	- - - -
Gliserol	+, D	+ + + +
Eritritol	+, -	+ + + +
Ribitol	-	- - - -
Ksilitol	+	+ + + +
L-Arabinitol	-	- - - -
D-Glucitol	+, D	+ + + +
D-Mannitol	+	+ + + +
D-Galaktilol	+, -	- - - -
myo-Inositol	-	- - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	-	- - - -
2-keto-D-Glukonat	+	+ + + +
5-keto-D-Glukonat	-	- - - -
D-Glukonat	+, -	+ + + +
D-Glukronat	+, -	- - - -
D-Galakturnik Asit	-	- - - -
DL-Lactat	+, -	+ + + +
Suksinat	+	+ + + +
Sitrat	+, -	+ + + +
Methanol	-	- - - -
Etanol	+, -	+ + + +
Propan 1,2 - diol	D, -	- - - -
Butan 2,3 - diol	-	- - - -
Kuiniik Asit	+, -	- - - -
D-Glukarat	-	- - - -
D-Galaktonat	-	- - - -
Nitrat	-	- - - -
Nitrit	+, -	+ + + +
Etilamin	+, -	+ + + +
L-Lizin	+, -	+ + + +
Kadaverin	+, -	+ + + +
Kreatin	-	- - - - - - - -
Kreatinin	+, -	+ + + +
D-Triptofan	-	- - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	+ + + +
myo-inositol'süz	+	+ + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + +
Biotin'siz	-	- - - -
Tiamin'siz	+	+ + + +
Biotin ve Tiamin'siz	-	- - - -
Piridoksinsiz	+	+ + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+ + + +
Niasin'siz	+	+ + + +
PABA'sız	+	+ + + +
25 °C'de	+	+ + + +
30 °C'de	+, -	+ + + +
35 °C'de	+, -	+ + + +
37 °C'de	+, -	+ + + +
40 °C'de	+, -	+ + + +
42 °C'de	-	- - - -
45 °C'de	-	- - - -
% 0.01Sikloheksimid	+, -	- - - -
% 0.1Sikloheksimid	+, -	- - - -
%1 Asetik Asit	-	- - - -
%50 D-Glukoz	+, -	+ + + +
%60 D-Glukoz	+, -	+ + + +
%10 NaCl	+	+ + + +
%16 NaCl	+, -	+ + + +
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + +
Filament Oluşumu	-	- - - -
Septat hif	-	- - - -
Ballistoconidia	-	- - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
		11 12 15 18 20 25 35 36
D-Glukoz	-	- - - - - - -
Galaktoz	-	- - - - - - -
Maltoz	-	- - - - - - -
Me- α -D-Glukozid	-	- - - - - - -
Sükroz	-	- - - - - - -
α,α Trehaloz	-	- - - - - - -
Melibioz	-	- - - - - - -
Laktoz	-	- - - - - - -
Sellobiyoz	-	- - - - - - -
Melezitoz	-	- - - - - - -
Rafinoz	-	- - - - - - -
İnulin	-	- - - - - - -
Nişasta	-	- - - - - - -
D-Ksiloz	-	- - - - - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + + + + + + +
D-Galaktoz	+, -	- - - - - - -
L-Sorboz	+, -	- - - - - - + +
D-Glikozamin	-	- - - - - - -
D-Riboz	+, -	+ + - + - - - -
D-Ksiloz	D, -	- - + - + - - -
L-Arabinoz	-	- - - - - - -
D- Arabinoz	+, -	- - - - - - -
L-Rhamnoz	-	- - - - - - -
Sükroz	-	- - - - - - -
Maltoz	-	- - - - - - -
α,α Trehaloz	-	- - - - - - -
Me α -D-Glukozid	-	- - - - - - -
Sellobiyoz	-	- - - - - - -
Salisin	D, -	- - - - - - -
Arbutin	D, -	- - - - - - -
Melibiyoz	-	- - - - - - -
Laktoz	-	- - - - - - -
Rafinoz	-	- - - - - - -
Melezitoz	-	- - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	D,-	- - - - - - -
Nişasta	-	- - - - - - -
Gliserol	+	+ + + + + + + +
Eritritol	+	+ + + + + + + +
Ribitol	-	- - - - - - -
Ksilitol	D,-	- - - - - - -
L-Arabinitol	-	- - - - - - -
D-Glucitol	+,D	+ + - + - + + +
D-Mannitol	+,D	+ + - + - + + +
D-Galaktitol	-	- - - - - - -
myo-Inositol	-	- - - - - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	+,D	+ + + + + + + +
2-keto-D-Glukonat	+, -	- + - - - - -
5-keto-D-Glukonat	-	- - - - - - -
D-Glukonat	+, -	+ + + + + + + +
D-Glukronat	-	- - - - - - -
D-Galakturnik Asit	-	- - - - - - -
DL-Lactat	+, -	+ + + + + + + +
Suksinat	+,D	+ + + + + + + +
Sitrat	+,D	+ + + + - - + +
Methanol	-	- - - - - - -
Etanol	+,D	+ + + + + + + +
Propan 1,2 - diol	+, -	+ + - + - - + +
Butan 2,3 - diol	-	- - - - - - -
Kuinik Asit	-	- - - - - - -
D-Glukarat	-	- - - - - - -
D-Galaktonat	-	- - - - - - -
Nitrat	-	- - - - - - -
Nitrit	+, -	+ + + + + + + +
Etilamin	+,W	+ + + + + + + +
L-Lizin	+	+ + + + + + + +
Kadaverin	+, -	+ + + + + + + +
Kreatin	-	- - - - - - -
Kreatinin	-	- - - - - - -
D-Glukozamin	-	- - - - - - -
D-Triptofan	W, -	- - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	D,-	+ + + + + + + +
myo-inositol'süz	+	+ + + + + + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + + + + + +
Biotin'siz	+,-	+ + + + + + + +
Tiamin'siz	+,-	+ + + + + + + +
Biotin ve Tiamin'siz	-	- - - - - - - -
Piridoksinsiz	+,-	+ + + + + + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+,-	+ + + + + + + +
Niasin'siz	+,-	+ + + + + + + +
PABA'sız	+,-	+ + + + + + + +
25 °C'de	+	+ + + + + + + +
30 °C'de	+	+ + + + + + + +
35 °C'de	+,-	+ + + + + + + +
37 °C'de	-	- - - - - - - -
40 °C'de	-	- - - - - - - -
42 °C'de	-	- - - - - - - -
45 °C'de	-	- - - - - - - -
% 0.01Sikloheksimid	+	+ + + + + + + +
% 0.1Sikloheksimid	+	+ + + + + + + +
%1 Asetik Asit	-	- - - - - - - -
%50 D-Glukoz	+,-	+ + + + + + + +
%60 D-Glukoz	-	- - - - - - - -
%10 NaCl	+,-	+ + - + - - + +
%16 NaCl	-	- - - - - - - -
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - - - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + + + + + +
Filament Oluşumu	-	- - - - - - - -
Septat hif	-	- - - - - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
		41 46 47 49 53 59 84 85
D-Glukoz	-	- - - - - - -
Galaktoz	-	- - - - - - -
Maltoz	-	- - - - - - -
Me- α -D-Glukozid	-	- - - - - - -
Sükroz	-	- - - - - - -
α,α Trehaloz		- - - - - - -
Melibioz	-	- - - - - - -
Laktoz		- - - - - - -
Sellobiyoz	-	- - - - - - -
Melezitoz	-	- - - - - - -
Rafinoz	-	- - - - - - -
İnulin	-	- - - - - - -
Nişasta	-	- - - - - - -
D-Ksiloz	-	- - - - - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + + + + + + +
D-Galaktoz	+, -	- + - - - + +
L-Sorboz	+, -	- - + - - + - -
D-Glikozamin	-	- - - - - - -
D-Riboz	+, -	+ + - - + - - -
D-Ksiloz	D, -	- - - - - - -
L-Arabinoz	-	- - - - - - -
D- Arabinoz	+, -	- - - - - - -
L-Rhamnoz	-	- - - - - - -
Sükroz	-	- - - - - - -
Maltoz	-	- - - - - - -
α,α Trehaloz	-	- - - - - - -
Me α -D-Glukozid	-	- - - - - - -
Sellobiyoz	-	- - - - - - -
Salisin	D, -	- - - - - - -
Arbutin	D, -	- - - - - - -
Melibiyoz	-	- - - - - - -
Laktoz	-	- - - - - - -
Rafinoz	-	- - - - - - -
Melezitoz	-	- - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	D,-	- - - - - - - -
Nişasta	-	- - - - - - - -
Gliserol	+	+ + + + + + + +
Eritritol	+	+ + + + + + + +
Ribitol	-	- - - - - - - -
Ksilitol	D,-	- - - - - - - -
L-Arabinitol	-	- - - - - - - -
D-Glucitol	+,D	+ + + + + + + +
D-Mannitol	+,D	+ + - + + + + +
D-Galaktitol	-	- - - - - - - -
myo-Inositol	-	- - - - - - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	+,D	+ + + + + + + +
2-keto-D-Glukonat	+, -	- - - - - + + -
5-keto-D-Glukonat	-	- - - - - - - -
D-Glukonat	+, -	+ + + + + - + +
D-Glukronat	-	- - - - - - - -
D-Galakturnik Asit	-	- - - - - - - -
DL-Lactat	+, -	+ + + + + + + +
Suksinat	+,D	+ + + + + + + +
Sitrat	+,D	+ + + + + - + +
Methanol	-	- - - - - - - -
Etanol	+,D	+ + + + + + + +
Propan 1,2 - diol	+, -	+ + + - + + - -
Butan 2,3 - diol	-	- - - - - - - -
Kuinik Asit	-	- - - - - - - -
D-Glukarat	-	- - - - - - - -
D-Galaktonat	-	- - - - - - - -
Nitrat	-	- - - - - - - -
Nitrit	+, -	+ + + + + + - -
Etilamin	+,W	+ + + + + + + +
L-Lizin	+	+ + + + + + + +
Kadaverin	+, -	+ + + + + + + +
Kreatin		- - - - - - - -
Kreatinin	-	- - - - - - - -
D-Glukozamin	-	- - - - - - - -
D-Triptofan	W, -	- - - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	D,-	+ + + + + + + +
myo-inositol'süz	+	+ + + + + + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + + + + + +
Biotin'siz	+, -	+ + + + + + + +
Tiamin'siz	+, -	+ + + + + + + +
Biotin ve Tiamin'siz	-	- - - - - - - -
Piridoksinsiz	+, -	+ + + + + + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+, -	+ + + + + + + +
Niasin'siz	+, -	+ + + + + + + +
PABA'sız	+, -	+ + + + + + + +
25 °C'de	+	+ + + + + + + +
30 °C'de	+	+ + + + + + + +
35 °C'de	+, -	+ + + + + + + +
37 °C'de	-	- - - - - - - -
40 °C'de	-	- - - - - - - -
42 °C'de	-	- - - - - - - -
45 °C'de	-	- - - - - - - -
% 0.01 Sikloheksimid	+	+ + + + + + + +
% 0.1 Sikloheksimid	+	+ + + + + + + +
%1 Asetik Asit	-	- - - - - - - -
%50 D-Glukoz	+, -	+ + + + + + + +
%60 D-Glukoz	-	- - - - - - - -
%10 NaCl	+, -	+ + - + - - + +
%16 NaCl	-	- - - - - - - -
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - - - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + + + + + +
Filament Oluşumu	-	- - - - - - - -
Septat hif	-	- - - - - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
		1 2 3 4 5 14 21 23 45
D-Glukoz	+	+
Galaktoz	+,D	+
Maltoz	+, -	-
Me- α -D-Glukozid	+, -	-
Sükroz	+	+
α , α Trehaloz	+, -	-
Melibioz	-	-
Laktoz	+, -	-
Sellobiyoz	D, -	-
Melezitoz	-	-
Rafinoz	+, -	-
İnulin	+, -	-
Nişasta	-	-
D-Ksiloz	-	-
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+
D-Galaktoz	+	+
L-Sorboz	+, -	-
D-Glikozamin	-	-
D-Riboz	+, -	-
D-Ksiloz	+, -	-
L-Arabinoz	+, -	-
D- Arabinoz	-	-
L-Rhamnoz	-	-
Sükroz	+	+
Maltoz	+, -	+
α , α Trehaloz	+, -	+
Me α -D-Glukozid	+, -	+
Sellobiyoz	+, -	+
Salisin	+, -	-
Arbutin	+, -	+
Melibiyoz	-	-
Laktoz	+, -	+
Rafinoz	+	+
Melezitoz	+, -	+

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	+, -	- - - - - - + +
Nişasta	+, -	- - - - - - - -
Gliserol	+, D	+ + + + + + + +
Eritritol	-	- - - - - - - -
Ribitol	+, -	+ + + + + + + +
Ksilitol	+, -	+ + + + + + + +
L-Arabinitol	-	- - - - - - - -
D-Glucitol	+, -	+ + + + + + + +
D-Mannitol	+, -	+ + + + + + + -
D-Galaktitol	-	- - - - - - - -
myo-Inositol	-	- - - - - - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	D, -	- - - - - - - -
2-keto-D-Glukonat	-	- - - - - - - -
5-keto-D-Glukonat	-	- - - - - - - -
D-Glukonat	-	- - - - - - - -
D-Glukronat	-	- - - - - - - -
D-Galakturnik Asit	+, -	- - - - - - - -
DL-Lactat	+, D	+ + + + + + + +
Suksinat	+, -	- - - - - - - +
Sitrat	+, -	- - - - - - - -
Methanol	-	- - - - - - - -
Etanol	+, D	+ + + + + + + +
Propan 1,2 - diol	+, -	- - - - - - - -
Butan 2,3 - diol	+, -	- - - - - - - -
Kuinik Asit	-	- - - - - - - -
D-Glukarat	-	- - - - - - - -
D-Galaktonat	-	- - - - - - - -
Nitrat	-	- - - - - - - -
Nitrit	-	- - - - - - - -
Etilamin	+	+ + + + + + + +
L-Lizin	+	+ + + + + + + +
Kadaverin	-	- - - - - - - -
Kreatin	-	- - - - - - - -
Kreatinin	-	+ + + + + + + +
D-Glukozamin	-	- - - - - - - -
D-Triptofan	+, -	+ + + + + + + +

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	+++++
myo-inositol'süz	+	+++++
Pantotenat'sız	+, -	+++++
Biotin'siz	+, -	+++++
Tiamin'siz	+, D	+++++
Biotin ve Tiamin'siz	+, -	+++++
Piridoksinsiz	+	+++++
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+++++
Niasin'siz	-	-----
PABA'sız	+, D	+++++
25 °C'de	+	+++++
30 °C'de	+	+++++
35 °C'de	+	+++++
37 °C'de	+	+++++
40 °C'de	+, -	- - - - - +
42 °C'de	+, -	- - - - -
45 °C'de	+, -	- - - - -
% 0.01 Sikloheksimid	+	+++++
% 0.1 Sikloheksimid	+	+++++
%1 Asetik Asit	-	+++++
%50 D-Glukoz	+, -	+++++
%60 D-Glukoz	-	- - - - -
%10 NaCl	+, -	- - - - -
%16 NaCl	+, -	- - - - -
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - -
Tomurcuklanma	+	+++++
Filament Oluşumu	-	- - - - -
Septat hif	-	- - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
		51 54 55 58 67 68 70 72
D-Glukoz	+	+ + + + + + + +
Galaktoz	+,D	+ + + + + + + +
Maltoz	+, -	- - - - - - - -
Me- α -D-Glukozid	+, -	- - - - - - - -
Sükroz	+	+ + + + + + + +
α , α Trehaloz	+, -	- - + - - - - -
Melibioz	-	- - - - - - - -
Laktoz	+, -	- - - - - - - +
Sellobiyoz	D, -	- - - - - - - -
Melezitoz	-	- - - - - - - -
Rafinoz	+, -	- - - - - - - -
İnulin	+, -	- - - - - - - -
Nişasta	-	- - - - - - - -
D-Ksiloz	-	- - - - - - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + + + + + + +
D-Galaktoz	+	+ + + + + + + +
L-Sorboz	+, -	+ + + + - + - +
D-Glikozamin	-	- - - - - - - -
D-Riboz	+, -	- - - - - - - -
D-Ksiloz	+, -	- - - + - + - -
L-Arabinoz	+, -	- - - - - - - -
D- Arabinoz	-	- - - - - - - -
L-Rhamnoz	-	- - - - - - - -
Sükroz	+	+ + + + + + + +
Maltoz	+, -	- + + + - + - -
α , α Trehaloz	+, -	+ - - - - - + +
Me α -D-Glukozid	+, -	- - - - - - + -
Sellobiyoz	+, -	+ + + - + + + -
Salisin	+, -	- - - - - + + -
Arbutin	+, -	+ - + + - - - -
Melibiyoz	-	- - - - - - - -
Laktoz	+, -	+ + + + + + + -
Rafinoz	+	+ + + + + + + +
Melezitoz	+, -	- + + + - + - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	+, -	+ + + + + + + -
Nişasta	+, -	- - - - - - - -
Gliserol	+, D	+ + + + + + + +
Eritritol	-	- - - - - - - -
Ribitol	+, -	- - - - - - - -
Ksilitol	+, -	- - - - + - + -
L-Arabinitol	-	- - - - - - - -
D-Glucitol	+, -	+ - + + + + - +
D-Mannitol	+, -	+ - - - - - - +
D-Galaktitol	-	- - - - - - - -
myo-Inositol	-	- - - - - - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	D, -	- - - - - - - -
2-keto-D-Glukonat	-	- - - - - - - -
5-keto-D-Glukonat	-	- - - - - - - -
D-Glukonat	-	- - - - - - - -
D-Glukronat	-	- - - - - - - -
D-Galakturnik Asit	+, -	- - - - - - - -
DL-Lactat	+, D	+ + + + + + + +
Suksinat	+, -	+ - - - + - + +
Sitrat	+, -	- - - - - - - -
Methanol	-	- - - - - - - -
Etanol	+, D	+ + + + + + + +
Propan 1,2 - diol	+, -	- - - - - - - -
Butan 2,3 - diol	+, -	- - - - - - - -
Kuinik Asit	-	- - - - - - - -
D-Glukarat	-	- - - - - - - -
D-Galaktonat	-	- - - - - - - -
Nitrat	-	- - - - - - - -
Nitrit	-	- - - - - - - -
Etilamin	+	+ + + + + + + +
L-Lizin	+	+ + + + + + + +
Kadaverin	-	- - - - - - - -
Kreatin	-	- - - - - - - -
Kreatinin	-	+ + + + + + + +
D-Glukozamin	-	- - - - - - - -
D-Triptofan	+, -	+ + + + + + + +

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	+ + + + + + + +
myo-inositol'süz	+	+ + + + + + + +
Pantotenat'sız	+, -	+ + + + + + + +
Biotin'siz	+, -	+ + + + + + + +
Tiamin'siz	+, D	+ + + + + + + +
Biotin ve Tiamin'siz	+, -	+ + + + + + + +
Piridoksinsiz	+	+ + + + + + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+ + + + + + + +
Niasin'siz	-	- - - - - - - -
PABA'sız	+, D	+ + + + + + + +
25 °C'de	+	+ + + + + + + +
30 °C'de	+	+ + + + + + + +
35 °C'de	+	+ + + + + + + +
37 °C'de	+	+ + + + + + + +
40 °C'de	+, -	- - - - - - - -
42 °C'de	+, -	- - - - - - - -
45 °C'de	+, -	- - - - - - - -
% 0.01 Sikloheksimid	+	+ + + + + + + +
% 0.1 Sikloheksimid	+	+ + + + + + + +
%1 Asetik Asit	-	+ + + + + + + +
%50 D-Glukoz	+, -	+ + + + + + + +
%60 D-Glukoz	-	- - - - - - - -
%10 NaCl	+, -	+ - - - - - - +
%16 NaCl	+, -	- - - - - - - -
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - - - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + + + + + +
Filament Oluşumu	-	- - - - - - - -
Septat hif	-	- - - - - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Williopsis californica</i>	<i>Williopsis californica</i>
		6 7 8
D-Glukoz	+,D	+ + +
Galaktoz	+,-	- - -
Maltoz	+,-	+ + +
Me- α -D-Glukozid	?	- - -
Sükroz	+,-	- - -
α,α Trehaloz	?	- - -
Melibioz	-	- - -
Laktoz	-	- - -
Sellobiyoz	D	- - -
Melezitoz	?	- - -
Rafinoz	+,-	- - -
İnulin	?	- - -
Nişasta	?	- - -
D-Ksiloz	?	- - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + +
D-Galaktoz	D,-	- - -
L-Sorboz	+,-	- - -
D-Glikozamin	-	- - -
D-Riboz	D,-	- - -
D-Ksiloz	+,-	- - -
L-Arabinoz	-	- - -
D- Arabinoz	-	- - -
L-Rhamnoz	+,-	- - -
Sükroz	+,-	+ + +
Maltoz	+,-	- - -
α,α Trehaloz	+,-	+ + +
Me α -D-Glukozid	+,-	- - -
Sellobiyoz	+,-	+ + +
Salisin	+,-	- - -
Arbutin	+,-	- - -
Melibiyoz	-	- - -
Laktoz	-	- - -
Rafinoz	+,-	+ + +
Melezitoz	-	- - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	-	- - -
Nişasta	+, -	- - -
Gliserol	+	- - -
Eritritol	+, -	- - -
Ribitol	+, -	- - -
Ksilitol	+, -	- - -
L-Arabinitol	-	- - -
D-Glucitol	+, -	+ + +
D-Mannitol	+	- - -
D-Galaktitol	-	- - -
myo-Inositol	-	- - -
D-Glukano 1,5 Lakton	+	- - -
2-keto-D-Glukonat	D, -	+ + +
5-keto-D-Glukonat	?	- - -
D-Glukonat	+, -	- - -
D-Glukronat	-	- - -
D-Galakturnik Asit	-	- - -
DL-Lactat	+	+ + +
Suksinat	+	- - -
Sitrat	+, -	- - -
Methanol	-	- - -
Etanol	+	+ + +
Propan 1,2 - diol	+	+ + +
Butan 2,3 - diol	+	- - -
Kuinik Asit	-	- - -
D-Glukarat	-	- - -
D-Galactonat	-	- - -
Nitrat	+, -	+ + +
Nitrit	+	+ + +
Etilamin	+	- - -
L-Lizin	+	+ + +
Kadaverin	+, -	+ + +
Kreatin	+, -	+ + +
Kreatinin	-	- - -
D-Glukozamin	-	- - -
D-Triptofan	-	- - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	+
myo-inositol'süz	+	+
Pantotenat'sız	+	+
Biotin'siz	-	-
Tiamin'siz	+	+
Biotin ve Tiamin'siz	-	+
Piridoksinsiz	+	+
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+
Niasin'siz	+	+
PABA'sız	+	+
25 °C'de	+	+
30 °C'de	+	+
35 °C'de	+, -	+
37 °C'de	-	-
40 °C'de	-	-
42 °C'de	-	-
45 °C'de	-	-
% 0.01 Sikloheksimid	-	-
% 0.1 Sikloheksimid	-	-
%1 Asetik Asit	-	-
%50 D-Glukoz	+, -	+
%60 D-Glukoz	+	+
%10 NaCl	-	-
%16 NaCl	-	-
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-
Üre Hidrolizi	-	-
DBB Reaksiyonu	-	-
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	-
Tomurcuklanma	+	+
Filament Oluşumu	-	-
Septat hif	-	-
Ballistoconidia	-	-

