

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**



**BEYAZ PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Doktora Tezi

MUSTAFA APAN

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Mustafa EVREN

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Mustafa APAN tarafından, **Dr.Öğretim Üyesi Mustafa EVREN** danışmanlığında hazırlanan “**BEYAZ PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 02.02.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye (Danışman)	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa EVREN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Abdulkadir HURŞİT Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI Ordu Üniversitesi Balıkçılık Tek. Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Oğuz Aydemir Çankırı Karatekin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

İmza

02/02/ 2023.

Mustafa APAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı : BEYAZ PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 23. 06.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 17

Tek kaynak oranı : % 4 çıkmıştır.

İmza

05/01 / 2023

Dr. Öğr. Üy. Mustafa EVREN

ÖZET

BEYAZ PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Mustafa APAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Doktora, Şubat/2023

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa EVREN

Bu çalışmada, 2006-2007 tarihleri arasında Samsun ili çeşitli marketlerden ve Terme ilçe pazarından satışa sunulan farklı marka ve ambalajlardaki kapalı 15 adet, açık 15 adet ambalaj olmak üzere toplam 30 adet beyaz peynir örneğinden toplam 48 adet maya suşu materyal olarak kullanılmıştır.

Mayalar beyaz peynirde rahatlıkla gelişebilirler, bunu nedeni bu mikroorganizmaların geniş aralıklı su aktivitelerinde, pH ve sıcaklık yeteneklerinin yanında enzim aktivilerinin yüksek olmasıdır. Beyaz peynirde gelişen mayalar acı tada, mayamsı tada, kötü kokuya, gaz oluşumuna, yumuşamaya ve istenmeyen gözenekli yapı oluşumu gibi istenmeyen yapı ve duyuşsal değişikliklere sebep olmasıyla çeşitli bozulmalara yol açar. Bu durum beyaz peynirde çeşitli kalite ve ürün kayıplarının düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca maya sayısının fazlalığı işletmelerde hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulmadığının önemli bir göstergesi olarak görülmektedir. Peynir yüzeyinde gelişen ve potansiyel bozulma etkeni olan maya suşlarının izole edilip tanımlanmaları, bu ürünlerin üretilmesi ve depolanmasında yaşanan sorunların önlenmesinde önemli katkı sağlayacaktır. Çalışmada beyaz peynirden izole edilen maya suşlarının tanımlanmasında genotip karakterlere dayalı PZR-RFLP yöntemi ile DNA sekans tanımlama yöntemi kullanılmıştır. PZR-RFLP yöntemiyle 48 adet maya suşu arasında hiçbir fark görülmediği bulunmuştur. Örnek maya DNA sekansları blast, benzerlik, NJ ve ML filogenetik analizlerine tabi tutulup akrabalık dereceleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu analizler sonunda beyaz peynirden izole edilen maya suşlarında *Yarrowia lipolytica* maya suşu dominant olarak bulunmuştur. Ayrıca filogenetik ağaçlarındaki ayrım, filogenetik analize tabi tutulan maya suşlarının “Market” ve “Pazar” örneklerinden izole edildiğini açıkça göstermektedir. Çünkü market örneklerinden izole edilen *Y. lipolytica*’ların daha çok Avrupa orijinli ve ticari olarak üretilen referans maya suşlarıyla akrabalıkları yakın olduğu bulunurken, pazardan örneklerinden izole edilen *Y. lipolytica*’ların daha çok karışık bölge orijinli ve yabani referans maya suşlarıyla akrabalık derecelerinin yakın olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar çeşitli literatürlerde de desteklenmiştir. Çalışmada ve literatürlerde görüldüğü gibi halk pazarında satışa sunulan beyaz peynir örneklerinde *Y. lipolytica* maya suşlarının orijinlerinin farklı olduğu bulunmuştur. Bunun sonucu olarak pazarda satışa sunulan beyaz peynirlerin, marketlerde satışa sunulan beyaz peynirlere kıyasla hem hijyenik hem de sağlık açısından risk oluşturacağı düşünülmektedir. Bu çalışmayla beyaz peynir sektöründe, mayaların neden olduğu ürün kayıpların önüne geçilmesinin yanında gıda, fermentasyon ve biyoteknoloji alanında kullanımıyla ilgili çalışmalara ışık tutması amaçlanmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Maya, PZR, PZR-RFLP, Filogenetik, DNA sekans, *Yarrowia lipolytica*.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF YEAST ISOLATED FROM WHITE CHEESE

Mustafa APAN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Food Engineer

Doctorate, February/2023

Supervisor: Dr. Faculty Member Mustafa EVREN

In this study, a total of 48 yeast strains were used as material from a total of 30 white cheese samples, 15 closed and 15 open packages, in different brands and packages, which were offered for sale from various markets in Samsun and Terme district market between 2006-2007. Yeasts can develop easily in white cheese, this is because these microorganisms have high enzyme activities in a wide range of water activities, pH and temperature abilities as well as high. Yeasts that develop in white cheese cause various deteriorations by causing undesirable structure and sensory changes such as bitter taste, yeasty taste, off-flavor, gas formation, softening and unwanted porous structure formation. This situation causes a decrease in various quality and product losses in white cheese. In addition, the excess number of yeast is seen as an important indicator that the hygiene and sanitation rules are not followed in the enterprises. Isolation and identification of yeast strains that develop on the cheese surface and are potential spoilage factors will contribute to the prevention of problems experienced in the production and storage of these products. In the study, PCR-RFLP method based on genotype characters and DNA sequence identification method were used to identify yeast strains isolated from white cheese. It was found that no difference was observed between 48 yeast strains of PCR-RFLP method. Sample yeast DNA sequences were subjected to blast, similarity, NJ and ML phylogenetic analyzes to determine the degree of relatedness. At the end of these analyses, *Yarrowia lipolytica* yeast strain was found to be dominant among the yeast strains isolated from white cheese. Moreover, the distinction in phylogenetic trees clearly shows that yeast strains subjected to phylogenetic analysis were isolated from “Market” and “Bazaar” samples. Because, while it was found that *Y. lipolytica* isolated from market samples were mostly closely related to reference yeast strains of European origin and commercially produced, *Y. lipolytica* isolated from bazaar samples were mostly found to have close affinity with mixed region origin and wild reference yeast strains. These results have been supported in various literatures. As seen in the study and in the literature, the origins of *Y. lipolytica* yeast strains were found to be different in the white cheese samples offered for sale in the bazaar. As a result, it is thought that the white cheeses offered for sale in the market will pose a risk both in terms of hygiene and health compared to the white cheeses offered for sale in the bazaars. With this study, it is aimed to prevent product losses caused by yeasts in the white cheese sector, as well as to shed light on studies related to its use in food, fermentation and biotechnology.

Keywords: Yeast, PCR, PCR-RFLP, Phylogenetics, DNA sequence, *Yarrowia lipolytica*.

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışması olarak bana bu konuyu veren, bilgi ve deneyimleriyle çalışmamı yönlendiren, çalışmamın her aşamasında destek olan danışmanım sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Mustafa EVREN'e;

Tezimin değerlendirilmesi, bilgi ve deneyimleriyle çalışmamı yönlendiren, çalışmamın her aşamasında destek olan katkı ve yönlendirmelerde bulunan sayın hocam Prof.Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a;

Tezimin değerlendirilmesi aşamasında katkı ve yönlendirmelerde bulunan sayın hocam Prof.Dr. A. Kadir HURŞİT'e;

Tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan Ordu Üniversitesi Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi sayın Doç.Dr. Cem Tolga GÜRKANLI'ya;

Tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan sayın Prof.Dr. Nurten KARA'ya, sayın Vildan Akın MUTLU'ya ve Ziraat Yüksek Mühendisi Ümit KAYABOYNU'ya;

Tez çalışmamla ilgili analizler için laboratuarlardan yararlanmama izin veren Gıda Mühendisliği ve Biyoloji Bölüm Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Hasan TEMİZ'e ve sayın hocam Prof. Dr. Erkan YALÇIN'a

Bana Doktora yapma fırsat ve olanağı sağlayan, Meslek Yüksek Okulumuz laboratuvarlarında çalışmama imkân veren Terme Meslek Yüksek Okulu Müdürü sayın hocam Doç.Dr. Erol TERZİ'ye;

Yardım ve destekleri için Terme Meslek Yüksek Okulundaki çalışma arkadaşlarıma ve bana maddi ve manevi her konuda destek veren aileme;

Tez çalışmam sırasında her konuda büyük desteğini gördüğüm, sabrını ve ilgisini esirgemeyen yol arkadaşım Mukaddes Arıgül APAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasını her konuda destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

MustafaAPAN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	i
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	6
2.1. Peynir	6
2.1.1. Beyaz Peynir	8
2.2. Beyaz Peynirde Görülen Bozulmalar	9
2.2.1. Tat Bozuklukları	10
2.2.2. Kabukta Bozulma	10
2.2.3. Kötü Koku	10
2.2.4. Gözenekli Yapı	10
2.3. Mayalar ve Genel Özellikleri	10
2.4. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler	13
2.4.1. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Konvansiyonel Yöntemler	13
2.4.2. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Test kitleri	14
2.3.3. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Teknikler	15
3. KAYNAK ÖZETLERİ	21
4. MATERYAL VE YÖNTEM	38
4.1. Materyal	38
4.2. Yöntem	39
4.2.1. Maya Suşlarının İzolasyonu, Saflaştırılması ve Depolanması	40
4.2.2. Maya Suşlarının Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Tanımlama Yöntemleri	41
4.2.2.1. Maya Suşlarının DNA'sının İzolasyonu ve Saflaştırılması	42
4.2.2.2. DNA İzolatlarının Saflık Kontrolü	44
4.2.2.3. PZR Aşaması	45
4.2.2.5. DNA Dizi Analiz Sonuçlarının (Sekanslarının) Okunması	48
4.2.2.6 Dizi (Blast) Analizi	49
4.2.2.7. Veri Seti Oluşturulması	49
4.2.2.8. ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesine Göre Filogenetik Analizler	49
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
5.1. Mayaların Saflaştırılması ve Stok Haline Getirilmesi	51
5.2. İzole Edilen Mayaların DNA'ların İzolasyonu ve Saflaştırılması	51
5.3. Maya Suşlarının DNA İzolatlarının Saflık Kontrolü	51
5.4. PZR Aşaması ve PZR Ürünlerinin Kontrolü	52
5.5. Maya Suşlarının PZR-RFLP Analizi	54
5.6. Maya DNA'nın Sekans Analizine Seçimi	56
5.7. DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Okunması ve Düzeltilmesi	56
5.8. ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesine Göre Blast Analizi, Genel Veri Seti Oluşturma ve Filogenetik Analizler	56
5.9. Veri Setinin Benzerlik Analizi	61
5.10. Veri Setinin Filogenetik Analizi	62
6. SONUÇ	73
7. KAYNAKLAR	77

EK.....	92
ÖZ GEÇMİŞ.....	100



SİMGELER VE KISALTMALAR

*. 2H ₂ O	: 2 Suda
“*.abi”	: Abi Formatlı Dosya Uzantısı
A	: Adenin
α	: Alfa
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
Tm	: Annealing Sıcaklığı
bç/bp	: Baz Çifti
β	: Beta
CBS	: Centraalbureau Voor Schimmelcultures
dk	: Dakika
rpm	: Dakikada Devir
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Na ₂	: Di-Sodyum
EDTA	: Disodyum Etilendiamintetraasetik Asit
3’	: DNA’ nın 3 Ucu
5’	: DNA’ nın 5 Ucu
dd H ₂ O	: Double-Distile Su
“*.fasta”	: Fasta Formatlı Dosya Uzantısı
GRAS	: Genel Olarak Güvenilir
gr	: Gram
G	: Guanin
Hd	: Haplotip Çeşitliliği
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
HCl	: Hidroklorik Asit
ITS	: İnternal Transcribed Spacers
IGS	: Intergenic Spacer
KİTAM	: Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma Ve Uygulama Merkezi
kb	: Kilo Baz
m	: Kütle
MP	: Maximum Parsimony
ML	: Maximum Likelihood
μ g	: Mikrogram

μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
M.Ö.	: Milattan Önce
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
M	: Molar
M _A	: Molekül Kütlesi
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NCBI	: National Collection Of Agricultural And Industrial Microorganisms
-	: Negatif
NJ	: Neighbor-Joining
Pi	: Nükleotid Çeşitliliği
X	: Oran
pH	: Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimidir.
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR- RFLP	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu -Restriksiyon Fragment Length Polymorphism
+	: Pozitif
rDNA	: Recombinant Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
D1/D2	: Ribosomal En Büyük Alt Birim (LSU)
sa	: Saat
s	: Saniye
°C	: Santigrat Derece
C	: Sitosin
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
NaCl	: Sodyum Klorür
H ₂ O	: Su
<i>Taq</i> DNA polimeraz	: <i>Thermus aquaticus</i> bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimidir.
T	: Timin
Tris	: Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane
TE	: Tris/EDTA

TAE	: Tris/Asetate/EDTA
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method Algorithm
v	: Versiyon
V	: Volt/Hacim
g	: Yerçekimi İvmesi
YEPD /YPD	: Yeast Extract Peptone Dextrose Agar/Broth
Agar/Broth	
YM	: Yeast Malt Agar/Broth
Agar/Broth	
%	: Yüzde



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye’de üretilen peynir çeşitleri (Koçak, 2022).....	6
Şekil 2.2. Geleneksel yöntemle beyaz peynir üretim aşaması (Üçüncü, 2008)	8
Şekil 2.3. Bulgar yöntemiyle beyaz peynir üretim aşaması (Üçüncü, 2008).....	9
Şekil 2.4. Saf maya hücresinin fizyolojik yapısı (<i>Candida Albicans</i> hücresinin elektron mikroskopundaki görünüşü) hz, hücre zarı; hmi, hücre membran invajinasyon; hd, hücre duvarı; er, endoplazmik retikulum; m, mitokondri; ç, çekirdek ; v, vakuol (Schaechter, 2004).....	11
Şekil 2.5. Mayaların hücre duvar yapısı (Wendy, 2021)	12
Şekil 2.6. Mayaların çoğalma şekilleri (Knop, 2011)	12
Şekil 2.7. Mayaların tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel yöntem prosedürü (Wingfield, 2021).....	14
Şekil 2.8. Mayaların tanımlanmasında kullanılan test kitleri yöntemlerin görünüm ve sonuç değerlendirmeleri	15
Şekil 2.9. Direkt elektroforetik yöntemlerin görüntüsü (Kavsaoğlu Ve Mersinkaya, 2019)	16
Şekil 2.10. Restriksiyon endonükleaz analiz yönteminin prensibi (Anonymous, 2022a). 16	
Şekil 2.11. Pulsed-field jel elektroforez (PFGE) yönteminin tanımlama prosedürleri (Mn, 2022)	17
Şekil 2.12. DNA hibridizasyon yöntemlerinin çeşitleri ve yöntemlerin prensipleri (Kanev Vd., 2015).....	17
Şekil 2.13. ITS gen bölgesi şematik olarak gösterimi (Fujita Et Al., 2001)	18
Şekil 2.14. PZR-RFLP tanımlama yönteminin prensibi (Anonymous, 2022c)	18
Şekil 2.15. PZR-RAPD tanımlama yönteminin prensibi (Alzohairy, 2015).....	19
Şekil 2.16. PZR-AFLP tanımlama yönteminin prensibi (Montaño-Pérez Et Al., 2006) ..	19
Şekil 2.17. Sekanslama tanımlama yönteminin işlem basamakları (Anonymous, 2019) .	20
Şekil 4.1. Saf maya suşlarının moleküler tanımlanmasında uygulanan işlemleri	42
Şekil 4.2. Titertek berthold marka nanodrop’un kullanımı (Anonymous, 2023).....	45
Şekil 4.3. DNA bazlar kromatogramlarının “Geneious”, “FinchTV” ve “CodonCode Aligner” programlarıyla el ile görsel olarak düzeltilmesi	49
Şekil 5.1. DNA izolatlarının saflık kontrol sonuçları	51
Şekil 5.2. PZR ürünlerinin kontrolü.....	53
Şekil 5.3. PZR-RFLP ürünlerinin elektroforez’de görüntülenmesi	55
Şekil 5.4. Oluşturulan veri setinin TIM2+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak NJ algoritmasına göre çizilmiş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir	63
Şekil 5.5. Oluşturulan veri setinin TIM2+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak ML algoritmasına göre çizilmiş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir.....	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. İzole edilen ve tanımlanan maya suşlarının elde edildiği kaynaklar.	38
Tablo 4.1. (devam).....	53
Tablo 4.2. Mayaların izolasyonu ve identifikasyonu için uygulanan analiz planı	40
Tablo 4.3. OneTaq® 2X Master Mix’ in kimyasal oranları ve sıcaklık döngüsü	46
Tablo 4.4. EconoTaq® PLUS 2X Master Mix’ in kimyasal oranları ve sıcaklık döngüsü	46
Tablo 4.5. Restiriksiyon enzimlerinin mix bileşimi, marka, inkübasyon ve inaktivasyon sıcaklık ve süresi	47
Tablo 5.1. Veri setinde bulunan maya suşlarının özellikleri.....	57
Tablo 5.1. (devam).....	72
Tablo 5.1. (devam).....	73
Tablo 5.1. (devam).....	74
Tablo 5.1. (devam).....	75
Tablo 5.2. jModelTest v.0.1 programı ile elde edilen sonuçlar	62



1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde büyük bir öneme sahip olan süt ve ürünleri içerdiği organik ve inorganik maddeler açısından oldukça zengin bir gıdadır. Mikroorganizmalar sütün bu zengin besin içeriğinden dolayı kolaylıkla gelişerek çeşitli olumsuzluklara neden olurlar. Bu gıdaların daha uzun süre dayanabilmeleri için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında sütün fermentasyon ile peynire dönüştürülmesi en eski ve en çok kullanılan yöntemdir. Fermentasyona dayalı üretimlerde çeşitli bakteri, maya ve küf suşları, substrat olarak kullanılan hammaddeler lipoliz, proteoliz, laktoz, laktat, sitrat metabolizması, amino asit ve serbest yağ asitleri metabolizmalarını gerçekleştirilmesiyle gıdanın besleyiciliğinin artmasına ve reolojik özelliklerinin oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu faydalarının yanında, organik bileşikler (enzim, organik asit, H_2O_2 , H_2S ve bakteriosin v.d.) oluşturmaları sonucu, patojen ve gıdayı bozan mikroorganizmaları inhibe ederek mikrobiyal kaliteyi artırırlar. Böylelikle, sütün besin değeri, raf ömrü ve katma değeri yükseltilmiş olmaktadır (Demirci, 1993; Tekinşen, 2000; Albayram, 2007; Esen, 2008).

Peynir, sütün çeşitli yöntemlerle pıhtılaştırılıp, olgunlaştırılması sonucu üretilen kendisine özgü aroması, dokusu ve kokusu olan bir gıdadır. Hammadde olarak çeşitli büyükbaş (inek ve manda sütü gibi) ve küçükbaş (koyun ve keçi sütü gibi) hayvanların tek başlarına veya bunların kombinasyonu kullanılmaktadır (Keskin, 1982; Hurşit, 1999).

Dünyada üretime sunulan bazı peynir çeşitleri; Beyaz Peynir, Mihaliç Peyniri, Keçi Peyniri, Tulum Peyniri, Otlı Peyniri, Lor Peyniri, Urfa Beyaz Peyniri, Dil Peyniri, Çerkez Peyniri, Abaza Peyniri, Tel Peyniri, Çökelek, Çanak Peyniri, Külek Peyniri, Cara Peyniri, Örgü Peyniri, Golot Peyniri, Çayır Peyniri, Torba Peyniri, İmansız Peyniri, Gravyer Peyniri, Yörük Peyniri, Cheddar, Mozzarella, Ricotta, Emmental, Edam, Gouda, Camembert, Brie, Roquefort, Parmesan, Provolone, Stilton, Gorgonzola, Feta ve Mascarpone şeklindedir. Peynir çeşitlerinin bu kadar fazla olma sebepleri; uzun raf ömrü olması, süt içeriğinin büyük bir bölümünü taşıması ve sütün fazla olduğu dönem ve bölgelerde çeşitli tekniklerle sütün peynire işlenmesi gelmektedir (Demirci, 1993; Anonymous, 2010a; Tekinşen, 2000).

Peynirlerin sınıflandırılmasında, kullanılan hammadde, kimyasal bileşimleri, nem ve kuru madde, tekstür yapıları, yağ oranı büyük bir rol oynamaktadır.

Peynirin mikrobiyolojik kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisi hammaddedir. Peynir üretiminde, hammadde olarak kullanılan sütün mikrobiyolojik açıdan iyi olmaması durumunda mikroorganizmalar peynirde rahatlıkla çoğalıp çeşitli olumsuzluklara neden olmaktadır (Şahin ve Korukluoğlu, 2000).

Özellikle beyaz peynirlerde gelişen mikroorganizmalar insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilmekte, bazı durumlarda sağlık açısından önemli bir sorun oluşturmaya bile, peynirde görünüş ve yapı gibi bazı duyuşsal özellikleri bozduğu için tüketici tarafından kabul edilemez kusurların oluşmasına neden olabilmektedir. Bu kusurları; lezzet ve tekstür kusurları (gözeneklilik ve şişkinlik), sert-kuru yapı, yumuşak yapı, kırıntılı yapı, unumsu yapı, pütürlü yapı, zayıf kitle, görünüm ve renk kusurları şeklinde sıralamak mümkündür (Ünlütürk, 2003). Peynirin kalitesi açısından uygulamada, hijyenik koşulların sağlanması ve özellikle uygun starter ile inhibitör içermeyen sütlerin kullanılması büyük önem taşır. Çünkü tüketici sağlığı için potansiyel tehlike arz eden mikroorganizmaların peynirde gelişmeleri, büyük ölçüde ancak bu önlemlerin alınması ile önlenabilmektedir (Tekinşen, 2000).

Mikroorganizmaların yukarıda sıralanan birtakım zararlı etkileri olmasına karşın, fermentasyon teknolojisinde (şarap, bira ve çeşitli organik maddelerin üretiminde), et ve et ürünlerinde (sucuk üretiminde), süt ürünlerinde (kefir, kıymız), unlu ürünler teknolojisinde (ekmek, pasta) vb. gıdaların üretiminde önemli rol oynamaları nedeniyle endüstriyel gıda üretiminde vazgeçilmez bir yerleri bulunmaktadır. Ancak, gıdanın doğal florasında bulunan veya dışarıdan bulaşan mikroorganizmalar, hatalı üretim, uygun olmayan koşullarda depolama ve taşıma koşullarının yanında, tüketicilerin bu ürünleri tüketim aşamasına kadar geçen süreçte yanlış muhafaza etmelerinden dolayı gıdanın bozulmasına neden olmaktadır. Bu bulaşmalar hammaddeden kaynaklanabildiği gibi yukarıda belirtilen nedenlerle mikroorganizmalar dışarıdan bu ürünlere bulaşabilmekte ve uygun koşullar bulduklarında da gelişebilmektedir. Mikroorganizmaların bulaşması sonucu oluşan bozulmalar ürünün çeşitli katmanlarında görülmekle birlikte, çoğunlukla peynir yüzeyinde görülmekte ve bozulmaların büyük çoğunluğu yüzeyde gerçekleşmektedir. Hem faydalı hem de zararlı yönleri ile mayalar da gıda endüstrisinde önemli bir yer tutmaktadır.

Mayalar, Fungi aleminde bulunan ökaryot tek hücreli organizmalardır. Maya kelimesi Farsça kökenli olup “Kıvam verici” veya “Fermente edici” anlamına

gelmektedir. Mayaların *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* ve *Deuteromycotina* olmak üzere üç ana alt bölümü vardır. Bu mikroorganizmalar toprak, hava, su, bitki, hayvan, üretilen çeşitli gıda ürünlerinde ve böceklerin doğal yapısında bulunsalar da daha çok bitki dokularında bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların düşük nem (yüksek konsantrasyonlu şeker ve tuz ortamlarında), düşük sıcaklık ve az oksijen bulunan ekterm ortamlarda gelişebilme özellikleri vardır. Mayalar, genellikle 5-8µm çapında, oval, uzun, eliptik veya yuvarlak hücre şekillerinde bulunmaktadır. Ayrıca bu mikroorganizmaların diğer belirgin özellikleri; nükleuslarının daha belirgin olması, miselyum oluşturmaması ve bölünme esnasında tomurcuk oluşturma şeklinde sıralanabilir. Bu özellikleriyle bakteri ve küflerden ayrılırlar. Ancak, bazı mayalar gerçek miselyum oluşturabildiklerinden maya benzeri olarak adlandırılmaktadır. Bu mikroorganizmalar seksüel (karşılıklı hücrelerin çaprazlanması örnek; *Saccharomyces cerevisiae*) ve/veya aseksüel (bölünme ve tomurcuklanma örnek; *Schizosaccharomyces pombe*) şekilde ürerler. Ayrıca *Endomycetaceae* veya *Saccharomycetaceae* familyasına dahil maya türlerinin spor oluşturma yetenekleri vardır. Maya ve maya benzeri funguslar katı besiyerlerinde düz, nemli, opak, kremsi, pembe, sarı, sirküler, sınırlı, yapışkan veya mukoid koloniler oluştururlar. Geniş pH, şeker ve alkol sınırları içerisinde gelişebilirler. Krem renginden pembe kırmızıya kadar değişen renkte pigmentler oluşturabilirler (Pamir, 1984; Gönlüm, 1994; Ayhan, 2000; Schaechter, 2004).

Mayalar çeşitli morfolojik ve biyokimyasal özellikleriyle birbirlerinden ayrılırlar. Mayaların bu özelliklerinden yararlanılarak tanımlamaları yapılmaktadır. Bu tanımlama işlemi için biyokimyasal (şeker asimilasyonu, üre hidrolizi, fermentasyonu vb.), ve morfolojik (sıvı ve katı besiyerlerindeki görünüşleri, hücre bölünmesi, spor yapıları vb.) testlere dayanan geleneksel tanımlama yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemler fazla işgücü ve zaman harcanmasının yanında bazı durumlarda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle API 20 C, API 20 C AUX ve API ID 32 C, Vitek gibi alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Bu geleneksel yöntemlere paralel olarak, son yıllarda, moleküler biyolojinin gelişmesiyle birlikte mayaların tespit ve tanımlamasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR)'na dayalı moleküler yöntemler oldukça önem kazanmıştır. PZR yöntemi; klasik belirleme ve tanımlama yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen ve hızlı olduğu kadar yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip bir yöntem olarak, gıdalardaki kaliteyi bozan mayaların

tanımlanmasında günümüzde kullanımı en çok tercih edilen yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. (Schaechter, 2004; Törnük vd., 2008).

H. Gobind Khorana 1971 yılında, iki primer kullanılarak DNA molekülünün belirli bir bölgesinin çoğaltılabileceğini belirlemiş, ancak uygulanmamıştır. 1983 yılında bir biyokimyacı olan Kary B. Mullis, *Thermus aquaticus* bakterisinden termotabil DNA polimerazı (*Taq* DNA polimeraz) izole ettikten sonra, DNA replikasyonunun tüp içinde taklit edilmesiyle istenilen bir bölgenin çok fazla sayıda çoğaltılmasını sağlayan ve kendisine Nobel ödülü kazandıran bir yöntem geliştirmiştir. PZR yöntemi ilk kez Saiki ve ark. tarafından 1985 yılında kullanılmış ve daha sonraki yıllarda bu metodun uygulama alanları genişleyerek tıp, ziraat, gıda, veteriner, biyoloji ve genetik ile ilgili bilim dallarında çok sayıda yeni buluşlar ve gelişmeler sağlanmıştır (Bartlett and Stirling, 2003; Devrim ve Kaya, 2004; Taban, 2007; Tanoğlu, 2008).

PZR yöntemi, nükleik asitlerin (DNA veya RNA) belirli bir bölümünün in vitro yöntemle hızlı ve çok sayıda çoğaltılmasına yönelik bir tekniktir. Bu yöntemle dizilimi bilinen iki bölge arasında bulunan bir DNA parçasını amplifiye (çoğaltmak) etmek amaçlanmaktadır. PZR yöntemi, temel olarak, tekrarlanan üç aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar denatürasyon, primerlerin bağlanması ve polimerizasyon aşamalarıdır.

PZR mikroorganizmaların hem tanımlamasında hem de aramasında yaygın olarak kullanılan PZR'nin en önemli modifikasyonları RT-PZR, Nested-PZR, PZR-AFLP, PZR-RFLP, PZR-RAPD ve Multiplex-PZR'dir (Arda, 1999; Türkyılmaz ve Esendal, 2002; Aydın, 2004; Sermenli, 2006; Günel, 2007; Durmaz, 2010).

Karışık maya türlerinin ve tür suşlarının ITS, IGS ve rDNA gen bölgelerinin PZR-RFLP analiz yöntemiyle parmak izi (Fingerprint) profilleri çıkarılması sayesinde bu mikroorganizmaların gruplandırılması yapılabilmektedir.

Bu yöntemin esası rRNA'yı kodlayan DNA molekülünü, PZR yöntemiyle çoğaltıp oluşan ürünleri restriksiyon enzimleriyle keserek, oluşan fragmentlerin jelde yürütülüp değerlendirilmesine dayanmaktadır. PZR-RFLP yöntemi 18S, 5.8S ve 28S'lik rDNA'lar ile ITS (Internal Transcribed Spacer) gen bölgelerinde kullanılan bir yöntemdir. Bu bölgenin fragment uzunluğu tür ve suşlara bağlı olarak 300-850 bp aralığında değişmektedir. ITS gen bölgelerinin çoğaltılmasında ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 ve ITS5 primerleri kullanılmaktadır. PZR-RFLP yöntemi rutin maya tanımlamaları için hızlı, kolay ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğu için gıda ve peynir

endüstrisinde mayaların belirlenmesi ve tanımlanmasında kullanılan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Rademaker and Savelkoul, 2009). PZR-RFLP tanımlama yönteminin güvenilirliğini arttırmak amacıyla çeşitli gen bölgelerinin (ITS, IGS ve D1/D2) DNA dizi analizi yapılmaktadır. El-Sharoud vd., (2009), Mısır'da geleneksel olarak üretilen Domiati, Kariesh, Matara (krem) peynirlerden hem taze hem de depolama süresince izole ettikleri toplam 120 maya suşu izolatlarının 40 tanesini 5.8S-ITS rDNA ve 26S rRNA (D1/D2) RFLP yöntemiyle tanımlayarak, bunların *Issatchenkia orientalis* (13), *Candida albicans* (4), *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*) (9), *Kodamaea ohmeri* (*Pichia ohmeri*) (1), *Kluyveromyces marxianus* (6) ve *Candida catenulata* (7) olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, *C. lusitaniae* hariç D1/D2 26S rRNA gen sekans analizinin maya tanımlamasında %100 doğrulukta olduğunu ve diğer gıda ürünlerinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Peynir ile ilgili Türk Gıda Kodeksi kapsamında 08.02.2015 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan ve 01.01.2016 tarihinde yürürlüğe giren Peynir tebliğine göre: “Peynir: Hammaddenin uygun bir pıhtılaştırıcı kullanılarak pıhtılaştırılması ve pıhtıdan peynir altı suyunun ayrılmasıyla, veya sütün permeatının ayrılmasından sonra pıhtılaştırılmasıyla elde edilen, farklı sertliklerde ve yağ içeriklerinde; salamura veya kuru tuzlama ile tuzlanarak ya da tuzlanmadan, starter kültür kullanarak veya starter kültür kullanmadan, telemesi haşlanarak ya da haşlanmadan, çeşnili veya çeşnisiz olarak, tekniğine uygun olarak üretilen, olgunlaştırılmadan ya da olgunlaştırıldıktan sonra tüketilen, çeşidine özgü karakteristik özellikleri gösteren süt ürünleri;” olarak tanımlanır (Anonymous, 2015).

Peynirin hammaddesi süt olduğu için insanların sağlıklı ve dengeli beslenmeleri açısından olmazsa olmaz bir gıda olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bu gıda beslenme fizyolojisi açısından, yüksek protein, esansiyel yağ asitleri içeriği, A, B₁₂, kalsiyum ve fosfor gibi öneme sahip ingredientleri içermektedir.