Çizelge 4.8. (Devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Torulaspora delbrückii</i>	<i>Torulaspora delbrückii</i>
		9 10 16 17 19 69
D-Glukoz	+	+ + + + + +
Galaktoz	+, -	+ + + + + +
Maltoz	+, -	- - - - - +
Me- α -D-Glukozid	+, -	- - - - - -
Sükroz	+, -	+ + + + + +
α , α Trehaloz	+, -	- - - - + -
Melibioz	+, -	+ - - - - -
Laktoz	-	- - - - - -
Sellobiyoz	-	- - - - - -
Melezitoz	+, -	- - - - - -
Rafinoz	+, D	+ + + + + +
İnulin	+, D	+ + + + + +
Nişasta	-	- - - - - -
D-Ksiloz	-	- - - - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + + + + +
D-Galaktoz	+, -	- - + - - +
L-Sorboz	+, -	- - - - - -
D-Glikozamin	-	- - - - - -
D-Riboz	-	- - - - - -
D-Ksiloz	D, -	- - + + + -
L-Arabinoz	-	- - - - - -
D- Arabinoz	-	- - - - - -
L-Rhamnoz	-	- - - - - -
Sükroz	+, -	- - - - - +
Maltoz	+, -	- - - - - -
α , α Trehaloz	+, D	- - - - - +
Me α -D-Glukozid	+, -	- - - - - -
Sellobiyoz	-	- - - - - -
Salisin	-	- - - - - -
Arbutin	-	- - - - - -
Melibiyoz	+, -	- - - - - -
Laktoz	-	- - - - - -
Rafinoz	+, -	- - - - - +
Melezitoz	+, -	- - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	+, -	- - - - - -
Nişasta	-	- - - - - -
Gliserol	+, -	- - - - + -
Eritritol	-	- - - - - -
Ribitol	D, -	- - - - - -
Ksilitol	+, -	- - - - - -
L-Arabinitol	-	- - - - - -
D-Glucitol	+, -	- - - - - +
D-Mannitol	+, -	- - - - - +
D-Galaktitol	-	- - - - - -
myo-Inositol	-	- - - - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	+, -	- - - - - -
2-keto-D-Glukonat	+, -	- - - - - +
5-keto-D-Glukonat	-	- - - - - -
D-Glukonat	+, -	- - - - - -
D-Glukronat	D, -	- - - - - -
D-Galakturnik Asit	-	- - - - - -
DL-Lactat	+, -	+ + + + + +
Suksinat	D, -	+ + - + + -
Sitrat	-	- - - - - -
Methanol	-	- - - - - -
Etanol	+, D	+ + + + + -
Propan 1,2 - diol	-	- - - - - -
Butan 2,3 - diol	-	- - - - - -
Kuinik Asit	-	- - - - - -
D-Glukarat	-	- - - - - -
Nitrat	-	- - - - - -
Nitrit	+, -	+ + + + + +
Etilamin	+, -	+ + + + + +
L-Lizin	+	+ + - + - +
Kadaverin	+, -	+ + + + + +
Kreatin	-	- - - - - -
Kreatinin	-	- - - - - -
D-Glukozamin	-	- - - - - -
D-Triptofan	-	- - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	+ + + + + +
myo-inositol'süz	+, -	+ + + + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + + + +
Biotin'siz	+, -	+ + + + + +
Tiamin'siz	+	+ + + + + +
Biotin ve Tiamin'siz	+, -	+ + + + + +
Piridoksinsiz	+	+ + + + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+ + + + + +
Niasin'siz	+	+ + + + + +
PABA'sız	+	+ + + + + +
25 °C'de	+	+ + + + + +
30 °C'de	+	+ + + + + +
35 °C'de	+, -	+ + + + + +
37 °C'de	+, -	+ + + + + +
40 °C'de	+, -	- - - - - -
42 °C'de	-	- - - - - -
45 °C'de	-	- - - - - -
% 0.01 Sikloheksimid	-	- - - - - -
% 0.1 Sikloheksimid	-	- - - - - -
%1 Asetik Asit	-	- - - - - -
%50 D-Glukoz	+, D	+ + + + + +
%60 D-Glukoz	+, -	+ + + + + +
%10 NaCl	+, -	- - - - - +
%16 NaCl	W, -	- - - - - -
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + + + +
Filament Oluşumu	-	- - - - - -
Septat hif	-	- - - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Pichia anamola</i>	<i>Pichia anamola</i>
		13 24 26 76 77 78
D-Glukoz	+	+
Galaktoz	+,D	+
Maltoz	+,D	+
Me- α -D-Glukozid	+, -	+
Sükroz	+, -	+
α , α -Trehaloz	D, -	-
Melibioz	-	-
Laktoz	-	-
Sellobiyoz	+, -	-
Melezitoz	D, -	-
Rafinoz	+,D	+
İnulin	-	-
Nişasta	D, -	-
D-Ksiloz	-	-
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+
D-Galaktoz	+, -	+
L-Sorboz	-	-
D-Glikozamin	-	-
D-Riboz	+, -	-
D-Ksiloz	+, -	-
L-Arabinoz	-	-
D- Arabinoz	-	-
L-Rhamnoz	-	-
Sükroz	+	+
Maltoz	+, -	+
α , α -Trehaloz	+,D	+
Me α -D-Glukozid	+, -	-
Sellobiyoz	+, -	+
Salisin	+	-
Arbutin	+,D	+
Melibiyoz	-	-
Laktoz	-	-
Rafinoz	+, -	-
Melezitoz	+, -	+

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	-	+ + + + + +
Nişasta	+, -	- - - - - -
Gliserol	+	+ + + + + +
Eritritol	+, -	+ + + + + +
Ribitol	+, -	+ + - + + -
Ksilitol	+, -	+ + + + + +
L-Arabinitol	D, -	- - - - - -
D-Glucitol	+, D	+ + + + + +
D-Mannitol	+	+ + + + + +
D-Galaktitol	-	- - - - - -
myo-Inositol	-	- - - - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	+, D	- - - + + -
2-keto-D-Glukonat	+, -	- - - + + -
5-keto-D-Glukonat	+	- - - - - -
D-Glukonat	+, -	+ + + + + +
D-Glukronat	-	+ + + - - +
D-Galakturnik Asit	-	- - - - - -
DL-Lactat	+	+ + + + + +
Suksinat	+, D	+ + - + + +
Sitrat	+, -	+ + - + + +
Methanol	-	- - - - - -
Etanol	+	+ + + + + +
Propan 1,2 - diol	+, D	- - - - - -
Butan 2,3 – diol	+, -	- - - - - -
Kuinik Asit	+, -	- - - - - -
D-Glukarat	-	- - - - - -
D-Galaktonat	-	- - - - - -
Nitrat	+, -	+ + + + + +
Nitrit	+, -	+ + - + + +
Etilamin	+, -	+ + + + + +
L-Lizin	+, -	+ + + + + +
Kadaverin	+, -	+ + + + + +
Kreatin	-	- - - - - -
Kreatinin	-	- - - - - -
D-Glukozamin	-	- - - - - -
D-Triptofan	-	+ + + + + +

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+	+ + + + + +
myo-inositol'süz	+	+ + + + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + + + +
Biotin'siz	+	+ + + + + +
Tiamin'siz	+	+ + + + + +
Biotin ve Tiamin'siz	+	+ + + + + +
Piridoksinsiz	+	+ + + + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+ + + + + +
Niasin'siz	+	+ + + + + +
PABA'sız	+	+ + + + + +
25 °C'de	+	+ + + + + +
30 °C'de	+	+ + + + + +
35 °C'de	+, -	+ + + + + +
37 °C'de	+, -	+ + + + + +
40 °C'de	-	- - - - - -
42 °C'de	-	- - - - - -
45 °C'de	-	- - - - - -
% 0.01Sikloheksimid	D,-	- - - - - -
% 0.1Sikloheksimid	-	- - - - - -
%1 Asetik Asit	-	- - - - - -
%50 D-Glukoz	+, -	+ + + + + +
%60 D-Glukoz	+, -	+ + + + + +
%10 NaCl	+	+ + + + + +
%16 NaCl	+, -	+ + + + + +
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + + + +
Filament Oluşumu	-	- - - - - -
Septat hif	-	- - - - - -
Ballistoconidia	-	- - - - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Galactomyces geotrichum</i>	<i>Galactomyces geotrichum</i>
		48 75 79
D-Glukoz	W,-	- - -
Galaktoz	-	- - -
Maltoz	-	- - -
Me- α -D-Glukozid	-	- - -
Sükroz	-	- - -
α,α Trehaloz	-	- - -
Melibioz	-	- - -
Laktoz	-	- - -
Sellobiyoz	-	- - -
Melezitoz	-	- - -
Rafinoz	-	- - -
İnulin	-	- - -
Nişasta	-	- - -
D-Ksiloz	-	- - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + +
D-Galaktoz	+	+ + +
L-Sorboz	+	+ + +
D-Glikozamin	-	- - -
D-Riboz	+, -	- - -
D-Ksiloz	+	+ + +
L-Arabinoz	-	- - -
D- Arabinoz	-	- - -
L-Rhamnoz	-	- - -
Sükroz	-	- - -
Maltoz	-	- - -
α,α Trehaloz	-	- - -
Me α -D-Glukozid	-	- - -
Sellobiyoz	-	- - -
Salisin	-	- - -
Arbutin	-	- - -
Melibiyoz	-	- - -
Laktoz	-	- - -
Rafinoz	-	- - -
Melezitoz	-	- - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	-	- - -
Nişasta	-	- - -
Gliserol	+	+ + +
Eritritol	-	- - -
Ribitol	+, -	- - -
Ksilitol	?	- - -
L-Arabinitol	?	- - -
D-Glucitol	+, D	+ + +
D-Mannitol	+	- - -
D-Galaktitol	-	- - -
myo-Inositol	-	- - -
D-Glukano 1,5 Lakton	+, -	+ + -
2-keto-D-Glukonat	-	- - -
5-keto-D-Glukonat	?	- - -
D-Glukonat	+, -	- - -
D-Glukronat	?	- - -
D-Galakturnik Asit	?	- - -
DL-Lactat	+, -	+ + +
Suksinat	+	+ + +
Sitrat	+, -	- - -
Methanol	-	- - -
Etanol	+	+ + +
Propan 1,2 - diol	?	- - -
Butan 2,3 - diol	?	- - -
Kuinik Asit	?	- - -
D-Glukarat	?	- - -
D-Galactonat	?	- - -
Nitrat	-	- - -
Nitrit	?	+ + +
Etilamin	+	+ + +
L-Lizin	?	+ + +
Kadaverin	?	+ + +
Kreatin	?	- - -
Kreatinin	?	- - -
D-Glukozamin	?	- - -
D-Triptofan	?	- - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+	+ + +
myo-inositol'süz	+	+ + +
Pantotenat'sız	+	+ + +
Biotin'siz	+	+ + +
Tiamin'siz	+	+ + +
Biotin ve Tiamin'siz	+	+ + +
Piridoksinsiz	+	+ + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+ + +
Niasin'siz	+	+ + +
PABA'sız	+	+ + +
25 °C'de	+	+ + +
30 °C'de	?	+ + +
35 °C'de	?	+ + +
37 °C'de	-	+ + +
40 °C'de	-	- - -
42 °C'de	-	- - -
45 °C'de	-	- - -
% 0.01Sikloheksimid	?	+ + -
% 0.1Sikloheksimid	?	+ + -
%1 Asetik Asit	?	- - -
%50 D-Glukoz	?	- + -
%60 D-Glukoz	?	- - -
%10 NaCl	?	- - -
%16 NaCl	?	- - -
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - -
Üre Hidrolizi	-	- - -
DBB Reaksiyonu	-	- - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - -
Tomurcuklanma	-	- - -
Filament Oluşumu	-	- - -
Septat hif	-	- - -
Ballistoconidia	-	- - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Pichia quilliermondii</i>	<i>Pichia quilliermondii</i>
		43 44 56 57
D-Glukoz	+,D	+ + + +
Galaktoz	+,-	+ - - -
Maltoz	D,-	- - - -
Me- α -D-Glukozid	+,-	- - + -
Sükroz	+,D	- - - -
α , α Trehaloz	D,-	- - - -
Melibioz	+,-	- - - -
Laktoz	-	- - - -
Sellobiyoz	D,-	- - - -
Melezitoz	-	- - - -
Rafinoz	+,-	- - - -
İnulin	D,-	- - - -
D-Ksiloz	-	- - - -
Nişasta	-	- - - -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ + + +
D-Galaktoz	+	+ + + +
L-Sorboz	+,-	- - + +
D-Glikozamin	+,D	- - - -
D-Riboz	+,D	- - - -
D-Ksiloz	+	+ + - -
L-Arabinoz	+,-	+ + - -
D- Arabinoz	+,-	- - - -
L-Rhamnoz	+,-	+ + - -
Sükroz	+	+ + + +
Maltoz	+,D	- - + +
α , α Trehaloz	+	- - - -
Me α -D-Glukozid	+,-	- - - -
Sellobiyoz	+,-	+ + + -
Salisin	+,-	+ + - -
Arbutin	+,-	+ + - -
Melibiyoz	+,-	- - - -
Laktoz	-	+ + + +
Rafinoz	+,D	+ + + +
Melezitoz	+,-	- - + +

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	+, -	- - - -
Nişasta	W, -	- - - -
Gliserol	+, D	+ + + +
Eritritol	-	- - - -
Ribitol	+, D	+ + + +
Ksilitol	+, D	- + - -
L-Arabinitol	+, -	- - - -
D-Glucitol	+, -	+ - + -
D-Mannitol	+, -	- - - -
D-Galaktilol	+, -	- - - -
myo-Inositol	-	- - - -
D-Glukano 1,5 Lakton	+, -	- - - -
2-keto-D-Glukonat	+	- - - -
5-keto-D-Glukonat	-	- - - -
D-Glukonat	+, -	- - - -
D-Glukronat	-	- - - -
D-Galakturnik Asit	-	- - - -
DL-Lactat	+, -	+ + + +
Suksinat	+, D	+ + + +
Sitrat	+	+ + + +
Methanol	-	- - - -
Etanol	+	+ + + +
Propan 1,2 - diol	+, -	+ + + -
Butan 2,3 - diol	-	- - - -
Kuinik Asit	+	- - - -
D-Glukarat	-	- - - -
D-Galaktonat	-	- - - -
Nitrat	-	- - - -
Nitrit	+, -	+ + + +
Etilamin	+	+ + + +
L-Lizin	+	+ + + +
Kadaverin	+	+ + + +
Kreatin	-	- - - -
Kreatinin	-	+ + + +
D-Triptofan	-	- - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+, -	+ + + +
myo-inositol'süz	+	+ + + +
Pantotenat'sız	+	+ + + +
Biotin'siz	W, -	- - - -
Tiamin'siz	+, -	+ + + +
Biotin ve Tiamin'siz	+, -	- - - -
Piridoksinsiz	+	+ + + +
Pridoksin ve Tiamin'siz	+, -	+ + + +
Niasin'siz	+	+ + + +
PABA'sız	+	+ + + +
25 °C'de	+	+ + + +
30 °C'de	+, -	+ + + +
35 °C'de	+, -	+ + + +
37 °C'de	+, -	+ + + +
40 °C'de	+, -	+ + + +
42 °C'de	+, -	+ + - -
45 °C'de	-	- - - -
% 0.01Sikloheksimid	+,D	+ + + +
% 0.1Sikloheksimid	+, -	+ + + +
%1 Asetik Asit	-	- - - -
%50 D-Glukoz	+, -	+ + + +
%60 D-Glukoz	+, -	+ + + +
%10 NaCl	+	+ + + +
%16 NaCl	+, -	- - - -
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- - - -
Asetik Asit Üretimi	-	- - - -
Üre Hidrolizi	-	- - - -
DBB Reaksiyonu	-	- - - -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- - - -
Tomurcuklanma	+	+ + + +
Filament Oluşumu	-	- - - -
Septat hif	-	- - - -
Ballistoconidia	-	- - - -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
		40
D-Glukoz	D,-	-
Galaktoz	-	-
Maltoz	-	-
Me- α -D-Glukozid	-	-
Sükroz	-	-
α , α -Trehaloz	W	-
Melibioz	-	-
Laktoz	-	-
Sellobiyoz	-	-
Melezitoz	-	-
Rafinoz	-	-
İnulin	-	-
Nişasta	-	-
D-Ksiloz	-	-
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+
D-Galaktoz	+, -	+
L-Sorboz	+, -	+
D-Glikozamin	+, -	-
D-Riboz	-	-
D-Ksiloz	D,-	+
L-Arabinoz	-	-
D- Arabinoz	-	-
L-Rhamnoz	-	-
Sükroz	-	-
Maltoz	-	-
α , α -Trehaloz	+, -	-
Me α -D-Glukozid	-	-
Sellobiyoz	D,-	-
Salisin	+, -	-
Arbutin	+, -	-
Melibiyoz	-	-
Laktoz	-	-
Rafinoz	-	-
Melezitoz	-	-

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	-	-
Nişasta	-	-
Gliserol	+,D	+
Eritritol	-	-
Ribitol	+, -	-
Ksilitol	-	-
L-Arabinitol	-	-
D-Glucitol	+,D	+
D-Mannitol	+	+
D-Galaktitol	-	-
myo-Inositol	-	-
D-Glukano 1,5 Lakton	+,D	+
2-keto-D-Glukonat	+	+
5-keto-D-Glukonat	+, -	-
D-Glukonat	+, -	-
D-Glukronat	+, -	-
D-Galakturnik Asit	-	-
DL-Lactat	+, -	+
Suksinat	+	+
Sitrat	+,D	-
Methanol	-	-
Etanol	+,D	+
Propan 1,2 - diol	-	-
Butan 2,3 - diol	-	-
Kuinik Asit	-	-
D-Glukarat	-	-
Galaktonat	-	-
Nitrat	-	-
Nitrit	+, -	+
Etilamin	+, -	+
L-Lizin	+, -	+
Kadaverin	+, -	+
Kreatin	-	-
Kreatinin	+, -	+
İmidazol	-	-
D-Triptofan	+, -	-

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+	+
myo-inositol'süz	+	+
Pantotenat'sız	+	+
Biotin'siz	+	+
Tiamin'siz	+	+
Biotin ve Tiamin'siz	+	+
Piridoksinsiz	+	+
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+
Niasin'siz	+	+
PABA'sız	+	+
25 °C'de	+	+
30 °C'de	+	+
35 °C'de	+, -	+
37 °C'de	-	+
40 °C'de	-	-
42 °C'de	-	-
45 °C'de	-	-
% 0.01 Sikloheksimid	+	+
% 0.1 Sikloheksimid	+	+
%1 Asetik Asit	-	-
%50 D-Glukoz	+, -	+
%60 D-Glukoz	-	+
%10 NaCl	+, -	+
%16 NaCl	-	-
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-
Üre Hidrolizi	-	-
DBB Reaksiyonu	-	-
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	-
Tomurcuklanma	+	-
Filament Oluşumu	-	+
Septat hif	-	-
Ballistoconidia	-	-

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri	
FERMANTASYON	<i>Candida versatilis</i>	<i>Candida versatilis</i>	
		37	38
D-Glukoz	+,D	+	+
Galaktoz	+,D	-	-
Maltoz	+, -	-	-
Me- α -D-Glukozid	-	-	-
Sükroz	+,D	-	-
α , α Trehaloz	+, -		
Melibioz	D, -	-	-
Laktoz	+, -		
Sellobiyoz	+,D	-	-
Melezitoz	D, -	-	-
Rafinoz	+, -	-	-
İnulin	-		
Nişasta	-		
D-Ksiloz	-	-	-
ASİMİLASYON			
D-Glukoz	+	+	+
D-Galaktoz	+	+	+
L-Sorboz	-	+	+
D-Glikozamin	-	-	-
D-Riboz	+, -	-	-
D-Ksiloz	D, -	-	-
L-Arabinoz	+, -	-	-
D- Arabinoz	+, -	-	-
L-Rhamnoz	-	-	-
Sükroz	+, -	+	+
Maltoz	+, -	-	-
α , α Trehaloz	+, -	-	-
Me α -D-Glukozid	-	-	-
Sellobiyoz	+	-	-
Salisin	+, -	-	-
Arbutin	+,D	-	-
Melibiyoz	+, -	-	-
Laktoz	+, -	-	-
Rafinoz	+, -	+	+
Melezitoz	-	-	-

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	-	- -
Nişasta	-	- -
Gliserol	+	+ +
Eritritol	-	- -
Ribitol	D,-	- -
Ksilitol	D,-	- -
L-Arabinitol	D,-	- -
D-Glucitol	-	+ +
D-Mannitol	+, -	+ +
D-Galaktitol	-	- -
myo-Inositol	-	- -
D-Glukano 1,5 Lakton	+, -	- -
2-keto-D-Glukonat	+, -	+ +
5-keto-D-Glukonat	-	- -
D-Glukonat	D,-	- -
D-Glukronat	-	- -
D-Galakturnik Asit	-	- -
DL-Lactat	W,-	+ +
Suksinat	+, -	- -
Sitrat	+, -	- -
Methanol	-	- -
Etanol	+, D	- -
Propan 1,2 - diol	-	- -
Butan 2,3 - diol	D,-	- -
Kuinik Asit	-	- -
D-Glukarat	-	- -
Nitrat	+	+ +
Nitrit	+	+ +
Etilamin	+	+ +
L-Lizin	+	+ +
Kadaverin	+	+ +
Kreatin	+, -	- -
Kreatinin	-	- -
D-Glukozaamin	-	- -
D-Triptofan	-	+ +

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	-	- -
myo-inositol'süz	+	+ +
Pantotenat'sız	+	+ +
Biotin'siz	-	+ +
Tiamin'siz	-	+ +
Biotin ve Tiamin'siz	-	+ +
Piridoksinsiz	+	+ +
Pridoksin ve Tiamin'siz	-	+ +
Niasin'siz	+	+ +
PABA'sız	+	+ +
25 °C'de	+	+ +
30 °C'de	+,W	+ +
35 °C'de	+,-	+ +
37 °C'de	-	+ +
40 °C'de	-	+ +
42 °C'de	-	- -
45 °C'de	-	- -
% 0.01Sikloheksimid	+,-	+ +
% 0.1Sikloheksimid	+,-	+ +
%1 Asetik Asit	-	- -
%50 D-Glukoz	+	+ +
%60 D-Glukoz	+	+ +
%10 NaCl	+	+ +
%16 NaCl	+	+ +
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	- -
Asetik Asit Üretimi	-	- -
Üre Hidrolizi	-	- -
DBB Reaksiyonu	-	- -
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	- -
Tomurcuklanma	+	+ +
Filament Oluşumu	-	- -
Septat hif	-	- -
Ballistoconidia	-	- -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Candida sake</i>	<i>Candida sake</i>
		22 50
D-Glukoz	+, -	- -
Galaktoz	+, -	- -
Maltoz	+, -	- -
Me- α -D-Glukozid	-	- -
Sükroz	+, -	- -
α , α -Trehaloz	+, D	
Melibioz	-	- -
Laktoz	-	
Sellobiyoz	D, -	- -
Melezitoz	-	- -
Rafinoz	-	- -
İnulin	-	
Nişasta	-	
D-Ksiloz	-	- -
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+ +
D-Galaktoz	+	+ +
L-Sorboz	+, -	- -
D-Glikozamin	+, -	- -
D-Riboz	+, -	- -
D-Ksiloz	+, -	- -
L-Arabinoz	-	- -
D- Arabinoz	-	- -
L-Rhamnoz	-	- -
Sükroz	+, -	+ +
Maltoz	+, -	- -
α , α -Trehaloz	+	+ +
Me α -D-Glukozid	+, -	- -
Sellobiyoz	+, -	- -
Salisin	+, -	- -
Arbutin	+, -	- -
Melibiyoz	-	- -
Laktoz	-	- -
Rafinoz	-	+ +
Melezitoz	+, -	- -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	-	- -
Nişasta	-	- -
Gliserol	+,D	+ +
Eritritol	-	- -
Ribitol	+,-	- -
Ksilitol	+,-	- -
L-Arabinitol	+,-	- -
D-Glucitol	+,-	- -
D-Mannitol	+,-	- -
D-Galaktitol	-	- -
myo-Inositol	-	- -
D-Glukano 1,5 Lakton	+,-	- -
2-keto-D-Glukonat	+,-	+ +
5-keto-D-Glukonat	D,-	- -
D-Glukonat	+,-	- -
D-Glukronat	-	- -
D-Galakturnik Asit	-	- -
DL-Lactat	+,-	+ +
Suksinat	+,D	- -
Sitrat	+,-	- -
Methanol	-	- -
Etanol	+,-	+ +
Propan 1,2 - diol	D,-	- -
Butan 2,3 - diol	+,-	- -
Kuinik Asit	-	- -
D-Glukarat	-	- -
Nitrat	-	- -
Nitrit	-	- -
Etilamin	-	- -
L-Lizin	+,-	- -
Kadaverin	+,-	- -
Kreatin	+,-	- -
Kreatinin	-	+ +
D-Glukozamin	-	- -
D-Triptofan	-	- -

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+	+
myo-inositol'süz	+, -	+
Pantotenat'sız	+	+
Biotin'siz	+	+
Tiamin'siz	-	+
Biotin ve Tiamin'siz	+, -	+
Piridoksinsiz	-	+
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+
Niasin'siz	+, -	+
PABA'sız	+	+
25 °C'de	+	+
30 °C'de	+, -	+
35 °C'de	+, -	+
37 °C'de	+, -	+
40 °C'de	-	-
42 °C'de	-	-
45 °C'de	-	-
% 0.01 Sikloheksimid	D, -	-
% 0.1 Sikloheksimid	-	-
%1 Asetik Asit	-	-
%50 D-Glukoz	+, -	+
%60 D-Glukoz	D, -	+
%10 NaCl	+, -	-
%16 NaCl	-	-
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-
Üre Hidrolizi	-	-
DBB Reaksiyonu	-	-
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	-
Tomurcuklanma	+	+
Filament Oluşumu	-	-
Septat hif	-	-
Ballistoconidia	-	-

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Candida diddensiae</i>	<i>Candida diddensiae</i>
		52
D-Glukoz	+,D	-
Galaktoz	+,D	+
Maltoz	D,-	-
Me- α -D-Glukozid	D,-	-
Sükroz	D,-	-
α,α Trehaloz	+,D	-
Melibioz	-	-
Laktoz	-	-
Sellobiyoz	D	-
Melezitoz	D,-	-
Rafinoz	-	-
İnulin	-	-
Nişasta	-	-
D-Ksiloz	-	-
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+
D-Galaktoz	+	+
L-Sorboz	+, -	+
D-Glikozamin	+, -	-
D-Riboz	+,D	-
D-Ksiloz	+	-
L-Arabinoz	+,D	-
D- Arabinoz	+, -	-
L-Rhamnoz	+, -	-
Sükroz	+	+
Maltoz	+	-
α,α Trehaloz	+,D	-
Me α -D-Glukozid	+,D	-
Sellobiyoz	+	-
Salisin	+,D	-
Arbutin	+, -	-
Melibiyoz	-	-
Laktoz	-	-
Rafinoz	-	-
Melezitoz	+,D	-

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	-	+
Nişasta	+, -	-
Gliserol	+	+
Eritritol	+	+
Ribitol	+	-
Ksilitol	+, D	-
L-Arabinitol	+, D	-
D-Glucitol	+	+
D-Mannitol	+	-
D-Galaktitol	-	-
myo-Inositol	-	-
D-Glukano 1,5 Lakton	+, -	+
2-keto-D-Glukonat	D, -	-
5-keto-D-Glukonat	-	-
D-Glukonat	+	+
D-Glukronat	-	-
D-Galakturnik Asit	-	-
DL-Lactat	-	+
Suksinat	+	+
Sitrat	+, D	+
Methanol	-	-
Etanol	+	+
Propan 1,2 - diol	-	-
Butan 2,3 - diol	-	-
Kuinik Asit	-	-
D-Glukarat	-	-
D-Galaktonat	-	-
Nitrat	-	-
Nitrit	-	+
Etilamin	+, -	+
L-Lizin	+	+
Kadaverin	+	+
Kreatin	-	-
Kreatinin	-	+
D-Glukozamin	-	-
D-Triptofan	-	+

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	-	+
myo-inositol'süz	+	+
Pantotenat'sız	+	+
Biotin'siz	-	+
Tiamin'siz	+, -	+
Biotin ve Tiamin'siz	+, -	+
Piridoksinsiz	+, -	+
Pridoksin ve Tiamin'siz	+, -	+
Niasin'siz	+	+
PABA'sız	+	+
25 °C'de	+	+
30 °C'de	+	+
35 °C'de	+	+
37 °C'de	+, -	+
40 °C'de	+, -	-
42 °C'de	+, -	-
45 °C'de	-	-
% 0.01 Sikloheksimid	-	+
% 0.1 Sikloheksimid	-	+
%1 Asetik Asit	-	-
%50 D-Glukoz	+, -	+
%60 D-Glukoz	+, -	+
%10 NaCl	+	+
%16 NaCl	+, -	-
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-
Üre Hidrolizi	-	-
DBB Reaksiyonu	-	-
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	-
Tomurcuklanma	+	+
Filament Oluşumu	-	-
Septat hif	-	-
Ballistoconidia	-	-

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanılanan Suşların Özellikleri
FERMANTASYON	<i>Pichia jadinii</i>	<i>Pichia jadinii</i>
		80
D-Glukoz	+	+
Galaktoz	+, -	+
Maltoz	-	-
Me- α -D-Glukozid	-	-
Sükroz	+	+
α , α -Trehaloz	-	-
Melibioz	-	-
Laktoz	-	-
Sellobiyoz	-	-
Melezitoz	-	-
Rafinoz	+, -	-
İnulin	W, -	-
Nişasta	-	-
D-Ksiloz	-	-
ASİMİLASYON		
D-Glukoz	+	+
D-Galaktoz	-	+
L-Sorboz	-	+
D-Glikozamin	-	-
D-Riboz	+, -	-
D-Ksiloz	+, -	+
L-Arabinoz	-	-
D- Arabinoz	-	-
L-Rhamnoz	-	-
Sükroz	+	+
Maltoz	+	+
α , α -Trehaloz	+	+
Me α -D-Glukozid	+, D	-
Sellobiyoz	+	+
Salisin	+	-
Arbutin	+	-
Melibiyoz	-	-
Laktoz	-	+
Rafinoz	+	+
Melezitoz	+	+

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
ASİMİLASYON		
Inulin	D,-	+
Nişasta	-	-
Gliserol	+	+
Eritritol	-	-
Ribitol	-	-
Ksilitol	D,-	+
L-Arabinitol	-	-
D-Glucitol	+,-	-
D-Mannitol	+,D	+
D-Galaktitol	-	-
myo-Inositol	-	-
D-Glukano 1,5 Lakton	+	-
2-keto-D-Glukonat	+,-	+
5-keto-D-Glukonat	-	-
D-Glukonat	+,D	+
D-Glukronat	-	+
D-Galakturnik Asit	-	-
DL-Lactat	+	+
Suksinat	+	-
Sitrat	+	-
Methanol	-	-
Etanol	+	+
Propan 1,2 - diol	+,D	-
Butan 2,3 - diol	+,D	-
Kuinik Asit	-	-
D-Glukarat	-	-
D-Galaktonat	-	-
Nitrat	+	+
Nitrit	+	+
Etilamin	+	+
L-Lizin	+	+
Kadaverin	+	+
Kreatin	-	-
Kreatinin	-	+
D-Glukozamin	-	-
D-Triptofan	-	-

Çizelge 4.8. (devam)

Testler	Literatür Suşlarının Özellikleri	Tanımlanan Suşların Özellikleri
BÜYÜME		
Vitamin'siz	+	+
myo-inositol'süz	+	+
Pantotenat'sız	+	+
Biotin'siz	+	+
Tiamin'siz	+	+
Biotin ve Tiamin'siz	+	+
Piridoksinsiz	+	+
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+
Niasin'siz	+	+
PABA'sız	+	+
25 °C'de	+	+
30 °C'de	+	+
35 °C'de	+	+
37 °C'de	+	+
40 °C'de	+, -	-
42 °C'de	+, -	-
45 °C'de	-	-
% 0.01 Sikloheksimid	D, -	-
% 0.1 Sikloheksimid	-	-
%1 Asetik Asit	-	-
%50 D-Glukoz	+, -	+
%60 D-Glukoz	-	+
%10 NaCl	-	-
%16 NaCl	-	-
EK KARAKTERLER		
Nişasta Oluşumu	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-
Üre Hidrolizi	-	-
DBB Reaksiyonu	-	-
MORFOLOJİ		
Pembe Koloni	-	-
Tomurcuklanma	+	+
Filament Oluşumu	-	-
Septat hif	-	-
Ballistoconidia	-	-

+ : Pozitif - : Negatif

D: 7 günden daha uzun süre bekletildiğinde sonuç alındı

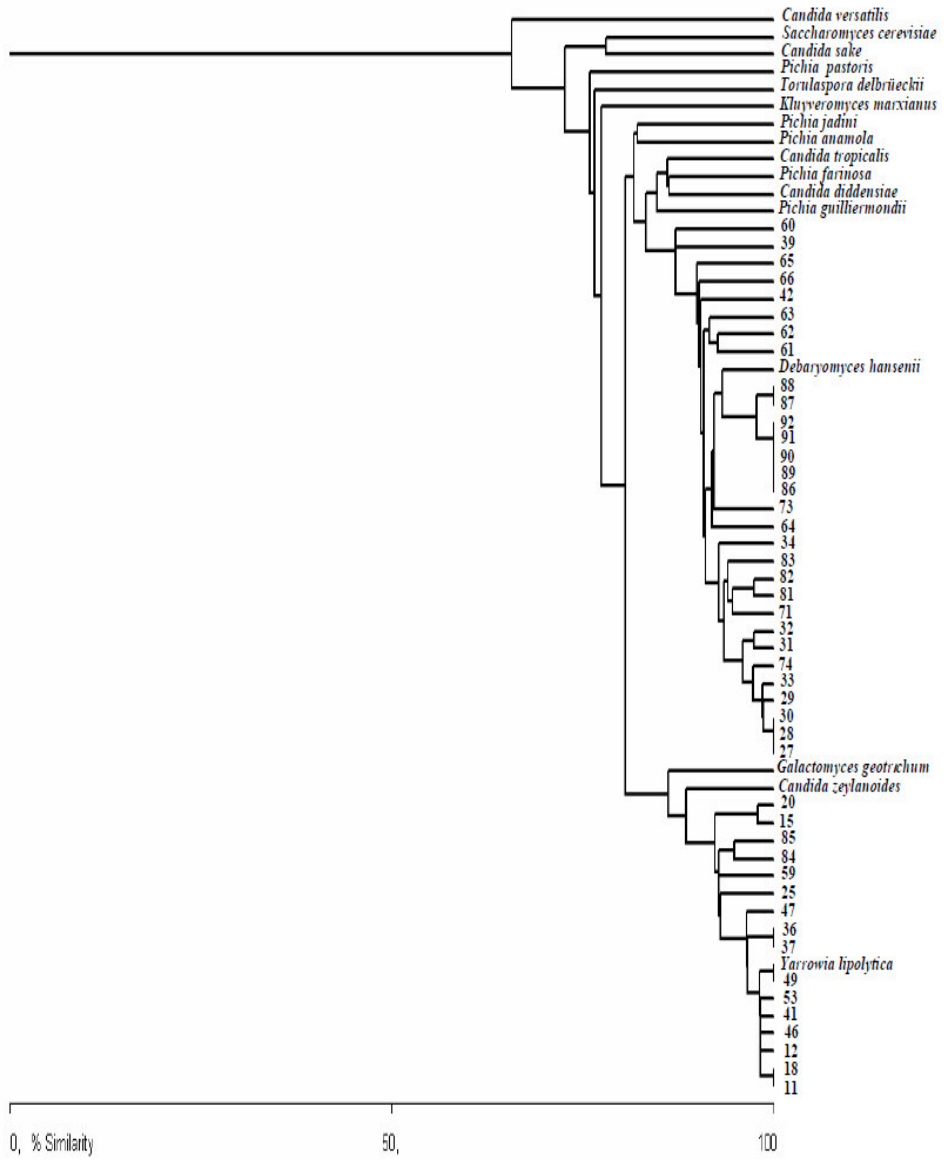
W: Yavaş ve zayıf büyüme

4.5.Fenotipik Olarak *Y. lipolytica* ve *D. hansenii* Olarak Tanılanan İzolatların Tip Türler İle Birlikte Küme Analizi

Fenotipik olarak izolatların hepsi 99 karakter bakımından analiz edilmiştir. Fenotipik olarak *Y. lipolytica* ve *D. hansenii* olarak tanılanan izolatların küme analizi Biodiversity 2.0 programı ile (<http://www.nhm.ac.uk/zoology/bdpro>) gerçekleştirilmiştir. Fenotipik analizlerden melibioz, laktoz, sellobioz, melezitoz, nişasta fermentasyon testleri, melibioz, nişasta, galactitol, myo-inositol, galaktronik asit, methanol, kuinik asit, D-glukarat, D-galaktonat, kreatin ve imidazol asimilasyonu testleri ile 40⁰, 42⁰ ve 45⁰ C'lerde büyüme, nişasta oluşumu, asetik asit üretimi, üre hidrolizi ve DBB testide dahil 23 tane karakter bütün izolatlar ve tip türler için negatif; glukoz asimilasyonu, para aminobenzoik asitsiz büyüme, 25⁰ ve 30⁰ C'de büyüme ile tomurcuklanma testleride dahil toplam 5 tane karakter bütün izolatlar ve tip türler için pozitif olduğundan analize dahil edilmemiştir.

27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 39, 42, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 73, 74, 81, 82, 83, 86, 87, 88, 89, 90, 91 ve 92 numaralı izolatlar *D. hansenii* NRRL-Y-7624 ile aynı kümede bulunmakta ve bu izolatların tip tür *D. hansenii*'ye benzerliği %80 ve üzerindedir. Bununla birlikte fenotipik tanılama sonucunda *D. hansenii* olarak tanılan 39, 60, 62, 63 ve 65 numaralı izolatlar ITS-PCR sonucunda, literatürde verilen 640bp'lik karakteristik bantı vermemişlerdir. (Guillamon et al., 1998; Loureiro and Querol, 1999; Fujita et al.,2001). İzolat 39,60 ve 63 için 280 bp, izolat 62 için 320 bp ve izolat 65 için 680 bp'lik farklı bant elde edilmiştir.

11, 12, 15, 18, 20, 25, 35, 36, 41, 46, 47, 49, 53, 59, 84 ve 85 numaralı izolatlar *Y. lipolytica* CBS 6124 ile aynı kümede bulunmakta ve bu izolatlar tip tür *Y. lipolytica*'ya %89 ve üstü fenotipik benzerlik göstermektedirler. Tip tür *Y. lipolytica* ile %90 ve üstü ile benzerlik gösteren bütün izolatlarda ITS bölgesinde 360bp'lik ortak bant görülmektedir (Fujita et al.,2001). 59 nolu izolat fenotipik olarak %89 benzerlik göstermesine rağmen ITS PCR sonucunda 580bp'lik farklı bir bant ile karakterize edilmiştir. Fenotipik olarak *Y. lipolytica* ve *D. hansenii* olarak tanılanan izolatların tip türler ile birlikte küme analizi şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bu izolatların tip türlere olan fenotipik benzerliğinin yüzdeleri ise çizelge 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.1. Fenotipik olarak *Y. lipolytica* ve *D. hansenii* olarak tanılanan izolatların tip türler ile beraber küme analizi (% Benzerlik)

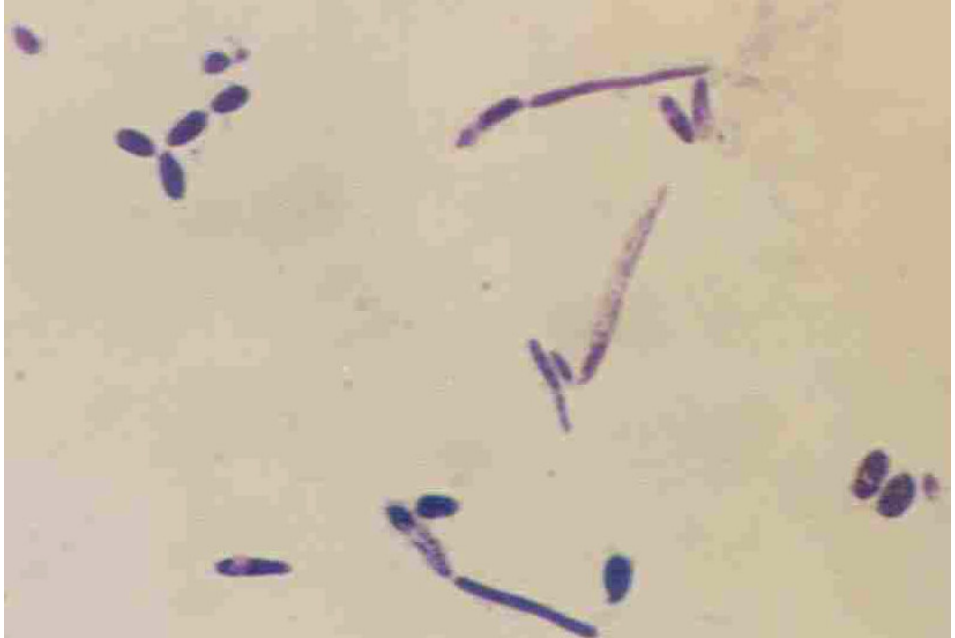
Çizelge 4.9. *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* olarak tanımlanan izolatlar ile tip türlerin fenotipik benzerliği

	<i>D.h</i>	<i>Y.l</i>	<i>K.m</i>	<i>T.d</i>	<i>P.a</i>	<i>G.g</i>	<i>P.g</i>	<i>C.z</i>	<i>C.v</i>	<i>C.s</i>	<i>C.d</i>	<i>P.j</i>	<i>P.f</i>	<i>C.t</i>	<i>S.c</i>	<i>P.p</i>
11	62,16	96,42	57,57	59,01	64,1	76,36	65,71	81,96	54,54	46,80	65,75	65,71	63,01	70,42	50	73,07
12	64	94,73	56,71	61,29	65,82	75	64,78	83,87	57,14	50	64,86	67,60	64,86	72,22	49,05	71,69
15	60	92,30	54,83	56,14	59,45	82,35	63,63	77,19	50,98	51,16	63,76	66,66	60,86	65,67	54,16	66,66
18	62,16	96,42	57,57	59,01	64,10	76,36	65,71	81,96	54,54	46,80	65,75	65,71	63,01	70,42	50	73,07
20	57,97	90,19	55,73	57,14	57,53	84	61,53	75	52	52,38	61,76	64,61	58,82	63,63	55,31	68,08
25	60	96,15	61,29	63,15	62,16	82,35	60,60	80,70	54,90	51,16	63,76	63,63	60,86	65,67	54,16	75
27	85,36	46,87	59,45	49,27	65,11	41,26	64,10	52,17	50,79	47,27	69,13	56,41	66,66	65,82	50	40
28	85,36	46,87	59,45	49,27	65,11	41,26	64,10	52,17	50,79	47,27	69,13	56,41	66,66	65,82	50	40
29	83,95	44,44	57,53	50	63,52	38,70	62,33	50	48,38	44,44	67,5	54,54	65	64,10	47,45	37,28
30	85,36	46,87	59,45	49,27	65,11	41,26	64,10	52,17	50,79	47,27	69,13	56,41	66,66	65,82	50	40
31	86,74	49,23	61,33	54,28	66,66	46,87	68,35	57,14	56,25	46,42	68,29	60,75	65,85	67,5	49,18	42,62
32	87,05	50,74	62,33	55,55	67,41	48,48	71,60	58,33	57,57	44,82	69,04	61,72	69,04	68,29	47,61	47,61
33	82,5	45,16	55,55	47,76	61,90	39,34	60,52	50,74	45,90	45,28	68,35	52,63	65,82	64,93	48,27	37,93
34	81,01	45,90	56,33	51,51	65,06	40	61,33	51,51	53,33	46,15	64,10	58,66	64,10	63,15	49,12	38,59
35	64,86	96,42	60,60	59,01	64,10	80	68,57	85,24	54,54	46,80	68,49	65,71	65,75	73,23	50	73,07
36	64,86	96,42	60,60	59,01	64,10	80	68,57	85,24	54,54	46,80	68,49	65,71	65,75	73,23	50	73,07
39	81,92	67,69	72	62,85	68,96	68,75	70,88	77,14	59,37	57,14	70,73	60,75	70,73	75	55,73	55,73
41	63,01	98,18	58,46	60	64,93	77,77	63,76	83,33	55,55	47,82	66,66	63,76	63,88	68,57	50,98	70,58
42	88,37	67,64	74,35	63,01	77,77	65,67	73,17	73,97	56,71	54,23	75,29	70,73	77,64	74,69	53,12	50
46	64	94,73	59,70	61,29	65,82	78,57	67,60	83,87	57,14	50	67,56	64,78	64,86	72,22	52,83	71,69
47	61,11	92,59	59,37	57,62	60,52	83,01	67,64	81,35	49,05	48,88	64,78	64,70	61,97	69,56	52	72
49	63,88	100	59,37	61,01	65,78	79,24	64,70	84,74	56,60	48,88	67,60	64,70	64,78	69,56	52	72
53	60,27	94,54	58,46	60	62,33	77,77	63,76	80	51,85	47,82	63,88	66,66	61,11	68,57	50,98	74,50
59	61,11	88,88	62,5	64,40	60,52	83,01	64,70	84,74	56,60	53,33	61,97	64,70	61,97	69,56	52	76
60	80	70,96	75	65,67	69,04	68,85	76,31	80,59	62,29	56,60	70,88	57,89	68,35	72,72	55,17	62,06
61	90,90	65,71	77,5	58,66	73,91	63,76	83,33	72	63,76	49,18	80,45	66,66	75,86	75,29	48,48	57,57
62	90,47	60,60	73,68	64,78	77,27	61,53	82,5	70,42	61,53	56,14	77,10	72,5	77,10	76,54	54,83	58,06
63	89,41	65,67	75,32	63,88	74,15	63,63	81,48	75	63,63	55,17	78,57	69,13	73,80	80,48	53,96	57,14
64	91,95	57,97	68,35	62,16	74,72	55,88	77,10	67,56	55,88	50	76,74	67,46	74,41	73,80	52,30	49,23
65	82,92	59,37	72,97	60,86	65,11	63,49	79,48	72,46	63,49	47,27	71,60	58,97	66,66	70,88	46,66	56,66
66	89,41	56,71	70,12	61,11	71,91	57,57	74,07	66,66	60,60	51,72	73,80	66,66	71,42	73,17	53,96	47,61
71	81,48	50,79	52,05	50	63,52	41,93	59,74	52,94	48,38	48,14	67,5	54,54	65	66,66	50,84	44,06
73	92,13	56,33	64,19	55,26	73,11	48,57	72,94	60,52	57,14	41,93	75	65,88	72,72	69,76	44,77	41,79
74	85,36	46,87	59,45	52,17	65,11	44,44	66,66	55,07	53,96	47,27	69,13	58,97	66,66	68,35	50	43,33
81	84,70	50,74	59,74	52,77	67,41	45,45	69,13	55,55	54,54	44,82	69,04	61,72	69,04	68,29	47,61	50,79
82	84,33	52,30	58,66	54,28	66,66	46,87	65,82	57,14	53,12	46,42	68,29	60,75	65,85	70	49,18	49,18
83	84,09	60	62,5	53,33	67,39	52,17	73,80	64	57,97	42,62	73,56	61,90	68,96	75,29	45,45	57,57
84	67,56	92,85	60,60	62,29	66,66	76,36	62,85	88,52	58,18	55,31	68,49	62,85	68,49	73,23	53,84	69,23
85	69,33	91,22	65,67	64,51	70,88	75	67,60	83,87	64,28	54,16	70,27	67,60	70,27	75	52,83	67,92
86	93,33	63,88	65,85	62,33	76,59	59,15	76,74	70,12	56,33	50,79	76,40	69,76	78,65	78,16	52,94	55,88
87	91,30	67,56	69,04	60,75	75	63,01	79,54	73,41	60,27	49,23	79,12	68,18	76,92	80,89	51,42	60
88	91,30	67,56	69,04	60,75	75	63,01	79,54	73,41	60,27	49,23	79,12	68,18	76,92	80,89	51,42	60
89	93,33	63,88	65,85	62,33	76,59	59,15	76,74	70,12	56,33	50,79	76,40	69,76	78,65	78,16	52,94	55,88
90	93,33	63,88	65,85	62,33	76,59	59,15	76,74	70,12	56,33	50,79	76,40	69,76	78,65	78,16	52,94	55,88
91	93,33	63,88	65,85	62,33	76,59	59,15	76,74	70,12	56,33	50,79	76,40	69,76	78,65	78,16	52,94	55,88
92	93,33	63,88	65,85	62,33	76,59	59,15	76,74	70,12	56,33	50,79	76,40	69,76	78,65	78,16	52,94	55,88