Peynirlerin sınıflandırılmasında çeşitli kriterler kullanılmaktadır. Bu kriterler aşağıda verilmiştir;

1. Pıhtının elde edilme yöntemine göre: Asit (setik asit, tartarik asit, sitrik asit v.d.), asit+ısı, asit+rennin+ısı ve fermentasyonla asitlendirme+ısı,
2. Sertlik ve yapı tutarlılığına göre: Çok sert, sert, yarı sert, yarı yumuşak ve yumuşak (taze),
3. Yağ içeriğine göre: Yüksek yağlı, tam yağlı, orta yağlı, düşük yağlı ve yağsız,
4. Nem oranına göre: çok yüksek nemli, yüksek nemli, orta nemli ve düşük nemli,
5. Haşlama sıcaklığına göre: Yüksek derecede, orta derecede, düşük derecede haşlananlar ve haşlanmayanlar,
6. Süt türüne göre; koyun, keçi, inek ve manda sütü,
7. Olgunlaştırma yöntemine göre: Starter bakterilerle olgunlaştırma (gözenekli ve gözeneksiz); küflerle olgunlaştırma (yüzeysel olgunlaştırma (Beyaz

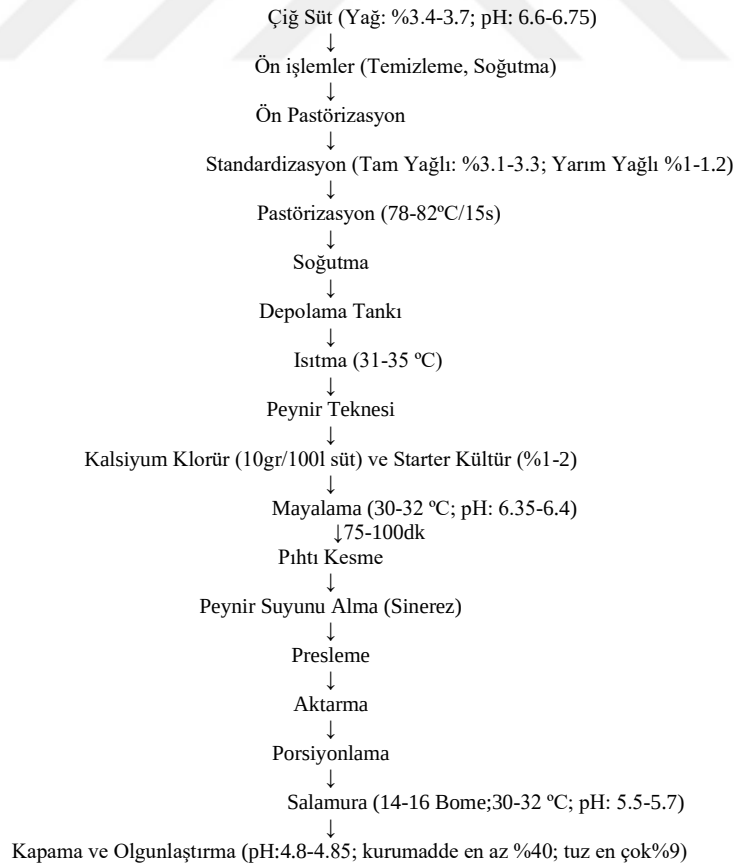
Küflü), derin olgunlaştırma (Mavi Küflü) ve yüzeysel+ derin olgunlaştırma; değişik yöntemlerle olgunlaştırılanlar ve olgunlaştırılmayanlar,

8. Ülke kökenine göre: Türk, Fransız gibi şeklinde sıralanmıştır (MEB., 2016; Hurşit ve Akgün, 2007; Koçak, 2022)

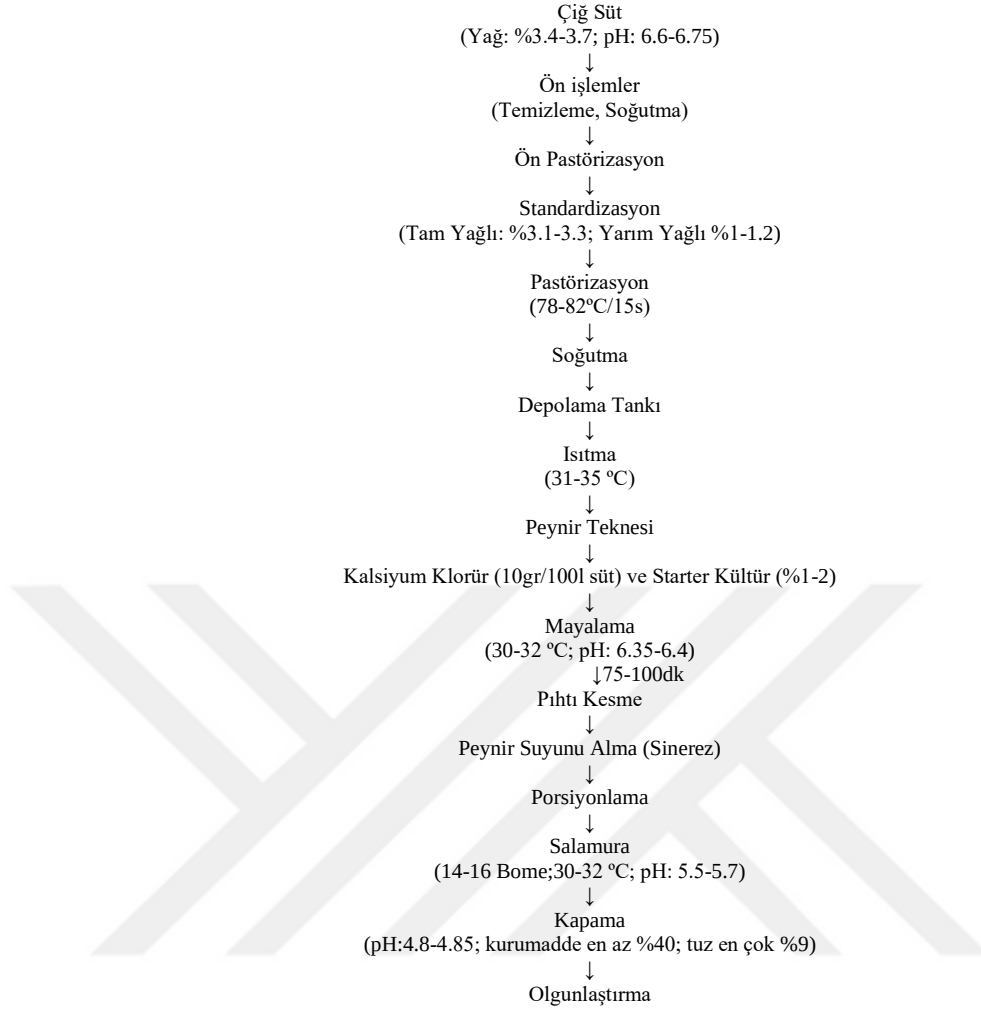
2.1.1. Beyaz Peynir

Ülkemizde beyaz peynirler Geleneksel ve Bulgar yöntemleriyle üretilmektedirler. Geleneksel peynir genellikle teneke, salamura veya Edirne olarak karşımıza çıkmaktadır. Bulgar yönteminde, ısıt işlemin büyük bir bölümü tek bir tekne içinde gerçekleştirilmektedir (Üçüncü, 2008). Bu iki proses ayrıntılı olarak Şekil 2.2 ve 2.3’de verilmiştir.

“Beyaz peynir: Hammaddenin peynir mayası kullanılarak pıhtılaştırılması ile elde edilen telemenin, tekniğine uygun olarak işlenmesiyle üretilen, üretim aşamalarındaki farklılıklara göre taze veya olgunlaştırılmış olarak tanımlanabilen, çeşidine özgü karakteristik özellikler gösteren salamuralı peynir,” olarak tanımlanır (Anonymous, 2015).



Şekil 2.2. Geleneksel yöntemle beyaz peynir üretim aşaması (Üçüncü, 2008)



Şekil 2.3. Bulgar yöntemiyle beyaz peynir üretim aşaması (Üçüncü, 2008)

2.2. Beyaz Peynirde Görülen Bozulmalar

Beyaz peynirde birçok mikroorganizma bozulmaya neden olmaktadır. Ancak bu bölümde daha çok mayaların neden olduğu bozulmalara değinilecektir. Mayalar, düşük su aktivitesi, yüksek tuz konsantrasyonu, düşük pH değeri, düşük sıcaklıkta gelişebilme yeteneği olan, belli enzim aktivitesi ve besin gereksinimi nedeniyle süt ürünlerinde, bozulmalara neden olarak önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu nedenle peynir üretiminde maya kontaminasyonunda hijyen ve sanitasyon kriterleri önemli bir faktördür (Kaynar, 2011).

Peynirlerde daha çok *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* ve *Torulopsis* cinslerine ait maya suşları bozulmaya neden olmaktadır (Kaynar vd., 2005).

2.2.1. Tat Bozuklukları

Mayalar genellikle tatlımsı, meyvemsi veya mayamsı tat ve kokuya neden olurlar. Bazen de acı tat oluşturdıkları görülmektedir.

2.2.2. Kabukta Bozulma

Sert peynirlerin kabuklarının uygun şekilde kurutulmaması maya gelişimine neden olur ve peynirde yumuşama, renk ve koku bozuklukları ortaya çıkar (Coşansu ve Ayhan, 2002; Kaynar vd., 2005).

2.2.3. Kötü Koku

Mayaların beyaz peynirde gelişmesi sonucu yabancı (kötü kokusu, maya kokusu vd.) kokulara neden olmaktadır (Kaynar vd., 2005; Üçüncü, 2008).

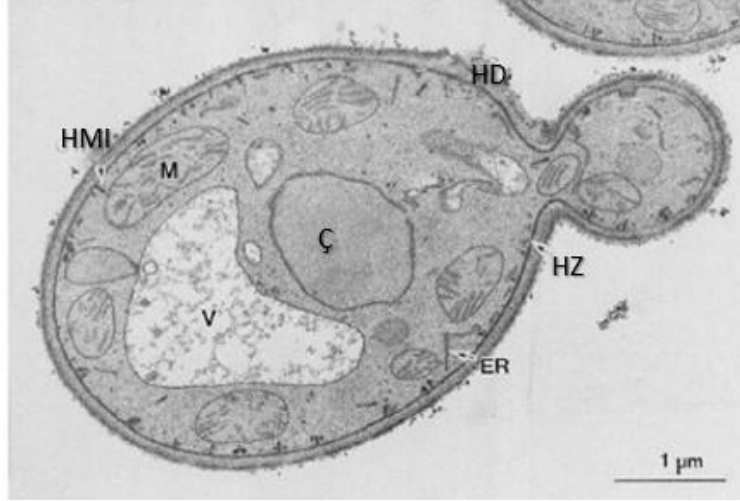
2.2.4. Gözenekli Yapı

Mayaların fermentasyonu sonucunda ortaya çıkan CO₂ gazı elips şeklinde ve değişik büyüklüklerde gözenekli yapıya neden olmaktadır (Tekinşen, 2000; Kaynar vd., 2005; Geronikou et al., 2020).

2.3. Mayalar ve Genel Özellikleri

Mayalar ilk olarak Sümerler, Babiller, Mısırlılar ve Gürcüler tarafından MÖ. 6000-2000’li yıllarda kullanılmıştır. Mayalar, bakterilerden genellikle daha büyük ve nükleuslarının daha belirgin olması ile, küflerden ise miselyum içermemeleri ile ayrılmaktadırlar (Romano et al., 2006).

Mayalar, fungusların *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* sınıfına ait, klorofil içermeyen, ökaryotik, tek hücreli mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar genellikle yuvarlak, silindirik, oval, limon şeklinde kendilerine özgü hücre yapısına sahiptirler. Maya hücresinin fizyolojik yapısı Şekil 2.4.’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 2.4. Saf Maya hücresinin fizyolojik yapısı (*Candida albicans* hücresinin elektron mikroskopundaki görünüşü) HZ, hücre zarı; HMI, hücre membran invajinasyon; HD, hücre duvarı; ER, endoplazmik retikulum; M, mitokondri; Ç, çekirdek ; V, vakuol (Schaechter, 2004)

Mayaların hücre duvarlarında glikoz, mannoz, protein, lipid ve kitin bulunmaktadır. Mayaların hücre duvar yapısı ve çoğalma şekilleri Şekil 2.5. ve Şekil 2.6.'da verilmiştir. Bu mikroorganizmalar eşeyli ve eşeysiz olarak çoğalmaktadırlar. Maya hücrelerinde çoğalma;

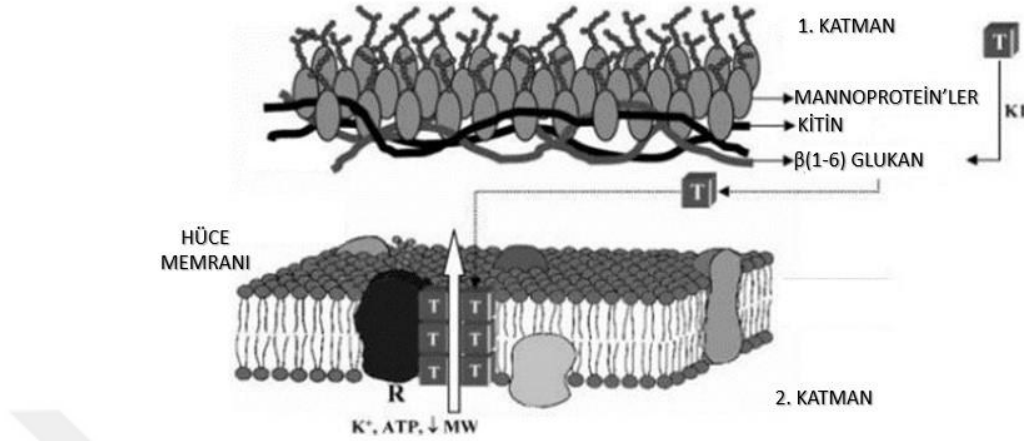
- 1. Eşeyli çoğalma:** İki hücre yan yana gelip birbirleri ile temas ettikten sonra arada bir kanal oluşturulup iki farklı gamet askospor birleşir, daha sonra vejatatif hücre meydana getirirler.
- 2. Eşeysiz çoğalma:** Maya hücresi tomurcuklanarak, bölünme ve spor ile çoğalma şekli gösterir.

Tomurcuklanarak çoğalma: Ana maya hücresinin bir tarafından dışarıya doğru çıkıntı yaptıktan sonra çekirdek bölünmesini takiben çekirdeğin (kromozom) bir tanesi tomurcuğa geçmekte ve işlem bitince tomurcuk ana hücreden ayrılmaktadır.

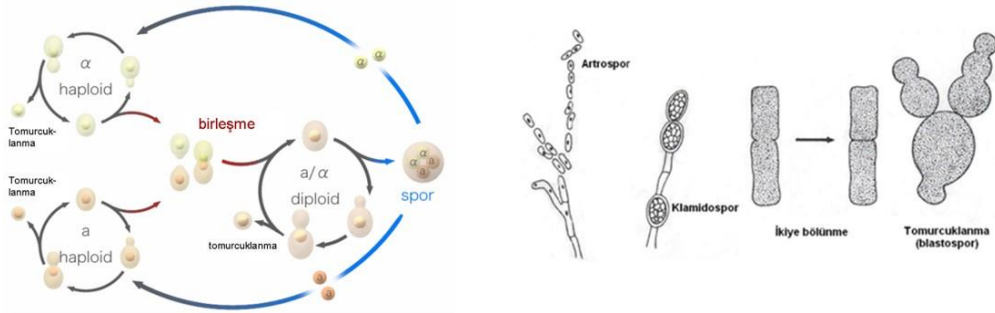
Bölünme: Mayalarda bu çoğalma şekli fazla görülmemektedir. Maya hücresi erginliğe ulaştığında hücrenin orta kısmından hücreyi ikiye ayıracak şekilde ara zarla bölünür. Çekirdek zarı çözünür ve iki yeni çekirdek meydana gelir. Bölünme tamamlandığında ana ve yavru hücre birbirinden ayrılır, bazı durumlarda bu ayrım olmamaktadır. Oluşan bu yapılara basit pseudomiselyum denmektedir.

Sporla çoğalma: Yalnızca yabani mayalarda görülür. Kalmidospor ve artrospor şeklinde görülür. Kalmidospor, örtülü spor anlamına gelir (kese içi) ve Artrospor (kese dışı), hif oluşturma yabani mayalarda görülen bir çoğalma şeklidir.

Mayalar, krem renginden pembe kırmızıya kadar değişen renkte pigmentler oluşturabilirler (Ayhan, 2000).



Şekil 2.5. Mayaların hücre duvar yapısı (Wendy, 2021)



Şekil 2.6. Mayaların çoğalma şekilleri (Knop, 2011)

Ascomycetes sınıfında bulunan mayalar belirli şartlar altında hücre içinde askospor oluştururken, *Basidiomycetes* sınıfındakiler hücre dışında basidiospor şekillendirirler (Kurtzman and Fell, 2000).

Mayalar, hava, toprak, su ve organik maddeler üzerinde yaygın olarak bulunurlar. Ayrıca, mayaların sıcak, nemli, şekerli, tuzlu, asidik ve aerobik ortamlarda gelişebildiği belirtilmiştir. Bu mikroorganizmalar karbonhidratları, organik asitleri, proteinleri ve lipitleri kullanabilmektedirler. Mayalar, 3-7.5 aralığında geniş bir pH sınırı içinde çoğalabilmektedir. Ayrıca mayaların gelişebilmeleri için karbonhidratları (Glikojenaz, laktaz, invertaz, maltaz vd), yağları (lipaz) ve proteinleri (proteinaz) hidrolize edebilen birçok enzimleri bulunmaktadır (Romano et al., 2006; Viljoen, 2006; Tunail, 2009). Mayalar, genel olarak güvenilir (GRAS) statüsünde

mikroorganizmalar olduğu için, ticari olarak çeşitli endüstri dallarında ve teknolojilerinde kullanılmaktadır. Bunlar;

- a. Gıda/Fermentasyon Teknolojisi (lezzetlendiriciler, organik asit, yoğurt, şarap, peynir, ekmek),
- b. Biyoteknolojik Ürünler (biyoetanol üretimi, çeşitli alkoller, alkanlar, karotenoid, Tek hücre proteini, tek hücre yağ üretimi, mikrobiyal enzim),
- c. Çevresel Teknolojiler (atıkları değerlendirme, bitki koruma),
- d. Biyomedikal Araştırmalar (Kanser hastalıkları, ilaç metabolizmaları, insan kalıtsal hastalıkları),
- e. Sağlık Hizmetleri Endüstrisi (İlaçlar, aşılar, hormonlar),
- f. Temel Biyolojik Araştırmalar (hücre biyolojisi; genetik, biyokimya, moleküler biyoloji) şeklinde sıralanmaktadır (Alper and Markham, 2018).

Bu mikroorganizmaların en önemli temsilcileri; *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* ve *Zygosaccharomyces* cinslerine ait suşlardır.

2.4. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Mayaların tanımlanmasında konvansiyonel, ticari test kitleri ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

2.4.1. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Konvansiyonel Yöntemler

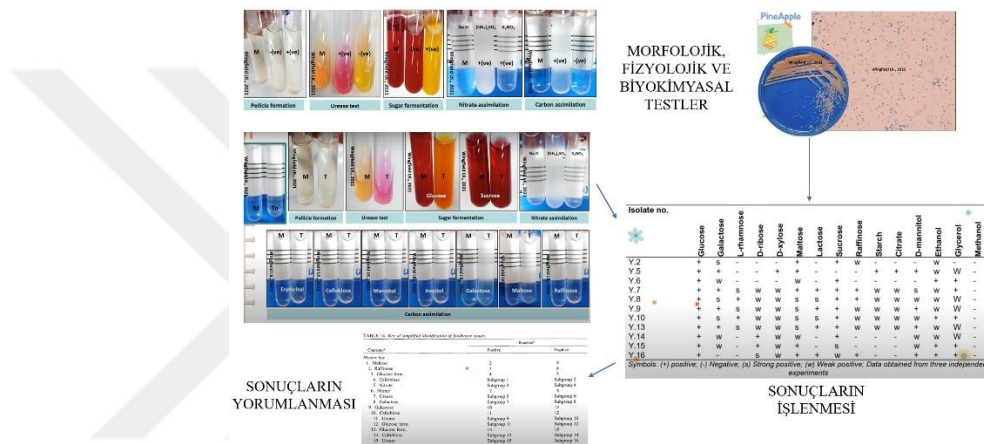
Mayaların tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel tanımlama yönteminde mayalara morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanır ve test sonuçları tanı anahtarlarında değerlendirilerek tanımlanması esasına dayanmaktadır (Barnett et al., 1990; Deak ve Beuchat, 1996; Kurtzman and Fell, 2000).

Mayalarda incelenen morfolojik özellikleri sıvı (zar oluşturma, çökelti oluşturma, vd) ve katı (koloni şekilleri, renk, kıvamı, vd) besiyerindeki yapıları, miselyum, pseudomiselyum, askospor, artrospor, ballistospor oluşturma, spor biçimi, askospordaki spor sayısı gibi makroskobik ve mikroskobik özellikler oluşturmaktadır (Lodder, 1970; Kreger–Van Rij, 1980; Kurtzman and Fell, 2000).

Fizyolojik testler; çeşitli karbon kaynaklarının fermentasyonu (maltoz, sellobiyoz, trehaloz, laktoz, melibiyoz, vd) karbon kaynaklarının (D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz, L-sorboz rafinoz, melezitoz D-ksiloz, D-riboz, L-arabinoz, D-arabinoz, D-glukozamin-HCl, N-asetil, D- glukozamin, arbutin, salisin, nişasta, inulin

D-mannitol, myo-Inositol, metanol, etanol, gliserol, propan, vd) asimilasyonu, çeşitli azot kaynaklarında (amonyum sülfat, potasyum di-hidrojen fosfat, vd) gelişme, vitamin gereksinimlerinin belirlenmesi (biotin, riboflavin), antibiyotiklere dirençlilik, jelatin sıvılaştırılması yüksek ozmotik basınçta, orta derece ozmotik basınçta ortamda, çeşitli sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarında gelişme, gibi çeşitli analizleri içermektedir (Kurtzman and Fell, 2000).

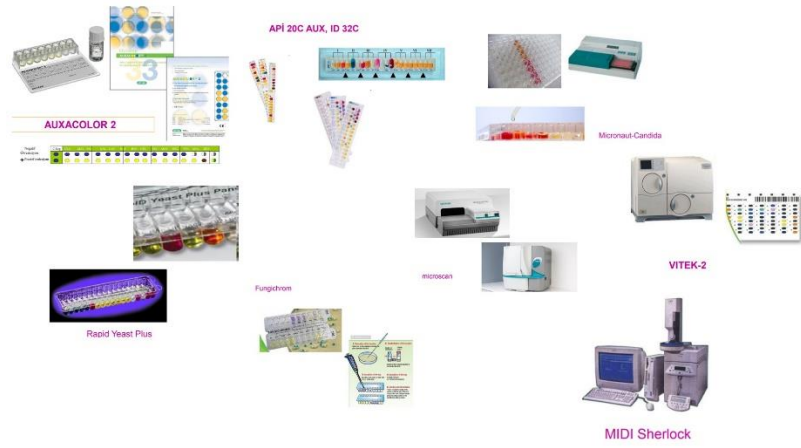
Biyokimyasal testler; DBB Reaksiyonu, üreaz reaksiyonu, coenzim Q tipi, DNA baz kompozisyonu ve DNA dizi homolojisi gibi analizler şeklinde sıralanmaktadır. Konvansiyonel yöntemleri prosedürü Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Mayaların tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel yöntem prosedürü (Wingfield, 2021)

2.4.2. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Test kitleri

Mayaların tanımlanmasında kullanılan ticari kitler minyatürize edilmiş API 20C, AUX, ID 32C, Fungichrom, Rapid Yeast Plus, Micronaut Candida, Vitek, Yeast Star ve Chomagar gibi spesifik besiyerinden oluşmaktadır. Bu ticari kitler konvansiyonel yöntemlerin ya asimilasyon analizleri yerine ya da enzim profili şeklinde kullanılabilir. Bu yöntemlerin görünüm ve sonuç değerlendirmeleri Şekil 2.8’de verilmiştir (Özkütük, 2011; Gültekin vd., 2013).



Şekil 2.8. Mayaların tanımlanmasında kullanılan test kitleri yöntemlerin görünüm ve sonuç değerlendirmeleri

2.3.3. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Teknikler

Genetik bilimi, moleküler biyoloji ve teknolojinin gelişmesinin yanında, genetik materyal hakkında elde edilen bilgilerin artmasıyla, mayaların moleküler tanımlama tekniklerinin kullanılması artmaya başlamıştır.

Konvansiyonel tanımlama teknikleri fenotipik özelliklere dayanmaktadır. Ancak bu özellikler çevresel faktörlerden etkilenmesine karşın, genotiplendirmeye dayalı moleküler tanımlama teknikleri bu faktörlerden etkilenmemektedirler (Hayden, 2004; Deak, 2007).

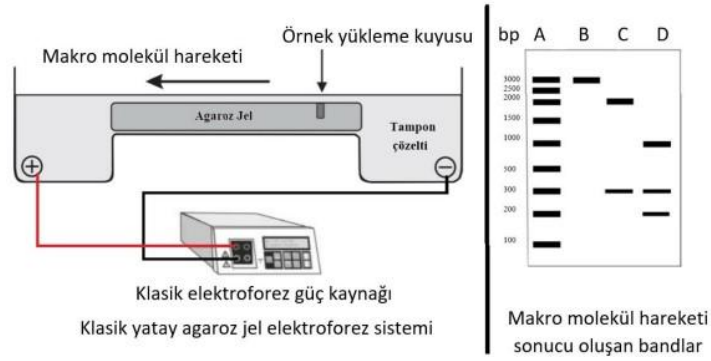
Mayaların tanımlanmasında kullanılan moleküler teknikler: jel elektroforezinin kullanıldığı direkt yöntemler, hibridizasyona dayalı yöntemler, amplifikasyon ile tarama, sekanslama ve diğer yöntemler şeklinde sıralanmaktadır (Hayden, 2004; Hierro et al., 2004).

1. Jel Elektroforezinin Kullanıldığı Direkt Yöntemler

Bu gruba giren yöntemler; Direkt Elektroforetik Yöntemler, Restriksiyon Endonükleaz Analizleri ve Pulsed-Field Jel Elektroforezi şeklinde sıralanmaktadır.

a. Direkt Elektroforetik Yöntemler

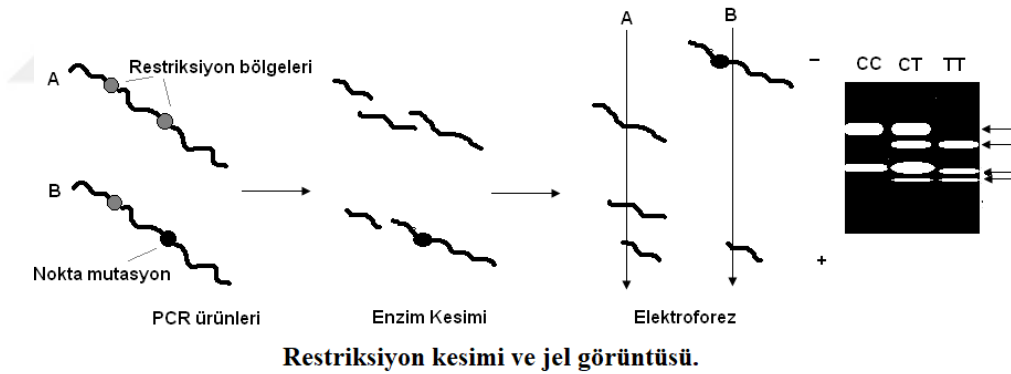
Maya hücresinin DNA'sı izole edilip, saflaştırıldıktan sonra DNA fragmentinin direkt yöntem elektroforetik ayırımına dayanmaktadır ve genel olarak kromozom boyutluna göre tanımda kullanılmaktadır (Holm et al., 1986; Ros-Chumillas et al., 2007). Bu yöntemin görüntüsü Şekil 2.9.'da verilmiştir.



Şekil 2.9. Direkt Elektroforetik yöntemlerin görüntüsü (Kavsaoğlu ve Mersinkaya, 2019)

b. Restriksiyon Endonükleaz Analizleri

Bu yöntem, ilk DNA temelli yöntem olup, maya DNA'sı DNA restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilerek oluşan fragmentler jel elektroforezinde UV ışık altında bant şeklinde görülmektedir (Fernández-Espinaret et al., 2000; Lopez et al., 2001). Bu Restriksiyon endonükleaz analiz yönteminin prensibi Şekil 2.10.'da verilmiştir.

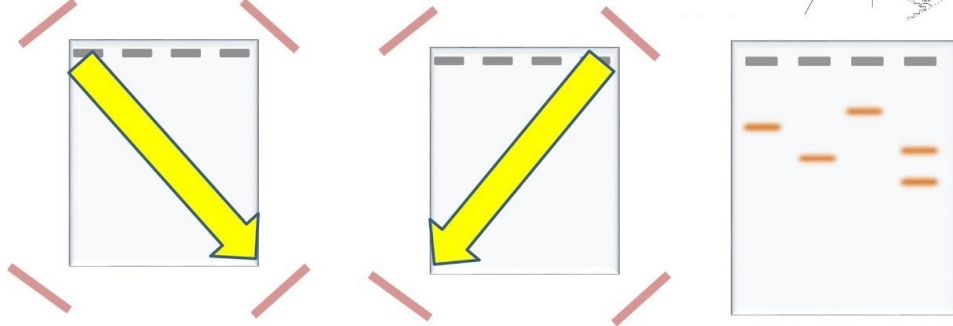


Şekil 2.10. Restriksiyon endonükleaz analiz yönteminin prensibi (Anonymous, 2022a)

c. Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE)

Mayaların DNA'ları, elektriksel alan değişimi kullanılarak genetik materyalinin molekül ağırlığına bağlı olarak dağılım göstermektedir (Yamagishi and Ogata, 1999; Gente et al., 2002). Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) yönteminin tanımlama prosedürleri Şekil 2.11.'de dir.

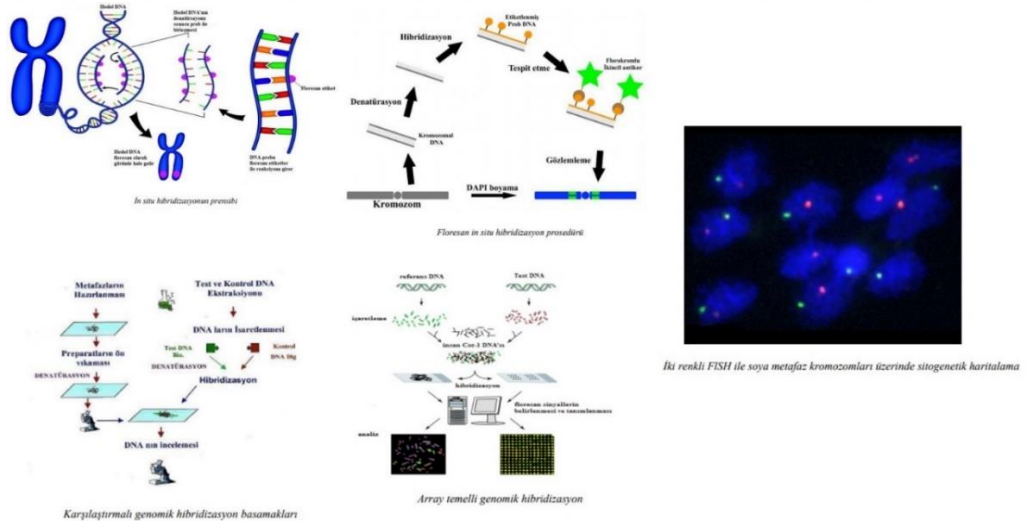
Pulse Field Gel Electrophoresis



Şekil 2.11. Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) yönteminin tanımlama prosedürleri (MN, 2022)

2. DNA Hibridizasyon Yöntemleri

DNA hibritleşmesi; birbirine eşlenik iki adet tek sarmal nükleik asit dizisinin çift sarmallı tek bir yapı haline gelmesi işlemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Anonymous, 2022b). DNA hibridizasyon yöntemlerinin çeşitleri ve bu yöntemlerin prensipleri Şekil 2.12.'de verilmiştir.



Şekil 2.12. DNA hibridizasyon yöntemlerinin çeşitleri ve yöntemlerin prensipleri (Kanev vd., 2015)

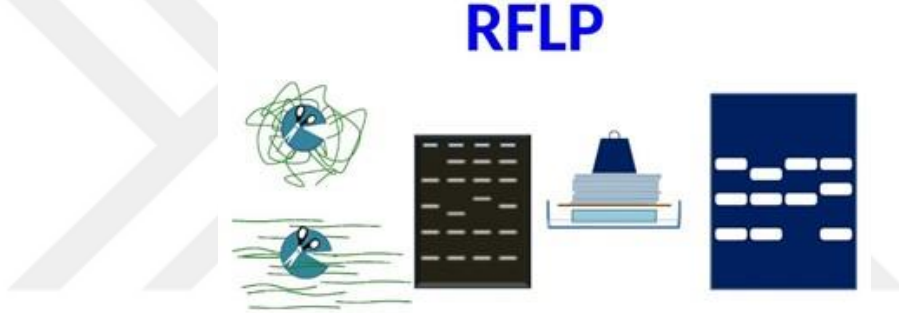
3. Amplifikasyon Teknikleri

Bu teknik, kalıp DNA'nın denatürasyonuna ve hedef alınan bölgenin çoğaltılmasına dayanmaktadır. Bu Tekniklerin en önemlileri PZR-RFLP; PZR-RAPD ve PZR-AFLP'dir.

Mayaların tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin en önemlerinde biri PZR-RFLP'dir. Bu teknikte, farklı mayaların rDNA (örn., NTS, 18S-NTS, ITS2, 18S ve 26S) genlerinin veya intergenik bölgelerinin (ITS, ETS, IGS ve NTS) bir kısmı veya bütünü çoğaltıldıktan sonra çeşitli restriksiyon enzimleri (örn., *Hae*III, *Hinf*I, *Rsa*I, vd) ile kesim yapılarak tanımlanmaktadır (White et al., 1990; Fernández-Espinar et al., 2000; Esteve-Zarzoso et al., 2003). Gen bölgesi şematik olarak Şekil 2.13.'de verilmiştir. Şekil 2.14.'de PZR-RFLP tanımlama yönteminin prensibi verilmiştir.