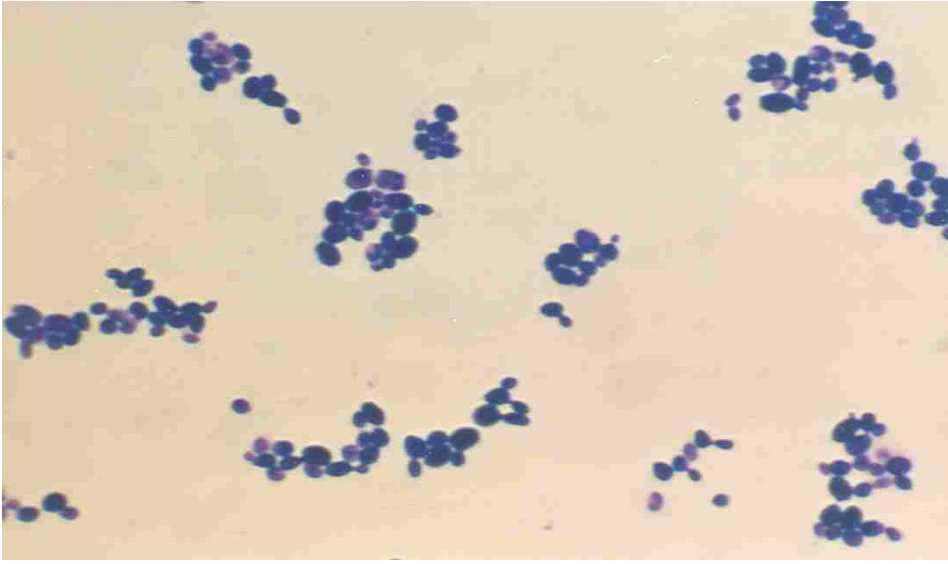
D.h: *Debaryomyces hansenii* NRRL-Y- 7624; *Y.l*: *Yarrowia lipolytica* CBS 6124; *K.m*: *Kluyveromyces maxianus* NRRL-Y ; *T.d*: *Torulaspora delbrückii* NRRL-Y-866; *P.a*: *Pichia anamola* NRRL-Y-366; *G.g*: *Galactomyces geotrichum* NRRL-Y-; *P.g*: *Pichia quilliermondii* NRLL-Y-2075; *C.z*: *Candida zeylanoides* NRRL-Y-1774; *C.v*: *C. versatilis*; *C.s*: *Candida sake* NRLL-Y-1622; *C.d*: *Candida didensiae*; *P.j*: *Pichia jadinii*; *P.f*: *Pichia farinosa* NRRL-Y-7553; *C.t*: *Candida tropicalis*; *S.c*: *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-12632; *P.p*: *Pichia pastoris*

4.6. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Fotoğrafları

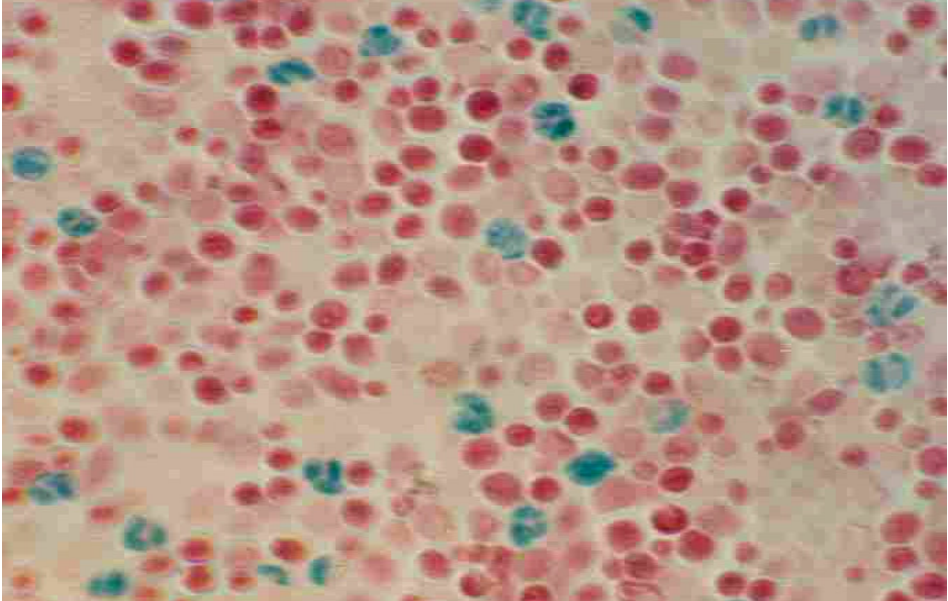
Tanılanan izolatların genel koloni görünüşlerinin yanı sıra vejetatif hücrelerinin ve askosporlarının genel görünümü Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6' da görülmektedir. İzolatların tanılanmasında kullanılan D-glukoz fermentasyonu ve DBB testi ile tanılamada kullanılan bazı asimilasyon testlerine ait sonuçlar Şekil 4.7, 4.8, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22' de görülmektedir. Tanılama testlerinde izolatların ekilmesinde izlenilen sıra da şekil 4.9' da gösterilmiştir.



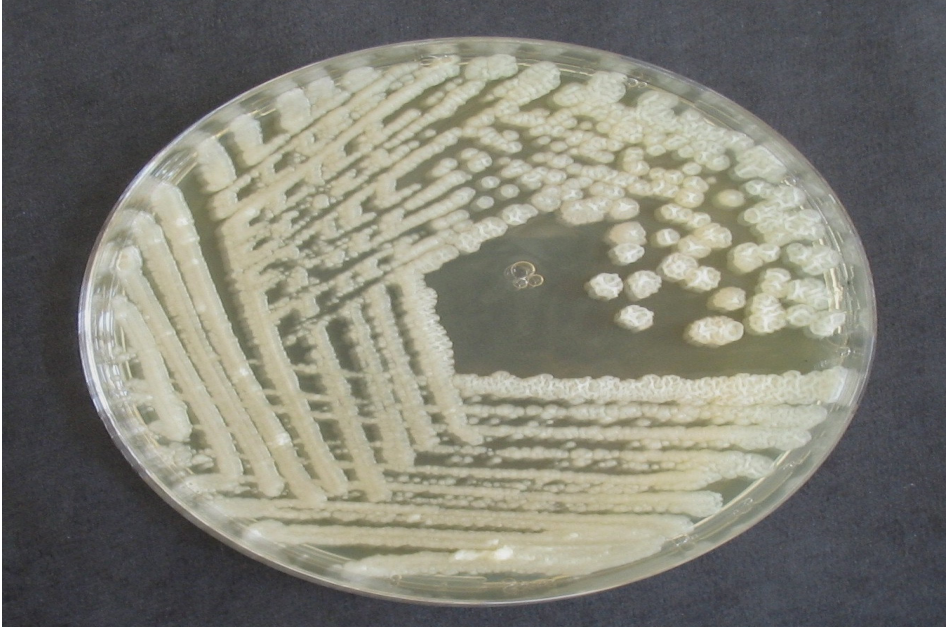
Şekil 4.2. *Y. lipolytica*'nın MYGP Broth'daki vejetatif hücrelerinin 27 °C'de 3 günlük görünümü (1000X)



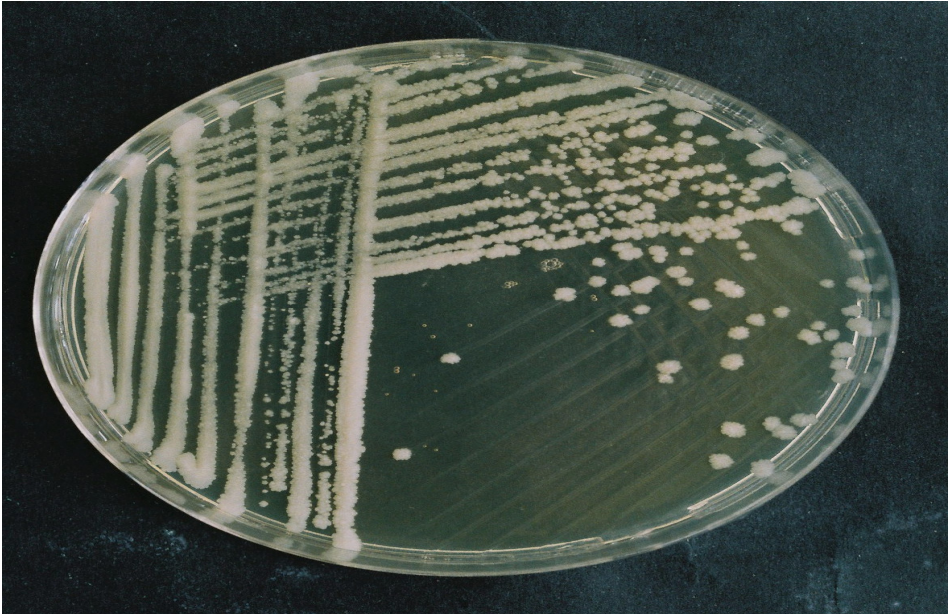
Şekil 4.3. *D. hansenii*'nin MYGP Broth'daki vejetatif hücrelerinin 27 °C'de 3 günlük görünümü (1000X)



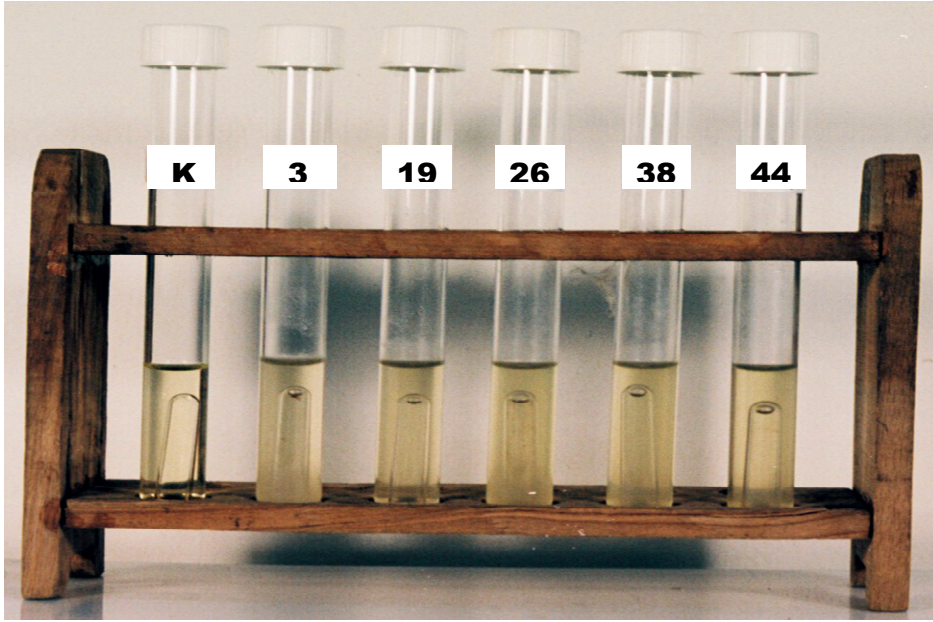
Şekil 4.4. *D. hansenii*'nin Asetat Agar'da askosporlarının 27 °C'de 10 günlük görünümü (1000X)



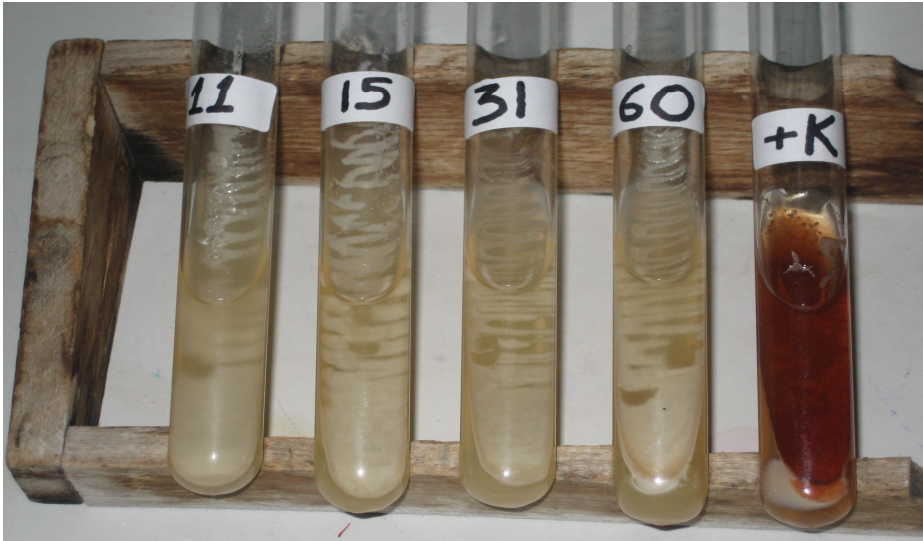
Şekil 4.5. *Y. lipolytica*'nın MYGP Agar'da 2 günlük genel koloni görünüşü



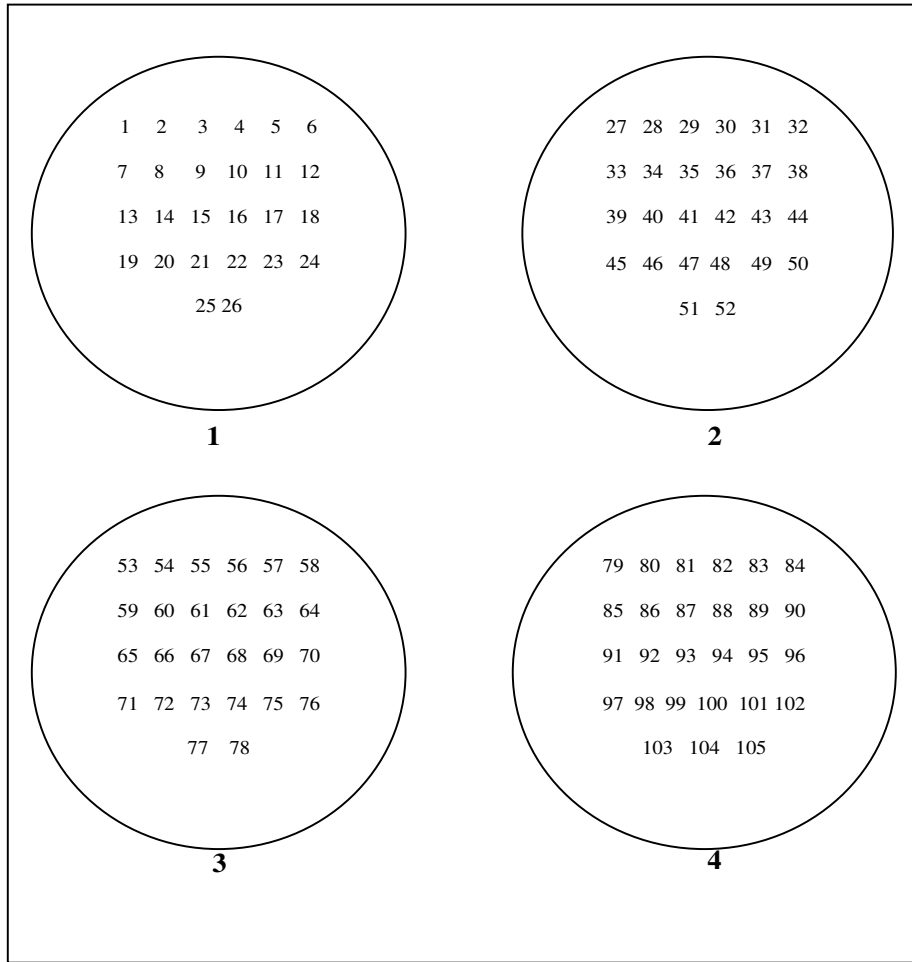
Şekil 4.6. *D. hansenii*'nin MYGP Agar'da 2 günlük genel koloni görünüşü



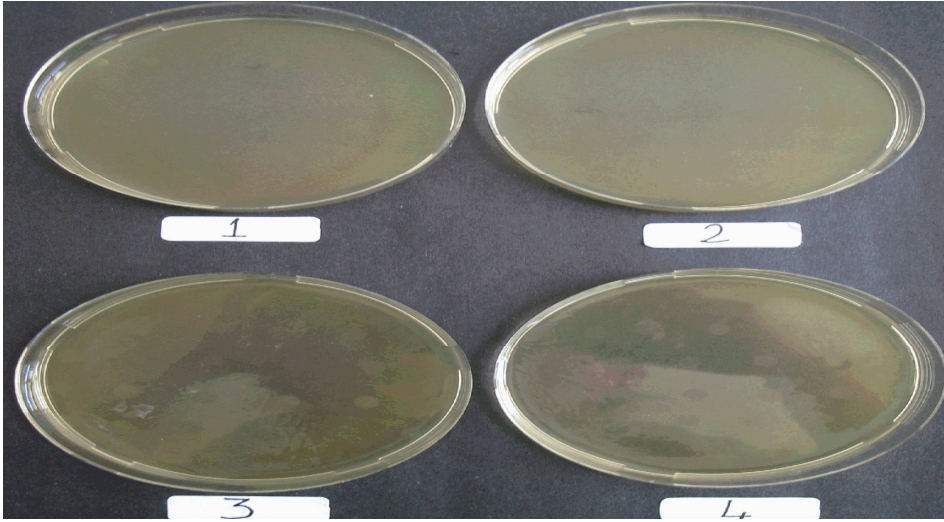
Şekil 4.7. D-Glukoz içeren Yeast Extract Broth'da 27 °C'de 5 günlük fermentasyon testi



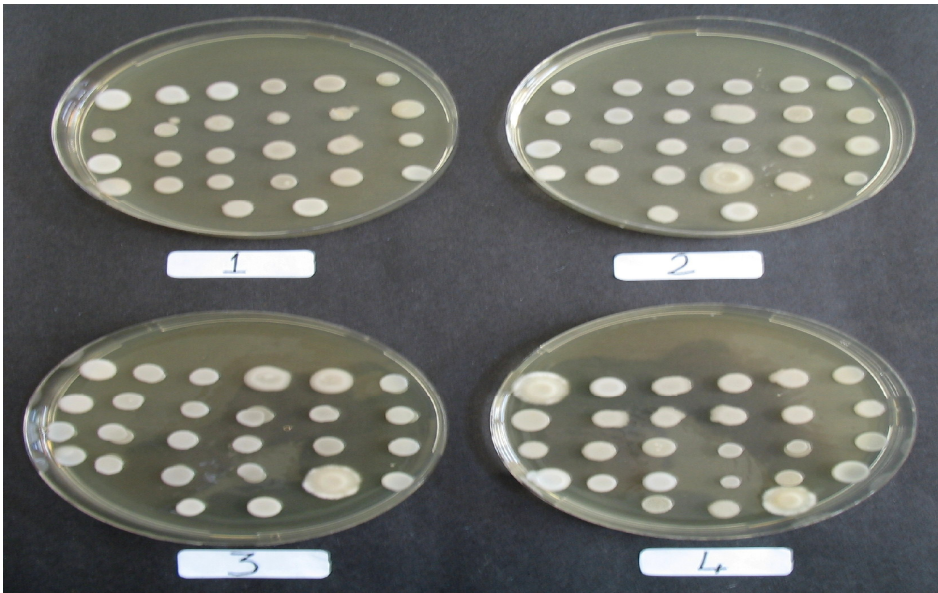
Şekil 4.8. Sabouraud Dextroz Agar'da 27 °C' de 10 günlük kolonilerin DBB testi



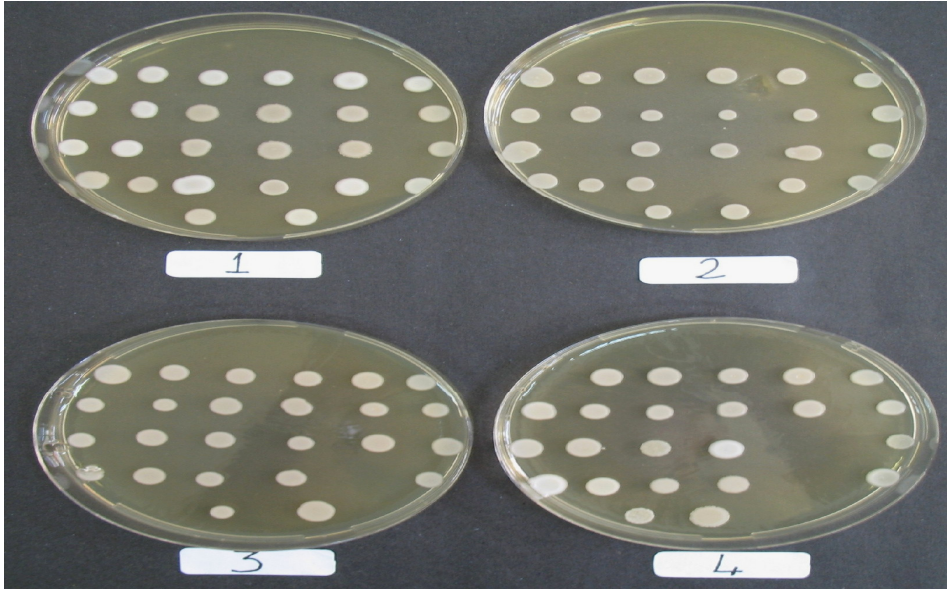
Şekil 4.9.Fenotipik tanılama testlerinde izolatların ekilmesinde izlenilen sıra; 1-92 arası izolat numaraları, 93; *Y. lipolytica* CBS 6124 , 94; *D. hansenii* NRRL-Y-7624, 95; *Candida zeylanoides* NRRL-Y-1774, 96; *Candida sake* NRLL-Y-1622, 97; *Candida tropicalis*, 98; *Pichia anamola* NRLL-Y-366, 99; *Pichia quilliermondii* NRRL-Y-2075, 100; *Pichia farinosa* NRRL-Y-7553 , 101; *Pichia pastoris* , 102; *Kluyveromyces maxianus* NRRL-Y- 1109, 103; *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-12632, 104; *Torulaspora delbrückii* NRRL-Y-866, 105; *G. geotrichum* NRRL-Y-17569