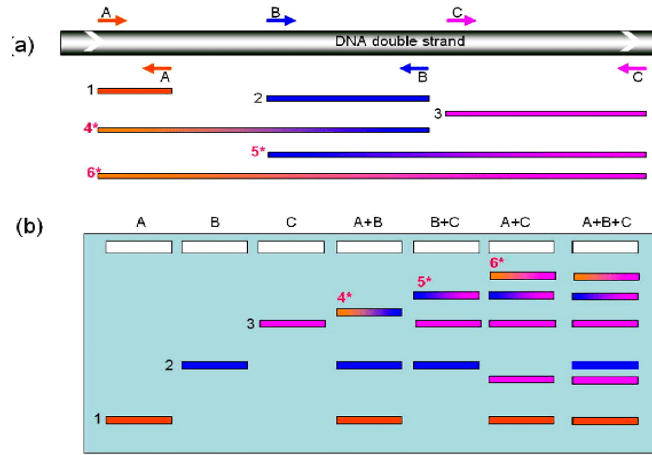


Şekil 2.13. ITS gen bölgesi şematik olarak gösterimi (Fujita et al., 2001)



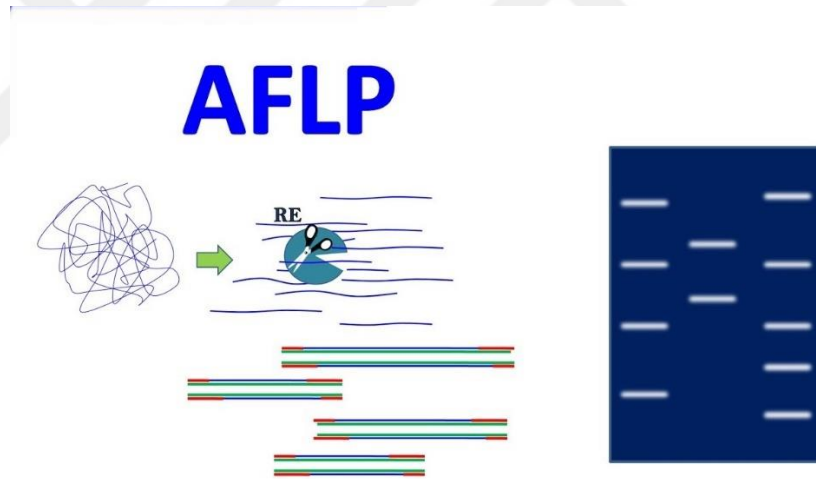
Şekil 2.14. PZR-RFLP tanımlama yönteminin prensibi (Anonymous, 2022c)

PZR-RAPD analizinde, mayaların rasgele seçilmiş DNA bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılırlar. Bu yöntemlerle mayaları tür seviyesinde ayırmak mümkündür (Romano et al., 1996). Şekil 2.15.'de PZR-RAPD tanımlama yönteminin prensibi verilmiştir.



Şekil 2.15. PZR-RAPD tanımlama yönteminin prensibi (Alzohairy, 2015)

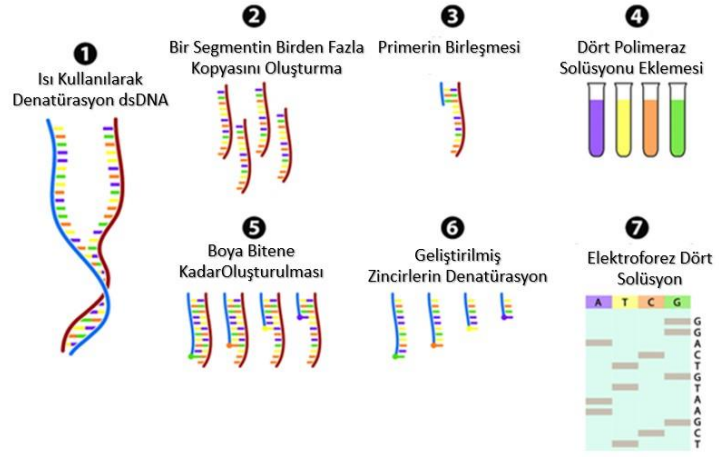
PZR-AFLP (Amplifiye Edilmiş Fragment Uzunluklu Polimorfizm) analiz yönteminde, maya DNA'sında restriksiyon kesimleri rastgele seçilmiş bölgelere göre maya tanımlamaları yapılmaktadır. Şekil 2.16.'da PZR-AFLP tanımlama yönteminin prensibi şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.16. PZR-AFLP tanımlama yönteminin prensibi (Montaño-Pérez et al., 2006)

4. Sekanslama

Mayaların DNA sekansı tanımlanmasının en önemli yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde mayanın genetik materyalleri, otomatize edilmiş cihazlarla (örn., the ABI Prism capillary electrophoresis sequencer) klonlanmasına dayanmaktadır. Genetik bölgeler ITS ve D1/D2 olabileceği gibi, spesifik bölgeler de olabilmektedir. Bu tanımlama yönteminin işlem basamakları Şekil 2.17.'de verilmiştir.



Şekil 2.17. Sekanslama tanımlama yönteminin işlem basamakları (Anonymous, 2019)

5. Diğer Analizler

Mayaların tanımlanmasında diğer moleküler tanımlama yöntemleri Real-Time PZR, Microsatellite (SSR), Green Fluoresans Protein, Microarray, MALDI-TOF mass spectrometry gibi şeklinde sıralanmaktadır (Chalupová et al., 2014).

3. KAYNAK ÖZETLERİ

İnsanoğlu 8000 yıldan beri fermentasyon ile ilgilenmiştir. Mayaların alkol ürettikleri M.Ö. 6000 yıllarında bilinmekteydi. Süt, et, sebze ve meyvelerin muhafazaları ve özel bir lezzet kazanmaları amacıyla fermentasyon işlemine tabi tutulması eski çağlardan beri bilinen bir yöntem olup, önemini günümüzde de korumaktadır (Güneri, 1993; Borcaklı ve Karakuş, 1992). Bu mikroorganizmaların çeşitli endüstri alanlarında özellikle fermentasyon ve biyoteknoloji alanında kullanım alanlarındaki çalışmalara hız verilmiştir. Bu çalışmalar, mayaların tek hücre proteini, etanol, metanol, n-alkan, sitrik asit, lipaz enzim, γ -dekalakton ve β -karoten üretimidir (Groenewald et al., 2014).

Mayalar beyaz peynirde rahatlıkla gelişebilirler bunu nedeni olarak bu mikroorganizmaların geniş aralıklı su aktivitelerinde, pH ve sıcaklık yeteneklerinin yanında enzim aktivilerinin yüksek olması gelmektedir. Beyaz peynirde gelişen mayalar acı tada, mayamsı tada, kötü kokuya, gaz oluşumuna, yumuşamaya ve istenmeyen gözenekli yapı oluşumu gibi istenmeyen yapı ve duysal değişikliklere sebep olmasıyla çeşitli bozulmalara yol açar. Bu durum beyaz peynirde çeşitli kalite ve ürün kayıplarının düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca maya sayısının fazlalığı işletmelerde hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulmadığının önemli bir göstergesi olarak görülmektedir (Jakobsen and Narvhus, 1996; Ünlütürk, 2003; Kaynar, 2011; Yerlikaya, 2018). Gülmez ve Güven, (2001) yılının Eylül-Ocak aylarında Kars ilinde çeşitli satış yerlerinden elde edilen 30 adet peynir örneğinin mikroflorasının belirlenmesi için yapılan çalışmada maya sayısı 1.5×10^9 kob/g olarak bulmuşlardır. Araştırmada, Ülkemizde üretilen peynirlerin çoğunun yetersiz hijyen koşullarında küçük işletmelerde üretildiklerini ve ambalajsız olarak satışa sunulduğunu belirterek bu durum halk sağlığı ve ürün kalitesi açısından büyük risk teşkil edeceği konusunda uyarılarda bulunmuşlardır. Uğurdoğan (2020), İstanbul ilindeki farklı marketlerden farklı zamanlarda toplam 20 farklı marka peynir örneğinin duysal, kimyasal ve mikrobiyolojik katitelerin yaptığı bir çalışmada maya sayısını ortalama 3.33 ± 0.69 logkob/g olduğu bulmuştur. Araştırmacı, bu sonucun literatürlerle karşılaştırabileceğini, çünkü Türk Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde (TGK) peynirlerin maya-küf sayısı ile ilgili herhangi bir sınırlamanın bulunmadığı konusunda dikkati çekmiştir.

Bu nedenle gıdalarda, özellikle de beyaz peynirlerde bulunan mayaların tanımlanması ürün kalitesi ve insan sağlığı açısından çok önemli olduğu için, tanımlamada kullanılan çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler konvansiyonel tanımlama yöntemleri, hızlı test tanımlama yöntemleri ve PZR tekniğiyle tanımlama yöntemi şeklinde sıralanmaktadır. Günümüzde araştırmacılar, moleküler yöntemler arasında yer alan PZR tekniğiyle maya tanımlama yönteminin diğer tanımlama yöntemlerine göre daha güvenilir, pratik ve hızlı olması nedeniyle bu yönetime ilgi duymaktadırlar.

Fleet ve Mian (1987), Sydney kentinde satışa sunulan çeşitli süt ve süt ürünlerinin (pastörize süt, krema, yağ, dondurma, yoğurt ve peynir) oluşturduğu toplam 161 örnek üzerinde mayaların tanımlanması ve sayımı üzerinde bir çalışma yapmıştır. Mayaların tanımlanmasında morfolojik olarak spor yapısı (spor oluşturma), psuedomycelium oluşturma ve tomurcuklanması incelenmesinin yansira karbonhidrat asimilasyonu, karbonhidrat fermentasyonu, nitrojen asimilasyonu, vitamin kullanımını, nişasta hidrolizi, kazein hidrolizi, gibi bir takım biyokimyasal testleri Kreger–Van Rij’in (1984) konvansiyonel tanımlama yöntemini kullanarak *Candida famata*, *Kluyvermyces marxianus* (*K. marxianus*) ve *Candida diffluens* (*C. diffluens*) türlerini tanımlamışlardır.

Coppola vd., (1988), toplam 16 Mozeralla peynir altı suyunun mikroflorasında Bütirik, Propionik asit ve laktik asit bakterilerinin yanında, *Candida*, *Kluyvermyces*, *Debaryomyces* ve *Brettanomyces* cinsi mayaların da bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu mikroorganizmaların tanımlanmasında mayaların makroskopik, mikroskopik ve biyokimyasal özelliklerine dayalı konansiyonel yöntemlerden yararlanmışlardır. Araştırmacılar sonuç olarak proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip suşların gelişmesini, peynir üretiminde kullanılan hammaddeye ve çevre koşullarına bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Jordano vd., (1991), İspanya’da üretilmiş *Bifidobacteria* cinslerine ait suşları içeren ticari fermente edilmiş yirmi farklı süt ürününü kapsayan örneklerin mikroflorasını incelemişler ve örneklerin %30’ unda 10^2 kob/g veya daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmada mayaların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemde kullanılan analiz sonuçlarını Lodder’in (1970) önerdiği standart tanımlama anahtarının yanında API 20C AUX enzim test kiti kullanarak izole edilen maya suşlarını *Torulopsis candida* olarak saptamışlardır.

Haridy (1992), 1990 ve 1991 yıllarında Mısır'ın Al-Minia şehrinden toplanan çiğ süt örneklerini incelediği toplam 126 maya izolatını, Lodder'ın (1970) ve Kreger Van Rij'in (1987) önerdiği morfolojik ve biyokimyasal testleri uygulayıp elde edilen sonuçları bu kaynaklarda bulunan tanı anahtarlarına göre değerlendirmişlerdir. Araştırmada, test sonuçlarının değerlendirilmesine göre izole edilen maya suşları *D. hansenii*, *Clavispora lusitaniae* (*Cl. Usitaniae*), *K. marxianus*, *Trichosporon beigeli* ve *Rhodotorula mucilaginosa* olarak tanımlanmıştır. Araştırmacı, *T. beigeli* ve *R. mucilaginosa* patojenik maya türleri yer aldığından, bunlarla çalışıldığında dikkat edilmesi gerektiğini belirtmiştir.

Mendonça-Hagler vd., 1993 yılında, *Metschnikowia* cinsine ait olduğu düşünülen suşların 18s ve 25s rRNA bölgelerini sekans analizine tabi tutarak filogenetik ilişkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar tarafından, Agricultural Research Service Culture Collection ve National Center for Agricultural Utilization Research Arizona' dan temin edilen örneklerde su (*Metschnikowia australis*, *M. bicuspidata*, *Metschnikowia krissii* ve *M. zobellii*) ve toprak (*M. hawaiiensis*, *Metschnikowia lunata*, *M. pulcherrima*, *M. lunata* ve *M. hawaiiensis*) belirtmişlerdir. *Saccharomyces cerevisiae*'nin RNA dizini referans alan araştırmacılar, primeleri 5'-GGTCCGTGTITCAAGACGG-3' (25s), 5'-TTGGAGACCTGCTGCGG-3' (25s) ve 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3' (18s) Applied Biosystems model 381A DNA sentezleyicisinde sentezleyerek sekans analize tabi tutmuşlardır. Elde edilen sekans verileri DNAML v3.42, PAUP v2.4.1 ve PHYLIP v3.42 bilgisayar programlarıyla sırasıyla Maximum-Likelihood, Parsimony ve Neighbor-Joining (Maximum-Likelihood) analizleri yapıp filogenetik ağaçları oluşturulup değerlendirmiş ve *M. lunata* ve *M. hawaiiensis* daha iyi ayrıldığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, rRNA sekans analizinin *Metschnikowia* cinsinde kuşku sonuçlar vermesinin yanında, yeni cinslerin anlaşılmasında iyi bir yöntem olabileceği sonucuna varmışlardır.

Yamada vd., 1994 yılında askospor yapıları şapka biçimli, nitrati asimile edebilen ve önceden *Hansenula* cinsinde bulunan 27 maya suşu izolatını 18S ve 26S rRNA bölge esasına dayanan filogenetik sınıflamasını yaptıkları çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'nin 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3' (18S rRNA' nın), 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' ve 5'-TTGGAGACCTGCTGCGG-3' üç DNA primerini kullanarak PZR-RFLP parmak izi yöntemiyle maya izolatlarını 7 gruba ayırmışlardır. Araştırmada II, III ve IV. gruplarında bulunan maya cinslerinde üç yeni

cins (*Ogataea*, *Kuraishia* ve *Nakazawaea*) bulunmuştur. Araştırmacılar bu yeni mayaların cinlerine ait suşları *Ogataea minuta* (*Pichia minuta*), *Kuraishia capsulata* (*Pichia capsulata*) ve *Nakazawaea holstii* (*Pichia Holstii*) şeklinde sıralamışlardır.

Liu vd., (1996) tarafından, Tayland'ın üç şehrinde toplanan Haipao çay örneklerinde yapılan mikrobiyel analizlerde çeşitli selektif besiyerileri kullanarak iki asetik asit bakteri suşu ve üç maya suşu izole edilmiştir. Mayaların tanımlanmasında morfolojik analizi askospor oluşumunu (Dalmau Plate yöntemiyle) Kreger–Van Rij'in (1984) önerdiği, biyokimyasal testlerde ise Barnett vd.'in (1990) önerdiği konvensiyonel yöntemleri kullanmışlardır. Araştırma sonucunda Haipao çayında bulunan baskın mayaları, *S. cerevisiae*, *Zaccharomyces bailii* (*Z. bailii*) ve *Brettanomyces bruxellensis* olarak tanımlamışlardır. Mayanın, gelişme gözlemlenen sıvı besiyerinde, gliserol, asetik asit ve etanol içeren bileşikler, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yoluyla analiz edilmiştir.

Valdes-Stauber vd., (1997), Almanya'da 6 süthaneden temin edilen 21 peynir örneğinde mayaları ve bazı bakterileri belirleme için yaptıkları çalışmada önemli sayıda *Arthrobacter nicotianae*, *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *C. variabilis* ve *Bhodococcus fascians* tespit edildiğini belirtmektedir. Çalışmada, mayaların biyokimyasal testler Barnett vd.'in (1990) önerdiği konvensiyonel yöntemleri mikropate şeklinde kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirmesinde Barnett'in (1994) geliştirdiği bilgisayar programından yararlanılmışlardır. Çalışma sonunda, rennet ve asit eklenmesiyle yapılan pıhtıdan elde edilen peynirlerin maya yükünün birbirinden farklı olduğunun görüldüğü, sadece rennet eklenmesiyle yapılan pıhtıdan elde edilen peynir örneklerinde *D. hansenii* ve *Galactomyces geotrichum* türleri, sadece asit eklenmesiyle yapılan pıhtıdan elde edilen peynir örneklerinde ise *K. marxianus* ve *Pichia membranaefaciens* türleri bulunmuştur. *C. valida* ve *G. candidum* içeren ticari maya kültürlerinin, rennet peynirlerinin olgunlaşma işleminde uygun olmayabileceğini belirtmişlerdir.

Şahin ve Öztürk (1998), 1996-1997 yıllarında Tekirdağ ve Bursa yörelerinden sağladıkları toplam 52 adet peynir örneğinin maya florası ve peynirlerin kimyasal yapısını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada peynir örneklerinden izole edilen 113 adet maya suşunun tanısı için morfolojik ve biyokimyasal testleri Lodder'in (1970) ve Kreger–Van Rij'in (1984) konvensiyonel tanımlama yöntemini kullanarak uygulamışlar, elde edilen bulguların değerlendirilmesinde izole edilen maya suşlarının

Candida, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* ve *Trichosporon* cinslerine ait olduklarını saptamışlardır.

Welthagen ve Viljoen (1999) tarafından, Cheddar peynirinin yapımı sırasında kontamine olan mayaların kaynağını ve bulaşan maya suşlarını belirlemeye yönelik olarak peynir fabrikasında yürütülen araştırmada, peynirin üretiminin çeşitli aşamalarından toplam 77 maya suşu izole edilip tanımlanmıştır. Mikrobiyolojik analizi yapılan peynir örneklerinde maya sayısını 9×10^2 ile 1.4×10^7 kob/g arasında değiştiği ve Kreger–Van Rij’in (1984) konvansiyonel tanımlama yöntemini kullanarak baskın maya suşlarının *D. hansenii* ve *Cr. albidus* olduğu saptanmış, bu iki suşun peynir üretiminde kullanılan alet-ekipmanlardan, çalışanlardan ve üretim hattından kontamine olabileceği belirlenmiştir.

Dlauchy vd., (1999), maya suşlarının tanımlanmasında kullanılan yöntemleri basitleştirmek için yaptıkları çalışmada, 128’i gıdaları bozan (içecek, şarap, bira ve gıdalardan) olmak üzere toplam 169 maya suşunu National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM), Budapeşte’den temin ederek tanımlamışlardır. Araştırmada, 18S rRNA kodlu, DNA sekansına komşu ITS1 bölgesini PZR-RFLP ile analiz eden araştırmacılar, moleküler düzeyde tanımlamadan önce maya suşlarını Kreger–Van Rij (1984) ve Barnett vd.’in (1996) uyguladığı konvansiyonel tanımlama yöntemler ile tanımlamışlardır. Maya DNA izolasyonu yöntemi olarak Molnar vd.’in 1995 yılında kullandığı yöntemi modifiye ederek DNA izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. PZR aşamasında, NSI 5' GTAGTCATATGCTTGCTC 3' ve ITS2 5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3' primerlerini kullanmışlardır. Araştırmada, PZR ürünlerini *HaeIII*, *MspI*, *AluI* ve *RsaI* restriksiyon enzimleriyle kesip RFLP analizine tabi tutarak, elektroforezde elde edilen sonuçlarını Molecular Analysis Fingerprint 2.0 software yazılımı ile değerlendirmişlerdir. Filogenetik analizde Jaccard benzerlik matrisine göre yapıp, kümeleme ve filogenetik ağaç yapımı için UPGMA yöntemini kullanmışlardır. Değerlendirme sonunda rDNA parmak izi analizinin taksonomi çalışmalarında hızlı ve suş seviyesinde sonuç verdiği belirtilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, kullandıkları dört enzimin mayaların tanımlamasına uygun olduğunu vurgulamışlardır.

Pereira-Dias vd., (2000) tarafından, Portekiz’de Evora Bölgesinde çiğ süttten imal edilen, yarı sert koyun peynirinde maya florasının incelendiği çalışmada, pıhtıdan ve olgunlaşma periyodu sırasında peynir örneklerinden 344 maya suşu izole edilerek,

Kreger–Van Rij’in (1984) önerdiği konvansiyonel tanımlama yönteminin yanında, enzim sistemine dayalı API ID 32 C tanımlama sistemleri kullanılması sonucunda baskın türlerin *D. hansenii* ve *C. intermedia* olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, API ID 32 C tanımlama sistemiyle tanımlamanın yorucu ve elde edilen sonuçların şüpheli olduğunu belirterek, tanımlama kalitesinin zayıf olduğu durumlarda ilave testlerin kullanılmasını önermişlerdir.

Barrio vd., 2000, *Saccharomyces* cinsine ait 29 maya suşunun doğruluğunu belirlemek amacıyla, Querol vd.’in (1992) önerdiği maya DNA izolasyon yöntemiyle elde edilen DNA’ları ITS1 ve ITS4 primerlerinin yanında *AluI*, *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *HpaII*, *NdeII* ve *ScrFI* restiraksiyon enzimlerini kullanarak, PZR-RFLP analizini yapıp moleküler olarak tanımlamışlardır. PZR-RFLP elektroforez bant sonuçlarını konuyla ilgili çeşitli literatürleriyle karşılaştırmışlardır. Bu karşılaştırma sonucunda 29 maya suşunun *Saccharomyces sensu stricto*, *Saccharomyces sensu lato*, *Saccharomyces kluyveri* ve *Saccharomyces barnettii* olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, PZR-RFLP tanımlama yönteminin doğruluğunu kanıtlamak amacıyla ITS1, ITS2 ve ITS3 primerlerini kullanarak DNA sekans analizini yapmışlar, elde edilen sekansları Clustal X ve Clustal W bilgisayar programlarıyla hizalayıp, Maximum Parsimony (MP) filogenetik analize tabi tutup DNAPARS ve PHYLIP MP filigenetik ağaçlarını çizdirmiştir. Araştırmada mayaların tanımlamasında PZR-RFLP ve DNA sekans tanımlama yöntemlerinin *Saccharomyces sensu stricto* suşu dışında diğer sonuçlarda tutarlılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Cosentino vd., (2001) tarafından, farklı çeşit Sardinian caciotta, ricotta pecorino ve feta gibi çeşitli koyun peynirlerinin oluşturduğu toplam 160 adet örnekten izole edilen maya suşlarını Lodder (1970), Kreger–Van Rij (1984) ve Barnett vd., (1990)’nın önerdiği biyokimyasal ve morfolojik testler doğrultusunda yaptıkları değerlendirmelere göre, *D. hansenii*, *G. candidum*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *Dekkera anomala*, *Yarrowia lipolytica*, *R. rubra*, *C. catenulata*, *C. sake*, *Pichia fermentans* ve *P. membranaefaciens* olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar, peynir örneklerinde *D. hansenii*’ni baskın tür olarak saptamışlar ve bu mikroorganizmanın sert peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılmasının umut verici olacağını belirtmişlerdir.

Petersen vd., (2001), Danimarka’da bir mandıradan pastörize süt, salamura ve olgunlaşma sırasında peynir yüzeyinden alınan örneklerde *D. hansenii*’nin özel önemini vurgulamak amacıyla yapılan bir çalışmada, maya ve bakteri suşlarını içeren

kompleks bir mikrofloradan oluşan Danbo tipi peynir örnek olarak kullanılmıştır. İzole edilen mayaların makro ve mikroskopik karakterleri Kurtzman ve Fell'e (2000) göre yapılırken asimilasyon analizi API ID 32 C kit ile yapılmıştır. Araştırmacılar ITS1 ve ITS4 primerlerini *Bam*HI, *Dpn*I, *Fnu*4HI, *Hae*III, *Hind*III, *Hpa*II, *Nla*II, *Sau*3AI ve *Taq*I restiriksiyon enzimlerini kullanarak PZR- RFLP analizine tabi tutmuşlardır. Çalışma sonunda *Trichosporon spp.*, *Rhodotorula spp.*, ve *Candida spp.*, gibi maya suşlarının peynirin olgunlaşmasının başlangıç döneminde *D. hansenii* suşlarına kıyasla daha düşük miktarlarda bulunurken, başlangıçtan itibaren tüm olgunlaşma süresi boyunca baskın maya türünün *D. hansenii* olduğu ve üretim esnasında bu suşun çevre koşullarına diğer suşlardan daha iyi adapte olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca, laktoz ile suşların çoğalma yeteneklerinin değiştiği, olgunlaştırmanın ilk günlerinde mayaların baskın olmasına karşın, olgunlaştırmadan yaklaşık beş gün sonra maya popülasyonunun azaldığı belirtilmiştir.

Hierro vd., (2004) yılında önceden tanımlanmış İspanya Tipi Kültür Koleksiyonu (CECT) 41 şarap maya suşunu PZR metodu ile tekrarlama amacıyla yaptıkları araştırmada, REP-PZR, ERIC-PZR ve PZR-RFLP 5-8S/ITS olmak üzere üç PZR yöntemini kullanmışlar, maya DNA izolasyonunu Querol vd., (1992)'ye göre yapmışlardır. PZR-RFLP *Cfo*I, *Hae*III ve *Hin*fI restiriksiyon enzimlerini kullanarak, PZR-RFLP bant sonuçlarını Guillamón vd., (1998) ve Esteve-Zarzoso vd., (1999) literatürleriyle karşılaştırmışlardır. Araştırmada, moleküler yöntem ile tanımlanan maya suşlarının *Candida boidinii*, *C. stellata*, *Hanseniaspora uvarum*, *D. bruxellensis*, *Schiz. pombe*, *T. delbrueckii*, *Issatchenkia terricola*, *Z. rouxii* ve *S. bayanus* oldukları belirtilmiştir. Araştırmacılar, bu üç yöntemi hızlı, basit ve güvenilir olarak bulmuşlar ve endüstriyel alanda mayaların tanımlaması için bu yöntemleri kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Lore vd., (2005) tarafından Kenya'nın orta kesimindeki deve çiftliklerinde geleneksel olarak deve sütünden üretimi yapılan 15 adet "Suusac" peynirlerden oluşan örneklerin mikroflorasının incelendiği çalışmada, en sık izole edilen türler olarak (%24) *Leuconostoc mesenteroides* var. *mesenteroides*, (%20) *Candida krusei* ve (%16) *Lactobacillus plantarum* olduğu belirtilmektedir. Araştırmacılar izole edile mayaların tanımlanmasında, Harrigan ve McCance (1986)'nın önerdiği koloni karakteristikleri, besiyerindeki vejetatif formu, rengi, hif veya pseudohif şekli ve

askospor oluşumuna bakılması gibi morfolojik analizlerin yansıra asimilasyon testleri için API 20C AUX test kitinden yararlanmışlardır.

Lopandic vd., 2006 yılında Avusturalya'nın çeşitli marketlerinde satılan taze, mavi, olgunlaştırılmış ve yarı olgunlaştırılmış 99 adet peynir örneğinden elde edilen maya suşlarını morfolojik testleri (gerçek hif ve pseudohyphae, pigment oluşturmaları, vejatatif formasyon v.d.) ve Rohm vd., (1992) ve Yarrow (1998) yıllarında önerdiği karbonhidrat asimilasyonu, fermentasyonu, nitrat asimilasyonu, diazonium blue B (DBB) reaksiyonu gibi 60 adet biyokimyasal testi mikropate yöntemiyle yapmışlardır. Elde edilen test sonuçlarını Barnett vd.,' in (1994) yılında geliştirdiği maya tanımlama bilgisayar programında değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçların doğruluğunu belirlemek amacıyla primers ITS3p (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') ve NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primelerini kullanarak RAPD-PZR parmak izi analizi yöntemiyle mayaları gruplandırmışlardır. Grupları kesinleştirmek için NL1 ve NL4 primerlerinden yararlanmak suretiyle 26S rRNA (D1/D2) sekans analizi yapıp, NCBI, EMBL ve DDBJ gen bankalarıyla sonuçları değerlendirmişlerdir. Gruplandırılması yapılan maya suşlarının tanımlamalarının kesinleştirilmesinde dört spesifik primer kullanılarak RAPD-PZR parmak izi analizi yapıp, elde edilen veriler, yapılan diğer analizler ve literatür ile karşılaştırılarak mayaların tanımlamaları yapılmıştır.

Ros-Chumillas vd., (2007), portakal sularında gelişen mayaların hızlı DNA izolasyonunu amacıyla *S. cerevisiae* (Nr. CECT 1942) referanslı kültürü portakal sularına inoküle ederek; gelişen kültürleri maya extract buffer ve CTAB buffer'lı DNA izolasyon protokollerinin tek tek kullanılmalarının yanında bu iki protokolden sonra Silica Danaplasmid Miniprep Kit'ni kullanmışlardır. Araştırmacılar bu DNA izolasyon protokolünü karşılaştırmışlardır. Elde edilen maya DNA' larını White et al. (1990)'ın önerdiği ITS 1 ve ITS 4 primerlerini kullanarak PZR yöntemiyle elektroforez ürünlerini karşılaştırmışlardır. Ayrıca kontrol amaçlı Entrez/NCBI' den sekans analizi yapmışlardır. Maya extract buffer protokolüyle elde edilen DNA pelletinin çok jelimsi olduğu belirtilmiştir. İdeal maya sayısını 10^6 kob/ml ve DNA hacminin 5-20 µl olarak bulmuşlardır. CTAB buffer ile DNA jelimsi pelletten polisakkaritleri uzaklaştırmanın çok zor olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmada mayaların izolasyonu için en düşük kontaminasyon seviyesinin 10^3 kob/ml olduğu, maya extract buffer protokolünden

Silica Danaplasmid Miniprep Kiti kullanılan yöntemde polisakkaritlerin ve diğer inhibitör elementlerin ortamdan kaldırıldığı belirtilmiştir.

Yalçın 2007, farklı beyaz peynirlerde bozulmaya neden olan 92 maya suşu izole etmiş ve bu izolatların konvensiyonel tanımlamasını Barnett ve et al.'a (2000) göre yaparak, *Debaryomyces hansenii* (%32.6), *Kluyveromyces marxianus* (%18.5) ve *Yarrowia lipolytica* (%17.4), *Pichia*, *Torulaspora*, *Candida*, *Williopsis* ve *Galactomyces* olarak tanımlamıştır. Araştırmacı mayaların tanımlanmasında kümeleme analizini yapabilmek için Biodiversity 2.0 programını kullanmıştır. Fenotipik tanımlamada 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 PZR amplifikasyonu (ITS-PZR) ile genotipik olarak karakterize edilmiştir. Araştırmada oluşan bant uzunluklarına bağlı olarak kümeleme analizi yapılarak Biodiversity 2.0 programıyla değerlendirilip ağaç çizimi yapılmıştır. Yapılan genotipik tanımlama sonucunda, 15 *Y. lipolytica* ve 25 *D. hansenii* suşları biyokimyasal ve fizyolojik karakteristiklere dayalı konvensiyonel yöntemler kullanıldığında, tanımlamanın uzun zaman aldığı ve çoğunlukla yanlış olduğu sonucuna varılmıştır. Araştırmacı, ITS-PZR yönteminin, konvensiyonel yöntemine göre daha hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir ve daha ekonomik olduğunu belirtmiştir.

Jeyaram et al., (2008), Hindistan'da geleneksel bir şarap olan "Hamei" maya florasını incelemek amacıyla 2004 yılında Khurkhul, Sekmai, Mahabalikhun, Dewlaland, Keikhu, Sangaithel Choubok, Andro, Keinou, Jiribam, Sangaiprou, Kabuikhul, Irilbung bölgelerinden örnekler alınıp, mayalar izole edilmiştir. Araştırmacılar, izole edilen mayaları mikroskoptaki görünüşlerine göre ayırıp 163 adet farklı maya kolonisi izole etmişlerdir. Araştırmada kontrol grubu olarak Microbial Type Culture Collection Institute of Microbial Technology (IMTECH) referanslı maya suşları kullanılmıştır. Araştırmacılar saf maya kültürlerinden bir öze dolusu alıp ITS1 ve ITS4 primerlerini kullanarak PZR ürünü elde etmişler, daha sonra bu ürünü Esteve-Zarzoso vd., (1999) ve Granchi vd., (1999)'in önerdikleri yöntemlere göre *Hae* III, *Hinf* I ve *Cfo* I' in yanında *Dde* I, *Msp* I, *Hind* III ve *Eco*RI restriksiyon enzimlerini kullanarak kesmişler; elektroforez sonuçlarını Quantity One v. 4.5.1 bilgisayar programıyla değerlendirip gruplandırmışlardır. Araştırmada elde edilen grupları Schwartz and Cantor (1984)'te uyguladıkları protokolü modifiye ederek Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) ve Querol vd.,'in (1992) yılında önerdiği mitekoniyal DNA

PZR-RFLP tanımlama yöntemlerine tabi tutmuşlardır. Elde edilen verileri NTSYS v 2.20f programıyla gruplandırıp PFGE sonuçlarını, verilerin UPGMA işlenmesinde aritmetik ortalamalarını ve PFGE sonuçlarını UPGMA işlenmesinde ise Jaccard benzerlik katsayısını kullanarak, PAST v. 0.82. bilgisayar programında filogenetik analize tabi tutmuşlardır.

Huihui Sun vd., (2009), Çin'nin Pekin şarap üretim bölgesinde spontan fermentasyonla üretilen şaraplarda dinamik maya popülasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, sekiz adet non-*Saccharomyces* suş China General Microbiological Culture Collection Center Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (CGMCC) referanslı ve dokuz adet ticari *Saccharomyces* maya suşu kullanılmıştır. Araştırmacılar üzümlerden elde edilen şıraya bu kültürleri inoküle edip fermentasyona bırakmışlardır. Şarap fermentasyonu devam ederken maya örnekleri izole edilip besiyerindeki makroskopik (tekstür, renk, yükseklik v.d.) ve mikroskobik özelliklerine göre ayırım yapılmıştır. Araştırmada gruplanan maya suşları Makimura vd., (1994)'ne göre DNA'ları izole edilip, White vd., (1990) ve Fell vd., (2000)'ne göre ITS (ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılmış) ve 26S rRNA (D1/D2; NL1 ve NL4 primerleri kullanılmış) PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünler *Hae*III ve *Hin*fI restriksiyon enzimleriyle kesilip sonuçlar çeşitli literatürler ile karşılaştırılıp doğrulukları belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca maya tanımlamalarının doğruluğunu belirlemek amacıyla Legras and Karst (2003)'ün önerdiği §12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') ve §21 (5'-CACTTAACA CCGTATATGA-3') primerleri kullanılarak DNA sekans analizi yapılmış, elde edilen veriler NCBI veri tabanında gözden geçirilmiştir.

Blaiotta vd., (2010) yılında, İtalya'daki Salerno, Caserta, and Frosinone bölgelerinde bulunan 16 çiftlikten getirilen Mozzarella peynir örneklerinden 60 maya suşu izole ederek, bu izolatları hem lipolitik, proteolitik, karbonhidrat asimilasyonu ve fermentasyonu gibi geleneksel yöntemlerle hem de 5.8S rDNA PZR-RFLP bölgesini yöntemiyle tanımlamışlardır. Ayrıca 26S rRNA biyokimyasal özelliklerini inceledikleri araştırmada, *Cfo*I, *Hin*fI ve *Hae*III restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Araştırmacılar, *Kluyveromyces marxianus* (laktöz fermentasyonu) ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin (galaktoz fermentasyonu) dominat suşlar olduğunu ve Mozzarella peynirinin duyuşal özelliklerine olumlu etkileri olacağını belirtmişler ve bu konu hakkında daha çok çalışma yapılmasını önermişlerdir.

Gibson vd., (2011), arpa, bira (üç farklı tank ve iki farklı large birasında 59 yabani maya izole edip, ITS PZR/RFLP profillerini inceleyip) yabani mayaların tanımlanması ve tespiti için rutin identifikasyon yöntemi olarak kullanılıp kullanılmayacağını irdemişlerdir. Araştırmada, ITS bölgesinin 5.8 rRNA geni ve komşu ITS1-ITS2 bölgeleri çoğaltılıp *CfoI*, *HaeIII* ve *HinfI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Araştırmada elde edilen verilerden MycoBank, Genbank, CBSKNAW Fungal Biodiversity Centre database ITS verileri alınarak DNAMAN v4.1 ve Clone Manager 5 software yazılımlarıyla simülasyonları yapılar karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, dinlendirme tanklarında *Pichia*, fermentasyon tanklarında ise *Saccharomyces* baskın maya cinsleri olarak tanımlamışlardır. *Candida*, *Dekkera*, *Meyerozyma*, *Rhodotorula*, *Wickerhamomyces*, *Pichia* ve *Yarrowia* hem olgunlaştırma hem de fermentasyon tankından izole edilip tanımlayarak, bu yöntemin, bira, şarap gibi fermente gıdalara yabani mayaların ayırt edileceği hızlı, etkin ve ucuz bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır.

Karasu-Yalçın vd., (2012), 45 Erzincan tulum peynir örneklerinden 146 maya suşu izole edip, bu izolatların tanımlanmasında Deak ve Beuchat, (1996), Yarrow, (1998) ve Kurtzman et al., (2003) yıllarında önerilen mikroskopik, makroskopik görünüşlerine, sıvı besiyerindeki karakterine, nitrat asimilasyonu, vitamin kullanımı, çeşitli sıcaklıklarda gelişme, üre hidrolizi, pseudohyphae ve askospor yapısını incelemesine dayalı konvansiyonel tanımlama yöntemin yanında API ID 32C enzim test tanımlama kitini kullanarak 121 izolat tür, 12 izolat ise cins düzeyinde tanımlanmıştır. Araştırmada, maya izolatlarının *Candida*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces*'in 6 farklı cinslerine ait suşlar oldukları belirlenmiştir. Araştırmacılar, tulum peynirinde baskın maya suşlarının *Candida lambica*, *C. zeylanoides*, *C. famata* var. *famata*, *G. candidum* ve *C. kefir* olduğunu tespit ederek, API-ZYM test sisteminin enzimatik karakterli maya suşlarının tanımlanmasına uygun bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Alves vd., (2012), Portekiz'de fermente bir ürün olan kırık yeşil zeytinin bakteri, maya ve küf florasının belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, laktik asit bakterisi bulunmadığında mayaların zeytin florasına hâkim olduğu tespit edilmiştir. Zeytin florasına hâkim mayaları belirlemek amacıyla 108 adet maya suşu izole edilerek yapılan PZR-RFLP (5.8S ITS rDNA Bölgesi) ve DNA sekans (D1/D2 26S rDNA Bölgesi) analizi sonucunda kırık yeşil zeytin florasına hâkim olan maya

suşlarının, *Aureobasidium pullulans* (maya benzeri tür), *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida oleophila*, *Citeromyces matritensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Zygorulaspora mrakii* (yeni tür) olduğu sonucuna varmışlardır. Araştırmada 450-850 bp olarak bulunan PZR ürünleri *CfoI*, *HaeIII* ve *HinfI* restriksiyon enzimleriyle kesilmişler ve oluşan PZR-RFLP görüntülerini önceden yayınlanmış olan literatürlerle karşılaştırmışlardır (bu literatürler sırasıyla Guillamón vd., 1998; Esteve-Zarzoso vd., 1999; Esteve-Zarzoso vd., 2003 şeklindedir). PZR-RFLP analizinde sekiz farklı profil oluşturulmuştur. Ancak bu profiller sekans analizinde hiçbir şekilde benzerlik göstermemiştir. DNA sekans (D1/D2 26S rDNA Bölgesi) analizinin Blast analiz aşamasında, elde edilen verilerin incelenmesi sonucu %98' den yüksek benzerlik elde edilmiştir. DNA sekans analizindeyse dokuz farklı profil elde edilmiştir. Araştırmacılar *Candida quercitrusa* PZR-RFLP (5.8S ITS rDNA Bölgesi) ve DNA sekans (D1/D2 26S rDNA Bölgesi) analiz sonuçlarının birbirlerine uymadığını belirtmişlerdir.

Chanprasartsuk vd., (2013) tarafından, Tayland ve Avustralya'dan çeşitli marketlerden satın alınan taze ananasın "Smooth Cayenne" laboratuvar ortamında steril koşullarda suyu çıkartılıp spontan fermentasyon oluşması sağlandıktan sonra maya sayımı yapılmış ve fermentasyondan sorumlu 36 maya suşu izole edilip, PZR-RFLP (5.8S ITS rDNA Bölgesi), DNA sekans (5.8S ITS rDNA ve D1/D2 26S rDNA Bölgesi) ve API ID 32 C sistemiyle tanımlamaları yapılarak, yöntemlerin doğrulukları belirlenmeye çalışılmıştır. Her iki ülkeden izole edilen maya suşları; *Rhodotolula mucilaginosa*, *Issatchenkia orientalis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Pichia guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Candida tropicalis*, *Pichia fermentans*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida stellata*, *Erythrobasidium hasegawianum*, *Pichia membranifaciensi*, *Candida* sp., *Yarrowia lipolytica* ve *Tremella globispora* olarak tanımlanmıştır. Özellikle beyaz krem maya koloniler bu analiz yöntemlerinde farklı sonuçlar bulunmasına neden olmuş ve kabul edilebilirlik dilimini düşürmüştür. Araştırma sonucunda iki DNA sekans analiz yöntemlerinin potansiyelinin yüksek olmasına karşın, PZR-RFLP ve API ID 32 C sisteminin maya tanımlamasında yetersiz kaldığı belirlenmiştir.

Echeverrigaray vd., (2013), Brezilya'da yerel marketlerden 27 adet genç şarap (*Vitis vinifera*) ve 23 adet sofr şarabı (*Vitis labrusca*) olmak üzere toplam 50 adet kırmızı şarap örneğinde, şarapları bozan mayaların belirlenmesi için yapılan

çalışmada, 30 maya izolatının konvansiyonel, PZR-RFLP (5.8S ITS rDNA Bölgesi), PZR- RAPD (LSU rDNA Bölgesi), DNA sekans (5.8S ITS rDNA ve D1/D2 26S rDNA Bölgesi) tanımlamaları yapılmıştır. Bu amaçla ITS1-5.8S-ITS2 ve LSU rDNA bölgelerinin parmak izi analizi için ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')-ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3) Esteve-Zarzoso vd., (1999) ve NL-1 (5'-GCATATCAATAAG CGGAGGAAAAG-3')-NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAA GACGG-3') primerleri kullanılmıştır. PZR-RFLP ve PZR-RAPD sonuçları var/yok şeklinde işlenip Jaccard benzerlik katsayısı NTSYS bilgisayar programı kullanılarak benzerlikleri hesaplanıp UPGMA Dendrogram'ına işlemişlerdir. DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler Blast analizi için GeneBank kullanılmıştır. Araştırmacılar bu analiz doğrultusunda düşük skor, yüksek benzerliğe göre önceki sınıflamayı karşılaştırarak onaylamışlardır. Yapılan analiz sonuçlarına bağlı olarak 30 adet maya suşunun, *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia guilliermondii*, *Candida wickerhamii* ve *Trigonopsis cantarelli* olduğu belirlenmiş ve şarapta off-flavor'dan yüksek oranda *Brettanomyces* cinslerine ait suşların sorumlu olduğu belirtilmiştir.

Fadda vd., (2013), Güney Sardinya ve Kuzey İtalya bölgelerinden toplam 1.486 adet mastitisli süt örneğinden 142 adet maya suşu izole edilip morfolojik Kurtzman ve Fell'in (2000) önerdiği şekilde, biyokimyasal analizleri ise API ID 32C test kiti belirleyip sonuçları APILAB Plus paket programıyla tanımlamasını yapmışlardır. Ayrıca araştırmada, PZR-RFLP 18S-ITS1-5.8S rDNA Bölgesi *HaeIII* restiriksiyon enziminin kesimlerine göre sınıflandırması yapılmış, sınıflandırma sonrası maya suşları DNA sekanslarına (D1/D2 26S rDNA Bölgesi) göre tanımlanıp doğrulukları kontrol edilmiştir. Bu amaçla sekans işlemi sonrasında elde edilen verilerin Blast analizi için NCBI web sitesinde analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre 17 farklı maya suşunun *Candida* (%47.9), *Cryptococcus* (% 21.1), *Trichosporon* (%19.7), *Geotrichum* (%7.1) ve *Rhodotorula* (% 4.2) cinslerine ait olduğu belirlenmiş, *Candida* cinlerine ait suşların tüm tanımlama yöntemlerinde aynı sonucu verdiği, *Trichosporon* cinlerine ait suşların tanımlamasında API ID 32C sisteminde sorunlar çıktığı belirtilmiştir.

Padilla vd., (2014) tarafından, İspanya'nın Akdeniz Kıyı Bölge'lerinde keçi ve koyun sütlerinden yapılan peynirlerin olgunlaştırma aşamasında maya florasını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 530 adet maya suşu izole edilerek, moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Mayaların tanımlanmasında kullanılan moleküler

analizler sırasıyla PZR-RFLP (5.8S ITS rDNA Bölgesi) White vd., (1990) ve Esteve Zarzoso vd. (1999)'un önerdikleri şekilde hem universal primerlerini hem de *CfoI*, *HaeIII* ve *HinfI* restiriksiyon enzimlerini kullanmışlardır. PZR-RFLP band sonuçlarını 5.8S-ITS rRNA Yeast-id database "<http://www.yeast-id.com/>" internet sitesinden karşılaştırmışlar, mayaların tanımlamalarının doğruluğunu yapabilmek amacıyla DNA sekans (D1/D2 26S rDNA Bölgesi) analizi yapmışlardır. Analiz sonunda alınan verileri Tamura et al., (2011)'un önerdiği şekilde MEGA5 programıyla düzenleyip GenBank BLASTN'de Blast analizini yapmışlardır. Ayrıca araştırmada Minisatellit-PZR yöntemi ve M13 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') primeri kullanılarak *Debaryomyces hansenii* maya suşlarının genetik karakterizasyonu yapılmıştır. Araştırmacılar, elektroforez görüntülerinde hololog bantlardan benzerlik matriksini oluştururken, var (1)/yok (0) değerlerini verip, Jaccard benzerlik endeksini kullanarak NTSYS v 2.21 programı yardımıyla UPGMA dendrogramına işlemişlerdir ve SPSS v.19.0 programı kullanılarak grafik çizimini yapmışlardır. Çalışmada tüm peynirlerde dominant maya suşlarının *Debaryomyces hansenii* ve *Kluyveromyces lactis* olduğu tespit edilmiştir.

Yang vd., (2014), Tibet'te eşsiz lezzeti ve popüler bir süt ürünü olan "Yak Süt Çökeleğinde" maya florasını belirlemek amacıyla 10 adet örnekten 91 maya suşu izole edilip, Kurtzman ve Fell'in (1998) önerdiği morfolojik analizlerin, karbon asimilasyonun farklı sıcaklıkta gelişme, karbonhidrat asimilasyonu, nitrojen asimilasyonu ve glikoz konsantrasyonunda gelişmeye dayanan konvansiyonel tanımlama yönteminin yanında 5.8S/ITS ve D1/D2 26S rDNA Gen Bölgelerinin Sekans Analizlerine dayalı moleküler yöntemler kullanılarak tanımlamayı amaçlamışlardır. Sekans analizlerinden elde edilen verileri GenBank'dan BLASTN programı kullanılarak CBS, KNAW, YeastIP ve ATCC kültür koleksiyonlarından veri seti oluşturulup, MEGA 4 programı ile Neighbor-Joining metoduyla filogenetik ağacını çizmişlerdir. Araştırma sonunda, izole edilen maya suşlarının; *Kluyveromyces lactis* (6/10), *Pichia fermentans* (6/10), *Saccharomyces cerevisiae* (6/10), *Rhodotorula mucilaginosa* (6/10), *Kluyveromyces marxianus* (5/10), *Pichia kudriavzevii* (4/10), *Torulaspora delbrueckii* (2/10), *Torulaspora quercuum* (2/10), *Debaryomyces hansenii* (1/10) ve *Cryptococcus albidus* (1/10) olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmanın "Yak Süt Çökeleği" endüstrisinde kullanılabilecek probiyotik ve starter kültürlerin dizaynına ışık tutacağını belirtmişlerdir.

Khattab vd., 2016 yılında, Mısır'ın Assiut City kentinden çeşitli gıdalardan (yoğurt, tereyağı, portakal, mango suyu, domates vd.) 52 adet maya örneğinin Kreger–Van Rij'in (1984) önerdiği konvensiyonel tanımlama yönteminin yanında, DNA sekans (5.8S ITS rDNA ve D1/D2 26S rDNA Bölgesi) analizine dayalı moleküler tanımlama tekniklerini kullanmışlardır. Elde ettikleri verileri NCBI/BLAST web sitesinde hizalayıp filogenetik ağaç çizimini yaptıkları araştırma sonucunda 52 adet maya örneğinin *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Rhodotorula mucilaginosa* ve *Trichosporon dulcitum* maya suşları olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar mayaların tanımlanmasında konvensiyonel ve moleküler tanımlama yöntemlerinin sonuçlarının tutarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Shahzad Ali ve Zakia Latif, (2016) yılında çeşitli meyve ve sebze örneklerinden 29 adet maya suşu izole edip, CTAB DNA izolasyon yöntemini modifiye ederek kullanmışlardır. Elde edilen maya DNA'larını PZR-RFLP (5.8S ITS rDNA Bölgelerinin *TaqI* ve *HaeIII* restriksiyon enzimlerinin kesim noktalarına göre) analiz yöntemine tabi tutan araştırmacılar, elektroforez bant sonuçlarını literatür sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Ayrıca, araştırmada maya tanımlamalarının kontrolü için DNA sekans (5.8S ITS rDNA) analizi yapılmıştır. Sekans verileri NCBI sisteminde değerlendirilip filogenetik ağaçları çizilmiştir. Araştırmacılar, çalışmada bu iki moleküler yöntemin konvensiyonel tanımlama yöntemine göre daha kolay, tekrarlanabilir, geçerli ve tutarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Porru vd., 2018 yılında İtalya'da bulunan Sardinya Ada'sında üretilen salamura zeytinin spontan olarak gerçekleşen fermentasyonu sırasında mikroflorada bulunan 72 adet mayanın izolasyonunu yapmışlardır. Araştırmacılar, PZR-RAPD parmak izi sonucunu Bionumerics 6.6 bilgisayar programıyla analizleri doğrultusunda oluşturdukları dendrogramları UPGMA metoduyla ve Peson korelasyonu, maya izolatlarının profillerini çıkarmışlardır. Aynı zamanda araştırmada kümelemenin doğruluğunu belirlemek ve maya izolatlarını suş seviyesinde tanımlamak amacıyla D1/D2 26S rDNA Bölgesinin NL1 ve NL4 primerlerini içeren DNA sekans analizini kullanarak, tüm izole edilen mayalar tekrar tanımlanmıştır. Sekans analizinden elde edilen veriler MEGA 5.0 programıyla hizalanmış ve NCBI'nin GenBank'ı kullanılarak Blast analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda dominant maya suşlarının *Wickerhamomyces anomalus*, *Nakazawaea molendini-olei*, *Candida diddensiae*,

Candida boidinii, *Zygorulasporea mrakii* ve *Saccharomyces cerevisiae* olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, *W. anomalus* Wal maya suşunun tuza dayanıklılığı, enzim aktiviteleri (lipaz, β -glukozidaz ve esteraz) ve probiyotik özellikleri açısından en iyi teknolojik özellik gösterdiğini, *S. cerevisiae* Sc24 ve *C. boidinii* Cb60 maya suşlarının teknolojik olarak ümit vadettiğini, bu üç maya suşunun zeytin üretiminde starter olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Villarreal vd., (2021), yabani mayaların fermente gıdaların duyuşal özellikleri etkisinin yanında, etil alkol-asit dirençleri ve patojen mikroorganizmalar üzerine etkilerini araştırmak üzere 125 adet maya suşu izole edilip tanımlanmıştır. Mayaların DNA'sı "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" ile izole edilip DNA sekans (ITS1-5.8rRNA-ITS2) ile tanımlanmıştır. Çalışmada sekans sonuçları NCBI' in analizleri yapılmış; değerlendirme sonunda izole edilen mayaların *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces uvarum*, *Lachancea cidri*, *Kregervanrija delftensis* ve *Hanseniaspora valbyensis* olduğu belirlenmiştir. Araştırmada *Saccharomyces* suşlarının bira ve şarap fermentasyonu sırasında spesifik potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda araştırmacılar *L. cidri*'in suksinik ve asetik asit ürettiklerini belirlemişlerdir.

Kahve vd., (2022), fermente bir ürün olan şalgamın kalitesi ve güvenliği laktik asit fermentasyonu sırasında mikrobiyotada bulunan mayaların türlerine ve teknolojik özelliklerine bağlıdır. Bu durumu belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, şalgamdan sağlanan 172 adet maya örneğinin iPBS-PZR (iPBS 2395 primeri 5'-TCCCCAGCGGAGTCGCCA-3' kullanılmışlar) parmak izi analizi ve DNA sekans (5.8S ITS rDNA) analizi yapılarak tanımlamaları yapılmıştır. İzole edilen mayaların DNA' larını DNeasy Blood and Tissue kit kullanarak izole etmişlerdir. Araştırmacılar, iPBS-PZR parmak izi analizini var (1) yok (0) değerleri vererek, istatistiki değerlendirmesini Xlstat v 2017 bilgisayar programında yapmışlardır. DNA sekans analizinden gelen verilerin blast analizini <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> gen bankasında yapıp elde edilen sekansların hizalanmasını Thompson et al, (1994)'un önerdiği şekilde Clustal W programıyla yapmışlardır. Hizalanan sekansların analizinde MEGA X bilgisayar programında 1000 tekrarlı Tamura and Nei (1993) model seçilip Neighbor-Joining filogenetik ağaç çizilerek yorumlamışlardır. Araştırmacılar şalgamda bulunan maya suşlarının; *Pichia kudriavzevii*, *P. fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida oleophila*, *Kazachstania bulderi* ve *Geotrichum*

candidum olduğunu belirlemişlerdir. Şalgam fermentasyonu esnasında *P. kudriavzevii* sayısının arttığını ve diğer maya izolatlarının sayısının azaldığını tespit eden araştırmacılar, bu suşun enzim aktivitelerinin şalgamın aromasının oluşumuna katkı sağladığı için, starter kültür olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Peynirlerde gelişen ve potansiyel bozulma etmeni olan maya suşlarının izole edilip tanımlamalarının yapılması ve dominant maya suşlarının belirlenmesi, bu ürünlerin üretilmesinde ve depolanmasında yaşanan sorunların iyileştirilmesinde önemli rol oynamasının yanında, biyokimyasal ve fizyolojik karakteristiklere dayalı konvansiyonel tanımlama yöntemlerine göre daha hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir ve daha ekonomik alternatif tanımlama yöntemleri geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Ayrıca fermentasyon ve biyoteknolojik uygulamalara yeni maya suşlar eklenmesine katkı sağlayarak yeni araştırma konuları açacaktır. Bu amaçla, bu çalışmada beyaz peynir yüzeyinde bozulmaya neden olan mayaların moleküler karakterizasyonu yapılacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

2006-2007 tarihleri arasında Samsun ili çeşitli marketlerden ve Terme ilçe pazarından satışa sunulan farklı marka ve ambalajlardaki kapalı 15 adet, açık 15 adet ambalaj olmak üzere toplam 30 adet beyaz peynir örneğinden toplam 48 adet maya suşu materyal olarak kullanıldı. Tablo 4.1.'de DNA sekans analizine giden peynir örneklerinin alındığı ay, alınış şekli, örnek numarası gibi bilgiler verilmiştir.

Tablo 4.1. İzole edilen ve tanımlanan maya suşlarının elde edildiği kaynaklar.

Örnek No:	Peynir Çeşidi	Ambalaj Şekli	Alındığı Yer	Alındığı Tarih
12	Beyaz Peynir (İnek+Koyun Sütü)	Açıktaki Satış 500g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Pazar	11/02/06
13	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	500g' lık Metal Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	11/02/06
14	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	1000g' lık Plastik Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	11/02/06
15	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	700g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Market	11/02/06
16	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	500g' lık Metal Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	11/02/06
17	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	600g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Market	11/02/06
18	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	600g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Market	11/02/06
19	Ezine Peyniri (İnek ve Keçi Sütü)	600g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Market	11/02/06
20	Ezine Peyniri (İnek ve Keçi Sütü)	600g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Market	14/02/06
21	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	750g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Market	14/02/06
22	Beyaz Peynir (Koyun Sütü)	Açıktaki Satış 500g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Pazar	14/02/06
23	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	1000g' lık Metal Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	14/02/06
24	Beyaz Peynir (İnek+Koyun Sütü)	Kapalı Metal Büyük Kutudan 500g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Pazar	14/02/06

Tablo 4.1. (devam)

Örnek No:	Peynir Çeşidi	Ambalaj Şekli	Alındığı Yer	Alındığı Tarih
26	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	500g' lık Metal Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	14/02/06
27	Beyaz Peynir (İnek+Koyun Sütü)	Açıkta Satış 500g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Pazar	14/02/06
28	Beyaz Peynir (koyun Sütü)	500g' lık Metal Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	15/02/06
29	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	600 g' lık Plastik Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	16/02/06
30	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	Açıkta Satış 750g' lık Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Pazar	16/02/06
31	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	500 g' lık Plastik Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Pazar	15/03/06
32	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	317 g Cam Kavanoz	Pazar	15/03/06
33	Peyniri (İnek ve Koyun Sütü)	600 g' lık Plastik Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Pazar	15/03/06
34	Bilinmiyor	122 g Cam Kavanoz	Pazar	16/03/06
35	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	327 g Cam Kavanoz	Pazar	16/03/06
36	Beyaz Peynir	65.25 g Cam Kavanoz	Pazar	17/03/06
37	Bilinmiyor	65.25 g Cam Kavanoz	Pazar	05/04/06
39	Beyaz Peynir (İnek Sütü)	500 g' lık Plastik Ambalaj	Pazar	05/04/06
40	Beyaz Peynir (İnek+Koyun Sütü)	500 g' lık Plastik Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	14/04/06
41	Beyaz Peynir	310 g Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Pazar	24/05/06
42	Beyaz Peynir	325 g Plastik Ambalaj (Açık Ambalaj)	Pazar	24/05/06
44	Beyaz Peynir (koyun Sütü)	500g' lık Metal Ambalaj (Kapalı Ambalaj)	Market	10/04/06

4.2. Yöntem

Bu araştırmada 2006-2007 tarihleri arasında materyal olarak seçilen 48 maya izolatinin moleküler tanımlama yöntemi ile analiz, mayaların izolasyonu ve identifikasyonu için uygulanan analiz planı Tablo 4.2.'deki gibidir.

Tablo 4.2. Mayaların izolasyonu ve identifikasyonu için uygulanan analiz planı

MAYA SUŞLARININ İZOLASYONU SAFLAŞTIRILMASI ve DEPOLANMASI	YÖNTEM	İNKÜBASYON SÜRESİ (Gün)
	Zenginleştirme (YM Broth) 30°C	1-2 Gün
	Çizme ve Seri Dilüsyon Tekniğiyle Saflaştırma (YM Agar) 30°C	3 Gün
	Yatık Agar ve Gliserolle Depolama (PDA, YM Broth) 28-30°C	5 Gün
MOLEKÜLER TANIMLAMA YÖNTEMİ		
İZOLE EDİLEN MAYA SUŞLARI	DNA İzolasyonu (10'lu gruplar)	10 Gün
	DNA İzolatlarının Saflık Kontrolü (10'lu gruplar)	10-15 Gün
	PZR Aşaması	3-4 Gün
	PZR Amplifikasyon Ürünlerinin Saflaştırılması	10-15 Gün
	PZR-RFLP	10-15 Gün
	(ITS) PZR ürünlerinin sekans analizi için KİTAM'a gönderilip sonuçların “*.abi” uzantısı şeklinde gelmesi	30 Gün
	ITS1-5.8S-ITS2 rDNA Dizileme ve Dizi Analizi	15-30 Gün
	Filogenetik Sınıflandırma	5-15 Gün

4.2.1. Maya Suşlarının İzolasyonu, Saflaştırılması ve Depolanması

Beyaz peynirden izole edile maya suşlarının moleküler tanımlaması yapılmadan önce izolasyon ve saflaştırma işlemine tabi tutuldular. Makroskobik ve mikroskobik olarak saflıkları kontrol edilen maya suşları +4°C’de analiz yapılmaya kadar saklandı. Ayrıca, bu yöntem yanında ana maya stokları saflaştırma ve izolasyon işlemlerinden sonra 1.5 ml gliserol içeren YM Broth (Yeast Malt broth) besiyerine inokülasyon yapılarak -18°C’de saklandı (Deak and Beuchat, 1988; Welthagen and Viljoen, 1999; Kurtzman and Fell, 2000; Laubscher et al., 2000; Moreira et al., 2001). Maya suşlarının saflaştırma ve stok kültür elde etme prosedürü;

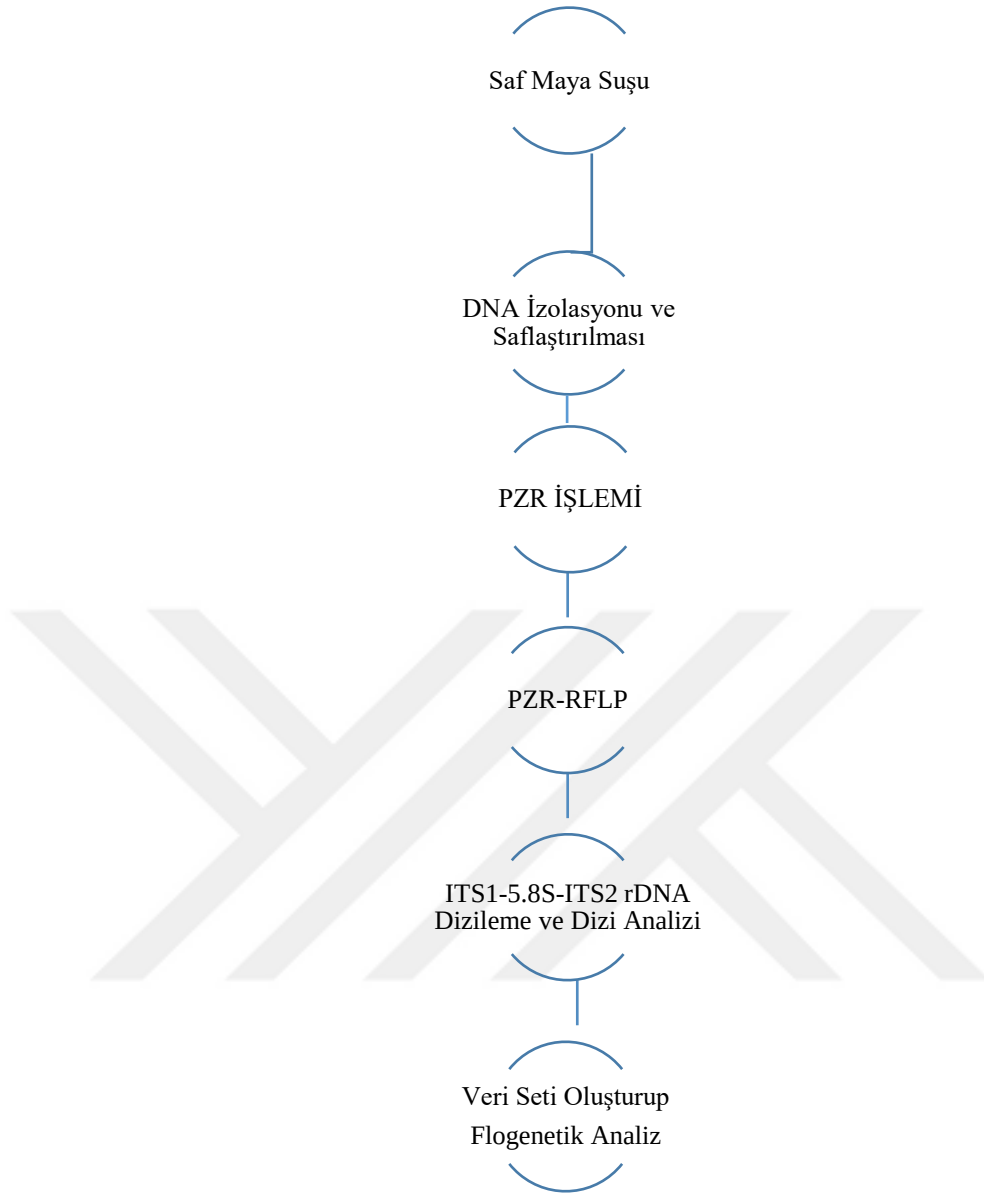
- Stok olarak Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerinde bulunan maya suşlarını saflaştırmak için Yeast Malt Broth (YM Broth) besiyerine inoküle edilerek, 1-2 gün 27-30 °C’de inkübasyona bırakılmasıyla ön zenginleştirme işlemi yapıldı.

- Gelişme gözlenen tüpler seri dilüsyon (10^{-6} ’ya kadar) tabi tutularak yüksek dilüsyonların (10^{-4} - 10^{-6} dilüsyon) her birinden içerisinde, önceden 121° C’de 15 kaplarına 1 ml ekim yapıldıktan yapılarak sonra 30°C’de 3 gün inkübasyona bırakıldı. Daha sonra gelişme gösteren maya suşları YM Agar besiyerine çizme yöntemiyle tekrar inoküle edilip, 30°C’de 3 gün inkübasyona bırakıldı.

- Saf olduğundan emin olunan maya suşları yatık PDA besiyerine inoküle edilerek 28°C’de 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabına konularak moleküler tanımlama yapıncaya kadar +4°C’de saklandı.