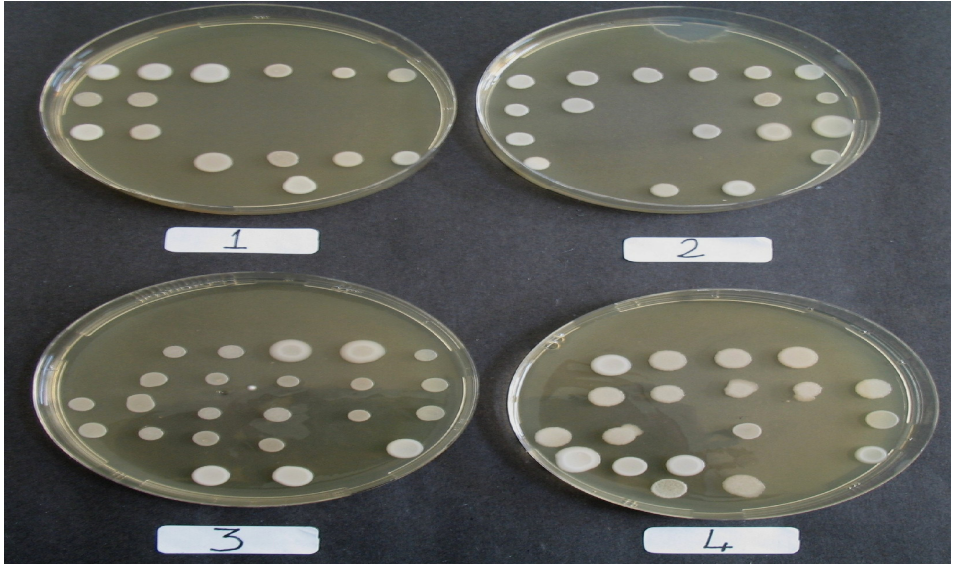
Şekil 4.10. N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü (Negatif kontrol)



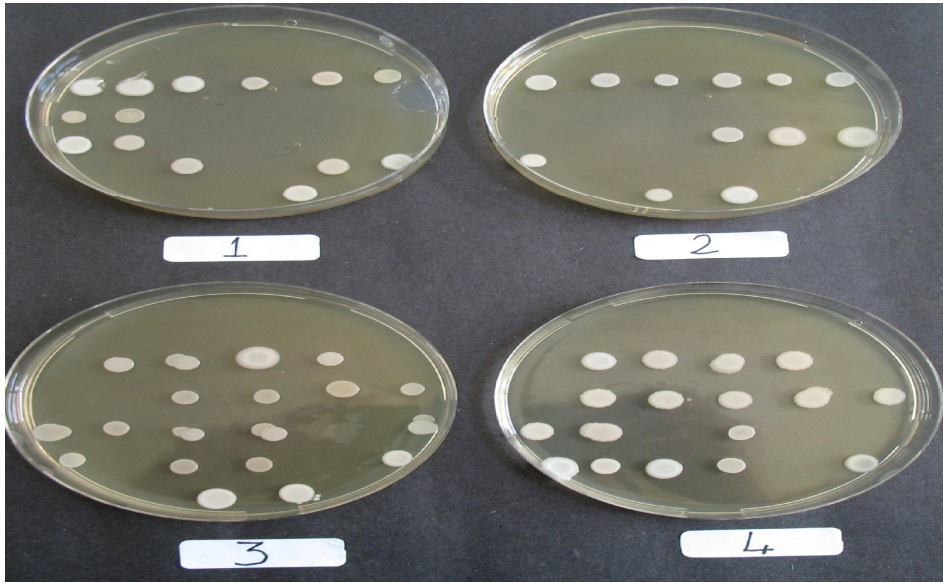
Şekil 4.11. Glikoz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü (Pozitif kontrol)



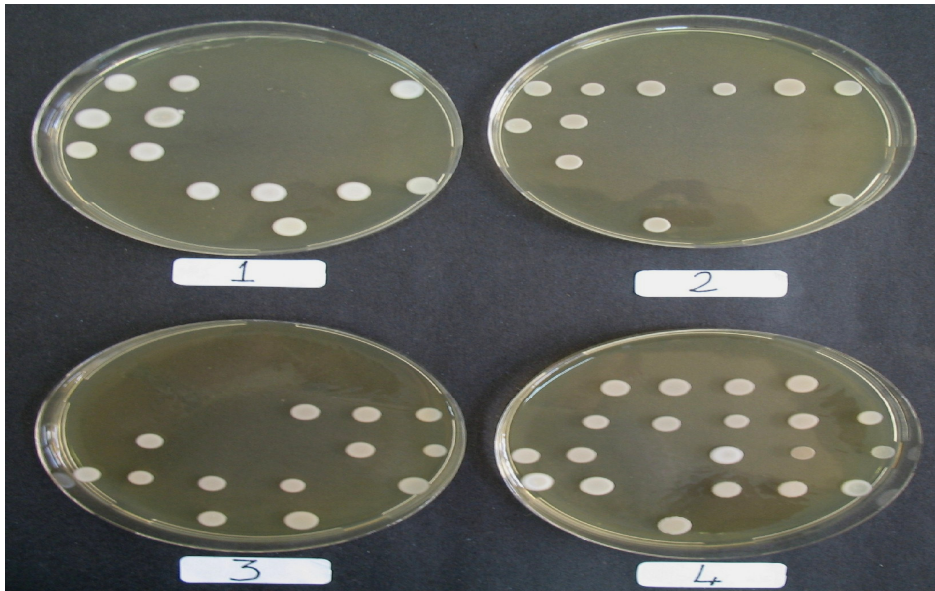
Şekil 4.12.Rhamnoz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



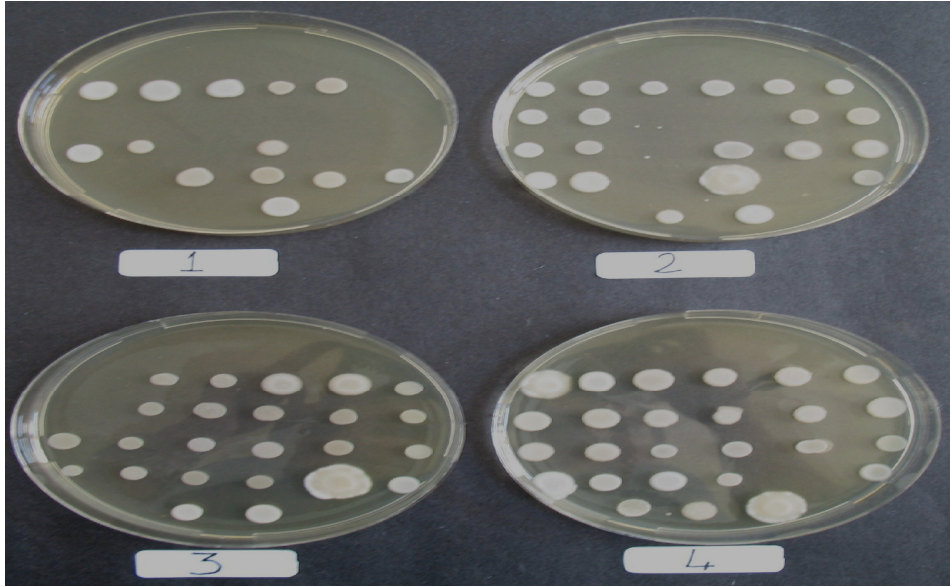
Şekil 4.13.Sükroz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



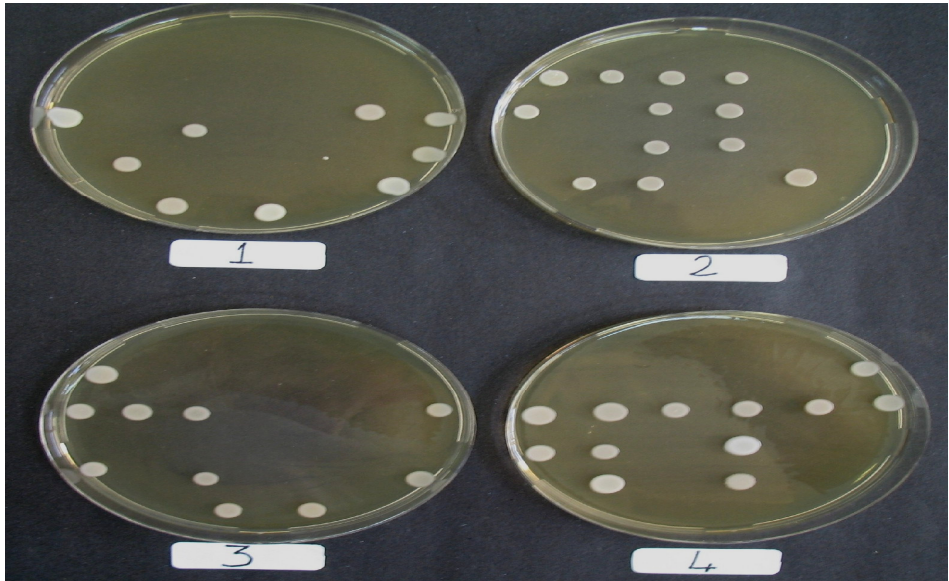
Şekil 4.14. Sellobioz içeren N- Base Agarda 27 °C'de kolonilerin 2 günlük görünümü



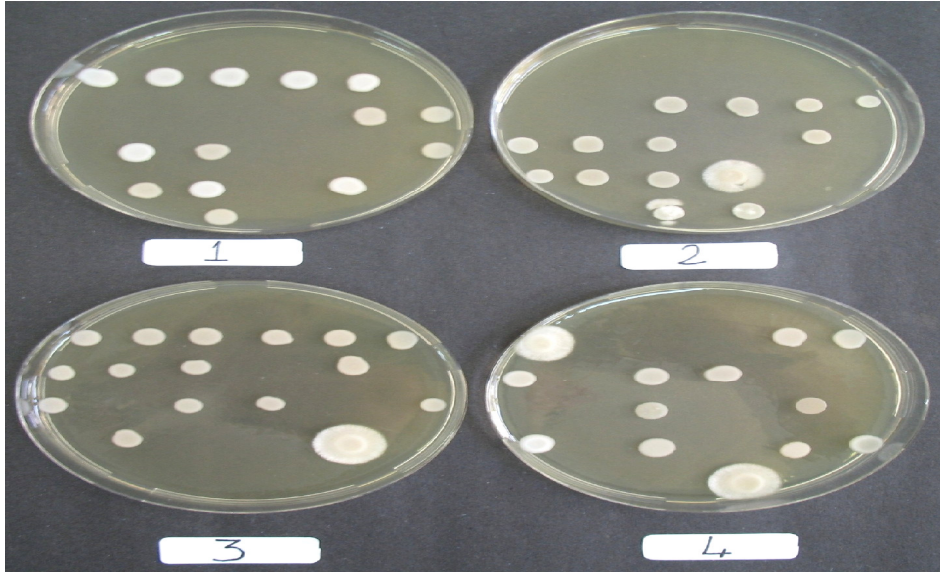
Şekil 4.15. Trehaloz içeren N- Base Agarda 27 °C'de kolonilerin 2 günlük görünümü



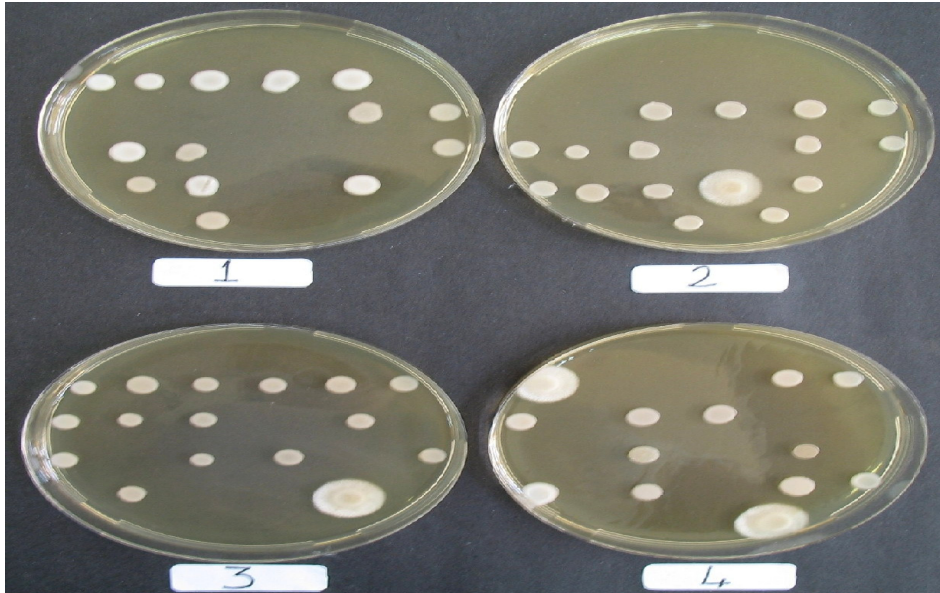
Şekil 4.16. Galaktoz içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



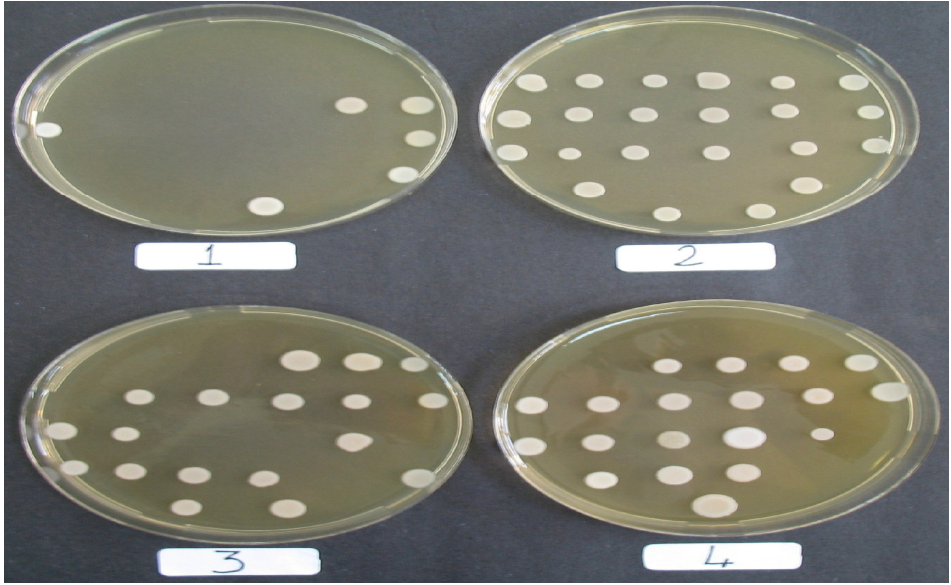
Şekil 4.17. Eritritol içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



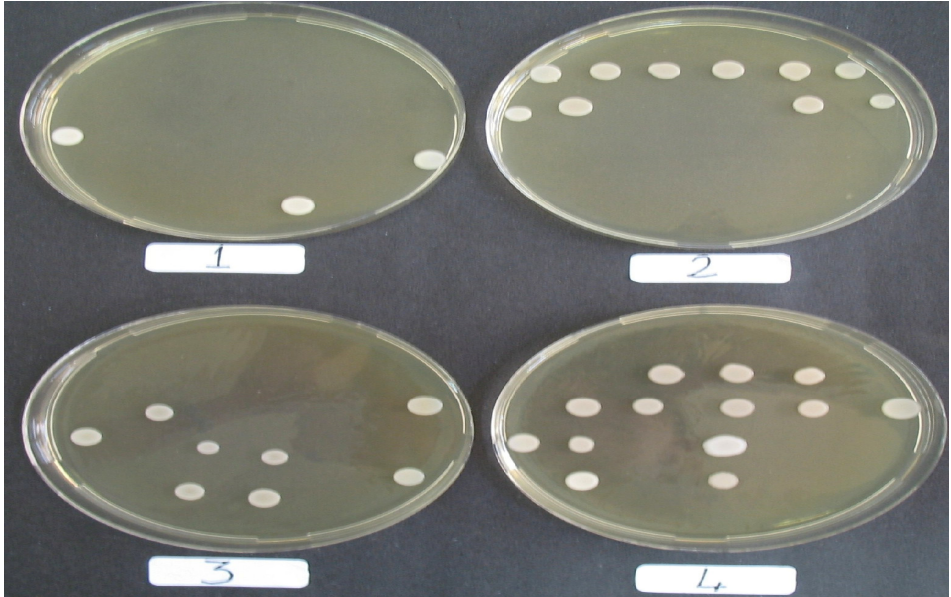
Şekil 4.18. %0,1 Sikloheksimid içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



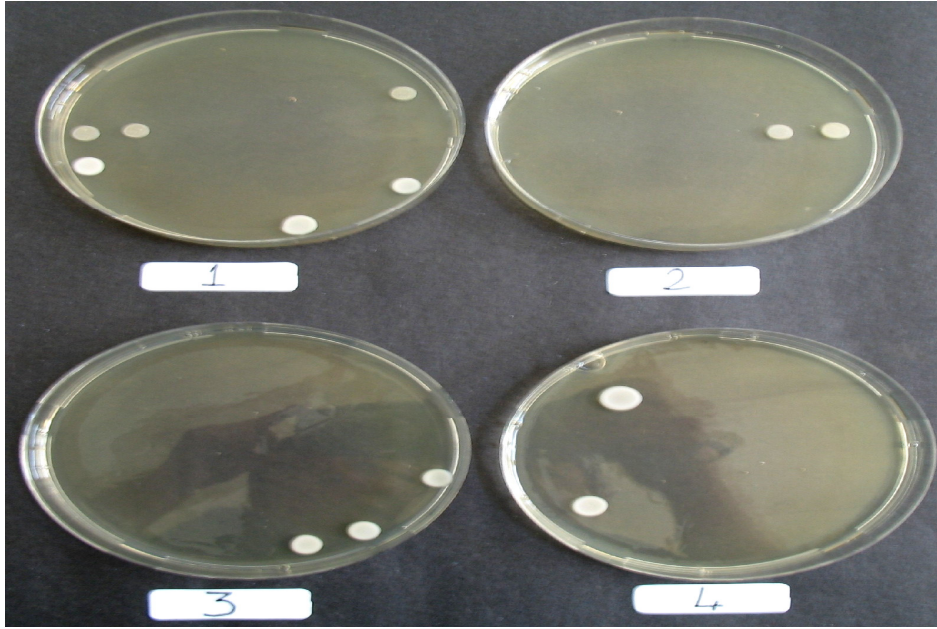
Şekil 4.19. %0,01 Sikloheksimid içeren N- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



Şekil 4.20. %10 NaCl içeren Yeast Ekstrakt Agarda 27 °C'de kolonilerin 7 günlük görünümü



Şekil 4.21. %16 NaCl içeren Yeast Ekstrakt Agarda 27 °C'de kolonilerin 7 günlük görünümü



Şekil 4.22. Nitrat içeren C- Base Agarda 27 °C’de kolonilerin 2 günlük görünümü

4.7. İzolatların Tribütirin Agarda Büyüme Boyunca Oluşan Ekstraselüler Lipaz Aktivitesi

Toplam 92 maya izolatu Tribütirinli Agara ekilmiş ve 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerdeki aktiviteleri ölçülmüştür (Brockhoff and Jensen, 1974; Sztajer et al., 1988., Rapp and Backhaus, 1992).. İzolatların büyüme boyunca oluşan lipaz aktivitesi çizelge 4.10’de verilmiştir.

Çizelge 4.10. İzolatların Tribütirin Agarda Büyüme Esnasında Oluşan Lipaz Aktivitesi (mm açık zon)

İzolat No	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat
1	-	-	1	1,5	1,5
2	-	-	0,75	1	1
3	-	-	1	1	1
4	-	-	0,75	0,75	1
5	-	-	1	1,5	2
6	-	-	0,5	0,75	1
7	-	-	0,75	1	1
8	-	-	0,75	1	1
9	-	-	0,75	1	1
10	-	-	0,75	1	1
11	-	-	0,5	0,75	1
12	-	-	0,75	0,75	1
13	-	-	-	0,5	0,5
14	-	-	-	0,5	0,5
15	-	-	0,75	1	1
16	-	-	0,5	0,75	1
17	-	-	1	1,5	2
18	-	-	0,5	0,75	1
19	-	-	0,75	0,75	1
20	-	-	0,5	0,75	1
21	-	-	-	0,75	1
22	-	-	-	0,75	1
23	-	-	-	0,75	1
24	-	-	0,75	1	1
25	-	-	0,75	1	1
26	-	-	0,75	1	1
27	-	-	0,5	0,75	1
28	-	-	0,5	0,75	1
29	-	-	1	1,5	2
30	-	-	1	1,5	2
31	-	-	0,75	1	1
32	-	-	1	1,5	2

Çizelge 4.10. (devam)

İzolasyon No	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat
33	-	-	0,5	1	1,5
34	-	-	-	0,5	0,5
35	-	-	0,5	0,75	1
36	-	-	0,75	0,75	1
37	-	-	0,5	0,75	1
38	-	-	0,5	0,75	1
39	-	-	0,5	0,75	1
40	-	-	-	-	-
41	-	-	0,5	0,75	1
42	-	-	0,75	1	1
43	-	-	0,75	1	1
44	-	-	-	0,5	0,5
45	-	-	-	0,5	0,5
46	-	-	0,5	0,75	1
47	-	-	0,5	0,75	1
48	-	-	-	-	-
49	-	-	0,5	0,75	1
50	-	-	0,5	0,75	1
51	-	-	0,75	1	1,5
52	-	-	0,5	1	1
53	-	-	0,5	0,75	1
54	-	-	0,75	1	1,5
55	-	-	0,75	1	1,5
56	-	-	0,5	0,75	1
57	-	-	0,5	1	1,5
58	-	-	0,5	1	1,5
59	-	-	0,5	0,75	1
60	-	-	0,5	0,75	1
61	-	-	0,5	0,75	1
62	-	-	0,5	0,75	1
63	-	-	0,5	0,75	1
64	-	-	0,5	0,75	1
65	-	-	0,5	0,75	1
66	-	-	0,5	0,75	1

Çizelge 4.10. (devam)

İzolat No	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat
67	-	-	-	0,5	0,5
68	-	-	0,5	0,75	1
69	-	-	0,75	1	1
70	-	-	0,75	1	1,5
71	-	-	-	-	-
72	-	-	0,5	0,75	1
73	-	-	0,5	0,75	1
74	-	-	1,0	1,5	2
75	-	-	-	-	-
76	-	-	1	1,5	2
77	-	-	0,75	1	1,5
78	-	-	1	1,5	2
79	-	-	0,5	0,75	1
80	-	-	1	1,5	2
81	-	-	1	1,5	2
82	-	-	0,5	0,75	1
83	-	-	0,5	0,75	1
84	-	1	2	2,5	3
85	-	1	2	2,5	3,5
86	-	1	2	2,5	3,5
87	-	1,5	2	3	3,5
88	-	1	2	2,5	3
89	-	1,5	2,5	3	3,5
90	1	2	2,5	3	3,5
91	1	2	2,5	3	3,3
92	1	2	2,5	3	3,5

-: Negatif

4.8. İzolatların Ekstraselüler Proteaz Aktivitesi

Toplam 92 maya izolatu kazein içeren YPG Agara ekilmiş ve 27 °C’de inkübasyona bırakılan petrilerdeki açılma zonları ile mayaların proteolitik aktiviteleri belirlenmiştir (Ahearn et al.,1968; Tempel and Jakobsen, 2000; Strauss et al.,2001; Buzzini and Martini, 2002; Gonzales et al.,2004). İzolatların büyüme boyunca oluşan ekstraselüler proteaz aktivitesi çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. İzolatların Kazein İçeren YPG Agarda Büyüme Esnasında Oluşan Proteolitik Aktivitesi

İzolat No	24 saat	İzolat No	24 saat
1	2	47	-
2	2	48	0,5
3	3	49	-
4	2	50	2
5	2	51	-
6	2	52	-
7	2	53	-
8	3	54	2,5
9	1	55	2,5
10	1	56	3
11	2	57	2,5
12	1	58	2,5
13	1	59	-
14	1	60	3
15	1	61	2
16	1	62	1
17	2	63	1
18	1	64	2
19	1	65	1

Çizelge 4.11. (devam)

İzolat No	24 saat	İzolat No	24 saat
20	1	66	1
21	2	67	2
22	1	68	2,5
23	3	69	2,5
24	3	70	1
25	2,5	71	1
26	2,5	72	-
27	1	73	1,5
28	1,5	74	1
29	1	75	-
30	2	76	1
31	1	77	5
32	1	78	2
33	1	79	1
34	1	80	-
35	-	81	1
36	-	82	2
37	1	83	2
38	1	84	2
39	1	85	1
40	-	86	2
41	1	87	1
42	1	88	1
43	2	89	2
44	3,5	90	2,5
45	3	91	2
46	-	92	1

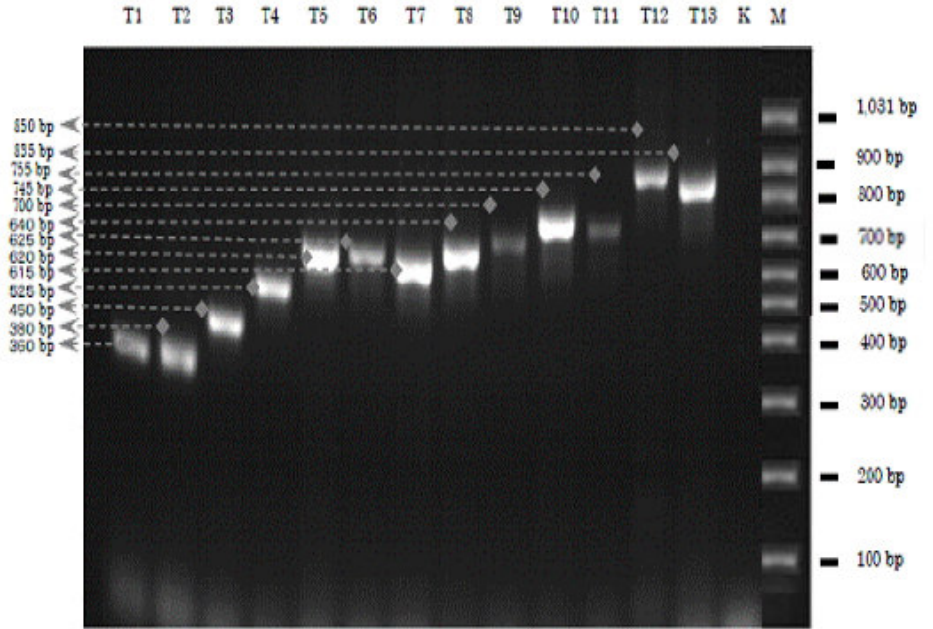
-: Negatif

4.9. DNA İzolasyonu

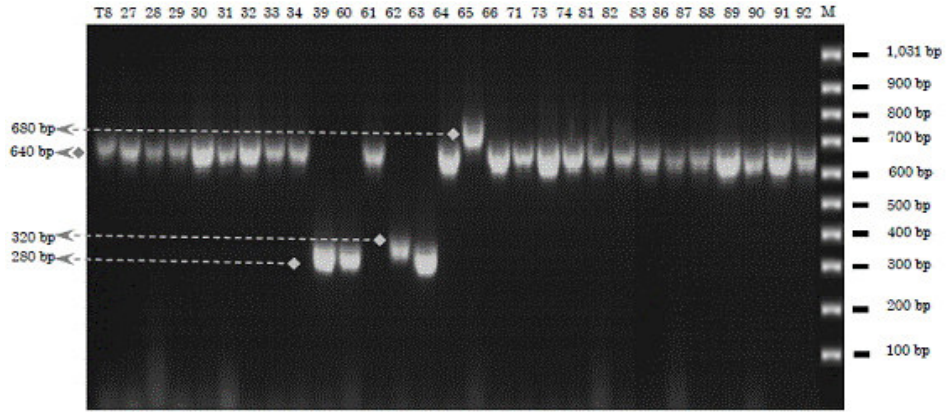
Fenotipik karakterizasyonu yapılan 92 izolattan *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* olarak tanılanan izolatların Petersen ve ark.'na (2001) göre genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri mini jel elektroforezinde kontrol edilmiş ve elektroforez sonucunda bütün izolatlardan yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant elde edildiği gözlenmiştir.

4.10. ITS PCR

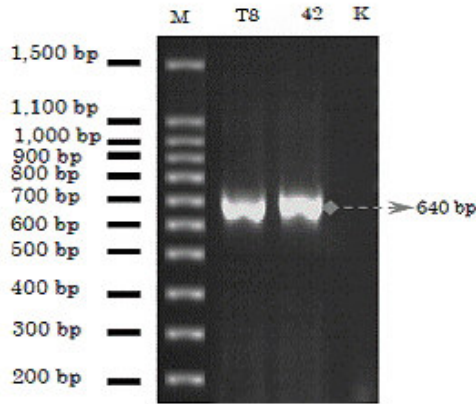
DNA'ları izole edilen *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* olarak tanılanan izolatlar ve standart türler (*Yarrowia lipolytica* CBS 6124, *D. hansenii* NRRL-Y-7624), ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile 5,8 S rRNA genlerini ifade eden ITS dizilerinin restriksiyon analizi ile karşılaştırılarak genotipik olarak tanılanmıştır. Fenotipik olarak *Y. lipolytica* olarak tanılanan 16 izolatın 15'i ITS PCR ile *Y. lipolytica* , *D. hansenii* olarak tanılanan 30 izolatın 25'i ITS PCR ile *D. hansenii* olarak tanılanmıştır. ITS PCR'a göre 15 *Y. lipolytica* straini ve 25 *D. hansenii* straini sırayla 360bp ve 640bp uzunluğunda tek bir bant oluşturmuşlardır. *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* olarak tanılanan izolatların bant uzunlukları UVI Image analiz sistemi kullanılarak yapılmıştır. 46 izolata ve *Y. lipolytica* CBS 6124 ve *D. hansenii* NRRL-Y-7624'e ait elektroforez sonuçları Şekil 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27'de görülmektedir. ITS PCR sonuçlarına göre *Y. lipolytica* ve *D. hansenii* olarak tanılanan izolatlar çizelge 4.11 'de gösterilmiştir.



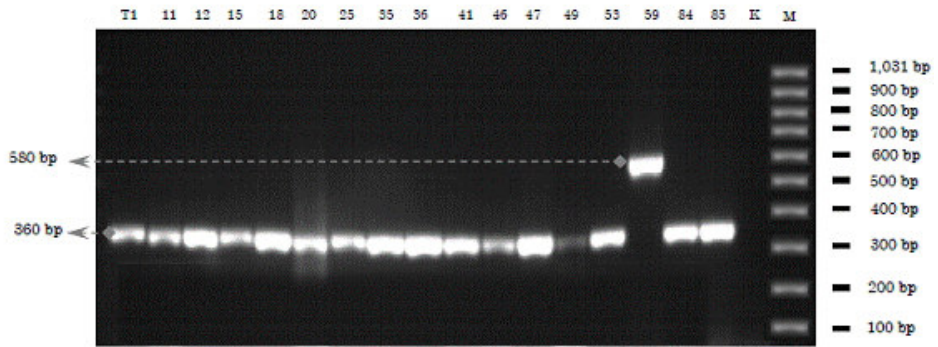
Şekil 4.23. Tip türlerin elektroforez sonuçları : T1; *Yaarrowia lipolytica* CBS 6124, T2; *Pichia pastoris* , T3; *Candida sake* NRLL-Y-1622 , T4; *Candida tropicalis*, T5; *Pichia quilliermondii* NRLL-Y-2075, T6 ; *Candida zeylanoides* NRRL-Y-1774, T7; *Pichia anamola* NRRL-Y-366, T8; *Debaryomyces hansenii* NRRL-Y-7624, T9; *Pichia farinosa* NRRL-Y-7553, T10; *Kluyveromyces maxianus* NRRL-Y-1109, T11; *Candida boidinii* NRRL-Y-2332, T12; *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-12632, T13; *Torulaspora delbrüeckii* NRRL-Y-866, M; Marker (O' Gene Ruler 100bp DNA)



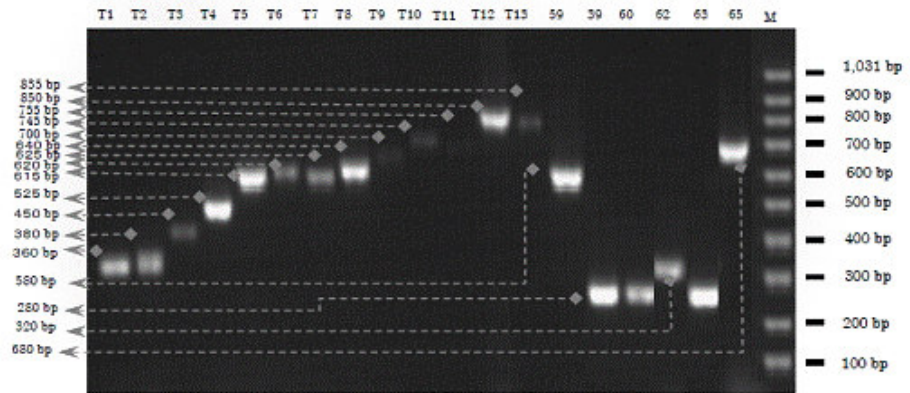
Şekil 4.24. Tip tür *Debaryomyces hansenii* ve fenotipik olarak *D. hansenii* olarak tanılanan izolatların elektroforez sonuçları : M; Marker (O' Gene Ruler 100bp DNA) T8; *D. hansenii* NRRL-Y-7624, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 39, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 73, 74, 81, 82, 83, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93; fenotipik olarak *D.hansenii* olarak tanılanan izolatlar



Şekil 4.25. Fenotipik olarak *D. hansenii* olarak tanılanan 42 nolu izolatın elektroforez sonucu : M; Marker (O' Range Ruler 100bp DNA) , T8; *D. hansenii* NRRL-Y-7624



Şekil 4.26. Tip tür *Yarrowia lipolytica* ve fenotipik olarak *Y. lipolytica* olarak tanılanan izolatların elektroforez sonuçları : M, Marker (O' Gene Ruler 100bp DNA), T1; *Y. lipolytica* CBS 6124, 11, 12, 15, 18, 20, 25, 35, 36, 41, 46, 47, 49, 53, 59, 84, 85; fenotipik olarak *Y. lipolytica* olarak tanılanan izolatlar



Şekil 4.27. Fenotipik olarak *D.hansenii* ve *Y.lipolytica* olarak tanılanan fakat elektroforez sonucunda bu organizmalar çıkmayan izolatların tip türlerle birlikte elektroforez sonuçları : M, Marker (O' Gene Ruler 100bp DNA), T1; *Yaarrowia lipolytica* CBS 6124, T2; *Pichia pastoris*, T3; *Candida sake* NRRL-Y-1622 , T4; *Candida tropicalis*, T5; *Pichia anamola* NRRL-Y-366, T6 ; *Candida zeylanoides* NRRL-Y-1774, T7; *Pichia quilliermondii* NRRL-Y-2075, T8; *Debaryomyces hansenii* NRRL-Y-7624, T9; *Pichia farinosa* NRRL-Y-7553, T10; *Kluyveromyces maxianus* NRRL-Y- 1109, T11; *Candida boidinii* NRRL-Y-2332, T12; *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-12632, T13; *Torulaspora delbrückii* NRRL-Y-866, 59; fenotipik olarak *Y. lipolytica* olarak tanılanan izolat, 39,60,62,63,65; fenotipik olarak *D.hansenii* olarak tanılanan izolatlar

Çizelge 4.12. ITS PCR Sonuçlarına Göre *Y.lipolytica* ve *D. hansenii* Olarak Tanılanan İzolatlar

Örnek No	İzolat No	<i>D. hansenii</i>	Örnek No	İzolat No	<i>Y. lipolytica</i>
8	27	+	4	11	+
8	28	+	4	12	+
8	29	+	5	15	+
9	30	+	6	18	+
9	31	+	6	20	+
9	32	+	7	25	+
9	33	+	10	35	+
9	34	+	10	36	+
10	39	-	11	41	+
11	42	+	12	46	+
16	60	-	13	47	+
17	61	+	14	49	+
17	62	-	14	53	+
17	63	-	16	59	-
17	64	+	22	84	+
18	65	-	22	85	+
18	66	+			
19	71	+			
19	73	+			
19	74	+			
21	81	+			
21	82	+			
21	83	+			
22	86	+			
23	87	+			
23	88	+			
23	89	+			
24	90	+			
24	91	+			
24	92	+			

5. TARTIŞMA

Son yıllarda gıda endüstrisinde mayaların neden olduğu bozulmalar ciddi bir problem halini almıştır. Büyük hacimlerde üretim yapıldığında eğer ham madde önemli bir ekonomik değere sahipse bozulma gıda endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bozulmayı engellemek için yeterli stratejilerin dizayn edilmesinde, kontaminasyon kaynağını bilmek ve üründe bozulmaya neden olan mayalar arasındaki benzerliği bilmek oldukça avantajlıdır (Couto et al., 1994 ; Loureiro , 2000).

Mayaların sebep olduğu bozulmaların kontrolü için gıdalardaki toplam canlı maya popülasyonunun sayımı ve aranmasında etkili tekniklerin kullanılması zorunludur. Farklı tipteki gıdalarda predominant olan türlerinde mutlaka tanınması gerekmektedir. Ayrıca proses ve kalite kontrolü kontamine maya strainleri ile üretime karışmış olan maya strainlerinin hızlı ve doğru tanınmasını istemektedir (Couto et al.,1994, Deak, 1995).

Yapılan bu araştırmada farklı beyaz peynir örnekleri toplanmış ve bu örneklerden maya izolasyonu yapılmıştır. Araştırmacılar süt ve süt ürünlerinde bozulmaya neden olan mayaların izolasyonunda tripton glukoz yeast ekstrakt kloramfenikol agar (TGYCA) kullanmışlardır (Deak et al.,1998; Beuchat et al.,2001;). Bizim araştırmamızda da başlangıçta peynirlerde bozulmaya neden olan mayaların izolasyonu için TGYCA, dikloran rose bengal kloramfenikol agar (DRBC), Ph 3,5 olan asidik potato dekstroza agar (APDA) ve kloramfenikol içeren plate count

agar (PCAC) kullanılmış ancak TGYCA dışındaki besiyerlerinde mayalarla birlikte küflerde ürediği için daha sonraki çalışmalarda izolasyon besiyeri olarak TGYCA kullanılmıştır. İzolasyon sırasında küflerin elimine edilmesi için % 0,01 oranında sikloheksimid kullanımı Van Uden ve Do Carmo Sausa (1957, 1962); Fell ve ark. (1960); Ross ve Morris (1965) ve Buckley ve ark. (1968) tarafından önerilmektedir (Martin, 1950; Beach and Davenport, 1971; Jarwis and Williams, 1987). Ancak bütün maya türlerinin izolasyonunda sikloheksimidin etkili olmadığı, bazı mayaların ise sikloheksimid varlığında büyüyemediği bilindiğinden Barnett ve ark.'nın (1983,2000) mayaları tanılama tayin anahtarlarında, bu antibiyotiğin %0,01 ve %0,1 konsantrasyonlarında mayaların büyüüp büyüyemediğini saptayan testler içerilmektedir. Araştırmamızda amaç mümkün olduğu kadar çok peynirlerde bozulmaya neden olan maya türünün izolasyonu olduğu için sikloheksimid varlığında büyüyen mayaların elimine olacağı düşünülerek DRBC, APDA ve PCAC besiyerlerine bu antibiyotik ilave edilmemiştir. Çalışmalarımızda sadece mayaların ürediği TGYCA, izolasyon besiyeri olarak kullanılmıştır.

Çeşitli gıda kaynaklarından izole edilen mayaların tanılanmasında biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik karakterleri kapsayan konvansiyonel ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Maya izolatlarının fenotipik olarak genus ve tür düzeyinde tanılanması için kullanılabilecek çeşitli referanslar bulunmaktadır. Raper ve Thom (1949), Raper ve Fennell (1965), Wickerham (1951, 1952), Lodder ve Kreger-van Rij (1952), Wickerham ve Burton (1962), Alexopoulos (1962, 1979, 1996), Paff ve ark. (1966), Lodder (1970), Barnett ve ark. (1983,2000),

Kreger-van Rij (1984) ve Pitt ve Hocking (1985), genel olarak mikoloji alanında çalışmalar yapmış olan ve maya taksonomisiyle de ilgilenen araştırmacılarıdır. Alexopoulos (1962, 1979, 1996), özellikle fungus taksonomisi ile ilgili çalışmaları olan en önemli mikologlardan birisidir. Araştırmacı, “Introductory Mycology” adlı en son kitabında mayaları askomisetik, aseksüel askomisetik ve basidiomisetik mayalar olarak sınıflandırmıştır. Phaff ve ark. (1966) mayaları askosporogenik, ballistosporogenik, asporogenik ve maya benzeri organizmalar olmak üzere dört grupta incelerken, Beneke ve Stevenson (1987), *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* olarak iki grupta, Frazier ve Westhoff (1988), *Askosporogenous*, *Ballistosporogeneous* ve *Fungi Imperfecti* olarak üç grupta incelemişlerdir. Bazı araştırmacılar fungusları izolasyon kaynağına göre değerlendirerek tanılama yollarına gitmişlerdir. Örneğin Jarvis ve Williams (1987), Beneke ve Stevenson (1987) ve Frazier ve Westhoff (1988), daha çok gıda maddeleri ve içeceklerden izole edilen funguslar için çok kapsamlı olmayan bir tanılama anahtarı da vermiştir. Barnett ve ark. (1983,2000) tarafından izolasyon kaynağına göre tanılama anahtarlarının bulunduğu kitap, maya taksonomisi ile ilgili çalışmalar yapan araştırmacıların en çok başvurduğu referans haline gelmiştir.

Bu araştırmamızda, izole edilen mayaların genus ve tür düzeyinde fenotipik olarak tanılanmasında Barnett ve ark. (2000) tarafından önerilen tayin anahtarlarından yararlanılmıştır. Zira mayaların identifikasyonu konusunda en geniş ve detaylı tayin anahtarları bu araştırmacılar tarafından verilmiştir. Kreger-van Rij (1984) tarafından yazılmış olan “The Yeasts: A Taxonomic Study” adlı kitapta mayaların

izolasyonu, sınıflandırılması ve identifikasyonu ile ilgili bilgiler verilmiş olmasına rağmen bu sınıflandırmada genus ve türlerinin özellikleri ayrı ayrı tayin anahtarları ile verilmiştir. Araştırmamızda bazı genus ve türlerin tanılanmasında bu kaynağın yanı sıra Kurtzman ve arkadaşlarının hazırladığı tanılama prosedürlerinden de yararlanılmıştır.

Yapılan araştırmalarda peynirlerde bozulmaya neden olan maya genus ve türleri; *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *K. blattae*, *K. thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida rugosa*, *C. zeylanoides*, *C. sake*, *C. diddensiae*, *C. sphaerica*, *Torulaspora delbrückii*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporan beigelii*, *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia anamola*, *P. membranifaciens* ve *Sporobolomyces gutinis*'dir (Fleet,1990, Westall and Filtenborg,1998, Prillinger et al.,1999, Suzzi et al.,2001, Vasdinyei and Deak, 2003).Bazı beyaz peynir örneklerinde maya sayısının 10^7 - 10^8 olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir araştırmada Avrupa ve kuzey Amerikan peynirlerinin 12'sinden 5'inde maya sayısının 10^6 - 10^8 cfu/g olduğu bulunmuştur. Bu peynirlerde *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* türleri en sıklıkla izole edilmiştir. (Fleet,1990). Araştırmamızda 18 farklı beyaz peynir örneğinde maya sayısı 10^7 - 10^8 cfu/g olarak bulunmuş ve dominant olarak izole edilen türler ise *D. hansenii* ile *Y. lipolytica*'dır.

Barnett ve ark. (2000) izole edilen mayaların genus ve tür düzeyinde tanılanmasında 9 farklı tayin anahtarı oluşturmuşlardır. İzolasyon kaynağına göre mayaları; glukozu fermente edebilen mayalar, glukozu fermente edemeyen mayalar, oval, silindirik, konik veya

reniform askosporlara sahip askosporogenik mayalar, satürn, şapka şeklinde askosporlara sahip askosporogenik mayalar, iğne veya kamçı şeklinde askosporlara sahip askosporogenik mayalar, ballistokonidia oluşturan mayalar, basidiomisetik mayalar, pembe renkli koloni oluşturan mayalar ve metanolü kullanan mayalar olarak gruplandırmışlardır.. Mevcut olan son baskıda, bozulmaya neden olan mayalara yönelik belli bir tayin anahtarı olmadığı için 1 ve 2 numaralı tayin anahtarı kullanılmıştır (Barnett et al.,2000). Glukozu fermente edebilen ve edemeyen izolatlar bulunması sebebiyle iki farklı tayin anahtarından yararlanılmıştır. Glukozu fermente edemeyen 6, 7, 8, 11, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34,35, 36, 39, 41, 42, 46, 47, 48, 49, 52, 53, 55, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 73, 74, 75, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 numaralı izolatlar olup diğer izolatların glüköz fermentasyonu pozitifdir. Ökaryotik mikroorganizmalar üzerindeki detaylı moleküler biyolojik ve genetik yöntemlerle identifikasyon çalışmaları 90'lı yıllarda henüz yeni başladığı ve bütün türler için tam bir veri tabanları oluşturulmadığı için Barnett ve ark. (1983,2000) tarafından türlerin tanımlanmasında adı geçen moleküler biyolojik yöntemler hakkında detaylı bilgiler verilmemiş ve klasik yöntemlerin moleküler biyolojik yöntemlerle desteklenmesi gerektiği belirtilmiştir (Verachtert and De Mot, 1990, Kurtzman, 1990; Glick and Pasternak, 1994; Barnett et al.,2000; Boekhout et al.,2003). Araştırmamızda izole edilen maya suşlarının tanımlanması için genetik ve moleküler biyolojik yöntemden de yararlanılmış, izolatların morfolojik, fizyolojik ve kültürel özellikleri ile tanımlama sonucunda en sık bulunan *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* , internal

transcribed spacer (ITS) 5,8 S ribozomal DNA bölgesinin (ITS-PCR) PCR amplifikasyonu kullanılarak karakterize edilmiştir.