4.2.2. Maya Suşlarının Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Tanımlama Yöntemleri

Stok saf maya suşları YM Agar besiyerine çizme yöntemiyle inoküle edilip, 30°C’de 3 gün inkübasyona bırakılarak saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra saf maya suşları 10’arlı gruplar halinde moleküler tanımlamalarının yapılabilmesi için Şekil 4.1.’de belirtilen işlemlere tabi tutuldular. Moleküler tanımlama analizlerinde kullanılan kimyasallar ve besiyerlerinin özellikleri Ek’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Saf maya suşlarının moleküler tanımlanmasında uygulanan işlemleri

4.2.2.1. Maya Suşlarının DNA'sının İzolasyonu ve Saflaştırılması

Toplam maya DNA'sının 29 tanesinde, Hoffman (2003), Stirling (2003) Mesapogu, vd., (2013) ve Biss, vd., (2014) maya DNA izolasyon ve saflaştırma yöntemlerinin optimizasyonu yapılarak uygulandı. Bu yöntemdeki uygulanan işlem basamakları aşağıdaki gibidir;

- Stok kültürden bir öze dolusu izolat, Yeast Extract Peptone Dextroz Agar'a (YEPD veya YPD agar) inokübe edilip, 30 °C'de 2-3 gün inkübe edildikten sonra, 7-10 ml Yeast Extract Peptone Dextrose Broth'ta (YEPD veya YPD broth) inoküle edilerek, 30 °C'de 12-24 sa 150 rpm'de çalkalayıcılı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

- 2.000g/10dk santrifüjleme işlemi yapıp, 0.5 ml steril ultra saf su ile süspansiyon haline getirildi.

- Bu karışımdan 1.5 ml alınıp eppendorf tüpüne aktarıldı. Daha sonra 15.000g/10dk santrifüjleme işlemi yapıp döküldü.

- 0.3 gr (yaklaşık 0.3 µl) 1 mm boyutunda cam boncuk, 0.2 ml Buffer A çözeltisi, 0.2 ml Fenol: Kloroform: Izoamil alkol (25:24:1) eklenip vorteks ile 3 dk karıştırılarak, üzerine 0.2 ml TE tamponu eklenip 15.000g/5dk santrifüjleme işlemi yapıldı.

- Üst kısım yeni tüpe aktarılıp %98.99 soğuk etil alkol ile karıştırılıp 0°C’de 15 dk bekletildi. Daha sonra 15.000g/2dk santrifüjleme işlemi yapılarak, süpernatant atılıp kalan kısım 0.4 ml TE ile süspansiyon haline getirildi.

-Elde edilen süspansiyona 10 µl 4M Amonyum Asetat eklenip karıştırıldı.

- Bu karışıma 1 ml %70 soğuk etil alkol eklenip 15.000g/2dk santrifüjleme işlemi yapıldı.

- Süpernatant ayrıştırılıp, pellet, desikatörde 1 sa kurumaya bırakıldı.

- Kuru pellete 50-100 µl TE eklenerek analiz yapılana kadar derin dondurucuda depolandı.

Geriye kalan 19 adet maya suşunun DNA’sı Ros-Chumillas vd., (2007) ve Shahzadi ve Latif, (2010) yıllarında önerilen CTAB maya DNA izolasyon ve saflaştırma yöntemi kullanılarak maya DNA’ları izole edilmiştir. Bu yöntemdeki uygulanan işlem basamakları aşağıdaki gibidir;

- Stok kültürden bir öze dolusu izolat, Yeast Extract Peptone Dextroz Agar’a (YEPD veya YPD agar) inoküle edilip, 30 °C’de 2-3 gün inkübe edildikten sonra, 7-10 ml Yeast Extract Peptone Dextrose Broth’ta (YEPD veya YPD broth) inoküle edilerek, 30 °C’de 12-24 sa 150 rpm’de çalkalayıcılı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

- Gelişen kültürlerden 2 ml alınıp, 13.000rpm/5dk sonra süpernatant döküldü.

- Tüp içerisine 400 µl CTAB içeren buffer (1.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, %2 CTAB, %1 PEG 8000, %0.1 mercaptoethanol) ile 0.3 gr (yaklaşık 0.3 µl) 1 mm boyutunda cam boncuk konup yüksek hızda 1 dk vortekslendi.

- Karışım 65°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı.

- Karışım üstüne eşit hacimde Fenol: Kloroform: Izoamil alkol (25:24:1) eklenip 3 dk vorteks ile karıştırılarak, üzerine 0.2 ml TE tamponu eklenip 15.000g/5dk santrifüjleme işlemi yapıldı.

- Üst kısım yeni tüpe aktarılıp %98.99 soğuk etil alkol ile karıştırılarak 0°C’de 15 dk bekletildi. Daha sonra 15.000g/2dk santrifüjleme işlemi yapılarak, süpernatant atılıp kalan kısım 0.4 ml TE ile süspansiyon haline getirildi.

- Bu süspansiyona 10 µl 3M Sodyum Asetat (pH 5.2) eklenip karıştırıldı.

- Bu karışıma 1 ml %70 soğuk etil alkol eklenip 15.000g/2dk santrifüjleme işlemi yapıldı.

- Süpernatant ayrıştırılıp, pellet desikatörde 1 sa kurumaya bırakıldı.

- Kuru pellete 50-100 µl TE eklenerek analiz yapılincaya kadar derin dondurucuda depolandı.

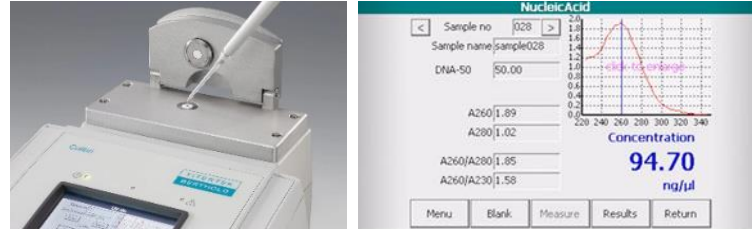
4.2.2.2. DNA İzolatlarının Saflık Kontrolü

İzole edilen DNA’ların varlığının belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi kullanıldı (Sambrook, 1989). Bu yöntemdeki uygulanan işlem basamakları aşağıdaki gibidir;

- Bunun için 0.5 gr agaroz 50 ml 1X TAE (Tris, Asetik Asit, EDTA) tamponu içerisinde manyetik karıştırıcıda tamamen berrak bir görüntü elde edinceye kadar ısıtılıp, sıcaklık 50 °C’ye düşüncü taraklı elektroforez tablasına döküldükten sonra, soğumaya bırakıldı.

- Jel soğuduktan sonra içinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez set içine yerleştirilip taraklar çıkarıldı. Elektroforezde 80 V 45dk yürütüldü. DNA bantları görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.

Ayrıca izole edilen maya DNA’sının saflığının kontrolü ve DNA’sının miktarı belirlemek için için “Titertek Berthold” marka nanodrop kullanıldı. Bu amaçla saf maya DNA’sından 2-3 µl alınıp, nanodrop gözüne konularak belirlendir (Hermann et al., 2020).



Şekil 4.2. Titertek Berthold marka nanodrop'un kullanımı (Anonymous, 2023)

4.2.2.3. PZR Aşaması

Saf ve bütünlüğü tam olarak elde edilen maya DNA örneklerinin ITS-1 ve ITS-2'i kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için 2 primer (ITS-1 ve ITS-4) kullanıldı. PZR için "OneTaq® 2X Master Mix" ve "EconoTaq® PLUS 2X Master Mix" Taq DNA Polymerase mixleri kullanıldı (Deak et al., 2000; Las Heras-Vazquez et al., 2003; Satora et al., 2013). Bu yöntemdeki uygulanan işlem basamakları aşağıdaki gibidir;

- DNA örneklerinin ITS-1 ve ITS-2'i kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için 2 primer ITS- Thermal cycler işlemine tabi tutularak istenen gen bölgesi çoğaltıldı. Polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0.2 ml'lik PZR tüplerinde Thermal Cyclers da yapıldı. Kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla stok solüsyonlar küçük miktarlarda (25-100 µl) steril ependorflara bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

- Maya DNA' ları, Primer ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) ve Primer ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) buz üzerinde çözündürülüp, vortekslenip sanrifüjlendi (White et al. 1990). PZR optimizasyonu yapıldı. Bu optimizasyona bağlı olarak 48 adet maya suşunun 3 paralel PZR'si yapıldı. Bu DNA'ların tamamından PZR ürünleri alındı. PZR aşamasında kullanılan mix oranları ve sıcaklık döngüleri Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.'deki gibidir.

Tablo 4.3. OneTaq® 2X Master Mix' in kimyasal oranları ve sıcaklık döngüsü

KİMYASAL	1 X (µl)	10X (µl)
dd H₂O	6.9	69
ITS 1	0.8	8
ITS 4	0.8	8
Mix	17	170
DNA	5.5	-
TOPLAM	31	-

94	5 dk	
94	20 sn	
56	1 dk	} 35X
72	1 dk	
72	7 dk	

Tablo 4.4. EconoTaq® PLUS 2X Master Mix' in kimyasal oranları ve sıcaklık döngüsü

KİMYASAL	1 X (µl)	10X (µl)
dd H₂O	10.6	106
ITS 1	0.3	3
ITS 4	0.3	3
Mix	12.7	127
DNA	1.1	-
TOPLAM	25.1	-

94	5 dk	
94	20 sn	
55	1 dk	} 30X
72	1 dk	
72	5 dk	

- PZR ürünlerinin kontrolü %1.5-2.0 agaroz içeren 1X TAE ile elektroforezde, 90 V 45dk yürütüldü ve PZR sonuçları fotoğraflandı.

4.2.2.4. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizm (PZR-RFLP) Analizi

Önceden tanımlanan maya suşlarının 400-750 bp bant içeren PZR ürünlerinin Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP) analizi için, kullanılacak olan restiriksiyon enzimlerinin *Hin* I, *Cfo*I (*Hha* I) ve *Hae* III (*Bsu*R I) olduğuna karar verilerek analizi yapıldı (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Querol et al., 2004). Restiriksiyon enzimlerinin mix bileşimi, marka, inkübasyon ve inaktivasyon sıcaklık ve süresi Tablo 4.5.'teki gibidir.

Tablo 4.5. Restriksiyon enzimlerinin mix bileşimi, marka, inkübasyon ve inaktivasyon sıcaklık ve süresi

<i>Hin</i> I (Thermo Fisher Scientific)		
	1 X (µl)	10 X (µl)
ddH₂O	12	120
10 X R Buffer	2	20
<i>Hin</i> I enzimi	1	10
PCR ÜRÜNÜ	5	50
TOPLAM	20	200
İNKÜBASYON SICAĞLIK/SÜRESİ	37°C	4 sa
İNAKTİVASYON SICAĞLIK/SÜRESİ	65 °C	20 dk
<i>Cfo</i> I (Promega)		
	1 X (µl)	10 X (µl)
ddH₂O	12.3	123
10 X Buffer	2	20
BSA	0.2	2
<i>Cfo</i> I enzimi	0.5	5
PCR ÜRÜNÜ	5	50
TOPLAM	20	200
İNKÜBASYON SICAĞLIK/SÜRESİ	37°C	4 sa
İNAKTİVASYON SICAĞLIK/SÜRESİ	65 °C	20 dk
<i>Hae</i> III (Thermo Fisher Scientific)		
	1 X (µl)	10 X (µl)
ddH₂O	12	120
10 X Buffer	2	20
<i>Hae</i> III enzimi	1	10
PCR ÜRÜNÜ	5	50
TOPLAM	20	200
İNKÜBASYON SICAĞLIK/SÜRESİ	37°C	4 sa
İNAKTİVASYON SICAĞLIK/SÜRESİ	80 °C	20 dk

PZR-RFLP ürünleri %1.5-3 agaroz içeren 1X TAE'de 90 V 45dk yürütölüp fotoğrafları çekildi. Fotoğraflar ImageJ/Fiji 1.46 ve GelQuantnet programlarıyla incelendi. İnceleme sonunda izole edilen maya suşlarının kaç profile ayrıldıkları belirlendi (Espinosa et al., 2002).

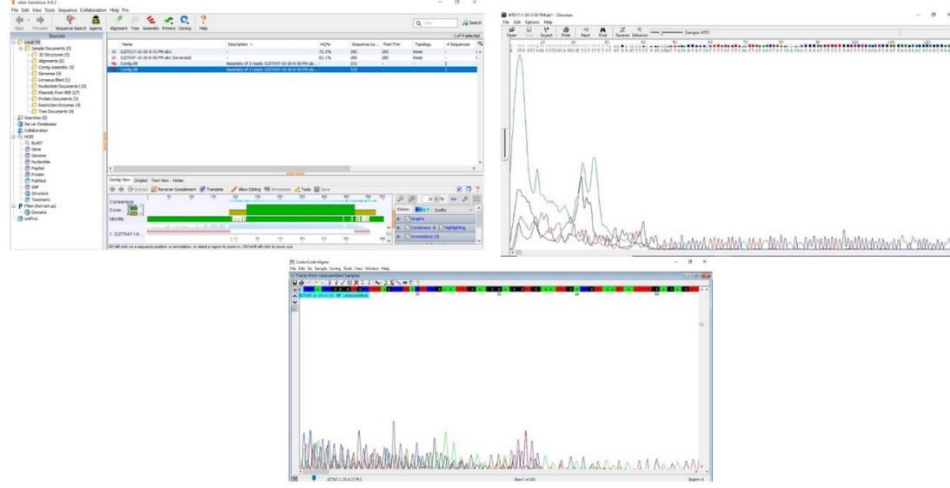
4.2.2.5. DNA Dizi Analiz Sonuçlarının (Sekanslarının) Okunması

Marketlerden ve pazardan elde edilen beyaz peynir örneklerinden izole edilen toplam 10 adet maya suşu ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin DNA sekans analizi için KİTAM'a gönderildi.

PZR ürünleri, ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesinin dizi analizi için "Sanger Dizileme" yöntemi kullanılarak tek yönlü olarak yapılmıştır. Sonuçlar "*.abi" dosya uzantılarıyla anılmıştır.

Elde edilen 10 adet maya suşuna ait ileri (forward) ve geri (reverse) dizileri yanlış okunmuş veya okunmamış bazlar, kromatogramdaki (videogram) sinyallerin (piklerin) güçlölüğüne, temizliğıne bakılarak "Geneious (v 4.8.2.)", "FinchTV (v 1.4.0 Demo)", Bioedit (v 7.2.5 software)" ve "CodonCode Aligner (v 10.0.1 Demo)" programlarıyla el ile görsel olarak düzeltildi. Okuması yapılan 10 adet maya suşunun sekansların kromatogramlarının yapılış örneğı Şekil 4.3.'deki gibidir (Hall, 1999; Lemey et al., 2009).

Elde edilen sonuçlar "Notepad veya MS Office Word" programları kullanılarak "*.fasta" formatına çevrilip depolandı. Yapılan çalışmaya göre ITS bölgesinin baz uzunluğunun 400-750 bç baz çifti uzunluğı arasında değışim gösterdiği gözlemlendi ve değeriendirilmeye alındı.



Şekil 4.3. DNA bazlar kromatogramlarının “Geneious”, “FinchTV” ve “CodonCode Aligner” programlarıyla el ile görsel olarak düzeltilmesi

4.2.2.6 Dizi (Blast) Analizi

El ile görsel olarak düzeltilen, genlerin dizi eşlemeleri (sequence alignment) “Geneious (v 4.8.2.)” ve “Bioedit (v 7.2.5 software)” programlarıyla yapıldı ve yeni DNA dizileri elde edikten sonra https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome sitesinde bulunan veri tabanı kullanılarak değerlendirildi Blast analizinden elde edilen referans maya suşlarıyla bir veri seti oluşturuldu (Hall, 1999; Baxeavanis and Ouellette, 2001; Lemey et al., 2009; Anonymous, 2017; Anonymous, 2020a).

4.2.2.7. Veri Seti Oluşturulması

Blast analizinden “% benzerlik oranı” nın yanı sıra, çalışmayı yürüten bölüm, ATCC, CBS, gıda, peynir ve süt kaynaklı olmalarına dikkat alınarak elde edilen referans maya suşlarına bir veri seti oluşturuldu.

Ayrıca peynirler ve gıdalarda bozulmaya neden olan dominant maya suşlarının yanında, biyoteknolojide kullanılan maya suşları hakkında literatür taraması yapıp, elde edilen referans maya suşları veri setine eklendi.

Oluşturulan yeni veri setinin Blast analizi yapılırken “Bioedit”, “MEGAX” ve “Clustal2X” programları kullanıldı.

4.2.2.8. ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesine Göre Filogenetik Analizler

Düzenlenen veri setleri “Clustal2X” programıyla hizalandı. DNA dizileri “DnaSP 6” programıyla benzerlik analizine tabi tutuldu ve filogenetik analizine en

uygun baz değişim modelini belirlemek için “jModelTest1” programı kullanıldı. Seçilen moledele bağlı olarak verilerin Filogenetik analizler “PAUP4” programıyla ML (Maksimum-Likelihood) ve NJ (Neighbor-Joining) analiz yapıldıktan sonra filogenetik analizi yapıldı. Oluşturulan filogenetik ağaçların güvenilirliklerini belirlemek için 10.000 tekrarlı analizleri yapılp, %50’nin üzerinde desteklenen düğümler ağaçlarda belirtildi. Sonuçların değerlendirilmesi için evrimsel ağaçlar oluşturulup karşılaştırıldı (Fernndez-Espinar et al., 2000; Baxevanis and Ouellette, 2001; Letovsky, 2002; Nisiotou and Gibson, 2005; Bovers et al., 2008; Lemey et al., 2009; Akpınar vd., 2014; Vincent et al. 2018).



5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Mayaların Saflaştırılması ve Stok Haline Getirilmesi

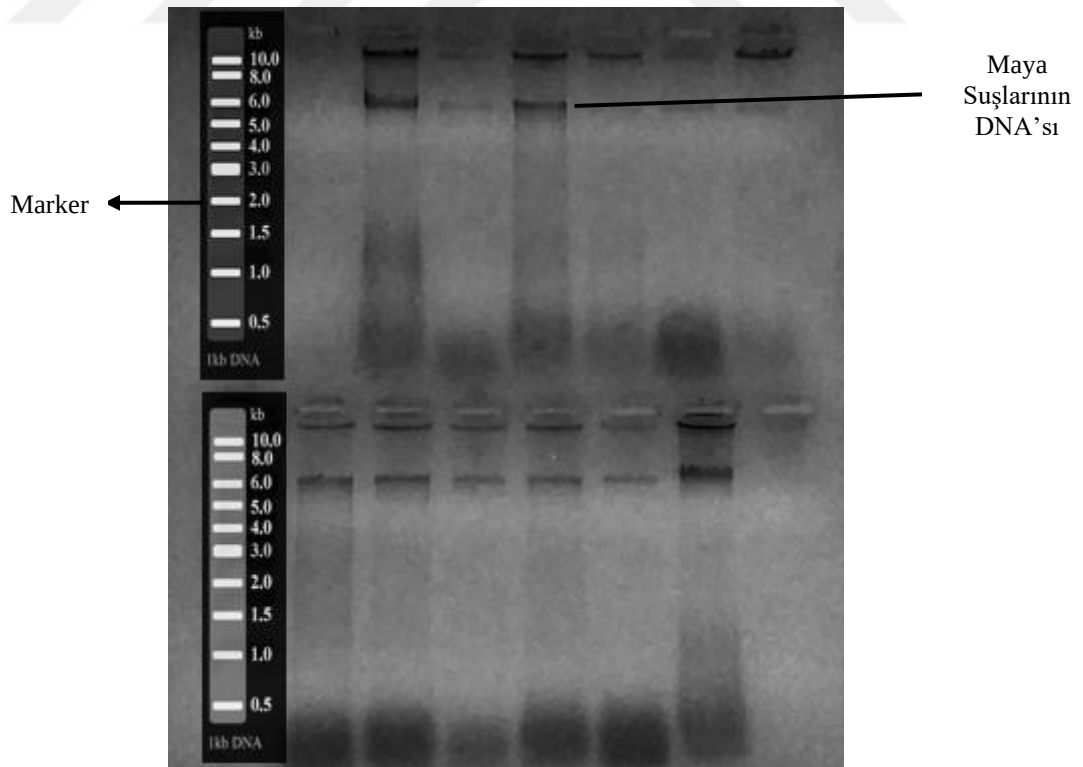
2006-2007 tarihleri arasında Samsun ilinde çeşitli marketlerde satışa sunulan farklı marka ve ambalajlardaki 20 adet, evlerden sağlanan 12 adet olmak üzere toplam 32 adet beyaz peynir örneğinden izole edilip, konvansiyonel yöntemlerle tanımlamaları yapılan 48 maya suşu hem dilüsyon hem de çizme yöntemiyle saflaştırılıp stok kültür haline getirilmiş ve analiz yapılincaya kadar +4°C’de saklandı.

5.2. İzole Edilen Mayaların DNA’ların İzolasyonu ve Saflaştırılması

Beyaz peynir örneklerinden izole edilen saf maya kültürleri Hoffman (2003), Stirling (2003) Mesapogu vd., (2013), Biss, vd., (2014), Ros-Chumillas vd., (2007) ve Shahzadi ve Latif, (2010) maya DNA izolasyon ve saflaştırma yöntemleri kullanılarak 48 adet maya suşunun DNA’sı izole edilip saflaştırılıp ve -18°C’de saklandı.

5.3. Maya Şuşlarının DNA İzolatlarının Saflık Kontrolü

Maya suşlarının DNA’ları kontrol edilip analiz edilinceye kadar -18°C’de saklanmıştır. Maya DNA’larının saflık örneği Şekil 5.1.’de verilmiştir.

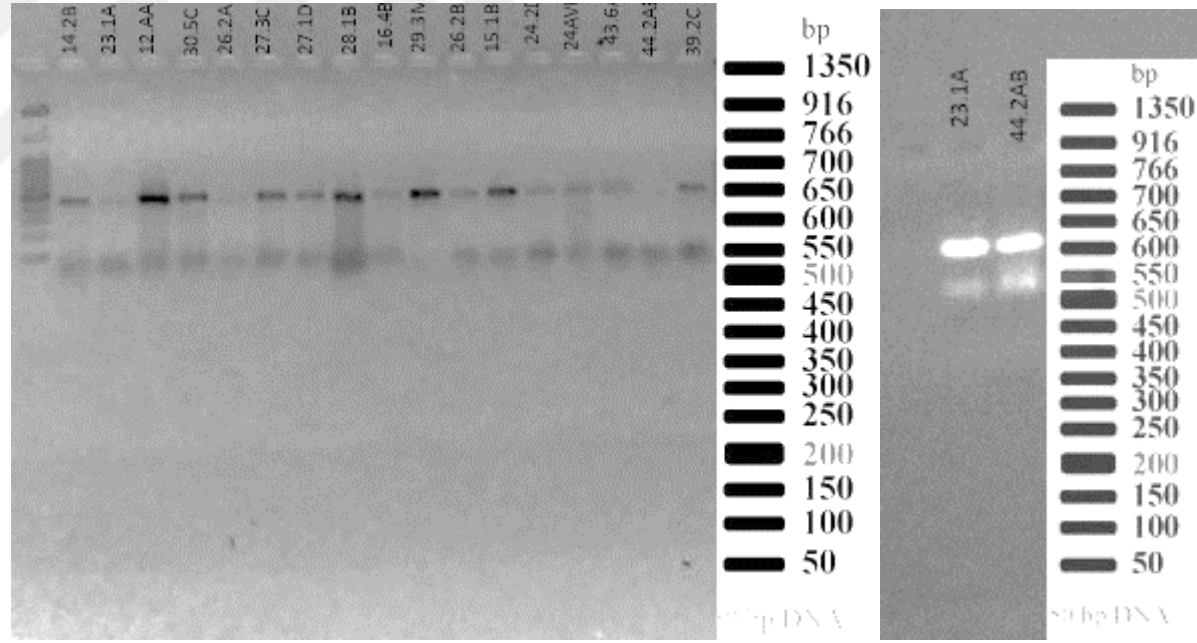


Şekil 5.1. DNA izolatlarının saflık kontrol sonuçları

5.4. PZR Aşaması ve PZR Ürünlerinin Kontrolü

PZR ürünlerinin kontrolü %1.5-2.0 agaroz içeren 1X TAE ile elektroforezde, 90 V 45dk yürütölüp ve PZR sonuçlarının örnek fotoğrafları Şekil 5.2.'de verilmiştir.





Şekil 5.2. PZR ürünlerinin kontrolü

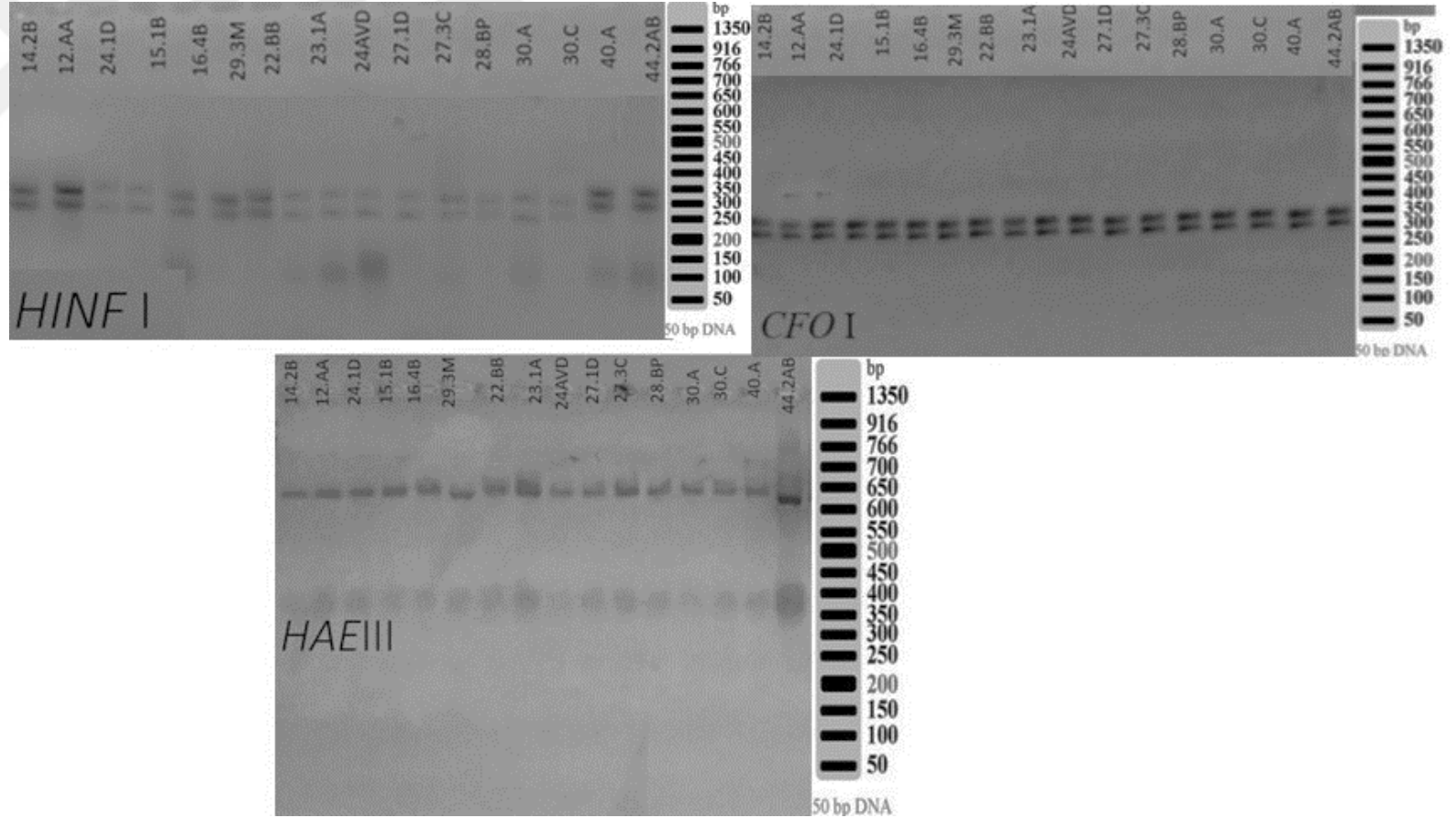
5.5. Maya Suşlarının PZR-RFLP Analizi

PZR-RFLP ürünleri %1.5-3 agaroz içeren 1X TAE'de 90 V 45dk yürütülüp fotoğrafları çekildi. Fotoğraflar ImageJ/Fiji 1.46 ve GelQuantnet programlarıyla incelenmiştir. PZR-RFLP ürünlerinin elektroforez fotoğraf örnekleri Şekil 5.3.'de verilmiştir.

Şekil 5.3.'te de görüldüğü gibi peynirden izole edilen maya suşlarının PZR ürünlerini *Hinf* I ve *Cfo* I restriksiyon enzimi iki yaklaşık 350+300 bp şeklinde bölünme gözlenir iken, *Hae* III restriksiyon enziminde 48 adet PZR ürünlerinin hiçbirinde kesim söz konusu olmadığı bulundu.

Esteve-Zarzoso vd., (1999), Querol vd., (2004), Korabecna (2007) ve Jeyaram vd., (2008) yıllarında yaptıkları çalışmada aynı restriksiyon enzimi kullanarak *Candida colliculosa*, *C. guilliermondii*; *C. inconspicua*, *C. glabrata*, *C. norvegica*, *C. parapsilosis*, *C. stellata*, *C. succiphila*, *C. tropicalis*, *C. tenuis*, *C. vini*, *C. zeylanoides*, *Pichia guilliermondi*, *Torulospira delbrueckii* ve *Yarrowia lipolytica* maya suşlarının PZR-RFLP elektroforez sonuçlarında benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Aynı zamanda PZR-RFLP elektroforez fotoğrafları incelendiğinde 48 adet maya suşunun birbirine benzediği görüldü. Bu nedenle UPGMA (Ağırlık Olmayan Çift Grup Yöntemi Algoritması) oluşturulmadı.



Şekil 5.3. PZR-RFLP ürünlerinin elektroforez’de görüntülenmesi

5.6. Maya DNA'nın Sekans Analizine Seçimi

PZR-RFLP sonuçları birbirine benzediği için, DNA dizi analizine örneklerin gönderilmesinde peynirin kaynağına bakıldı. Buna göre 4 adet marketten ve 6 adet Terme pazarından gelen peynir örneklerinden izole edilen toplam 10 adet maya PZR ürünü KİTAM'a gönderildi. Bu örneklerle ilgili bilgiler aşağıdaki gibidir;

Market peyniri 28, 29, 40 ve 44 maya suşları.

Pazar peyniri 12, 22, 24, 27.1, 27.2 ve 30 maya suşları.

5.7. DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Okunması ve Düzeltilmesi

Elde edilen 10 adet maya suşuna ait ileri (forward) ve geri (reverse) dizileri yanlış okunmuş veya okunmamış bazlar, kromatogramdaki (videogram) sinyallerin (piklerin) güçlülüğüne, temizliğine bakılarak "Geneious (v 4.8.2.)", "FinchTV (v 1.4.0 Demo)", Bioedit (v 7.2.5 software)" ve "CodonCode Aligner (v 10.0.1 Demo)" programlarıyla el ile görsel olarak düzeltilmiştir (Hall, 1999; Lemey et al., 2009).

Elde edilen sonuçlar "Notepad veya MS Office Word" programları kullanılarak "*.fasta" formatına çevrilip depolandı. Yapılan çalışmaya göre ITS bölgesinin baz uzunluğunun 400-750 bp baz çifti uzunluğu arasında değişim gösterdiği gözlemlenmiştir ve değerlendirilmeye alınmıştır.

5.8. ITS1-5.8S-ITS2 Gen Bölgesine Göre Blast Analizi, Genel Veri Seti Oluşturma ve Filogenetik Analizler

Blast analizinden "% benzerlik oranı"nın yanı sıra, çalışmayı yürüten bölüm, ATCC, CBS, gıda, peynir ve süt kaynaklı olmalarına dikkat alınarak elde edilen referans maya suşlarıyla bir veri seti oluşturulmuştur.