İzolatların sistematik olarak sınıflandırılmasında, Barnett ve ark. (2000) ile Alexopoulos ve ark.'nın (1996) hazırladığı sistematik kategorilerden faydalanılmıştır. Buna göre, Barnett ve arkadaşları, *Candida* genusunu *Saccharomycetales* ordosunun *Candidaceae* familyası altında incelerken, Alexopoulos ve arkadaşları ise *Saccharomycetales* ordosu altındaki *Saccharomycetaceae* familyası içerisinde incelemişlerdir (Alexopoulos et al.,1996; Barnett et al.,2000).

İzole edilen maya suşlarının fenotipik olarak tanılanmasındaki ilk adım mayaların morfolojik özelliklerinin incelenmesidir. Wickerham (1951,1970), Wickerham ve Burton (1962), Banwart (1981), *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Williopsis*, *Candida*, *Pichia* ve *Galactomyces* türlerinin Malt ekstrakt ve MYGP agar üzerinde krem rengi koloniler oluşturduğunu belirtmektedir. Hücrelerin tomurcuklanma özelliğinin, boyutlarının ve şekillerinin belirlenmesi için Van de Walt (1970), Barnett ve ark., (1983,2000) ve Kreger-van Rij (1984) benzer yöntemler vermiştir. Wickerham (1970), Banwart(1981), Barnett ve ark. (1983,2000), Kreger-van Rij (1984), Beneke ve Stevenson'a (1987) göre *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Williopsis*, *Candida*, *Pichia* genuslarının eşeysiz üremesi multilateral tomurcuklanma ile olmakta, hücreler de küresel, elips, ovoid, subgloboz veya silindirik şekilde tek, çift veya gruplar halinde bulunmaktadır. *Galactomyces* genusunda ise eşeysiz üreme fisyon bölünme ile gerçekleşmektedir. Hücrelerin pseudomisel oluşturma

özelliklerinin incelenmesi için Van der Walt (1970), Barnett ve ark.(1983,2000) ve Kreger-van Rij (1984), iki değişik yöntem önermiştir. Wickerham (1970), Banwart(1981), Barnett ve ark. (1983,2000), Kreger-van Rij (1984), Beneke ve Stevenson (1987) ve Frazier ve Westhoff'a (1998) göre *Galactomyces*, *Yarrowia*, *Torulaspora* ve *Candida* genuslarına ait türler pseudomisel oluşturmaktadır. Araştırmamızda da izole edilen maya suşları yukarıda belirtilen özelliklere uygunluk göstermiştir.

Wickerham ve Burton (1962), Van der Walt (1970), Barnett ve ark. (1983,2000), Kreger-van Rij (1984), Beneke ve Stevenson (1987), Cregg (1987) ve Kuirtzman'a (1990) göre *Yarrowia lipolytica*, *Williopsis californica*, *Pichia anamola*, *Torulaspora delbrüeckii*, *Kluyveromyces marxianus* oval, satürn, şapka şeklinde 1-4 askospor, *Debaryomyces hansenii* küresel 1-2 kadar askospor oluşturmaktadır. Askospor oluşumunun gözlenebilmesi için iki tip besiyeri tavsiye edilmektedir. Bu besiyerleri Gorodkova Agar ve Asetat Agardır (Barnett et al., 1983,2000; Kreger-van Rij, 1984). Araştırmamızda incelenen suşlarda askospor oluşumunun gözlenebilmesi için tavsiye edilen besiyerlerinden Asetat Agar denenmiştir. Asetat agarda *D. hansenii*, *K. marxianus*, *T. delbrüeckii*, *Pichia anamola* askospor oluşturmuşlardır. Ancak diğer türlerin bu besiyerinde askospor oluşumu gözlenemeyince izole edilen suşların heterotallik olabileceği yani iki eşem tipinin bulunduğu ve eşleşmenin bu iki zıt eşem tipi arasında gerçekleştiği düşünülerek farklı eşem tipinin de izole edilmiş olabileceği ihtimaliyle suşlar kendi aralarında çaprazlanıp yeniden Asetat agara ekilmiştir. Ancak bu işleminden de sonuç alınamamıştır. Bu durumda askospor oluşumu

gözlenmeyen suşların tümünün ayrı bir eşem tipinde heterotallik suşlar olduğu düşünülmüştür.

Mayaların tanılanmasında morfolojik testlerden sonraki basamak, hücrelerin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin test edilmesidir. Karbon ve azot kaynaklarının asimilasyonunu belirlemede kullanılan en yaygın yöntemler, tüplerde sıvı besiyeri kullanımı, agarlı besiyerinde oksonogram ve replika plate yöntemidir (Verachtert and De Mot 1990; Boekhout et al.,1996; Barnett et al.,1983, 2000). Literatürde *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Galactomyces* ve *Williopsis* genuslarına ait türlerin şekerleri fermente etmesinin ve karbon kaynakları asimilasyonu özelliklerinin türlere göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir. *Debaryomyces*, *Pichia* ve *Galactomyces* genusları genel olarak şekerleri zayıf bir şekilde fermente ederken *Y. lipolytica*'nın fermentasyon yapmadığı, *P. anamola*'nın sadece D-glukozu fermente ettiği, *D. hansenii*'nin D-glukozu ve diğer şekerleri fermente etme özelliklerinin değişik olduğu belirtilmiştir (Wickerham, 1970, Kreger-van Rij, 1884; Barnett et al.,1983,2000). İncelenen suşların fermentasyon özelliğinin ve karbon kaynaklarının asimilasyonu testlerinin sonuçları literatürde belirtilen (Barnett et al.,1983,2000) sonuçlarla uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

Literatürde *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Galactomyces* ve *Williopsis* genuslarına ait türlerin, azot kaynaklarının asimilasyonu türlere göre değişiklik göstermektedirler. *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus*, *T. delbrückii*, *P. quilliermondii*, *C. sake* nitrati asimile kullanamazken, *P.*

anamola, *W. californica* ve *C. versatilis* nitrati, nitriti, L-lisini ve etilamini asimile etmektedirler. Yapılan çalışmada incelenen suşların azot kaynakları asimilasyonu test sonuçları literatürde belirtilen (Barnett et al.,1983,2000) sonuçlarla uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

Tanılama testleri arasında bulunan sikloheksimid’de büyüme testinde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları %0,01 ve %0,1 olmasının nedeni, mayaların çok düşük sikloheksimid konsantrasyonlarına adapte olabilmeleridir. Bu antibiyotiğe dirençli olan mayaların modifiye edilmiş 80S ribozomlara sahip olduğu, dolayısıyla bu bölgelerde protein sentezini engelleyen bu antibiyotikten etkilenmedikleri düşünülmektedir (Barnett et al.,1983,2000). *Y. lipolytica*, *K. marxianus*, *P. quilliermondii*, *C. zeylanoides* , *C. versatilis* ve *D. hansenii*’nin bazı izolatlarının bu antibiyotik %0,01 ve %0,1 konsantrasyonlarına dirençli olduğu, *W. californica*, *T. delbrückii*, *P. anamola*, *C. sake* , *C. diddensiae* ise sikloheksimidin bu konsantrasyonlarına dirençsiz olduğu belirtilmesine rağmen *C. diddensiae* olarak tanılanan 52 numaralı izolatın sikloheksimidin %0,01 ve %0,1 konsantrasyonlarına dirençli olduğu bulunmuştur. İncelenen diğer suşlar sikloheksimid varlığında büyüme testinde tip türler ile benzer özellik göstermişlerdir.

Maya türlerinin bir çoğunun, yüksek D-glukoz konsantrasyonlarında büyüebildiği belirtilmektedir (Van der Walt, 1970). Barnett ve ark.’na göre (2000), *D. hansenii*, *W. californica*, *T. delbrückii*, *P. anamola*, *P. quilliermondii*, *C. zeylanoides*, *C. versatilis*, *C. sake* ve *C. diddensiae* %50 ve %60 glukozlu ortamda byümekte, *Y.*

lipolytica, *K. marxianus* sadece %50 glukozlu ortamda büyüyebilme yeteneğine sahiptir. İncelenen suşlar tip türler ile benzer özellik göstermişlerdir.

Diazonyum Blue B (DBB) renk testi basidiomisetik mayaların askomisetik mayalardan ayırtedilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Basidiomisetik mayaların oluşturduğu koloniler DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk almakta, askomisetik mayalarda ise herhangi bir renk değişimi olmamaktadır. Askomisetik mayalar olan *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Galactomyces* ve *Williopsis* genusları DBB çözeltisi ile renk değiştirmemektedir. Bu test için iki farklı besiyeri önerilmektedir. Bunlar ya 10 günlük kültürün birkaç saat 55⁰ C’de tutulması (Barnet et al.,1983,2000) ya da 3 hafta 25⁰ C’de inkübe edilen kültüre DBB çözeltisi eklenmesi ya da inkübasyonun 5-7 güne indirilip daha sonra kültürün 16 saat boyunca 55-60C’de tutularak kültürün üzerine DBB çözeltisi eklenmesi önerilmektedir (Van-der Walt,1970, Lodder 1970). Araştırmamızda MYGP agar kullanılarak, 10 günlük kültüre DBB çözeltisi eklenerek test gerçekleştirilmiştir. İncelenen bütün suşlar askomisetik maya olduğundan DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk almamıştır.

Genellikle mayaların büyümesi için gerekli sıcaklık oranları 0⁰C’nin biraz aşağısından 40⁰C’nin birkaç derece üstüne kadar çıkabilmektedir. Genel olarak mayaların çoğu mesofiliktir ve optimum büyüme sıcaklığı 25-30⁰C ‘dir Bununla birlikte psikrotrofik mayalar optimum olarak 20⁰C’nin altında büyüebilmektedirler. Çok az bir maya türü 45-47⁰C’nin üstünde büyüebilmektedir. Örneğin, *K. marxianus*’un

maksimum büyüdüğü sıcaklık derecesi 46, *P. quilliermondii*'nin ise 41⁰C'dir. (Deak,2006). Araştırmamızda *K. marxianus* olarak tanıladığımız 45 nolu izolatin ve *P. quilliermondii* olarak tanılanan 43, 44 numaralı izolatların 42⁰ C'de büyüebildiği bulunmuştur. Literatürde *D. hansenii*'nin 25 ,30⁰ C'lerde büyüebildiği, 35, 37 ⁰ C'lerde bazı türlerin büyüyüp bazılarının büyüyemediği, 40, 42, 45⁰ C'lerde ise büyüyemediği, *Y. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. versatilis*, *W. californica* ve *K. marxianus*'un 25, 30, 35⁰ C'lerde büyüebildiği, 37, 40, 42, 45⁰ C'lerde büyüyemediği belirtilmiştir. *T. delbrückii*, *P. anamola*'nın 25, 30, 35, 37⁰C'lerde büyüyüp, 40,42 ve 45⁰C'lerde büyüyemediği, *P.quilliermondii*'nin ise 25, 30, 35, 37, 40⁰ C'lerde büyüebildiği 42, 45⁰ C'lerde ise büyüyemediği belirtilmiştir (Barnett et al., 2000). Araştırmamızda incelenen suşlardan *P. quilliermondii* olarak tanılanan 43, 44 numaralı izolatların 42⁰ C'de, *C. versatilis* olarak tanılanan 37, 38 numaralı izolatların 37 ve 40⁰ C'de, *C. zeylanoides* olarak tanılanan 40 numaralı izolatin ise 37⁰ C'de büyüebildiği bulunmuştur. Belirtilen izolatlar dışındaki izolatlar literatüre uygunluk göstermiştir.

Araştırma sonucunda, fenotipik tanılamaya göre, izole edilen 92 maya suşunun 30 adeti *Debaryomyces hansenii*, 17 adeti *Kluyveromyces marxianus*, 16 adeti *Yarrowia lipolytica*, 6 adeti *Pichia anamola*, 6 adeti *Torulaspora delbrückii*, 4 adeti *Pichia quilliermondii* , 3 adeti *Galactomyces geotrichum*, 3 adeti *Williopsis californica*, 2 adeti *Candida sake*, 2 adeti *Candida versatilis* ve 1 adeti *Candida zeylanoides*, 1 adeti *Candida didensiae* ve 1 adeti de *Pichia jadinii* olarak tanılanmıştır. Mayaları tür seviyesinde fenotipik olarak tanılamak için yaklaşık 50-100 test yapılması gerekmekte ve final sonuca en az 4-5 haftada

ulaşılabilmektedir. Tanılamanın uzun zaman almasından dolayı bu tanılama yöntemleri gıda endüstrisinde rutin olarak kullanılmamaktadır. Bunun yerine son zamanlarda fermentasyon ve asimilasyon testlerinin bir kısmını içeren basitleştirilmiş tanılama metodları geliştirilmiştir. API ID 32C, API 20C, Vitek YBC (yeast biochemical card) gibi basitleştirilmiş sistemler, maya tanısında kullanılan klasik metodlara benzer yaklaşımlara dayanmaktadır. Tanılama sistemleri otamatikleştirildiğinde bile yanlış veya belirsiz tanılamaya götürebilmektedir (Latouche et al.,1997; Couto et al.,1994). Ayrıca bu sistemlerde tüm mayaların veri tabanları olmadığından daha çok klinik izolatların veri tabanları olduğundan dolayı biz çalışmamızda klasik yöntemleri kullanarak mayaları fenotipik olarak tanıladık.

Latouche ve ark.(1997) tarafından yapılan bir çalışmada klinik laboratuvarlardan ve farklı kültür koleksiyonlarından 32 klinik izolat ve 49 tip strain toplanmıştır. Tip strainler bir izolatın doğru tanılanması için standart olarak kullanılmıştır. İzolatların fenotipik tanılanmasında Vitek YBC ve API ID 32C kullanılmıştır. Bu metodların ikisi de karbonhidrat asimilasyonuna dayanmaktadır. İzolatların genotipik tanılanmasında PCR fingerprint kullanılmıştır. Vitek YBC ile doğru tanılama oranı %87,3, API ID 32C ile %76,8'dir. Bütün izolatlar PCR fingerprint ile doğru olarak tanılanmıştır. Bu araştırmacılar biyokimyasal profillerin test koşullarındaki çok küçük değişimlerden dolayı değişiklik gösterebildiğinden dolayı bu metodların morfolojik testler kullanılarak daha doğru olabileceğini belirtmişlerdir .

Arias ve ark.(2002) tarafından yapılan bir çalışmada portakal suyundan izole edilen mayalar 5 farklı yöntem kullanılarak tanılanmıştır. Tip strainlerde dahil toplam 99 strain 26S rRNA genlerinin dizi analizi, 5,8S-ITS-PCR, klasik tanılama yöntemi, RapID Yeast Plus sistem ve API 20C yöntemleri kullanılarak tanılanmıştır. Doğru identifikasyona göre en iyi sonucu 26S rRNA genlerinin dizi analizi vermiştir. Bunu ITS-PCR ve klasik yöntem izlemiştir. RapID Yeast Plus sistem ile izolatların %35'i doğru olarak tanılanırken, API 20C ile %13'ü doğru tanılanmıştır. Konvansiyonel yöntemler 60-90 testi içerirken, API 20C toplam 19 asimilasyon testini içermektedir. Son zamanlarda geliştirilen RapID Yeast Plus Sistem tanılama kiti ile 4 saatte identifikasyon yapılabilmektedir. Bu yöntem mikroorganizmaların fizyolojik özelliklerine dayanılarak geliştirilmiştir. Fakat bütün identifikasyon testleri klinik teşhisler için dizayn edilmiştir ve uygulaması çok az bir maya türü için sınırlıdır.

Peynirlerde raf ömrünü azaltan, duyu kaliteyi bozan faktörler ; gaz oluşumu, proteolizis sonucu acı tat oluşması , lipolizis sonucu serbest yağ asitleri miktarının artmasıdır. *D. hansenii*'nin yüksek konsantrasyonu güçlü bir maya kokusuna sebep olurken, *Y. lipolytica* yağ degradasyonu sonucu olarak peynirlerde istenmeyen tekstüre sebep olmaktadır. Araştırmamızda %2 kazein içeren yeast pepton glukoz agarda mayaların proteaz aktivitesine bakılmıştır. 35, 36, 40, 46, 47, 49, 51, 52, 53, 59, 72, 75 ve 80 numaralı izolatlar proteaz aktivitesi göstermezken *P. quilliermondii* olarak tanılanan 44 nolu izolat ile *K. marxianus* olarak tanılanan 45 nolu izolatlar 3,5 ve 3 cm zon çapıyla en yüksek proteaz aktivitesi göstermişlerdir. İzolatların tribütirin agarda büyüme boyunca

oluşan ekstrasellüler lipaz aktivitesi de ölçülmüştür. 40, 48, 71 ve 75 nolu izolatlar lipaz aktivitesi göstermezken *D. hansenii* olarak tanılanan 86, 87, 88, 89, 90, 91 ve 92 numaralı izolatlar 120. saatte 3-3,5 cm zon çapıyla en yüksek lipaz aktivitesi göstermişlerdir. *D.hansenii* bütün peynir çeşitlerinde en sık rastlanan bir türdür. *D.hansenii*'nin yüksek NaCl konsantrasyonundan en az etkilenen tür olduğu bilinmektedir. Bunların yanı sıra, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia guilliermondi* ve *Candida parapsilosis* gibi düşük su aktiviteli çeşitli besinlerde kontaminant bir tür olarak bilinmektedir (Prista et al., 2005; Breuer and Harms, 2006;). Araştırmamızda *D. hansenii* tuza daha dayanıklı olduğundan *Y. lipolytica*'ya göre peynirlerde daha fazla bulunmuştur. Fenotipik olarak izolatların %32,6'sı *D. hansenii*, % 17,4'ü *Y. lipolytica* olarak tanılanmıştır.

Bireyler ait oldukları türün genetik yapısını temel olarak taşımakla birlikte, kalıtsal moleküllerindeki gen kapsamına giren ya da girmeyen nükleotid dizileri bakımından çeşitlilik gösterirler. Bu nedenle bir türü oluşturan bireylerin her birinin kendine özgü bir genetik yapısı vardır. Genetik tiplendirme bir organizmanın genotip yapısına ait özelliklerin çeşitli yöntemlerle belirlenmesidir. Buna göre genetik tiplendirme, bir türün üyeleri arasındaki genetik çeşitliliğin ölçümünü sağlar. Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların tiplendirmesi ve tanılanması için çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiştir. Bunlar pulsed field jel elektroforez, DNA dizi analizi, PCR-fingerprint, RAPD PCR ve RFLP PCR'dır. Bu tekniklerin bazıları çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen mayaların karakterizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen çoğu yöntem endüstride rutin uygulama için çok zor ve oldukça fazla tecrübe

gerektirmektedir. Son yıllarda ribozomal RNA genlerini hedefleyen PCR'a dayalı teknikler kullanılmaya başlandı. Bu tekniklerden 5,8S rRNA genlerini ifade eden ITS dizilerinin restriksiyon analizi hem izolatların tiplendirmesinde hem de türlerin tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Deak et al.,2000). ITS bölgelerini kodlamayan ve ribozomal RNA genlerini (5S, 5,8S, 18S ve 28S) kodlayan DNA'nın restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi analizine dayanan bu yöntemin bir çok fungus türünün aranmasında oldukça kullanışlı olduğu belirtilmiştir (Fernandez-Espinar et al.,2000). Ökaryotik organizmalarda ribozomal DNA operonu 18S, 5,8S, 28S ve 5S genlerinden oluşmaktadır. rDNA operonundaki transkripsiyonel birimler 18S, 5,8S ve 28S'dir. Burada genler arası transkript aralığı (ITS) adını alan diziler 18S ile 5,8S arasında (ITS1) ve 28S ile 5,8S arasında (ITS2) adını alır. Bu bölgeler rRNA'ya çevrilmemektedir. rRNA genleri oldukça korunmuş olmasına rağmen ITS bölgeleri türler arasında dengeli bir çeşitlilik göstermektedir. ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanılmasıyla fungusların 5,8S rDNA bölgesi ile ITS1 ve ITS2 bölgeleri amplifiye olmaktadır (Fujita et al.,2001). Araştırmamızda fenotipik olarak *Y. lipolytica* ve *D. hansenii* olarak tanımlanan izolatların moleküler identifikasyonu için ITS-PCR tekniği kullanılmıştır. Çalışmamızda ITS-PCR'ı tercih etmemizin nedeni, *Y. lipolytica*'nın ITS bölgesi 360bp, *D. hansenii*'nin 640bp olması ve bu iki organizmanın bp uzunluklarının birbirine çok yakın olmamasıdır. Ayrıca bu yöntemin rutin identifikasyon için oldukça hızlı ve kullanışlı bir yöntem olmasıdır. Bu amaçla 46 izolat , *D. hansenii* NRRL-Y 7624 ve *Y. lipolytica* CBS 6124 ' e ait genomik DNA'lar, ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile 5,8 S rRNA genlerini ifade eden ITS dizilerinin restriksiyon

analizi ile karşılaştırılarak tanılanmıştır. ITS-PCR'a göre fenotipik olarak *D. hansenii* olarak tanılanan 30 izolatın 25'i literatürde belirtilen 640bp'lik karakteristik bantı oluştururken, fenotipik olarak *Y. lipolytica* olarak tanılanan 16 izolatın 15'i 360bp'lik bant oluşturmuşlardır.

Amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutları bazı türlerde hemen hemen aynı olabilmektedir. Örneğin , *C. parapsilosis* ve *C.tropicalis* 'de yaklaşık 520 bp. , *C. saitoana* ve *P. anamola*'da yaklaşık 614 bp.'dir. Fakat bu organizmaların ITS3 ve ITS4 primer çifti ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu, türe spesifik farklılıklar göstermiştir. Bunun tam tersi ITS3 ve ITS4 primerleri ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu *C.utilis* ve *Stephanoascus ciferri* için yaklaşık 356 bp. iken ITS1 ve ITS4 primerleri ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu yine türe spesifik farklılıklar oluşturmuştur (Fujita et al.,2001). Dolayısıyla, moleküler biyolojik tekniklerin, konvansiyonel tanılama teknikleri ile desteklenmesi gerekmektedir (Acheampong, 2000).

Caggia ve ark.(2001) tarafından yapılan bir çalışmada yoğurtlardan izole edilen *Pichia anamola* ITS bölgesinin RFLP analizi kullanılarak tanılanmıştır. Parakende satılan kabarık paketli yoğurt örneklerinde maya sayısı 10^7 'den daha fazla bulunmuştur. Seçilen 87 koloni fizyolojik ve morfolojik testlerle tanılanmıştır. Tanılanan türlerin çoğu *P.anamola* olarak, çok azı ise *S.cerevisiae* olarak bulunmuştur. İzole edilen suşların hiçbiri laktozu fermente edemezken hepsi galaktozu fermente etmişlerdir.Bu araştırmacılar galaktozu fermente eden mayaların yoğurtta bozulmaya neden olduklarını söylemişlerdir. *P.anamola* olarak tanılanan 7 suşun rDNA ITS bölgesinin restriksiyon bantları

incelenmiştir.İncelenen bütün türler 620bp uzunluğunda tek bir fragment oluşturmuştur (Caggia et al.,2001).