Ayrıca 2003-2023 tarihleri arasında yayınlanmış literatürlerde *Yarrowia lipolytica*'nın farklı suşları elde edilip veri setine eklenmiştir. Bu şekilde elde edilen *Yarrowia* cinsine ait toplam 51 adet (örnekler ve dış grup dahil) DNA dizisi içeren veri seti oluşturulmuştur. Yapılan veri seti ve mayaların özellikleri Tablo 5.1.'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Veri setinde bulunan maya suşlarının özellikleri

Suş İsmi	Genbank Kodu	İzole Edilen Örnek	Lokasyon	Kaynak	Referans
12	-	Beyaz Peynir	Market Samsun/Türkiye	Bu Çalışma	
22	-	Beyaz Peynir	Market Samsun/Türkiye	Bu Çalışma	
24	-	Beyaz Peynir	Market Samsun/Türkiye	Bu Çalışma	
27.1	-	Beyaz Peynir	Market Terme/Samsun/ Türkiye	Bu Çalışma	
27.2	-	Beyaz Peynir	Market Terme/Samsun/ Türkiye	Bu Çalışma	
30	-	Beyaz Peynir	Market Terme/Samsun/ Türkiye	Bu Çalışma	
28	-	Beyaz Peynir	Pazar Terme/Samsun	Bu Çalışma	
29	-	Beyaz Peynir	Pazar Terme/Samsun/ Türkiye	Bu Çalışma	
40	-	Beyaz Peynir	Pazar Terme/Samsun/ Türkiye	Bu Çalışma	
44	-	Beyaz Peynir	Pazar Terme/Samsun/ Türkiye	Bu Çalışma	
<i>Y. lipolytica</i>	OM337576	-	Çin	Engineering <i>Yarrowia lipolytica</i> to produce nutritional fatty acids: Current status and future perspectives	Liu et al., (2019); L. Cao et al., (2022)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105979	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)

Tablo 5.1. (devamı)

Suş İsmi	Genbank Kodu	İzole Edilen Örnek	Lokasyon	Kaynak	Referans
<i>Y. lipolytica</i>	MK934490	-/Yoğurt	Polonya/ Türkiye	Yoğurt Kaymağından İzole Edilen <i>Yarrowia lipolytica</i> 'nın Molekülerİdentifikasyonu ve Lipolitik Aktivitesi	Szczyrba (2019) Kiymacı vd. (2022)
<i>Y. lipolytica</i>	KP132929	-	Avustralya	International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi	Irinyi et al., (2015)
<i>Y. lipolytica</i>	MN853744	Peynir	Çin	-	Wang (2019)
<i>Y. lipolytica</i>	KP069020	-	Avustralya	-	Irinyi et al., (2014)
<i>Y. lipolytica</i>	MT671352	Kara ve akciğer	Brezilya	Bacterial and fungal pathogens in granulomatous lesions of <i>Chelonia mydas</i> in a significant foraging ground of southern Brazil	Bracarense et al., (2022)
<i>Y. lipolytica</i>	MW979511	-	ABD	-	Jagtap et al., (2021)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105990		Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Y. lipolytica</i>	OM337578	-	ABD/ABD	A survey of yeast from the <i>Yarrowia</i> clade for lipid production in dilute acid pretreated lignocellulosic biomass hydrolysate/-	Quarterman, et al., (2017); LaButti et al., (2022)
<i>Y. lipolytica</i>	OM337577	-	ABD	Draft Genome Assemblies of Ionic Liquid-Resistant <i>Yarrowia lipolytica</i> PO1f and Its Superior Evolved Strain, YICW001.	Walker et al., (2022)
<i>Y. lipolytica</i>	ON114154	-	ABD	-	Jin,Y. and Rao (2022)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105966	Fermente parafin	İngiltere	Polyphasic re-examination of <i>Yarrowia lipolytica</i> strains and the description of three novel <i>Candida</i> species: <i>Candida oslonensis</i> sp. nov., <i>Candida alimentaria</i> sp. nov. and <i>Candida hollandica</i> sp. nov.	Knutsen et al., (2007)
<i>Y. lipolytica</i>	MT875363	Kalanisasyon suyu	Hindistan	-	Reddy (2020)
<i>Y. lipolytica</i>	HM627146	Böcek/ Bryndza Peynir	Bulgaristan/ Slovakia	-/ Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese	Gouliamova et al., (2011)/ Pangallo et al., (2014)
<i>Y. lipolytica</i>	KX228398	Oreochromis	Mısır	-	El-Sayed et al., (2016)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105967	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105985	İnfekte olmuş deri	İngiltere	Polyphasic re-examination of <i>Yarrowia lipolytica</i> strains and the description of three novel <i>Candida</i> species: <i>Candida oslonensis</i> sp. nov., <i>Candida alimentaria</i> sp. nov. and <i>Candida hollandica</i> sp. nov.	Knutsen et al., (2007)
<i>Y. lipolytica</i>	KP132912	-/Yoğurt	Avustralya / Türkiye	International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi /Yoğurt Kaymağından İzole Edilen <i>Yarrowia lipolytica</i> 'nın Molekülerİdentifikasyonu ve Lipolitik Aktivitesi	Irinyi et al., (2015); Kiymacı vd., (2022)

Tablo 5.1. (devamı)

Suş İsmi	Genbank Kodu	İzole Edilen Örnek	Lokasyon	Kaynak	Referans
<i>Y. lipolytica</i>	ON242313	-	Fransa	Dynamical metabolic modelling for lipid accumulation by <i>Yarrowia lipolytica</i> growing on glucose	Robles-Rodriguez et al., (2015)
<i>Y. lipolytica</i>	OW986180	İnsan kanı	Belçika	-	Becker (2022)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105968	Zeytin	İtalya	Polyphasic re-examination of <i>Yarrowia lipolytica</i> strains and the description of three novel <i>Candida</i> species: <i>Candida oslonensis</i> sp. nov., <i>Candida alimentaria</i> sp. nov. and <i>Candida hollandica</i> sp. nov.	Knutsen et al., (2007)
<i>Y. lipolytica</i>	MK267773	Peynir	İspanya	Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products	Buehler et al., (2017)
<i>Y. lipolytica</i>	MH459414	Peynir	Ukranya	-	Fomina et al., (2018)
<i>Y. lipolytica</i>	DQ680840	-/ Süt Ürünü	Brezilya/ Türkiye	<i>Yarrowia lipolytica</i> and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry/ Süt ve süt ürünlerinden <i>Yarrowia lipolytica</i> izolasyonu, identifikasyonu ve ürettikleri alkalın proteaz ve ribonükleaz enzimlerinin aktivitelerinin araştırılması	Akpınar (2008)/ Takahashi et al., (2014)
<i>Y. lipolytica</i>	LC050545	Peynir	Avusturya	Metabolic Flexibility of <i>Yarrowia lipolytica</i> Growing on Glycerol	Sauer et al., (2017)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105978	Toprak	Hollanda	Polyphasic re-examination of <i>Yarrowia lipolytica</i> strains and the description of three novel <i>Candida</i> species: <i>Candida oslonensis</i> sp. nov., <i>Candida alimentaria</i> sp. nov. and <i>Candida hollandica</i> sp. nov.	Knutsen et al., (2007)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105981	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105973	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Y. lipolytica</i>	EF643594	Narenciye	Meksika	Screening of microorganisms for bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone	Palmerín-Carreno et al., (2015)
<i>Y. lipolytica</i>	KY105981	-/Toprak	Hollanda/ Japonya	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia hollandica</i>	NR 151802	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)

Tablo 5.1. (devamı)

Suş İsmi	Genbank Kodu	İzole Edilen Örnek	Lokasyon	Kaynak	Referans
<i>Yarrowia hollandica</i>	NR 151802	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia bubula</i>	KY105958	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia deformans</i>	KY105961	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia alimentaria</i>	KY101920	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia galli</i>	KY102097	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia osloensis</i>	KY102278	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia divulgata</i>	KY105964	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia parophoni</i>	KY457248	Tanımlanamayan Böcek	Bulgaristan	-	Gouliamova (2017)
<i>Yarrowia brassicae</i>	MF136067	<i>Yarrowia brassicae</i> 'nin holotipi	Çin	-	Hui and Liu (2017)
<i>Yarrowia yakushimensis</i>	NR169916	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)
<i>Yarrowia keelungensis</i>	NR160312	-	ABD	National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA	Anonymous (2018)
<i>Yarrowia porcina</i>	KF649300	-	Maceristan	-	Dlauchy and Nagy (2013)
<i>Yarrowia phangngaensis</i>	KY102330	-	Hollanda	DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation	Vu et al., (2016)

Oluşturulan veri seti analize alınmaları için “Clustal2X” programıyla hizalanıp “Bioedit” programıyla DNA dizileri düzenlendi. Daha sonra bu veri setiyle bulunana 238 bç uzunluğundaki maya DNA dizileri “DnaSP6” programıyla benzerlik analizine tabi tutulmuş ve filogenetik analizine en uygun baz değişim modelini belirlemek için “jModelTest1” programı kullanılmıştır. TIM2+I+G mode seçilip filogenetik analizleri “PAUP4” programıyla yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesi için evrimsel ağaçlar oluşturulup karşılaştırıldı (Fernández-Espinar et al., 2000, Nisiotou and Gibson, 2005, Bovers et al., 2008, Akpınar vd., 2014, Vincent et al., 2018).

5.9. Veri Setinin Benzerlik Analizi

Veri setinde bulunan maya DNA dizileri hizalandıktan sonra, “DNaSP6” programıyla yapılan benzerlik analizine göre, veri setinin monomorfik bölgenin 0 ve polimorfik bölgenin 238-242, haplotip çeşitliliği (haplotype diversity, Hd) 0,7043-0,9667 olarak belirlendi. Peynirden izole edilen mayaların benzerlik analizi sonucu birbirlerine benzer olan maya suşları aşağıdaki gibidir;

Pazardan elde edilen peynir örneklerinden izole edilen 12, 22, 24, 27.1, 27.2 ve 30 maya suşları ile *Yarrowia lipolytica* KY105979/CBS 5919, *Y. lipolytica* MK934490/322, *Y. lipolytica* KP132929/WM1041 ISHAM-ITS-ID MITS796, *Y. lipolytica* KP069020/WM01.193 ISHAM-ITS-ID MITS3041, *Y. lipolytica* MT671352/CM65611P, *Y. lipolytica* MW979511/CABBI, *Y. lipolytica* KY105990/CBS 11385, *Y. lipolytica* OM337578/YB419, *Y. lipolytica* OM337577/YICW001, *Y. lipolytica* OM337576/PO1f, *Y. lipolytica* ON114154/NRRLY-64008, *Y. lipolytica* KY105966/CBS 6331 ve *Y. lipolytica* MT875363/MK0090 referans maya suşları arasında,

Marketlerden elde edilen peynir örneklerinden izole edilen 28, 29,40 ve 4maya suşları ile *Y. lipolytica* KY105973/CBS 6124, *Y. lipolytica* HM627146/D_MR, *Y. lipolytica* KY105967/CBS 2072, *Y. lipolytica* KY105985/CBS 7133, *Y. lipolytica* KP132912/CNRMA6.726 ISHAM-ITS_ID MITS805, *Y. lipolytica* EF643594/LN-13, *Y. lipolytica* ON242313/R15, *Y. lipolytica* OW986180, *Y. lipolytica* KY105968/CBS 2073, *Y. lipolytica* MK267773/E24792-ITS, *Y. lipolytica* MH459414/Chee-FF21, *Y. lipolytica* DQ680840/N4a, *Y. lipolytica* LC050545/PW3312, *Y. lipolytica* MW281684/CBS 5589 ve *Y. lipolytica* KY105978/CBS 2078 referans maya suşları arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir.

5.10. Veri Setinin Filogenetik Analizi

Elde edilen veri setine en uygun baz değişim modelini belirlemek için jModelTest v.0.1 programı kullanıldı. Bu analiz sonucunda Akaike Information Criterion (AIC) ve Basian Information Criterion (BIC) değerlerinin yanı sıra I (frequency of invariable sites) ve G (Gamma Correction) değerleri de belirlenmiştir. jModelTest v.0.1 programı ile elde edilen sonuçlar Tablo 5.2.' de verilmiştir.

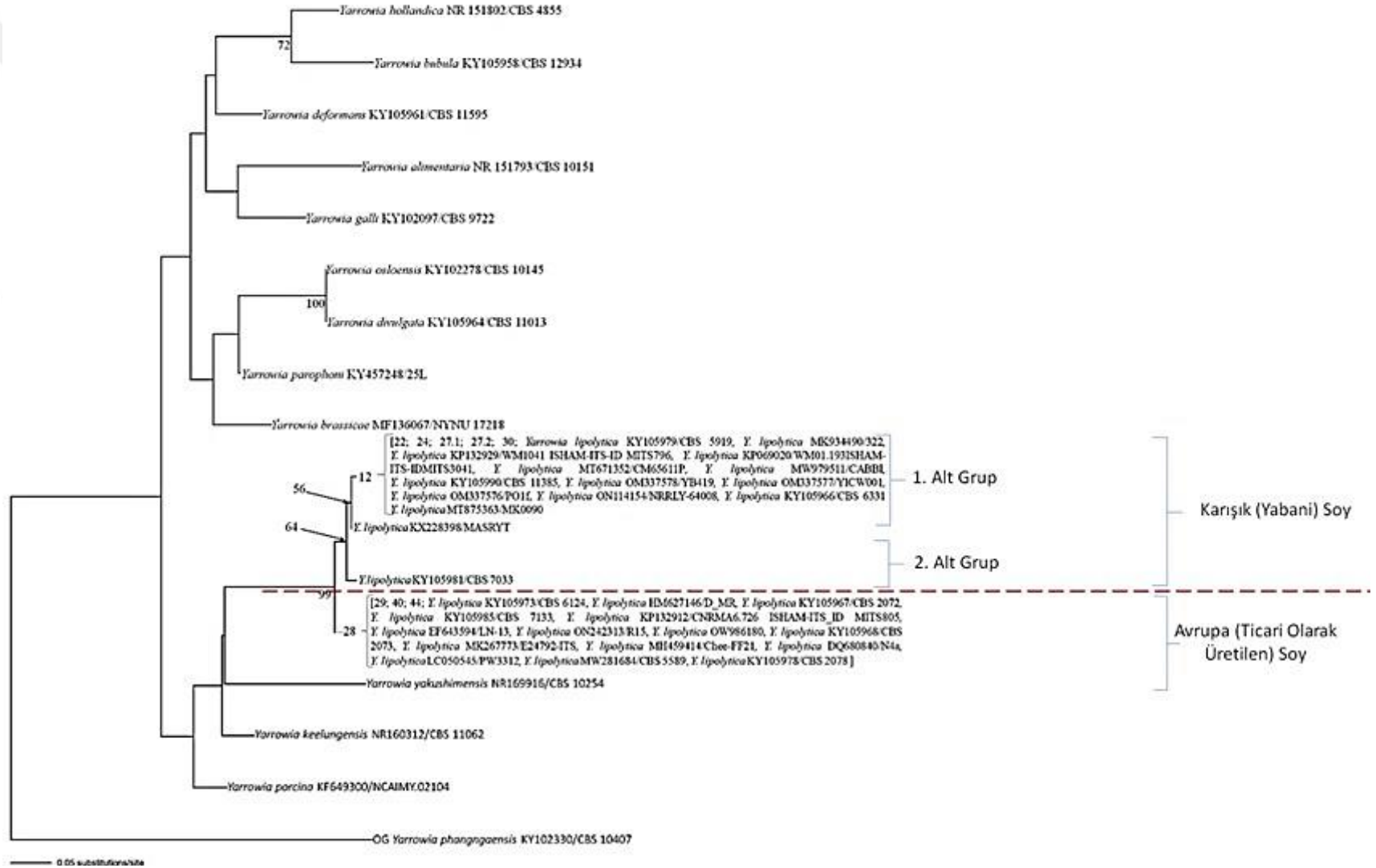
Tablo 5.2. jModelTest v.0.1 programı ile elde edilen sonuçlar

DİŞ GRUP DAHİL		
TIM2+I+G	AIC	BIC
I	0.4550	0.3390
G	0.4550	0.3390

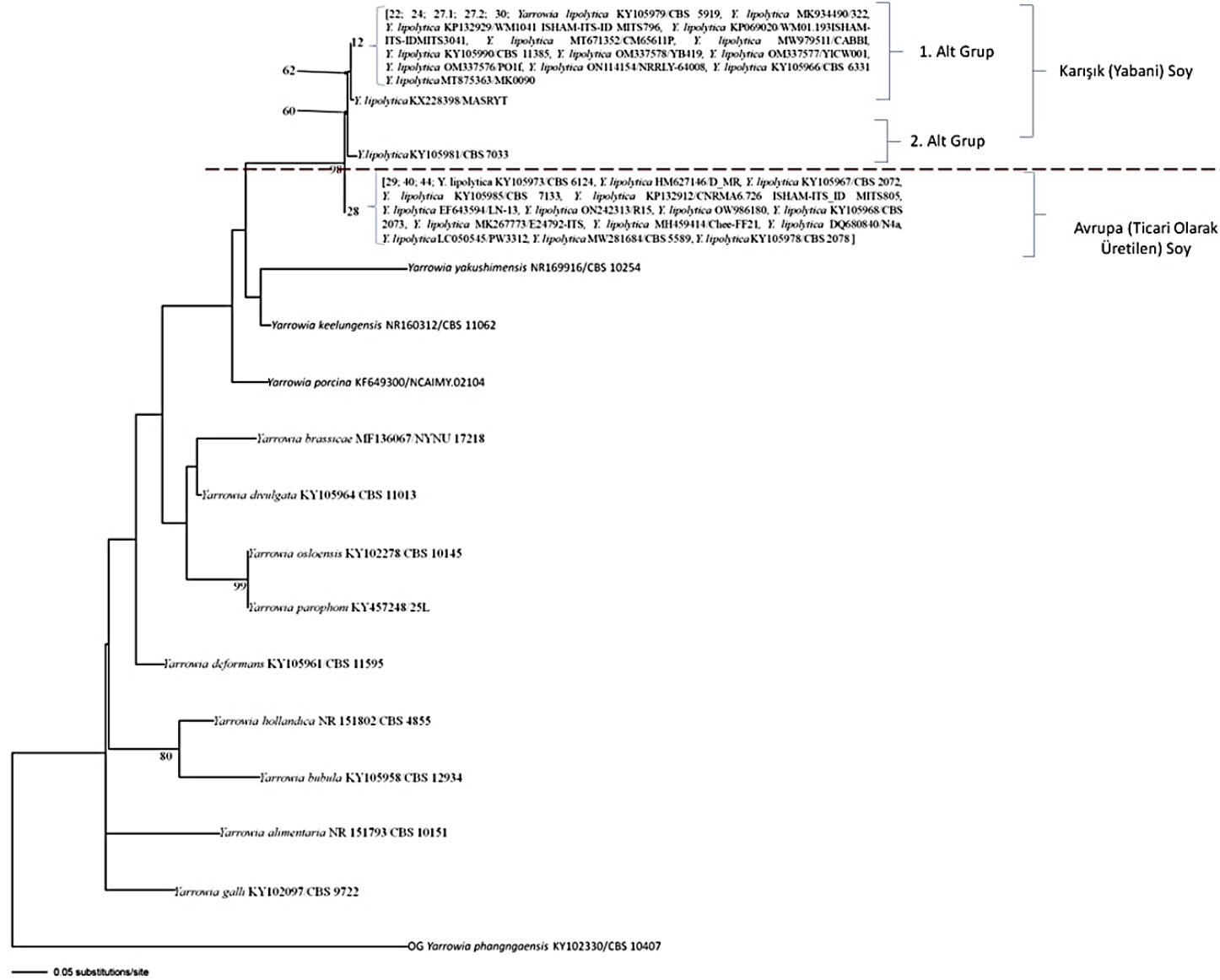
Veri setinin filogenetik analizi TIM2+I+G modeline bağlı olarak veri setinin filogenetik analizleri “PAUP4” programıyla NJ (Neighbor-Joining) ve ML (Maksimum-Likelihood) analizi yapıldıktan sonra filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

NJ ve ML algoritmalarıyla oluşturulan filogenetik ağaçların güvenilirliklerini belirlemek için 10.000 tekrarlı (Bootstrap) analizleri yapıp, %50'nin üzerinde desteklenen düğümler ağaçlarda belirtilmiştir. NJ ve ML filogenetik ağaçları şekil 5.4. ve 5.5.'te verilmiştir.

NJ tree



Şekil 5.4. Oluşturulan veri setinin TIM2+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak NJ algoritmasına göre çizilmiş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir



Şekil 5.5. Oluşturulan veri setinin TIM2+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak ML algoritmasına göre çizilmiş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir

NJ ve ML filogenetik ağaçları birbirlerine benzemekte olup, beyaz peynirden izole edilen maya izolatları iki ana soy hattı şeklinde ayrılmakta ve bu ayrım 99 ve 98 bootstrap değerleri ile desteklenmektedir. Bu ayrım maya suşlarının “Market” ve “Pazar” örneklerinden izole edildiğini açıkça göstermektedir.

NJ ve ML filogenetik ağaçlarında Marketlerden elde edilen peynir örneklerinden izole edilen 28, 29, 40 ve 44 nolu maya suşları ile ağırlıklı *Y. lipolytica*’nın Avrupa soylarına ait referans suşları ile yakın akrabalık içerisinde olduğu görülmektedir. Bu hem haploid analizi ile hem de blast analizindeki %98-100’lük değerlerce desteklenmektedir. Ayrıca bu soy hattında bulunan *Yarrowia lipolytica* suşlarının çoğu laboratuvarı üretilen ticari suşlar olarak görülmektedir. *Y. lipolytica* KY105973/CBS 6124 (*Y. lipolytica* W29 suşundan üretilmiş) ve *Y. lipolytica* DQ680840/N4a (mutasyon ile elde edilmiş) referans maya suşları arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir (Casarègola, et al., 1997; Anonymous, 2018a). Suzzi vd., (2001), mozzarella peynirlerinin çeşitli bölgelerinden izole edip lipolitik ve proteolitik aktiviteleri incelemek amacıyla izole ettikleri *Yarrowia lipolytica* maya suşlarının Avrupa kökenli olduklarını belirlemişler ve bu maya suşlarını kendi koleksiyonlarına katmışlardır. Kıymacı vd., (2022), yoğurt kaymağından izole edilen *Yarrowia lipolytica* maya suşlarının moleküler identifikasyonu ve lipolitik aktivitesi için yaptıkları çalışmada ağırlıklı olarak Avrupa orjinli *Y. lipolytica* belirtmişlerdir. ABD’de Nebraska eyaletinde satışa sunulan çok sert, sert, orta yumuşak, yumuşak ve krem ağırlıklı olarak ABD menşeli peynir örneklerinden 239 koloni saflaştırılarak DNA sekans analizi sonucunda dominant maya suşu %79 *Debaryomyces hansenii* ve %63 *Galactomyces candidus* bulunduğu bildirilmiştir. Diğer maya suşları olarak %13 *Candida parapsilosis*, *C. sake*, *C. batistae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia kudriavzevii* ve *Yarrowia lipolytica* olarak saptanmıştır. *Y. lipolytica* sadece Almanya menşeli yıkanmış kabuklu peynir ve küf olgunlaştırılmalı peynirlerde bulunduğu belirtilmiştir (Banjara et al., 2015). Ayrıca *Yarrowia lipolytica* beyaz peynirde starter ve olgunlaştırmaya yardımcı kültür olarak da kullanılabilmektedir (Cerit, 2020; Gürkan, 2019, Bintsis, 2021).

NJ ve ML filogenetik ağaçlarında da görüldüğü gibi karışık ana soy hattında pazardan elde edilen peynir örneklerinden izole edilen 12, 22, 24, 27.1, 27.2 ve 30 nolu maya suşları ile ağırlıklı *Y. lipolytica*’nın karışık bölge orjinli ve yabani mayalar olduğu görülmektedir. *Y. lipolytica* MK934490/322, *Y. lipolytica*

MT671352/CM65611P, *Y. lipolytica* OM337578/YB419, *Y. lipolytica* OM337577/YICW001 ve *Y. lipolytica* OM337576/PO1f referans maya suşları yabancı tip olarak değerlendirilmekte ve biyoteknolojini çeşitli alanlarında kullanımı için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar arasında biyoyakıt, etanol, çeşitli organik asit, mikrobiyal enzim ve renk maddeleri üretim konuları gelmektedir (Casarègola, et al., 1997; Ledesma-Amaro et al., 2015; Pomraning et al., 2018; Larroude et al., 2020; Kamineni et al., 2021; Madzak, 2021; Sarantou et al., 2021).

Ayrıca bu soyda bulunan maya suşları *Y. lipolytica* KX228398 Mısır orjinli referans suşu ile daha yakın akrabalık derecesi olduğu hem %50 üstündeki bootstrap değerleri ile hem de hem de balast analizindeki %98-100'lük benzerlik göstermesiyle desteklenmektedir. Böyle farklı orjinli *Y. lipolytica* maya suşları çeşitli literatür kaynaklarında karşımıza çıkmaktadır. Naumova vd., (2010), Brezilya kıyılarında ölü bulunan *Chelonia mydas* balıklarının kara ve akciğerlerinden elde ettikleri *Y. lipolytica* maya suşlarının orijinlerinin arasında Japonya, Fransa, ABD ve Avustralya bulunduğunu belirtmişlerdir. Bankar vd., (2009), çeşitli fabrika atıklarında izole ettikleri *Y. lipolytica* maya suşlarının orijinlerinde farklılıklar görülmektedir. Bu farklılıkların Hindistan, ABD, Fransa ve Almanya olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı şekilde Mirbagheri vd., (2012), çeşit et ürünlerinden izole ettikleri *Y. lipolytica* maya suşlarının orijinleri ABD, Rusya, Norveç ve İran olduğunu belirtmişlerdir. Bu çeşitliliğin nedeni olarak pazarda satışa sunulan beyaz peynirlerin hammadden ve satış yerinden kontaminasyonu, yetersiz ısıtma işlem uygulamaları, soğuk zincirin sağlanamaması, peynirin satışı sırasında uygun şekilde depolanmaması, steril olmayan ambalaj, üretim sırasında hijyen-sanitasyon uygulamaları ve uygun olmayan depolama koşulları gibi faktörlerden ortaya çıkmaktadır. Kaynar vd., (2005), Ankara piyasasında satışa sunulan peynirlerin hijyenik kalitesini belirmesini yaptıkları bir çalışmada, peynirde maya bulunması üretim veya satış yerlerinde açık, hava ile temasın fazla olduğunun göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar uygun olmayan üretim ve satış yerlerinde mayalara yanında patojen mikroorganizmalarında hızla gelişmesiyle insan sağlığını olumsuz yönde etkileyeceğinin altını çizmişlerdir. Tunç vd., (2021), Sakarya ilindeki halk pazarlarında açıkta satılan beyaz peynirlerin mikrobiyal kalitesini belirlemek amacıyla 43 adet beyaz peynir örneğinde ortalama toplam koliform sayısı 1.62 ($\log_{10}$ kob/g), *Escherichia coli* 1.25 ($\log_{10}$ kob/g) *Pseudomonas* sp. 0.06 ($\log_{10}$ kob/g), *Staphylococcus aureus* 1.19 ($\log_{10}$ kob/g), maya-küf 1.9 ($\log_{10}$

kob/g) olarak tespit etmiştir. Araştırmacılar halk pazarında satılan beyaz peynir örneklerinin hijyenik açıdan düşük kalitede olduklarını ifade etmişlerdir. Literatürlerde de görüldüğü gibi pazarlarda satışa sunulan beyaz peynirler *Y. lipolytica* maya suşlarının farklı orijinlerin olmasının yanında patojen mikroorganizmalarında olabileceğini göstermektedir.

Araştırmada beyaz peynirden izole edilen tüm maya suşlarının yüksek oranda *Yarrowia lipolytica* maya suşlarını olabileceği düşünülmektedir. *Yarrowia lipolytica* gıdalarda bozulmaya yol açan maya suşları arasında yer almaktadır (Büyüksirt Bedir, 2019). Peynirlerde *Yarrowia lipolytica* en sık rastlanan 10 maya türü arasındadır (Kesenkaş ve Akbulut, 2006; Uzundağ vd., 2020). Bu sonuç PZR-RFLP yöntemi ile örtüşmektedir. Barrio vd. (2000), *Saccharomyces* cinsine ait 29 maya suşunun doğruluğunu belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 29 maya suşunun PZR-RFLP ve DNA sekans tanımlama yöntemlerinin *Saccharomyces sensu stricto* suşu dışında diğer sonuçlarda tutarlılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Yine aynı şekilde bir geleneksel peynir olan Cabrales peynirlerinden izole edilen mayaların tanımlanmasında ITS4 ve ITS5 primerleri kullanılıp *HaeIII* ve *HinfI* restriksiyon enzimleriyle kesimleri yapılarak PZR-RFLP profilleri çıkarılmıştır. Daha sonra araştırmada ITS1-5.8S-ITS2 DNA sekans analiz yapılarak sonuçlar karşılaştırmıştır. Araştırmacılar, moleküler tanımlama yöntem sonuçlarına göre Cabrales peynirinde *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* ve *Pichia fermentans* hâkim maya florası olduğu bulunmuş ve DNA sekans analizi ile PZR-RFLP analiz sonuçları birbirini ile örtüşmekte olduğunu belirtmişlerdir (Álvarez-Martín et al., 2007). Gibson vd., (2011), arpa, bira (üç farklı tank ve iki farklı large birasında 59 yabancı maya izole edip, ITS PZR/RFLP profillerini inceleyip) yabancı mayaların tanımlanması ve tespiti için rutin identifikasyon yöntemi olarak kullanılıp kullanılmayacağını irdelemişlerdir. Araştırmada, ITS bölgesinin 5.8 rRNA genini ve komşu ITS1-ITS2 bölgeleri çoğaltılıp *CfoI*, *HaeIII* ve *HinfI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. Araştırmacılar sonuçların tutarlı olduğunu belirtmişlerdir. Yunanistan'da farklı bölgelerden 12 adet ev yapımı kefir tanesi örneklerinden izole edilen maya suşları ITS1 ve ITS4 Primeri kullanılarak *HhaI*, *HinfI* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleriyle kesilip PZR/RFLP profillerini inceleyip literatürle karşılaştırmışlardır. Araştırmada maya suşları ITS1-5.8S-ITS2 DNA sekans analizine tabi tutulmuşlar ve sonuçlar blast analiz yapılarak kefir tanesindeki dominant maya suşlarının *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *D. hansenii*, *P. fermentans*, *Kazachstania*

unispora, *C. sakebeing*, *P. membranifaciens* ve *C. zeylanoides* olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ITS1-5.8S-ITS2 DNA sekans analizi ile PZR/RFLP profilleri arasında bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir (Kalamaki and Angelidis, 2017).

Araştırmamızda *Yarrowia lipolytica*'nın baskın olmasının en büyük sebebi beyaz peynir örneklerimizin koyun sütü ve yüksek oranda yağ içermesinden ileri gelmektedir. Bir diğer sebep ise özellikle *Yarrowia lipolytica*'nın kış ve ilkbahar aylarında dominant maya suşu olmasından kaynaklanmaktadır. Corbo vd., (2001), keçi, inek ve koyun peynirlerinin yanında peynir altı sularından toplam 105 adet maya izole etmişlerdir. İzole ettikleri bu maya suşlarını konvansiyonel yöntemle göre %15.24 *Trichosporon cutaneum*, %10.48 *Candida catenulata* ve %8.54 *Yarrowia lipolytica* maya suşlarının dominant olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca yağ oranı yüksek olan sütlerde *Yarrowia lipolytica* maya suşunu doğal olarak bulunabileceğini belirtmişlerdir. Bu maya suşunun +4°C'de sitrik ve laktik asit asimilasyonlarının yanında lipolitik ve proteolitik aktivitelerinin olduklarına dikkat çekmiştir. Kış, bahar ve yaz dönemlerinden elde edilen sütlerle yapılan Robiola di Roccaverano (keçi veya keçi ve inek karışımı olgunlaştırılmış yumuşak peynir) peynirlerin maya ve bakteri florasını incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada mikroorganizmaların tanımlanmasında Denatüre Gradient Jel Elektrophorez (DGGE) yöntemiyle kış ayında üretilen (geleneksel ve endüstriyel taze ve olgunlaştırılmış) Robiola di Roccaverano peynirlerinde *Geotrichum* spp., *Kluyveromyces lactis* *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomycete* spp. maya suşlarının dominant, bahar döneminde ayında üretilen (geleneksel ve endüstriyel taze ve olgunlaştırılmış) Robiola di Roccaverano peynirlerinde *Saccharomyces exiguus*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomycete* spp., *Candida sake* ve *Candida catenulata* dominant maya suşu olduğu halde yaz ayında üretilen peynirlerde maya izole edilemediğini ortam florasını küf aldığını belirtmişlerdir (Bonetta et al., 2008). Bu iki faktörü desteklemektedir. Ayrıca Demir (2021), koyun, inek ve keçi sütlerinden üretilen Edirne beyaz peynirlerinin depolama süresince fizikokimyasal, mikrobiyolojik, tekstürel ve duyuşal açıdan değerlendirilmesi üzerine yaptığı çalışmada inek ve koyun sütünden yapılan beyaz peynirlerin yağ oranının 49.71 ± 0.31 -% 51.96 ± 0.60 olduğu belirlenmiştir. Benzer bir çalışma Gürsoy vd., (2021), yapmış ve peynirlerin yağ oranlarını 53.00 ± 1.41 -

%58.00±0.00 bulmuştur. Literatür araştırması sonucu Türkiye de satışa sunulan beyaz peynirlerin yağ oranlarının yüksek olduğu bulunmuştur.

Welthagen ve Viljoe (1999), Gouda peynir fabrikasında 32 günlük peynirin olgunlaştırma periyodunda fabrikanın çeşitli yerlerinden maya suşu izole ederek Gouda peynirinde dominant maya suşun %20 *Debaryomyces hansenii* olmasının yanında diğer dominant suşların sırasıyla %11 *Yarrowia lipolytica*, %10.4 *Saccharomyces cerevisiae* ve %7.6 *Torulaspora delbrueckii* olarak belirtmişlerdir.

Türkiye’de yumuşak beyaz peynirlerin maya florasının incelenmesi için morfolojik, biyokimyasal PZR-RFLP ve 5.8S rDNA sekans analizi kullanılmıştır. Bu analizlerin sonucunda hâkim maya florasının %32.6 *Debaryomyces hansenii*, %18.5 *Kluyveromyces marxianus* ve %17.4 *Yarrowia lipolytica* olduğu belirtilmiştir. Özellikle mayaların proteolitik ve lipolitik aktiviteleri dolayısıyla peynirlerin olgunlaştırmasında olumlu rol oynasalar bile bu aktivitelerinden dolayı acılaşma ve ekşimeye neden olduklarını unutulmaması gerektiğinin altını çizmişlerdir (Yalçın ve Uçar, 2009).

Brezilya’da üç farklı şehirde, marketlerden topladıkları üç farklı ticari markaya ait 30 adet mozzarella peynir örneğinden izole edilen maya suşlarının tanımlamamasında EI1, NL1/ NL4 primerleri kullanarak PZR-PFLP yöntemiyle *Zygosaccharomyces bailii* UFMG-L10, *Kluyveromyces lactis* UFMG- PJ01B, *Debaryomyces hansenii* UFMGQA12-02, *Torulaspora delbrueckii* UFMG-PJ01A, UFMG-QJ11-02, *Candida catenulata* UFMG-QP10-2, *Candida albicans* ATCC18804, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750 ve *Candida lusitaniae* CBS 6936 kontrol suşlarını kullanarak karşılaştırılmasının yanında, analiz sonuçlarını doğrulamak amacıyla D1/D2 sekans analizinin yapılması sonucunda ticari markaya ait 30 adet mozzarella peynir örneklerinde %73 *Debaryomyces hansenii*, % 36 *Candida parapsilosis* ve %30 *Yarrowia lipolytica* dominant maya suşu olarak bulunmuştur (Facchin et al., 2013).

Burdur halk pazarından toplanan Aralık ve Ocak aylarında toplanan 100 adet beyaz peynir örneğinin maya florasının belirlenmesinde API 20 C AUX Test Kit’i kullanılarak mikrofloranın %84 *Candida* spp. bu değerin %14’ü *C. krusei*, %5’i *C. tropicalis* suşları olduğu belirlemişlerdir. Ancak araştırmacılar bu konu hakkında çalışmalar yapılmasını önermektedirler (Yurdakul vd., 2016).

Bintsis ve Papademas (2017), Kuzey-Doğu Akdeniz ve Balkanlar en çok üretilen peynirlerin Feta (Yunanistan), Domiati (Mısır), Beyaz (Türkiye), Brinza (Bulgaristan) ve Halloumi (Kıbrıs) olduğunu belirtmişlerdir. Arattırıcılar Danimarka ve Yunanistan salamura beyaz peynirde *Torulospore delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida sake*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Candida butyri* maya suşlarının dominant olup peynirde çeşitli kayıplara neden olduklarını belirtmişlerdir.

Krem peynir, sert peynir, yoğur ve içilebilir yoğurttan oluşan fungal olarak bozulmuş süt ürünlerinden 63 adet küf ve maya izole edilerek kalsiyum propiyonat, potasyum sorbat, sodyum benzoat ve natamisin antifungal katkı maddelerine karşı dirençlilikleri karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada, DNA izolasyonu için FastDNA SPIN Kit kullanılmış (ITS) ve 26S rRNA DNA sekans analizleri yapılarak tanımlamaları yapılmıştır. Araştırmada bozulmuş yarı sert ve sert peynirlerde baskın maya suş olarak %39 *Yarrowia lipolytica* olarak bulunmuştur. Ayrıca araştırmacılar *Yarrowia lipolytica* ve *Candida parapsilosis* maya suşlarının propiyonat, potasyum sorbat, sodyum benzoat ve natamisin antifungal katkı maddelerine karşı dirençlilikleri yüksek olduklarını belirtmektedirler (Garnier et al., 2017)

Gelen (2017); Gelen ve Ceylan (2021), 50 adet geleneksel beyaz peynir örneğinden mayalar izole edip, VITEK2 Compact sistemiyle %35.6 *Candida sake*, %13.3 *Candida zeylanoides*, %8.9 *Candida famata* ve %8.9 *Candida kefir* tanımlayarak beyaz peynirde dominant maya suşları olduğunu belirtmişlerdir.

Yalman (2018), Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen ve manda sütünden üretilmiş olan 20 adet (7 adet Mozzarella ve 13 adet Beyaz peynir) ev ve ticari peynir örneklerden toplam 180 adet maya izole edilip fenotipik ve MALDI-TOF MS tanımlama yöntemleri ile peynir örneklerinde dominant mayaların %41,51 *Debaryomyces*, %23,27 *Candida*, %7,55 *Clavispora*, *Pichia* %6,92 ve %6,29 *Kluyveromyces* cinslerine ait suşlar olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmada kullanılan peynir örneklerinin ortalama yağ oranlarını %11.25-%31.75 olarak belirlemiştir.

2015-2016 Kayseri'de süt ürünleri, et ürünleri, taze meyve ve sebzeler, turşu ve salamura ürünler olmak üzere farklı gıda gruplarına ait örneklerin maya profilleri tespit etmek amacıyla market, halk pazarları ve ev yapımı ürünlerden toplam 86 üründen 1032 adet maya izolatu izole etmişler ve PZR (rep- PZR) yöntemiyle gruplandırıp, her

bir grubu temsil edecek sayıda izolat 26 S ribozomal DNA üzerindeki 665 bp'lik bölge (D1/D2 bölgesi) ve ribozomal DNA'nın transkript olan ara bölgesini (ITS) hedef alan dizi analizi yöntemi ile tanımlanmışlardır. Tanımlanan izolatların dağılımı üründen ürüne değişmekle birlikte %11.60 *Pichia fermentans*, % 11.50 *Debaryomyces hansenii*, % 10.08 *Candida zeylanoides* ve %8.04 *Kluyveromyces marxianus* en baskın maya suşları olduklarını belirtmişlerdir (Büyükkiraz vd., 2020).

Marangoz (2020), yaptığı Salamura beyaz peynirlerde kötü kokuya neden olan uçucu bileşenlerin tanımlanması ve bozulma yapıcı mikroorganizmalarla ilişkilendirilmesi üzerine yaptığı çalışmada, nisan ayında Kırklareli' den 15 adet kötü kokan beyaz peyniri örnek olarak kullanmış ve bu örneklerin yağ oranlarını kuru madde üzerinden ortalama 54.52 ± 2.12 bulmasına karşın kötü kokuya neden olan floranın *Bacillus* spp. bakterilere ait suşlar olduğunu bulmuştur. Ayrıca mikroorganizmaların tanımlanmasında MALDI TOF MS cihazını kullanmıştır. Araştırmada kötü kokuya neden olan diğer mikroorganizmaların *Pseudomonas* spp. ve *Staphylococcus* spp., bakteri suşları olduğu bitirtilirken kayada değer maya sayısına rastlanılmadığı belirtilmiştir. Literatürlerden de görüldüğü gibi beyaz peynir yağ oranı yüksek üretim aynı aylarda olsa da, bulunduğu bölge, sütün standardizasyonu, peynirin üretim şekli, taşınması, paketlenmesi, satış yerleri ve tüketimden önceki depolama koşulları peynir florasını etkilemektedir.

Araştırmada mayaların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlerin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Cabrales peynirlerinden konvansiyonel ve test kiti ile tanımlanmış olan 71 adet izole edilen maya izolatı genotiplendirme için PZR-RFLP profil analizi ve ITS1-5.8S-ITS2 bölge sekans analizine tabi tutulmuştur. Araştırmada 33 adet maya suşunun (*Pichia* ve *Saccharomyces* cinslerine ait suşlar iken *Zygosaccharomyces* cinsine ait suş olarak tanımlanmıştır) yanlış konvansiyonel ve test kiti yanlış tanımlandığı belirtilmiştir (Álvarez-Martín et al., 2007).

2007 Ankara'da bulunan çeşitli marketlerden 27 adet farklı peynir (beyaz peynir, kaşar peynir ve tulum peynir) örneğinden toplam 44 maya izolatı elde edilmiştir. Bu izole edilen maya suşları temel prensibi konvansiyonel yöntemeye dayalı API-ID32C Test kiti ile %48'nin *Sacharomyces kefir*, %43'ünün *Cryptococcus humicola* ve %7'sinin *Candida lusitana*, *C. norvegensis*, *C. kruse* ve *C. inconspicua* olarak

bulmuşlardır. Ayrıca bu izolatların 18 adedi, 18S rRNA DNA sekans dizi analizine tabi tutulmuş olup, seçilen maya suşlarının 10 tanesi *Kluyveromyces marxianus* ve 8 tanesinin de *Pichia kudriavzeii* olduğu belirlenmiştir (Maiheubai, 2007).

Akpınar (2008), çeşitli süt ürünlerinden izole ettiği maya suşlarını hem konvensiyonel hem de moleküler yöntemle tanımlamıştır. Analiz sonuçlarında *Y. lipolytica* maya suşunu tanı anahtarında glikozu fermente edebildiği halde tanı anahtarlarında negatif sonuç bulmuşlardır.

Nevşehir yöresindeki Yavaş Ovası'nda Emir ve Kalecik Karası üzümlerine özgü yabani maya floraları ile bu üzümlerden elde edilen şıraların spontan fermentasyonları sırasında, maya florasındaki değişimler incelenmesi için yapılan bir çalışmada, izole edilen mayaları önce ID 32C sistemi ve konvensiyonel tanımlama sistemleriyle *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Stephanoascus* ve *Torulaspora* cinslerine ait suşlar olduğu belirlenmiştir. Araştırmada yapılan PZR-RFLP profil ve PZR-RAPD elde edilen suşlar arasındaki benzerliklerin olmadığı belirtilmiştir (Ergül, 2009).

Wrent vd., (2015), değişik kültür koleksiyonlarından oluşan önceden konvensiyonel yöntemle tanımlanan 94 adet karışık maya suşlarının doğruluklarının belirlenmesinde ilk etapta PZR-RFLP yöntemiyle sınıflandırma yapmak için IGS ve ITS rDNA yanı sıra PAD1 homolog bölgelerini çoğaltıp *Hinf*I, *Hae*III ve *Cfo*I restriksiyon enzimleriyle kesip profillerini Yeast-id database (<http://www.yeast-id.com>) web sitesinden incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuca göre maya suşlarını D1/D2 26S rDNA sekans analizini yapıp elde ettikleri verileri balst analizine tabi tutmuşlardır. Araştırmada PZR-RFLP profilleri ile 5.8S ITS rDNA sekans tanımlama yöntemiyle sonuçlarının örtüştüğünü konvensiyonel yöntemlerin yersiz kaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar 45 gıda kaynaklı *Debaryomyces fabryi* ve *Debaryomyces subglobosus* maya suşlarında %100 başarı sağlamışlardır.

Bu çelişki literatürlerde de görüldüğü gibi genotiplendirmenin genetik materyal üzerinden olduğu için analizin çevre koşullarından etkilenmemesidir. Ayrıca tanı anahtarlarındaki tutarsızlıklar, tanımlanan maya suşlarının isimlerinin değişmesi, maya suş ve türlerinin morfolojik olarak birbirlerine benzer yapıların oluşması daha fazla fizyolojik ve biyokimyasal test ihtiyacı gelmektedir.

6. SONUÇ

Türkiye’de artan nüfus artışı karşısında yeterli, dengeli ve sağlıklı beslenmesi çeşitli gıdaların uygun şekilde tüketilmesine bağlıdır. Bunların arasında süt ve ürünleri büyük yer tutmaktadır. Günümüzde ülkemiz tarımda ve sanayileşmede büyük adımlar atılsa da hala bu sektörlerdeki sorunlar çözülememiştir. Bu sorunlar kişi başına düşen süt miktarının azlığı, kayıt dışı üretimin fazlalığı, döviz kurlarındaki dalgalanmalar, bilgi ve teknoloji kullanımındaki eksiklikler, bilim kuruluşlarıyla özel sektör arasındaki iletişimsizlik, sermayedeki istikrarsızlıklar, işletmelerin büyüme düşüncelerinin olmaması, üreticinin farklı alanlara kayarak para kazanmak istemesi, hayvan bakımı-temizliği, hayvan barınaklarındaki sorunlar, hayvanların beslenmesindeki sorunlara, üreticinin eğitimsizliği, sütte yapılan çeşitli hileler, üretilen sütün standardizasyonu, satış yerlerindeki kötü koşullar, süt işleme ve üretim tesislerinin küçük işletme şeklinde olması v.b. şeklinde sıralanmaktadır. Bu sorunlardan peynir sektörü direk olarak etkilenmesiyle tüketicinin bu ürünlere ulaşması günden güne zorlaşmaktadır (Hekimoğlu ve Altindeğer, 2008; Turan vd., 2017; Kubaş ve Kondal, 2020; Karakök vd., 2022).

Beyaz peynir sektöründe bu sorunların yanında, beyaz peyniri bozarak çeşitli kalite kayıplarına neden olup ürün katma değerinin düşmesine sebep olan mikroorganizmalar özellikle mayalar gelmektedir. Mayalar, (birkaç *Candida* ve *Cryptococcus*’un bağız cinslerine ait bazı suşlar hariç) patojen özellik göstermeyen ökaryot mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar karbon asimilasyonu, fermentasyonu, lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucu peynirde; kötü kokuya, ransit tat, acılaşmaya, ekşimeye, yumuşamaya, yüzeyde zar oluşumuna ve gaz oluşumuna neden olarak ürünü bozmaktadırlar. Ayrıca maya sayısını TSE maksimumu limit sayısından yüksek sayıda olması o işletmenin hijyen-sanitasyon kurallarına düzgün bir şekilde uymadığının göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Günümüzde mayaların tanımlanmasında en güvenilir yöntemlerden biri DNA sekans sekans analizidir. Bu analiz daha çok özel laboratuvarlar tarafından yapılmaktadır. Sonuçlar daha sonra araştırmacılara tarafından blast analizi ve çeşitli özel programlarla çeşitli modelere bağlı filogenetik ağaçlar üzerinde tanımlanmaya dayanmaktadır. Bu nedenle DNA sekans tanımlama yöntemini kesinliği çok yüksek bir yöntemdir. Ancak bu yöntemdeki en büyük sorun DNA dizilerinin kirli olması ve veri setinin dizililemesini çok zaman almasıdır.

Çalışmada beyaz peynir örneklerinde bozulma etmeni mayalardan dominant olarak %100 *Yarrowia lipolytica* maya suşu olduğu belirlenmiştir. *Y. Lipolytica*, *Yarrowia* cinsine ait tek türdür. Türün gelişmiş formu ilk olarak 1960'lı yılların sonlarında Wickerham tarafından *Candida lipolytica* şeklinde tanımlanmıştır. Gelişmiş formu, *Endomycopsis lipolytica*, daha sonra *Saccharomyces lipolytica* ve nihayet *Yarrowia lipolytica* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Kesenkaş ve Akbulut, 2006). Çalışmada pazar ve marketlerden alınan örneklerde farklı orjinli *Y. lipolytica* suşları olduğu bulunmuş ve literatürlerce de bu sonuçlar desteklenmiştir. Bu sonucu PZR-RFLP parmak izi analiz sadece aynı maya suşu olduğunu belirlenmesinde kullanılmıştır. Ancak konvasiyonel tanımlama yöntemi yetersiz kalmıştır. Aynı şekilde bu sonuçlarda literatürlerce desteklenmiştir. Çalışma sunucuna göre;

Pazardan elde edilen peynir örneklerinden izole edilen 12, 22, 24, 27.1, 27.2 ve 30 maya suşları ile *Yarrowia lipolytica* KY105979/CBS 5919, *Y. lipolytica* MK934490/322, *Y. lipolytica* KP132929/WM1041 ISHAM-ITS-ID MITS796, *Y. lipolytica* KP069020/WM01.193ISHAM-ITS-IDMITS3041, *Y. lipolytica* MT671352/CM65611P, *Y. lipolytica* MW979511/CABBI, *Y. lipolytica* KY105990/CBS 11385, *Y. lipolytica* OM337578/YB419, *Y. lipolytica* OM337577/YICW001, *Y. lipolytica* OM337576/PO1f, *Y. lipolytica* ON114154/NRRLY-64008, *Y. lipolytica* KY105966/CBS 6331 ve *Y. lipolytica* MT875363/MK0090 referans maya suşları arasında,

Marketlerden elde edilen peynir örneklerinden izole edilen 28, 29, 40 ve 44maya suşları ile *Y. lipolytica* KY105973/CBS 6124 *Y. lipolytica* HM627146/D_MR, *Y. lipolytica* KY105967/CBS 2072, *Y. lipolytica* KY105985/CBS 7133, *Y. lipolytica* KP132912/CNRMA6.726 ISHAM-ITS_ID MITS805, *Y. lipolytica* EF643594/LN-13, *Y. lipolytica* ON242313/R15, *Y. lipolytica* OW986180, *Y. lipolytica* KY105968/CBS 2073, *Y. lipolytica* MK267773/E24792-ITS, *Y. lipolytica* MH459414/Chee-FF21, *Y. lipolytica* DQ680840/N4a, *Y. lipolytica* LC050545/PW3312, *Y. lipolytica* MW281684/CBS 5589 ve *Y. lipolytica* KY105978/CBS 2078 referans maya suşları arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir.

Her ne kadar çalışmamızdan elde edilen maya suşları beyaz peynir yüzeyinde bozulma neden olan maya suşları olsalar da mayaların birçok sanayi kolunda kullanılabileceği unutulmamalıdır. Özellikle *Y. lipolytica*'nın çeşitli suşları bu

sanayiler içerisinde önemli bir yeri vardır. *Y. lipolytica* maya sunun kullanıldığı/kullanılabileceği sanayiler;

- *Y. lipolytica* maya suşu peynirde olgunlaştırma sürecisini kısaltıcı, aroma ve lezzet destekleyicisi oldukları için olgunlaşma ajanı olarak kullanılabilir.

Bu konuyla ilgili yapılan araştırmalarda *Y. lipolytica* maya suşunun α_{s1} ve β -kazein metabolizması α ve β -oksidasyon metabolizmasını yanında, yüksek ekstrasellüler lipaz ve katalaz aktiviteleri sonucu aromatik bileşikler, metil ketonlar, alkoller, laktonlar, çeşitli yağ asitleri ve esterler gibi aroma maddeleri peynirin duyusal özelliklerini geliştirmeleri yönünden önemli role sahiptir (Suzzi et al., 2001; Kesenkaş ve Akbulut, 2006). Çalışmamızda da izole edilen maya suşlarıyla yakın yakın akraba olan *Y. lipolytica* EF643594/LN-13, *Y. lipolytica* KP132912/CNRMA6.726 ISHAM-ITS_ID MITS805, *Y. lipolytica* MK934490/322 ve *Y. lipolytica* MW979511/CABBI referans maya suşlarının yüksek ekstrasellüler lipaz aktivitesi olduğu belirlenmiştir (Kıymacı vd., 2022).

Çalışmamızda beyaz peynirden izole ettiğimiz maya suşları lipaz ve proteinaz aktivitelerine incelendikten sonra peynirlerin olgunlaştırılması için denemelerde kullanılabilir.

- *Y. lipolytica* maya suşunun starter kültür olarak kullanımı.

Mayalar peynirde olgunlaştırmayı katkı sağladığı gibi startertör kültür olarak kullanımı için çalışmalar yapılmaktadır (Uzundağ vd., 2020).

Çalışmamızdan elde edilen *Y. lipolytica* maya suşlarının katalaz, proteaz, amilaz, üreaz ve estereaz enzim aktivitelerine bakılarak starter kültür olarak kullanılıp kullanılmayacağına bakılabilir.

- *Y. lipolytica* maya suşunun probiyotik kültür olarak kullanımı.

Y. lipolytica D-1 ve N-6 maya suşunun miyeloperoksidaz, süperoksik dismutaz ve katalaz aktivitelerinin yüksek olduğu patojen mikroorganizmaların üzerinde edilmiştir (Angulo et al., 2021).

Ayrıca çalışmamızda izole edilen maya suşlarına hidrokarbonlara tutunma özelliklerinin belirlenmesi patojen bakteriler karşısında etkinliklerinin belirlenmesi, otoagregasyon, mide-pankreatik sıvı ortamında gelişme, çeşitli antibiyotiklere ve safra tuzlarına karşı dirençlerinin belirlenmesi gibi çeşitli analizlere tabi tutarak probiyotik özellikleri belirlenebilir.

- *Y. lipolytica* maya suşunun çeşitli biyoteknolojik ürün kullanılabilirliği.

Y. lipolytica maya suşları tek hücre protein, üretimi, tek hücre yağ üretimi, mikrobiyal enzim üretimi, karotenoid, sitrik asit, piruvik asit, süksinik asit, biyolojik sürfaktan, enzim üretimi, atık su uygulamalarında kullanıldığı belirtilmektedir (Casarègola et al., 1997; Destain et al., 1997; Bankar et al., 2009; Groenewald et al., 2013; Gonçalves et al., 2014; Csutak et al., 2015; Belo et al., 2016; Alper and Markham, 2018).

İlk olarak çalışmamızda peynirden izole ettiğimiz maya suşları ile *Y. lipolytica* CMGB32 akrabalık derecelerine bakılabilir. Bunun yanında çalışmamızda izole ettiğimiz maya suşlarıyla yakın akrabalıkları *Y. lipolytica* DQ680840/N4a, *Y. lipolytica* OM337577/YICW001, *Y. lipolytica* OM337576/PO1f, *Y. lipolytica* ON114154/NRRLY-64008, *Y. lipolytica* OM337578/YB419 ve *Y. lipolytica* KY105968/CBS 2073 haploid, blast ve filogenetik analizlerle ispatlanmış referans suşları literatürlerde belirtilen ürünlerde kullanılan suşlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyoreaktör kurarak biyoteknolojik bu ürünler üretilebilir.

Y. lipolytica türü GRAS statüsüne sahip organizmalardır. Bu organizmalar toksik ya da patojenik değildir bu yüzden, ilaç ve yiyecek endüstrisindeki uygulamalarda kullanımlarına izin verilmektedir (Durusel, 2019). *Yarrowia lipolytica* beyaz peynir üretiminde yardımcı kültür olarak kullanılmış ve aldehit ve keton bileşiklerinin oluşumunda etkili bulunmuştur (Gürkan, 2019). Bu açıdan değerlendirildiğinde yüzeyde belirlenen türün gelişmesi sağlık açısından risk oluşturmamakla beraber, tüketici beğenisini düşürmesi ve sonuçta ekonomik açıdan kayıp olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, toksik ya da patojenik türler de gelişebilir. Bu durumda risk yalnızca beğeni ve ekonomik olmaktan çıkar aynı zamanda sağlık açısından da önemli olabilir. Peynirlerin üretim, olgunlaşma, nakliye ve saklanma koşulları hijyen kurallarına uygun ve özellikle soğuk zincir koşullarında satışa sunulması ekonomik ve sağlık açısından önemlidir. Ayrıca -bütün gıda ürünlerinde olduğu gibi halk pazarı ve sokaklarda satılan peynirlerde denetimlerin yeterince yapılamaması, yine merdiven altı üretimi gibi nedenler peynirlerde insan sağlığı açısından risk faktörleridir.

7. KAYNAKLAR

- Akpınar, O. (2008). *Süt ve süt ürünlerinden Yarrowia lipolytica izolasyonu, identifikasyonu ve ürettikleri alkalın proteaz ve ribonükleaz enzimlerinin aktivitelerinin araştırılması*. Basılmış Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 291, İzmir.
- Akpınar, O., Haliki, E., Uçar, F. B., and Uztan, A. H. (2014). Star network analysis of sequence based identified *Yarrowia lipolytica* strains. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk J. Biochem.* 39(1), 78-86.
- Albayram, C. (2007). *Turşu ve zeytinde gelişen mayaların izolasyonu ve identifikasyonu*. Basılmış Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, 96, Samsun.
- Alper, Hal, S., and Markham, Kelly, A. (2018). Synthetic biology expands the industrial potential of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology*. 30(10), 1085-1095.
- Álvarez-Martín, P., Flórez, A. B., López-Díaz, T. M., and Mayo, B. (2007). Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*. 17(8), 961-967.
- Alves, M., Gonçalves, T., and Quintas Célia. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control*. 23(2), 363-368.
- Alzohairy, A., M. (2015). Chapter 6: Molecular markers, genotyping, and (next generation) nucleic acid sequencing. Erişim: 15 Mayıs 2022, https://www.researchgate.net/figure/RAPD-PCR-Principles-of-the-Single-A-Double-A-B-and-Triple-A-B-and-C-primed_fig1_309175510.
- Anonymous. (2010a). *Yöresel peynir çeşitleri*. <http://www.gurmerehberi.com/gurme-rehberi/yiyecekler/yoresel-peynir-cesitleri/> (Erişim: 17 Ağustos 2012).
- Anonymous. (2012a). Thermo Fisher Scientific *Hin* I. Product Information.1-3.
- Anonymous. (2012b). Thermo Fisher Scientific *Cfo* I. Product Information. 1-3.
- Anonymous. (2012c). Promega *Hae* III. Product Information. 1-3.
- Anonymous. (2015). *Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği*. T.C. Resmi Gazete 08.02.2015 tarih ve 29261 sayı. Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Anonymous. (2017). <https://www.youtube.com/watch?v=ls4QLUlmzQY> (Erişim tarihi: 21/04/2021).
- Anonymous. (2018a). *Bulletin of the IDF N 495/ 2018: Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products*. https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/woocommerce_uploads/2018/12/Bulletin-of-the-IDF-N%C2%B0-495_2018_Inventory-of-microbial-food-cultures-with-safety_Cat.pdf (Erişim: 15 Ocak 2023).
- Anonymous. (2018b). Direct Submission. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NR_160312 (Erişim: 3 Şubat 2023).
- Anonymous. (2019). *Sanger sekanslama*. Erişim: 15 Mayıs 2022, <https://letgenbio.com/sanger-sekanslama/>
- Anonymous. (2020a). <https://www.youtube.com/watch?v=Wh04zy692mA> erişim tarihi: 21/04/2021.
- Anonymous. (2020b). *BIORON 100 bp DNA Ladder*. https://www.bioron.net/ifufiles/IFU_304105_100bp-ready_Rev010120_rj.pdf.

- Anonymous. (2022a). Erişim: 15 Mayıs 2022, <https://www.biyologlar.com/restriction-fragment-length-polymorphism-rflp-analizi>.
- Anonymous. (2022b). *Nükleik asit hibritleşmesi*. Erişim: 15 Mayıs 2022, https://tr.wikipedia.org/wiki/N%C3%BCkleik_asit_hibritleşmesi.
- Anonymous. (2022c). *Advanced molecular biological techniques*. Erişim: 15 Mayıs 2022, <https://slideplayer.com/slide/9032232/>.
- Anonymous. (2022d). *NEB 1 kb DNA Ladder*. <https://international.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder#Product%20Information>.
- Anonymous. (2023). Erişim: 15 Mayıs 2022, <https://www.medicalexpo.com/prod/titertek-berthold/product-67770-502194.html>.
- Angulo, C., Reyes-Becerril, M., and Alamillo, E. (2021). Probiotic and immunomodulatory activity of marine yeast *Yarrowia lipolytica* strains and response against *Vibrio parahaemolyticus* in fish. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 13(5), 1292–1305.
- Arda, M. (1999). *Nükleik asitlerinin vitro amplifikasyon yöntemleri*. Erişim: 15 Mayıs 2012, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EFA311BE869018F1B9>.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (eds.). (2003). “Appendix 2 commonly used reagents and equipment”. in *Current protocols in molecular biology*. (s. A.2.1-A.2.8). John Wiley & Sons, Inc.
- Aydın, S. Ö. (2004). RAPD (rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiğı. *Dumlupınar Üni. Fen Bil. Ens. Derg.* 6, 113-130.
- Ayhan, K. (2000). “Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar”. Halkman, K., ve Ayhan, K. (ed.). *Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları kitabı*. (s. 55-56). Ankara. Asil.
- Banjara, N., Suhr, M. J., and Hallen-Adams, H., E. (2015). Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current Microbiology*. 70(6), 792–800.
- Bankar, A. V., Kumar, A. R., and Zinjarde, S., S. (2009). Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(5), 847–865.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., and Yarrow, D. (1990). *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Barrio, E., Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., and Querol, A. (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*. 78, 87–97.
- Bartlett, J. M. S., and Stirling, D. (eds.). (2003). “A short history of the polymerase chain reaction” in: *Methods in molecular biology: PCR protocols*. (s. 3-6). Humana Press.
- Baxevanis, A., D., and Ouellette, B., F., F. (2001). *Bioinformatics a practical guide to the analysis of genes and proteins*. Toronto: A John Wiley & Sons, Inc.
- Becker, P. (2022). Direct Submission. Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OW986180>.
- Belo, I., Ferreira, P., Lopes, M., and Mota, M. (2016). Oxygen transfer rate and pH as major operating parameters of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* W29 and CBS 2073. *Chemical Papers*. 70(7), 869–876.
- Bintsis, T., and Papademas, P. (2017). Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *International Journal of Dairy Technology*. 55(3), 113-120.
- Bintsis, T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiology*. 7(4), 447–470.

- Biss, M., Hanna, M. D., and Wei Xiao, W. X. (2014). "Isolation of yeast nucleic acids". Wei Xiao, W., X. (eds.). in: *Yeast protocols (Methods in Molecular Biology)* (s. 15-21). New York: Springer Science Business Media.
- Blaiotta, G. J., Pepe, O., and Aponte, M. (2010). Short communication: identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo mozzarella cheese. *Dairy Sci.* 93(6), 2358–2361.
- Bonetta, S., Bonetta, S., Carraro, E., Rantsiou, K., and Cocolin, L. (2008). Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR–DGGE. *Food Microbiology.* 25(6), 786–792.
- Borcaklı, M., ve Karakuş, M. (1992). Turşu ve salamura zeytin fermentasyonları: genel prensipler ve gelişmeler. *Gıda Sanayi.* 6(1), 10-15.
- Bovers, M., Hagen, F., Kuramae, E., E., and Boekhout, T. (2008). Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genetics and Biology.* 45(4), 400-421.
- Bozdayı, G., Kalkancı, A., Biri, A., ve Kuştımur, S. (2003). ID32 C kiti ile *Candida albicans* olarak saptanan izolatların PCR ve Klasik yöntemler ile yeniden adlandırılması. *T. Klin Mikrobiyoloji-Enfeksiyon.* 2, 1-5.
- Bracarense, Ana, P. F. R. L., Domiciano, I. G., da Silva Gagliotti, G. F. P., Domit, C., and Lorenzetti, E. (2022). Bacterial and fungal pathogens in granulomatous lesions of *Chelonia mydas* in a significant foraging ground off southern Brazil. *Veterinary Research Communications.* 46, 859–870.
- Buehler, A. J., Evanowski, R. L., Martin, N. H., Boor, K. J., and Wiedmann, M. (2017). Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *Journal of Dairy Science.* 100(11), 8814–8825.
- Büyükkiraz, E. A., Kahraman, N., ve Kesmen, Z. (2020). Bazı Gıdalardaki Bozulma Etkeni Maya Türlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması. *Çukurova J. Agric. Food Sci.* 35(1), 15-28.
- Cao, L., Yin, M., Shi, T.-Q., Lin, L., Ledesma-Amaro, R., and Ji, X.-J. (2022). Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce nutritional fatty acids: Current status and future perspectives. *Synthetic and Systems Biotechnology.* 7(4), 1024-1033.
- Casarègola, S., Feynerol, C., Diez, M., Fournier, P., and Gaillardin, C. (1997). Genomic organization of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chromosoma.* 106(6), 380–390.
- Cerit, Z., G. (2020). *Beyaz peynir ve süt işleme tesisinden izole edilen mikrobiyotanın karakterizasyonu*. Basılmış Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 165, Ankara.
- Ceylan, H. G., Demir, T., ve Kurt, Ş. (2019). Geleneksel olarak üretilen adıyaman peynirinin bazı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi. *ADYÜTAYAM.* 7(1), 1-13.
- Chalupová, J. C., Raus, M., Sedlářová, M., and Sebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Review Biotechnol Adv.* 32 (1). 230-41.
- Chanprasartsuk, O., Prakitchaiwattana, Ch., and Sanguandeeikul, R. (2013). Comparison of methods for identification of yeasts isolated during spontaneous fermentation of freshly crushed pineapple juices. *J. Agr. Sci. Tech.* 15, 1479-1490.
- Coppola, S., Parente, E., Dumontet, S., and La Peccerella, A. (1988). The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Le Lat.* 68(3), 295-310.

- Corbo, M., R., Lanciotti, R., Albenzio, M., and Sinigaglia, M. (2001). Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology*. 69(1-2), 147–152.
- Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Mulargia, A. F., and Palmas, F. (2001). Yeasts associated with sardinian ewe's dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 69(1-2), 53–58.
- Coşansu, S., ve Ayhan, K. (2002). *Fermented products and their microbiological spoilage*. Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği.
- Csutak, O., Ghindea, R., Stoica, I., Tanase, A.-M., and Vassu, T. (2012). Identification of two yeast strains from oil-polluted environment by RFLP on ITS-5.8S rDNA and RAPD analyses. *Romanian Biotechnological Letters*. 17(1), 6913-6920.
- Dlauchy, D., and Nagy, E. (2013). Direct Submission. Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KF649300>.
- Dlauchy, D., Tornai-Lehocski, J., and Peter, G. (1999). Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Appl. Microbiol.* 22(3), 445-453.
- Deak, T., and Beuchat, L., R. (1996). *Handbook of spoilage Yeasts*, New York: CRC Press.
- Deak, T., and Beuchat, L., R. (1988). Evaluation of simplified and commercial systems for identification of foodborne yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 7(2), 135-145.
- Deak, T., Chen, J., and Beuchat, L. R. (2000). Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (10), 4340–4344.
- Deak, T. (2007). *Handbook of food spoilage yeasts*. New York: CRC Press.
- Demir, F. H. (2021). *Koyun, inek ve keçi sütlerinden üretilen Edirne beyaz peynirlerinin depolama süresince fizikokimyasal, mikrobiyolojik, tekstürel ve duyuşsal açıdan değerlendirilmesi*. Basılmış Doktora Tezi. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 281, Tekirdağ.
- Demirci, M. (1993). *Beslenme ilkeleri*. Tekirdağ: Trakya Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Destain, J., Roblain, D., and Thonart, P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*. 19(2), 105–107.
- Devrim, A. K., ve Kaya, N. (2004). Polimeraz zincir reaksiyonu. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 10(2), 209-214.
- Durmaz, R. (2010). *Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Tipleri*. Erişim: 20 Ağustos 2021, <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/035.pdf>.
- Durusel, B. (2019). *Yarrowia lipolytica tarafından üretilen biyosüpfaktanın optimizasyonu ve Salmonella biyofilm oluşumuna etkisi*. Basılmış Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 141, İzmir.
- Echeverrigaray, S., Randon, M., Silva, K., da Zacaria, J., and Longaray-Delamare, A., P. (2013). Identification and characterization of non-*Saccharomyces* spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. *World J. Microbiol Biotechnol.* 29(6), 1019–1027.
- El-Sayed, M., T., Tartor, Y., H. and El-Ghamrey, M., M. (2016). Direct Submission. Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX228398>.
- El-Sharoud, W. M., Belloch, C., Peris, D., and Querol, A. (2009). Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products, *Journal of Food Science*,

Food Microbiology and Safety, 00(0), M1-M6 Retrieved March 22, 2015, from <https://www.uv.es/~perisnav/Publications/El-Sharoud%20W.M.%202009.pdf>.