Senses-Ergul ve ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli gıdalardan izole edilen 22 maya suşu klasik ve moleküler yöntemlerle tanılanmıştır. Klasik yöntemlerle 11 genusa ait 12 tür olarak tanılanan bu isolatlar *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus albidus*, *Aurebasidium spp.*, *Hanseniospora valbyensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Pichia anamola* ve *Geotrichum candidum*'dur.Klasik yöntemlerle tanılamada Barnett ve ark.'nın maya tayin anahtarını kullanmışlardır. Maya isolatlarının genotipik karakterizasyonu için ise ITS-PCR kullanılmıştır. Aynı türe ait suşlar arasındaki farkı göstermek için ise restriksiyon endonukleaz ile ITS-18S rRNA gen bölgesini kesmişlerdir .

Fenotipik olarak *Y. lipolytica* ve *D. hansenii* olarak tanılanan isolatların küme analizi Biodiversity 2.0 programı ile (<http://www.nhm.ac.uk/zoology/bdpro>) gerçekleştirilmiştir. 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 39, 42, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 73, 74, 81, 82, 83, 86, 87, 88, 89, 90, 91 ve 92 numaralı isolatlar *D. hansenii* NRRL-Y-7624 ile aynı kümede bulunmakta ve bu isolatların tip tür *D. hansenii*'ye benzerliği %80 ve üzerindedir. 39, 60, 62, 63 ve 65 numaralı isolatlar fenotipik olarak %80 ve üzerinde tip tür *D. hansenii* ile benzerlik göstermesine karşın ITS PCR sonucunda bu isolatlar literatürde verilen 640bp'lik karakteristik bant oluşturmamışlardır. 39, 60 ve 63 numaralı isolatlar için 280bp ,62 numaralı izolat için 320bp ve 65 numaralı izolat

için 680bp'lik bant elde edilmiştir. Bu izolatlar fenotipik karakterler bakımından %80 ve üstü benzerlik göstermesine ve aynı kümede olmalarına rağmen farklı ITS özelliklerinden dolayı bunlar genotipik olarak *D. hansenii* dışında değerlendirilmektedir. Fenotipik olarak tip tür *D. hansenii*'ye %80 ve üzeri benzerlik gösteren izolatlarda ITS PCR sonucunda 640bp'lik bant karakteristik olmasına rağmen bu özellik 30, 60, 62, 63 ve 65 numaralı izolatlarda bulunmadığından dolayı bu da bize mayalarda sadece fenotipik değerlendirmenin tanılamada yeterli olmadığını göstermektedir.

11, 12, 15, 18, 20, 25, 35, 36, 41, 46, 47, 49, 53, 59, 84 ve 85 numaralı izolatlar *Y. lipolytica* CBS 6124 ile aynı kümede bulunmakta ve bu izolatlar tip tür *Y. lipolytica*'ya %89 ve üstü fenotipik benzerlik göstermektedirler. ITS PCR sonucunda *Y. lipolytica* olarak tanılanan izolatlar 360bp'lik ortak bir bant oluşturmuşlardır. 59 nolu izolat fenotipik olarak *Y. lipolytica*'ya %89 benzerlik göstermesine rağmen 580bp'lik farklı bir bant ile karakterize edilmiştir. Bu nedenle izolat 59 *Y. lipolytica* olarak değerlendirilmemiştir. Fenotipik olarak *Y. lipolytica* ile aynı kümede bulunan izolatların %93,75'i *Y. lipolytica*'ya %90 ve üzerinde benzerlik göstermekte ve bu izolatların hepsi ITS bölgesinde 360bp'lik ortak bir bant oluşturmuşlardır. Bununla birlikte izolatların %6,25'inde farklı ITS bölgesi belirlendiğinden fenotipik tanılamının tek başına yeterli olmadığı görülmüştür.

Bir gıda ürününün mikrobiyolojik analizini ölçmenin farklı sebepleri vardır. Hiç şüphesiz en önemli nedeni de tüketicinin sağlığını tehdit eden patojenik mikroorganizmaların bulunup bulunmadığını

göstermektedir. Ayrıca proses hattında kontaminasyonun rotasının belirlenmesi, ham maddenin kalitesinin değerlendirilmesi, raf ömrünün tahmin edilmesi gibi sebepler de göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Loureiro and Querol, 1999). Mikroorganizmaların tanılanmasında kullanılan moleküler teknikler morfolojik ve fizyolojik karakteristiklere dayanan konvansiyonel tekniklere göre daha duyarlı ve spesifiktir. Yapılan bu çalışmada klasik yöntemlerle *Y. lipolytica* olarak tanılan izolatların ITS PCR ile %93'ü *Y. lipolytica*, , *D. hansenii* olarak tanılan izolatların ise %83'ü *D. hansenii* olarak tanılanmıştır. Görüldüğü gibi klasik yöntemler kültür koşullarından güçlü bir şekilde etkilenmekte kesin olmayan veya yanlış sonuçlar verebilmektedir. PCR'a dayalı tekniklerin kullanılmasıyla gıda endüstrisinde istenmeyen kontaminasyonların kaynağı doğru olarak saptanabilecek ve bozulmaya neden olan mayaların tanısı kısa sürede güvenilir bir şekilde gerçekleştirilecektir. Böylece elde edilen kesin sonuçlarla daha iyi, etkili ve ucuz bir kalite kontrolü uygulanabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acheamong, E.A.A., 2000.** Some aspects of the taxonom, genetics, carotenogenesis and chemical composition of a red yeast *Rhodotorula rubra*, TPI, MSc Thesis, Memorial Universty of Newfoundland, 175p.
- Ahearn,D.G., Meyers , S.P. , Nichols, R.A., 1968.** Extracellular Proteinases of Yeasts and Yeast-like Fungi , Applied Microbiology., 1370- 1374.
- Akgül, Ö., 2006.,** Klinik örneklerden izole edilen germ tüp pozitif maya kökenli *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* ayırımının fenotipik yöntemlerle ve PCR ile belirlenmesi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 61s.
- Alexopoulos, C.J., 1962.** Introductory Mycology, 2nd Ed.,John Wiley and Sans, New York, 220p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., 1979.** Introductory Mycology, 3nd Ed., John Wiley and Sans, New York, 307p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwesh, M., 1996.** Introductory Mycology, 4nd Ed., John Wiley and Sans, New York, 867p.

KAYNAKLAR (devam)

- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., Lombardi, A., 2000.** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products, Letter in Applied Microbiology, 30, 5-9.
- Arias, C.R., Burns, J.K., Friedrich, L.M., Goodrich, R.M., Parish, M.E., 2002.** Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Different Identification Methods, Applied and Environmental Microbiology, 1955-1961.
- Atlas, R.M., Parks, L.C., 1997.** Handbook of Microbiological Media, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, 1705p.
- Atlas, R.M., 2004.** Handbook of Microbiological Media, 3th Ed., CRC Press, Boca Raton, 2051p.
- Ausubel, F. M., Brent, R. , Kingston, R. E., 1997.** Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 3rd ed., N. Y.
- Banwart, G. J., 1981.** Basic Food Microbiology, AVI Publishing Co. Inc, Westport, 519p.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1983.** Yeasts: Characteristics and Identification, 1th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 811p.

KAYNAKLAR (devam)

- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2000.** Yeasts: Characteristics and Identification, 3th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1139p.
- Beneke, E.S., Stevenson, K.E., 1987.** Food and Beverage Mycology, 2nd Ed., Van Nostrand Reinhold Publishers, New York, p. 1-17.
- Beech, F.W., Davenport, R.R., 1971.** Methods in Microbiology, Academic Press, London, Vol: 4, p.153-188.
- Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J., 1999.** Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth, Food Control, 10, 27-33.
- Beuchat, L.R., Fraandberg, E., Deak, T., Alzamora, S. M., Chen, J., Guerro, S., Lopez, M. A., Ohisson, J., Olsen, M., Peinado, J. M., Schnurer, J., Silaniz, M. T., Lehoezki, J. T., 2001.** Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeast: an interlaboratory study, Int. Journal of Food Microbiol., Vol: 70, 89-96.
- Boekhout, T., Robert, V., Phaff, H., 2003.** Yeast in Food: Beneficial and Detrimental Aspects, CRC Press, Boca Raton, p. 69-121.

KAYNAKLAR (devam)

- Breuer, U., Harms, H., 2006.** *Debaryomyces hansenii*-an extremophilic yeast with biotechnological potential, *Yeast*, 23,415-437.
- Brockerhof, H., Jensen, R.G., 1974.** *Lipolytic Enzymes*, Academic Pres, London, 329p.
- Buzzini, P., Martini, A., 2002.** Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments, *Journal of Applied Microbiology*, 93, 1020-1025.
- Caggia,C., Restuccia,C. ,Pulvirenti, A., Giudici,P., 2001.** Identification of *Pichia anamola* isolated from yoghurt by RFLP of ITS region, 71, 71-73.
- Cappa, F., Cocconelli , P.S., 2001.** Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis, *Food Microbiology*, 69, 157-160.
- Chen,Y.C., Eisner, J.D., Katar , M.M., Rassouliau-Barrett, S.L., Lofe, K., Yarfitz, S. L., Limaye, A.P., Cookson , B. T., 2000.** Identification of Medically Important Yeasts Using PCR- Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the rRNA Genes , *Journal of Clinical Microbiology*, 2302- 2310.

KAYNAKLAR (devam)

Colowick, S.P., Kaplan, N., 1955. Methods in Enzymology Academic Press, New York, Vol: 1, 144p.

Corbo,M.R., Lanciotti, R., Albenzio, M., Sinigaglia, M.,2001. Occurence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region, International Journal of Food Microbiology, 69, 147-152.

Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Mulargia, A.F., Palmas, F., 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products, International Journal of Food Microbiology, 69, 53-58.

Couto, B.M.M., Van der Vossen, J.M.B.M., Hofstra, H., huis in't Veld,J.H.J., 1994. RAPD analysis : a rapid technigue for differentiation of spoilage yeasts, International Journal of Food Microbiology, Vol:24, 249-260.

Couto, B.M.M., Vogels, J.T.W.E., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., Van der Vossen, J.M.B.M., 1995. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy two identification techniques for foof-borne yeasts, Journal Applied Bacteriology, Vol: 79, 525-535.

KAYNAKLAR (devam)

- Couto, B.M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., Van der Vossen, J.M.B.M., 1996.** Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains, Applied and Environmental Microbiology, 41-46.
- Dağışan, L., 2005.** XIX. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir, 102-105.
- Deak, T., 1995.** Methods for the rapid detection and identification of yeast in food, Trends in Food Science Technology, Vol:6, p. 287-292.
- Deak, T., Beuchat, L.R., 1996.** Handbook of food spoilage yeasts, New York, USA, CRC Pres, 315p.
- Deak, T., Beuchat, L.R., Guerzoni, M.E., Lillie, A., Peter, G., Rohm, M., Schnürer, F., Tabajdi, P.V., Westphal, S., 1998.** A collaborative study on media for the enumeration of yeast in foods, Int. Journal of Food Microbiol., Vol: 43, 91-95.
- Deak, T., Chen, J., Beuchat, L.R., 2000.** Molecular Characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from Poultry, Applied and Environmental Microbiology , 4340-4344.

KAYNAKLAR (devam)

Deak, T., 2006. Safety and Quality of Fermented Foods: New Developments in Biopreservation, 195s.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch,, C., Uruburu, F., Querol,A.,1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers, International Journal of Systematic Bacteriology, Vol: 49, 329-337.

Fernandez, M.T., Ubedo, J.F., Briones, A.I.,1999. Comparative study of non- *Saccharomyces* microflora of musts in fermentation by physiological and molecular methods, FEMS Microbiology Letters, Vol: 173, 223-229.

Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E.,2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5,8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces* : a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts, Antonie van Leeuwenhoek Vol:78, 87-97.

Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Simit, M.S., Nicaud, J.M., 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications, FEMS Yeast Research, Vol: 5, 527-543.

KAYNAKLAR (devam)

- Fleet, G.H.,1990.** Yeast in dairy products, Journal of Applied Bacteriology, Vol:68,199-211.
- Frazier, W.C., Westhoff, D.C., 1988.** Food Microbiology, Mc Grow Hill Book Co., New York, 516p.
- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimota, T., 2001.** Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains, Journal of Clinical Microbiology, 3617-3622.
- Gomes, L.H., Duarte, K.M.R., Argueso, J.L., Echevergaray, S., Tavares, F.C.A., 2000.** Methods for yeast characterization from industrial products, Food Microbiology, Vol:17, 217-223.
- Gonzalez, J.A., Gallordo C.S., Pombar, A., Rego, P., Rodriguez, L. A., 2004.** Determination of enzymatic activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*saccharomyces* yeast, Electron J. Environ. Agric. Food Chem., 3 (5), 743-750.
- Glick, B. R., Pasternak, J. J., 1994.** Moleculer Biotechnology, American Society for Microbiology, Washington, 500p.

KAYNAKLAR (devam)

Guillamon ,J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A., 1998.

Rapid identification of wine yeast species based on RFLP Analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region, Arch. Microbiol., Vol:169, 387-392.

Hansen,T.K., Jakobsen,M., 2001. Taxonomical and technological

characteristics of *Saccharomyces spp.* associated with blue veined cheese, International Journal of Food Microbiology, 69, 59-68.

Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J.M., 2004. New PCR-

based methods for yeast identification, 97, 792-801.

Jakobsen, M., Norvhus, J., 1996. Yeast and their possible beneficial

and p. negative effects on the quality of dairy products, Int. Dairy Journal, Vol: 6, 755-768.

Jarvis, B., Williams, A. P., 1987. Food and Beverage Mycology, 2nd

Ed., Van Nostrand Reinhold Int. Co., New York, 612p.

Kirsop, B.E., 1984. A Manual of Laboratory Methods, Academic Press

Inc., London, p. 109-127.

KAYNAKLAR (devam)

- Kirsop, B.E., Kurtzman, C.P., 1988.** Living Resources for Biotechnology: Yeasts, Cambridge University Press, Cambridge, 222p.
- Koyuncu,E., 2006,** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* suşlarının genotiplendirmesi ve moleküler yöntemlerin tanıdaki yerinin araştırılması, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 95s.
- Kreger-van Rij, N.J. W., 1984.** The Yeast a Taxonomic Study, Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, 1082p.
- Kurtzman, C.P., 1990.** Classification of general properties of yeasts, Marcel Decker Inc., New York, p. 1-34.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 2003.** Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘ Saccharomyces complex’ determined from multigene sequence analyses, FEMS Yeast Research, 3, 417-432.
- Latouche, G.N., Daniel, H.M., Lee, O.K., Mitchell, T.G., Sorrell, T.C., Meyer, W., 1997.** Comparison of Use of Phenotypic and Genotypic Characteristics for Identification of Species of the Anamorph Genus *Candida* and Related Teleomorph Yeast Species, Journol of Clinical Microbiology, 3171-3180.

KAYNAKLAR (devam)

- Lieckfelt, E., Meyer, W., Börner, T., 1993.** Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting, J. Basic Microbiol., Vol:33, p. 413-426.
- Lodder, J., 1970.** The Yeasts a Taxonomic Study, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385p
- Lodder, J., Kreger-van Rij, N.J.W., 1952.** The Yeasts a Taxonomic Study, North Holland Publishin Co., Amsterdam, 840p.
- Lopes, M.B., Soden, A., Henschke, P., Langridge, P., 1996.** PCR Differentiation of Commercial Yeast Strains Using Intron Splice Site Primers, Applied and Environmental Microbiology, 4514-4520.
- Lopez,V., Querol,A., Ramon,D., Fernandez-Espinar,T., 2001.** A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts, International Journal of Food Microbiology, 68,75-81.
- Loureiro, V., Querol, A., 1999.** the prevalence an control of spoilage yeasts in foods and beverages, Trends in Food Science & Technology, Vol: 10, p. 356-365.

KAYNAKLAR (devam)

- Loureiro, V., 2000.** Spoilage yeasts in foods and beverages : characterisation and ecology for improved diagnosis and control, Food Research International, Vol: 33, p. 247-256.
- Martin,J.P., 1950.** Use of acid, rosebengal and streptomisin in the plate method for estimating soil fungi, Soil Sci., 69, p. 215-233.
- Martorel, P., Fernandez-Espinar, T., Querol, A., 2005.** Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces*, 5, 1157-1165.
- Montrocher, R., Verner, M.C., Briolay, J., Gautier, C., Marmesse, R., 1998.** Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences, International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 295-303.
- Ness, F., Lavellee, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., Dulau, L., 1993.** Identification of Yeast Strains Using the Polymerase Chain Reaction, J. Sci. Food Agric., Vol: 62, 89-94.
- Paffetti, D., Barberio,C., Casalone,E., Cavalieri,D., Fani,R., Fia,G., Mori,E., Polsinelli,M., 1995.** DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction length polymorphism is useful for east typing, Res. Microbiol., 146,587-594.

KAYNAKLAR (devam)

- Phaff, H.J., Miller, M.W., Mrak, E.M., 1966.** The Live of Yeasts, Harward University Press, Cambridge, 186p.
- Perez, M.A., Gallego, F.J., Hidalgo, P., 2001.** Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains, FEMS Microbial Letters, Vol:205, 375-378.
- Petersen, K.M., Moller, P. L., Jespersen, L., 2001.** DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses, International Journal of Food Microbiology, 11-24.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., 1985.** Fungi and Food Spoilage, Academic Press, London, 685p.
- Prillinger, H., Molnar, O., Eliskoses L. F., Lapondic, K., 1999.** Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese, Antonie van Leeuwenhoek, Vol:75, 267-283.
- Prista, C., Loureiro-Dias, M.C., Montiel, V., Garcia, R., Romas, J., 2005.** Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii* , FEMS Yeast Research, Vol: 5, 693-701.

KAYNAKLAR (devam)

- Querol, A., Barrio, E., Ramon, D., 1992.** A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization, Vol: 15, 439-446.
- Raper, K. B., Fennell, D. I., 1965.** The Genus *Aspergillus*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 545p.
- Raper, K. B., Thom, C., 1949.** A Manual of the *Penicillia*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 320p.
- Rapp, P., Backhaus, S., 1992.** Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. Enzyme Microb Technol., Vol: 14, 938-943.
- Rechcigl, M., 1978.** CRC Handbook Series in Nutrition and Food. Sect. G. Diets, Culture Media, Food Supplements. Vol. 3. Culture Media for Microorganisms and Plants, CRC Press, Cleveland, 647 pp.
- Rohm, E., Lechner, F., 1990.** Evaluation and Reliability of a Simplified Method for Identification of Food-Borne Yeasts, Applied and Environmental Microbiology, 1290-1295.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Shuman, H.A., 1989.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2 nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

KAYNAKLAR (devam)

Sandven, P., 1990. Laboratory Identification and Sensitivity Testing of Yeasts Isolates, National Institute of Public Health , 48, p. 27-36.

Senses-Ergul, S., Agoston,R., Belak, A., Deak, T., 2005. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests, International Journal of Food Microbiology, 1-5.

Senses-Ergul, S., Ozbas Z.Y., 2006, Characterization of the yeast flora present in some Turkish high-sugar products, Journal of General and Applied Microbiology, 52, 2, 99-106.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P.,2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by *non-Saccharomyces* winw yeasts, Journal of Applied Microbiology 91,182-190.

Suzzi, G., Lanorte, M.T., Galgara, F., Andrighetto, C., Lambardi, A., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E., 2001. Proteolytic, lipolytic and molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese,International Journal of Food Microbiology, 69, 69-77.

KAYNAKLAR (devam)

- Sztajer,H., Maliszewska, L., Wieczorek, J., 1988.** Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes, Enzyme Microb. Technol., Vol: 10,p.492-497.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., 1989.** Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, 3.Baskı, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Teks. Ser., No:55, İzmir, 260sf.
- Tempel, T., Jakobsen, M., 1998.** Yeasts Associated with Danablu, Int. Dairy Journal, 8, 25-31.
- Tempel, T., Jakobsen, M., 2000.** The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for roduction of Danablu, International Dairy Journal, 10, 263-270.
- Topcu, S. Ö., 2006.** Ankara sokak sütü ve peynir örneklerinden maya izolasyonu, sütlerden aflatoksin M1 tayini, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 97s.
- Török,T., King, A.D. J.R., 1991.** Comparative Study on the Identification of Food-Borne Yeasts, Applied and Environmental Microbiology, 1207-1212.

KAYNAKLAR (devam)

- Otlu, B., 2004.,** Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* suşları ile kolonize suşlar arasındaki genotipik farklılıkların pulsed field gel electrophoresis ve arbitrarily primed PCR yöntemi ile araştırılması, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 102s.
- Van der Vassen, J.M.B.M., Hofstra, H., 1996.** DNA based typing identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementetion, Int. J. Food microbiol., Vol: 33, 35-49.
- Van der Walt, J.P., 1970.** Criteria and Methods Used in Classification, North Hollad Publishing Co., Amsterdam, 1385p.
- Vaughan-Martini, A., 2003.** Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine, Int. Microbiol, 6, 175-182.
- Verachtert, H., De Mot, R., 1990.** Biotechnology and Biocatalysis, Marcel Dekker. Inc., New York, 536p.
- Vasdinyei, R., Deak, T., 2003.** Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy using traditional and molecular identification techniques, International journal of Food Microbiology, 86, 123-130.

KAYNAKLAR (devam)

- Welthogen, J.J., Viljaen, B.C., 1999.** Comparison of ten media for the enumeration of yeast in dairy products, Food Research International, Vol: 30, 207-211.
- Westall, S., Filtenborg, O., 1998.** Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere, Food Microbiology, 15, 243-249.
- Wickerham, L. J., 1951.** Taxonomy of Yeasts, US Dept. Agriculture Techn. Bull., No: 1029, p. 1-56.
- Wickerham, L.J., Burton, K.A., 1962.** Philogeny and Biochemistry of the Genus *Hansenula*, Bacteriol. Rev., 26, p. 382-397.
- Wickerham, L.J., 1952.** Recend advances in the taxonomy of yeasts, Ann. Rev. Microbiol., 6, p. 317-332.
- Wickerham, L.J., 1970.** The Yeasts a Taxonomic Study, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385p.
- Wolf, K., 1996.** Nonconventional Yeast in Biotechnology, Springer Verlag, Berlin, 607p.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı : ÖZTÜRK YALÇIN
Adı : Tansel
Mektup Adresi : Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
 Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
 35100,Bornova-İzmir/ TÜRKİYE
Tel : +902323884000(2436) **E-posta:** tanselozturk@hotmail.com
Doğum tarihi : 14/ 03/ 1976
Doğum Yeri : İstanbul

EĞİTİM

Bitirilen Akademik Dereceler

Derecenin Tipi	Ana Çalışma Alanları	Yıl	Üniversite
Lisans	Mikrobiyoloji	1993-1997	Ege Üniversitesi
Yüksek Lisans	Mikrobiyoloji	1997-2000	Ege Üniversitesi

Yüksek Lisans Tezinin Adı:

Çeşitli Kaynaklardan Ekstraselüler Lipaz Üreten Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu.

Mevcut Çalışmalar

Çalışılan Derece : Doktora Çalışması
Tezin Adı : Beyaz Peynirlerde Bozulmaya Neden Olan *Y. lipolytica* ve *D. hansenii*'nin Fenotipik ve Genotipik İdentifikasyonu.
Enstitü : Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yabancı Dil : İngilizce