- Ergül, Ş. Ş. (2009). *Determination of yeast flora during the vinification of emir and kalecik karası grape varieties of Nevşehir region and investigation of some technological characteristics of isolated endogenic strains*. Basılmış Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 259, Nevşehir.
- Esen, E. (2008). *Farklı gıda maddelerinde maya kontaminasyonu üzerine bir çalışma*, Basılmış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 80, İstanbul.
- Espinosa, J., C., Fernandez-Gonzalez, M., Ubeda, J., and Briones, A. (2002). Identification of wine yeasts by PCR-RFLP without previous isolation on plate. *Food Technol. Biotechnol.* 40(2), 157–160.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and 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.* 49(1), 329–337.
- Esteve-Zarzoso, B., Zorman, T., Belloch, C., and Querol, A. (2003). Molecular characterisation of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 404-411.
- Facchin, S., Oliveira, A. L., Barbosa, A. C., Carmo, L. S., Crisolita, M., Silva, C., Morais, P. B., and Rosa, C. A. (2013). Yeasts and hygienic-sanitary microbial indicators in water buffalo mozzarella produced and commercialized in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 44(3), 701-707.
- Fadda, M., E., Pisano, M., B., Scaccabarozzi, L., Mossa, V., Deplano, M., Moroni, P., Liciardi, M., and Cosentino, S. (2013). Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species isolated from bovine intramammary infection. *Journal of Dairy Science.* 96(12), 7692–7697.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., and Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology.* 50(3), 1351–1371.
- Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. and 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.* 78(1), 87-97.
- Fleet, G. H., and Mian, M. A. (1987). The occurrence and growth of yeasts in dairy products, *International Journal of Food Microbiology.* 4(2), 145-155.
- Fomina, M., Hong, J., W., Zelena, L., and Tkachenko, K. (2018). Direct Submission. Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH459414>.
- Fujita, H., Senda, Y., Nakaguchi, S., and Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology.* 39(10), 3617-3622.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., and Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology.* 241, 191–197.
- Gelen, S. U. (2017). *Beyaz peynirde mayaların izolasyonu ve identifikasyonu*. Basılmış Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 101, Erzurum.

- Gelen, S., U., and Ceylan, Z. (2021). Isolation and identification of yeasts in white cheese. *J. Adv. VetBio. Sci. Tech.* 6(2), 100-105.
- Gente, S., Desmasures, N., Jacopin, C., Plessis, G., Beliard, M., Panoff, J.-M., and Gueguen, M. (2002). Intra-species chromosome-length polymorphism in *Geotrichum candidum* revealed by pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 127-134.
- Geronikou, A., Srimahaeak, T., Rantsiou, G., Triantafillidis, G., Larsen, N., and Jespersen, L. (2020). Occurrence of yeasts in white-brined cheeses: methodologies for identification, spoilage potential and good manufacturing practices. *Frontiers in Microbiology.* 11 (582778), 1-21.
- Gibson, B. R., Pham, T., Wimalasena, T., Box, W. G., Koivuranta, K., Storgårds, E., and Smart, K. A. (2011). Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery ‘wild’ yeast contaminants, *Journal of The Institute of Brewing.* 117(4), 556-568.
- Gouliamova, D., E., Stoilova-Disheva, M., M., and Dimitrov, R., A. (2011). Direct Submission. Erişim: 3 şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM627146>.
- Gouliamova, D., E. (2017). Direct Submission. Erişim: 3 şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY457248>.
- Gonçalves, F. A. G., Colen, G., and Takahashi, J., A. (2014). *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal.* 1–14.
- Gönlüm, A. (1994). *Maya ve maya benzeri fungusların klasik yöntemler ve hazır kit sistemleri ile karşılařtırılmalđ identifikasyonu*. Basılmış Yüksek Lisans Tezi. GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 38, Ankara.
- Granchi, L., Bosco, M., Messina, A., and Vincenzini, M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology.* 87(6), 949–956.
- Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C. van Dijck, Piet W. M., and Wyss, M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology.* 40(3), 187-206.
- Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology.* 169(5), 387–392.
- Gülmez, M., ve Güven, (2001). Kars ilinde satışa sunulan eil (Civil) peynirlerin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Dergisi.* 7(1), 63-70.
- Gültekin, A., Koç, A. N., ve Atalay, A., M. (2013). Candida türlerinin tanımlanmasında kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *Dergi Park Sağlık Bilimleri Dergisi.* 22(1), 24-30.
- Günel, T. (2007). Gen anlatımının kantitatif analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.* 27, 763-767.
- Güneri, L. (1993). *Reellerde ozmoofilik mayaların izolasyonu, sayımı ve identifikasyonu ile değişik parametrelerin (su aktivitesi, ph, temperatur) büyüme etkisi*. Basılmış Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 91, İzmir.
- Gürkan, H., (2019). *Bazı mayaların beyaz peynirde uçucu aroma bileşikleri ve proteoliz düzeyine katkısı ile biyoaktif peptit üretme performanslarının belirlenmesi*. Basılmış Doktora Tezi. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 203, Malatya.

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 41, 95-98.
- Haridy, M. S., A. (1992). Yeast flora of raw milk in El-Minia City, Egypt. *Cryptogamie Mycologie*. 13 (4). 321-326.
- Harrigan, W., F., and McCance M., E. (1986). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. London: Academic Press.
- Hayden, R., T. (2004). "In vitro nucleic acid amplification techniques". Persing, D., and Tenover, H. F., C. (eds.) in: *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. (s. 43-71). Washington. ASM Press.
- Hekimoğlu, B., ve Altindeğer, M. (2008). *Ülkemizde ve Samsun ilinde; süt hayvancılığı ve süt sektöründeki mevcut durum, sorunlar ve öneriler*. Samsun: Samsun İl Tarım Müdürlüğü Yayını.
- Hermann, C. W., Jean-Paul, M. K. B., Alfred, K. K., Laurent Simon, A. A., Maïmouna, A. T., and Marius, A. D. (2020). Technical sheet of comparative study of two techniques control of DNA from yeast isolates producing pectinase. *Int. J. Adv. Res.* 8(09), 979-983.
- Hermansyah, N. A., Julinar, K. R., and Susilawati, Y. (2017). Identification of *Candida* species by assimilation and multiplex-PCR methods. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 52(6), 1070-1078.
- Hierro, N., González, Á., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2004). New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology*. 97(4), 792–801.
- Hoffman, C., S. (2003). "Yeast". Ausubel, F., M., Brent, R., Kingston, R., E., Moore, D., D., Seidman, J., G., Smith, J., A. and Struhl, K. (eds.) in: *Current protocols in molecular biology*. (s. 13.0.1-13.0.3). John Wiley & Sons, Inc.
- Holm, C., Meeks-Wagner, D. W., Fangman, W. L., and Botstein, D. (1986). A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene*. 42, 169-173.
- Hui, F., L. and Liu, X., J. (2017). Direct Submission. Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF136067>.
- Huihui Sun, H., Ma, H., Hao, M., Pretorius, I. S., and Chen, S. (2009). Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation in Beijing wine region. *China. Annals of Microbiology*. 59(1), 69-76.
- Hurşit, A. K., ve Akgün A. (2007). *Süt bilimi ve teknolojisi*. Samsun: Süt Tek. Dersi Ders Notları.
- Hurşit, A., K. 1999. *Süt Bilimi ve Teknolojisi*, Samsun: OMÜ Ziraat Fakültesi Ders Kitabı.
- İrkin, R. (2017). Farklı tuz konsantrasyonlarının beyaz peynirlerdeki starter kültür Bakterilerinin canlılıklarına etkisi. *Akademik Gıda*. 15(3), 308-314.
- Irinyi, L., Khan, A., and Meyer, W. (2014). Direct Submission. Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP069020>.
- Irinyi, L., Serena, C., Garcia-Hermoso, D., Arabatzis, M., Desnos-Ollivier, M., Vu, D., Cardinali, G., Arthur, I., Normand, A., C., Giraldo, A., da Cunha, K., C., Sandoval-Denis, M., Hendrickx, M., Nishikaku, A., S., de Azevedo Melo, A., S., Merseguet, K., B., Khan, A., Parente Rocha, J. A., Sampaio, P., da Silva Briones, M., R., E., Ferreira, R., C., de Medeiros Muniz, M., Castanon-Olivares, L., R., Estrada-Barcenás, D., Cassagne, C., Mary, C., Duan, S., Y., Kong, F., Sun, A., Y., Zeng, X., Zhao, Z., Gantois, N., Botterel, F., Robbertse, B., Schoch, C., Gams, W., Ellis, D., Halliday, C., Chen, S., Sorrell, T., C., Piarroux, R., Colombo, A., L., Pais, C., de Hoog, S., Zancoppe-Oliveira, R., M., Taylor, M., L., Toriello, C., de Almeida Soares, C., M., Delhaes, L., Stubbe, D.,

- Dromer, F., Ranque, S., Guarro, J., Cano-Lira, J., F., Robert, V., Velegraki, A., and Meyer, W. (2015). International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 53(4), 313-337. Erişim: 3 şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP132929>.
- Jagtap, S., S., Dien, B., S., and Rao, C., V. (2021). Direct Submission. Erişim: 15 Mayıs 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW979511>.
- Jakobsena, M., and Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal.* 6, 755-768.
- Jeyaram, K., Mohendro Singh, W., Capece, A., and Romano, P. (2008). Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' —a traditional starter used for rice wine production in Manipur. *India International Journal of Food Microbiology.* 124, 115-125.
- Jin, Y.-S., and Rao, C., V. (2022). Direct Submission, Erişim: 3 şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ON114154>.
- Jordano, R., Medina, L. M., and Salmeron, J. (1991). Contaminating mycoflora in fermented milk. *Journal of Food Protection.* 54(2), 131-132.
- Kahve, H., İ., Akbulut, M., and Coklar, H. (2022). Identification and technological characterization of endogenous yeast isolated from fermented black carrot juice, shalgam. *LWT - Food Science and Technology.* 154(112823), 1-9.
- Kalamaki, M., S., and Angelidis, A., S. (2016). Isolation and molecular identification of yeasts in Greek kefir. *International Journal of Dairy Technology.* 70 (2). 261-268.
- Kamineneni, A., Consiglio, A. L., MacEwen, K., Chen, S., Chifamba, G., Shaw, A. J., and Tsakraklides, V. (2021). Increasing lipid yield in *Yarrowia lipolytica* through phosphoketolase and phosphotransacetylase expression in a phosphofructokinase deletion strain. *Biotechnology for Biofuels.* 14(1), 1-14.
- Kanev, O., Özdemir, K., ve Muranlı, F. D. (2015). In situ hibridizasyon yöntemleri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi.* 3, 613-621.
- Karabıyıklı, ř., ve Erdoğan, S. (2019). Peynir üretiminde mikroorganizmaların rolü ve önemli mikroorganizma grupları. *Journal of New Results in Engineering and Natural Science,* 1, 35-45.
- Karakök, S., G., Özkütük, K., and Gökçe, G. (2020). Çukurova bölgesi sığır yetiştiriciliğinin yapısı ve kaliteli süt üretiminde yaşanan problemler. *J.Agric. Fac. Ç.Ü.* 1-10. Erişim: 10 şubat 2023, <https://www.researchgate.net/publication/359733040>.
- Karasu-Yalçın, S., şenses-Ergül, S., ve Yeşim Özbaş, Z. (2012). Identification and enzymatic characterization of the yeasts isolated from Erzincan Tulum Cheese. *Mljekarstvo.* 62(1), 53-61.
- Kavsaoğlu, A. R., ve Mersinkaya, İ. (2019). Electrophoresis control software and system design with python. *GU. J. Sci. Part C.* 7(4), 969-984.
- Kaynar, Z., Kaynar, P., ve Kaynar, C. (2005). Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.* 62(1, 2, 3), 1-10.
- Kaynar, P. (2011). Ülkemiz peynirleri üzerine mikrobiyolojik araştırmalar. *Türk Mikrobiyol Cem. Derg.* 41(1), 1-8.
- Keskin, H. (1982). *Besin kimyası.* İstanbul: Fatih Yayınevi.
- Kesenkaş, H., ve Akbulut, N. (2006). Mayaların peynir üretiminde destek starter kültür olarak kullanımı. *Ege Üniv. Ziraat Fak., Derg.* 43(2), 165-174.

- Kıymacı, M., E., Şimşek, D., ve Altanlar, N. (2022). Molecular identification and lipolytic activity of *Yarrowia lipolytica* isolated from yoghurt cream. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 46 (2), 450-457.
- Khattab, S. M., R., Abdel-Hadi, A. M., Abo-Dahab, N. F., and Atta, O. M. (2016). Isolation, characterization, and identification of yeasts associated with foods from Assiut City, Egypt. *British Microbiology Research Journal*. 13(1), 1-10.
- Knop, M. (2011). Yeast cell morphology and sexual reproduction – a short overview and some considerations. *Comptes Rendus Biologies*. 334(8-9), 599–606.
- Knutsen, A. K., Robert, V., Poot, G. A., Epping, W., Figge, M., Holst-Jensen, A., and Smith, M. T. (2007). Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(10), 2426–2435.
- Koçak, C. (2022). *Peynirin öyküsü*. https://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/f78f60cedaa5af2_ek.pdf?dergi=273 (Erişim tarihi: 10.05.2022).
- Korabecna, M. (2007). The Variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. *Trends in Applied Microbiology. Formatex*. 783-787.
- Kreger–Van Rij, N. J., W. (1987). *The Yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Kubaş, A., ve Kondal, M. (2020). Tekirdağ ilinde süt ve süt ürünleri sektörü ve geleceği. *Balkan ve Yakın Doğu Sosyal Bilimler Dergisi*. 6(4), 100-103.
- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (2000). *The Yeast: a taxonomic study*. Netherlands: Elsevier Science Press.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., and Robert, V. (2011). “Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts”. Kurtzman, C., P., and Fell, J., W., (eds.). in: *The Yeasts*. (s. 87–110). Netherlands: Elsevier Science Press.
- LaButti, K., Clum, A., Grigoriev, I., Barry, K., and Ng, V. (2022). Direct Submission, Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OM337576>.
- Larroude, M., Trabelsi, H., Nicaud, J.-M., and Rossignol, T. (2020). A set of *Yarrowia lipolytica* CRISPR/Cas9 vectors for exploiting wild-type strain diversity. *Biotechnology Letters*. 42(5), 773–785.
- Las Heras-Vazquez, F. J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J. M., and Rodriguez-Vico, F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*. 3(1), 3–9.
- Laubscher, W. D. F., Viljoen, B. C., and Albertyn, J. (2000). The yeast flora occurring in the trachea of broiler chicken. *Food Technol. Biotechnol.* 38(1), 77–80.
- Ledesma-Amaro, R., Dulermo, T., and Nicaud, J., M. (2015). Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce biodiesel from raw starch. *Biotechnology for Biofuels*. 8(1), 1-12.
- Legras J. L., and Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 249-255.
- Lemey, P., Salemi, M., and Vandamme, A-M. (2009). *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. The Edinburgh Building: Cambridge University Press.
- Letovsky, S. (2002). *Bioinformatics: Databases and Systems*. New York: Kluwer Academic Publishers.

- Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., and Liao, C. C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea Beverage, Haipao, and their interactions during Haipao. *Fermentation Food Microbiology*. 13(6), 407–415.
- Lodder J. (1970). *The Yeasts*. Amsterdam: North – Holland Publishing Company Press.
- Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., and Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*. 23, 341–350.
- Lopez, V., Querol, A., Ramon, D., and Fernández-Espinar, T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts, *International Journal of Food Microbiology*. 68, 75-81.
- Lore, T. A., Mbugua, S. K., and Wangoh, J. (2005). Enumeration and identification of microflora in Suusaca Kenyan traditional fermented camel milk product. *Lebensm.-Wiss.U-Tecnol*. 38, 125-130.
- Madzak, C. (2021). *Yarrowia lipolytica* strains and their biotechnological applications: how natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement. *Journal of Fungi*. 7(7), 1-67.
- Maihebubai, A. (2017). *Peynirlerden izole edilen mayaların probiyotik özelliklerinin araştırılması*. Basılmış Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 139, Ankara.
- Makimura, K., Murayama, S. Y., and Yamaguchi, H. (1994). Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*. 40(5), 358–364.
- Marangoz, B. B. (2020). *Salamura beyaz peynirlerde kötü kokuya neden olan uçucu bileşenlerin tanımlanması ve bozulma yapıcı mikroorganizmalarla ilişkilendirilmesi*. Basılmış Doktora Tezi. İstanbul Aydın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Gıda Mühendisliği Programı, 112, İstanbul.
- Mendonça-Hagler, L. C., Hagler, A. N., I, and Kurtzman, C. P. (1993). Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *International Journal Of Systematic Bacteriology*. 43(2), 368-373.
- Mesapogu, S., Jillepalli, C. M., and Arora, D. K. (2013). “Microbial DNA extraction, purification and quantitation” Arora, D., K., Das, S. and Mouleswararao, C. (eds.). in: *Analyzing microbes manual of molecular biology techniques*. (s. 2-16). London: Springer.
- Mirbagheri, M., Nahvi, I., Emtiazi, G., Mafakher, L., and Darvishi, F. (2012) Taxonomic characterization and potential biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* Isolated from meat and meat products. *Jundishapur J. Microbiol*. 5(1), 346-351.
- Mn. (2022). *Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)*. Erişim: 15 Mayıs 2022, <https://microbiologynote.com/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge/>.
- Molnar, O., Messner, R., Prillinger, H., Stahl, Ulf., and Slavikova, E. (1995). Genotypic identification of *Saccharomyces* species using random amplified polymorphic DNA Analysis. *Systematic and Applied Microbiology*. 18(1), 136-145.
- Montaño-Pérez, K., Villalpando-Canchola, E., and Vargas-Albores, F. (2006). AFLP (amplified fragment length polymorphism) y su aplicación en acuicultura. *Interciencia, versión impresa* ISSN 0378-1844. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800005#fig2.
- Moreira, S. R., Schwan, R. F., Pinheiro de Carvalho, E., and Wheals, A. E. (2001). Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32(2), 117-122.

- Naumova, E. S., Serpova, E. V., and Naumov, G. I. (2010). Genome variability of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology*. 79(2), 229–236.
- Nisiotou, A. A., and Gibson, G. R. (2005). Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5·8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes. *Letters in Applied Microbiology*. 41(6), 454–463.
- Özkütük, A. (2011). *Maya türlerinin tanımlanmasında*. Erişim: 30 Mayıs 2022, https://www.tmc-online.org/userfiles/file/maya_sunumlar_izmir_2011/4.pdf.
- Quarterman, J., Slininger, P. J., Kurtzman, C. P., Thompson, S. R., and Dien, B. S. (2016). A survey of yeast from the *Yarrowia* clade for lipid production in dilute acid pretreated lignocellulosic biomass hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(8), 3319–3334.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., and Ramón, T. D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(9), 2948-2953.
- Querol, A., Frutos, R., de L., and Fernández-Espinar M. T. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek*. 85, 175–185.
- Padilla, B., Manzanares, P., and Belloch, C. (2014). Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiology*. 38, 160-166.
- Palmerín-Carreño, D. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., Verde Calvo, J. R., Prado-Barragán, A., and Huerta-Ochoa, S. (2015). Screening of microorganisms for bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone. *LWT - Food Science and Technology*. 64(2), 788–793.
- Pamir, H. (1984). *Fermentasyon mikrobiyolojisi uygulama klavuzu*. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Yayınları.
- Pangallo, D., Šaková, N., Koreňová, J., Puškárová, A., Kraková, L., Valík, L., and Kuchta, T. (2014). Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 170, 38–43.
- Pereira-Dias, S., Potes, M. E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2000). Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 60(1) 55–63.
- Petersen, K. M., Møller, P. L., and 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*. 69(1-2), 11–24.
- Porru, C., Rodríguez-Gómez, F., Benítez-Cabello, A., Jiménez-Díaz, R., Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., and NoéArroyo-López, Francisco. (2018). Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. *Food Microbiology*. 69, 33-42.
- Pomraning, K. R., Bredeweg, E. L., Kerkhoven, E. J., Barry, K., Haridas, S., Hundley, H., and Baker, S. E. (2018). Regulation of yeast-to-hyphae transition in *Yarrowia lipolytica*. *mSphere*. 3(6), 1-18.
- Rademaker, Jan L. W., and Savelkoul, P. (2009). “Microbial typing based on PCR amplification”. Persing, D., Tenover, F. C., Tang, YÍ-W., Nolte, F. S., Hayden, R. T., Van Belkum, A. (eds.). in: *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice* (s. 197-203). Washington DC: ASM Press.
- Reddy, G. (2020). Direct Submission. Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT875363>.

- Robles-Rodríguez, C. E., Muñoz-Tamayo, R., Bideaux, C., Gorret, N., Guillouet, S. E., Molina-Jouve, C., and Aceves-Lara, C. A. (2018). Modeling and optimization of lipid accumulation by *Yarrowia lipolytica* from glucose under nitrogen depletion conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 115(5), 1137–1151.
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., and Bräuer, M. (1992). Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*. 72(5), 370–376.
- Romano, A., Casaregola, S., Torre, P., and Gaillardin, C., (1996). Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 255-264.
- Romano, P., Capece, A., and Jespersen, L. (2006). “Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts” Querol, A., and Fleet, G. H., (eds.). in: *Yeasts in Food and Beverages*. (s. 13-53). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Weiss, J., and Lopez-Gomez, A. (2007). Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. *Food Control*. 18, 33–39.
- Sambrook, J. (eds.). (1989). “Rapid isolation of yeast DNA”. in: *Molecular cloning a laboratory manual*. (s. 6.31-6.32). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarantou, S., Stoforos, N., G., Kalantzi, O., and Papanikolaou, S. (2021). Biotechnological valorization of biodiesel-derived glycerol: Trials with the non-conventional yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium* sp. Carbon. *Resources Conversion*. 4, 61–75.
- Satora, P., Drożdż, I., Duda-Chodak, A., and Skrzypiec, K. (2013). The use of PCR-RFLP technique for the analysis of yeast contaminants in winemaking. *Potravinárstvo*. 7, 16-19.
- Sauer, M., Egermeier, M., Russmayer, H., and Marx, H. (2017). Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1-9.
- Sermenli, H., B. (2006). *Polimeraz Zincir Reaksiyonu*. (s. 1-43). Erişim: 15 Mayıs 2010, www.mu.edu.tr/departments/biyoloji/MUBiyoweb/molbio/PCR.ppt.
- Schaechter, M. (2004). *The desk encyclopedia of microbiology*. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Schwartz, D. H., and Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-size DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37, 67–75.
- Szczyrba, A. (2019). “*Yarrowia lipolytica* strain 322 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence”. Direct Submission. Erişim: 15 Mayıs 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1652025840>.
- Shahzadi Ali, M., and Latif, Z. (2016). Molecular characterization of yeast strains isolated from different sources by restriction fragment length polymorphism. *Pak. J. Bot.* 48(1), 363-370.
- Stephenson, F. H. (eds.). (2003). “Solutions, mixtures, and media”. in: *Calculations in Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*. (s.18-42). San Francisco: Academic Press.
- Stirling, D. (2003). “DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria”. Stirling, D., and Bartlett, J. M., S. (eds.). in: *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)*. (s. 53-54). Totowa: Humana Press.
- Suzzi, G., Lanorte, M., Galgano, F., Andrichetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R., and Guerzoni, M. (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia*

- lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 69(1-2), 69–77.
- Şahin, İ., ve Korukluoğlu, M. (2000). *Küf gıda insan*. Bursa: Vipaş A. Ş.
- Şahin, İ., ve Öztürk, N. (1998). *Salamura beyaz peynirlerde bozulmaya neden olan mayaların tanımlanması*. Tubitak Proje no: TOKTAG-1582, 47.
- Taban, B. (2007). *İmmünomanyetik Ayırma-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İMA-PZR) yönteminin uygulanması ile tavuk etlerinde Salmonella spp. Belirlenmesi*. Basılmış Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 134, Ankara.
- Takahashi, J. A., Gonçalves, F. A. G., and Colen, G. (2014). *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*. 2014, 1–14.
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10(3), 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10), 2731-2739.
- Tanoğlu, T., B. (2008). *Erzincan Garnizonunda tüketime sunulan tavuk ve hindi etlerinden konvansiyonel kültür ve moleküler (PZR) metotla Salmonella Spp. 'nin teşhisi*. Basılmış Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 63, Kayseri.
- MEB. (2016). *Beyaz peynir üretimi*. Ankara: MEB Yayınları.
- Tekinşen, O. C. (2000). *Süt ürünleri teknolojisi*. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Thompson, J., D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22), 4673–4680.
- Törnük, F. Z., Kesmen, ve H. Yetim (2008, Mayıs). “Et ve et ürünlerinde patojen bakterilerin tespitinde Real-Time PCR tekniğinin kullanılması”. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Tunail, N. (2009). *Mikrobiyoloji*. Ankara: Pelin Ofset. Asil.
- Tunç, K., Gödek, Z., Mustafa, N., ve Semerci, A. B. (2021). Sakarya ilindeki halk pazarlarında açıkta satılan beyaz peynirlerin mikrobiyal kalitelerinin belirlenmesi. *LKÜ. Fen Bilimleri Dergisi*. 3(1), 44-49.
- Turan, Z., Şanver, D., ve Öztürk, K. (2017). Türkiye’de hayvancılık sektöründen süt inekçiliğinin önemi ve yurt içi hasılaya katkısı ve de dış ülkelerle karşılaştırılması. *Ömer Halisdemir Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*. 10(3), 60-74.
- Türkyılmaz, S., ve Esendal, Ö., M. (2002). Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 8(1), 1-76.
- Uğurdoğan, E. (2020). *İstanbul’da satılan tulum peynirlerinde bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi ve geleneksel tulum peynir ile karşılaştırılması*. Basılmış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mühendisliği Bilim Dalı, 60, İstanbul.
- Uzundağ, D., Arslan, S., Yüksekdağ, Z., Beyatlı, Y., ve Sakallı, A. (2020). Beyaz peynirden izole edilen *Cryptococcus humicola* suşlarının starter aktivitelerinin araştırılması. *Gıda*. 45(5). 872-880.
- Üçüncü, M. (2008). *A’dan Z’ye peynir teknolojisi*. İzmir: Meta Basım Matbaacılık.

- Ünlütürk, A. (2003). "Gıda Mikrobiyolojisi". Ünlütürk, A., ve Turantaş, F., (ed.). *Süt ve süt ürünlerinde mikrobiyolojik bozulmalar, patojen mikroorganizmalar ve muhafaza yöntemleri*. (s. 294-295). İzmir: Asil.
- Valdes-Stauber, N., Scherer, S. and Seiler, H. (1997). Identification of yeasts and *Coryneform* Bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 34(2), 115-129.
- Viljoen, B., C. (2006). "Yeast ecological interactions. yeast–yeast, yeast–bacteria, yeast–fungi interactions and yeasts as biocontrol agents yeasts in food and beverages". Querol, A., and Fleet, G., H. (eds.). in: *Yeasts in Food and Beverages*. (s.83–110). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Villarreal, P., Ruiz, J. I., Quintrel, P. A., Olivares-Muñoz, S., Nespolo, R. F., and Cubillos, F. A. (2021). Identification of new ethanol-tolerant yeast strains with fermentation potential from central Patagonia. *Yeast*. 39(18), 1-13.
- Vincent, M., Hung, C. H., Mark Baran, P. R., Azahari, A. S., and Awang Adeni, D. S. (2018). isolation, identification and diversity of oleaginous yeasts from Kuching, Sarawak, Malaysia. *BIODIVERSITAS*. 19(4), 1266-1272.
- Vu, D., Groenewald, M., Szoke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., de Vries, M., Verkley, G., J., Crous, P., W., Boekhout, T., and Robert, V. (2016). DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Stud. Mycol.* 85, 91-105.
- Walker, C., Ryu, S., Haridas, S., Na, H., Zane, M., LaButti, K., and Trinh, C., T. (2020). Draft Genome Assemblies of Ionic Liquid-Resistant *Yarrowia lipolytica* PO1f and Its Superior Evolved Strain, YICW001. *Microbiology Resource Announcements*. 9(9), 1-2.
- Wang, Y., C. (2019). Direct Submission. Erişim: 3 Şubat 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN853744>.
- Wendy., K (2021). Soluble feed ingredients: hydrolyzed yeast cell wall (MOS). Erişim: 30 Mayıs 2021, <https://www.hiyeast.com/soluble-feed-ingredients-hydrolyzed-yeast-cell-wall-mos/>.
- Welthagen, J. J., and Viljoen, B. C. (1999). The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiology*. 16(1), 63-73.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics". Innis, M., A., Gelfand, D., H., Sninsky, J. J., Corporation, C., and White, T., J. (eds.). in: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (s. 315-322). California: Academic Press, Inc.
- Wingfield, L., K. (2021). *Exercise: Yeast Identification (biochemical test)*. Erişim: 30 Mayıs 2022, <https://www.youtube.com/watch?v=Xisggg-m9ls>.
- Wrent, P., Rivas, E.-M., Gil de Prado, E., Peinado, J. M., and de Silóniz, M.-I. (2015). Development of species-specific primers for rapid identification of *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*. 193, 109–113.
- Yalçın, H. T., Ö. (2007). *Beyaz peynirlerde bozulmaya neden olan Yarrowia lipolytica ve Debaryomyces hansenii'nin fenotipik ve genotipik identifikasyonu*. Basılmış Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 225, İzmir.
- Yalçın, H. T., and Uçar, F. B. (2009). Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish white cheeses. *Annals of Microbiology*. 59(3), 477-483.
- Yalman, M. (2018). *Manda sütünden üretilen farklı çeşit peynirlerin karakterizasyonu, mayaların izolasyonu ve potansiyel probiyotiklerin seçilmesi*. Basılmış Doktora Tezi.

- Yamada, Y., Maeda, K., and Mikata, K. (1994). The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia* species, formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (*Saccharomycetaceae*): the proposals of three new genera, *Biosci Biotechnol Biochem.* 58(7), 1245–1257.
- Yamagishi, H., and Ogata, T. (1999). Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 341-353.
- Yang, J.-J., Guo, C.-F., Ge, W.-P., Wang, Q.-N., Zhang, Y., Chen, Y., Yang, J., Ma, Y., Yuan, Y.-J., and Qin, L.-H. (2014). Isolation and identification of yeast in yak milk dreg of Tibet in China. *Dairy Science and Technology.* 94(5), 455-467.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. Kurtzman, C. P., and Fell, J. W. (eds.). in: *The Yeasts, a Taxonomy Study*. (s. 77-100). Amsterdam: Elsevier Publishers.
- Yerlikaya, O. (2018). Ege ve Marmara bölgesi'nde üretilen ve tüketime sunulan beyaz peynirlerin bazı mikrobiyolojik özelliklerinin incelenmesi üzerine bir araştırma. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 55(4), 499-505.
- Yurdakul, Ö., Keyvan, E., ve Ersoy, T. E. (2016). Burdur halk pazarlarından toplanan beyaz peynirlerde patojen *Candida* spp. varlığının belirlenmesi. *Vet Mikrobiyol Derg.* 27(2), 88-92.
- Zübeyir Turan, Z., ve Şanver, D. (2017). Türkiye'de hayvancılık sektöründen süt inekçiliğinin önemi ve yurt içi hasılaya katkısı ve de dış ülkelerle karşılaştırılması. *İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi.* 10(3), 60-74.

EK

Bu bölümde Moleküler tanımlama yöntemlerinde kullanılan besiyerleri ve çeşitli çözeltilerin hazırlanışları verilmiştir. Bu çözeltiler ilk etapta stoklar halinde hazırlanmış daha sonra, kullanılan yönteme bağlı olarak son konsantrasyon ayarlanmıştır. Bu bölümde kullanılan çözeltilerin hepsi moleküler saflıkta veya HPLC saflıktadır. Ayrıca bu çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan su, ya ddH₂O veya ultra saf su olup, tüm çözeltiler ve sular 0.22 µm por çaplı filtrelerle sterilize edilmiştir (Sambrook, 1989; Ausubel et al. 2003).

Kullanılan Kimyasal Formüller

1. $M = (m \cdot 1000) / (M_A \cdot V)$

M= Molarite

m= Kullanılacak miktar (gr)

M_A= Molekül ağırlığı

V= Toplam Hacim (ml)

2. $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$

M₁=I. Çözeltinin Molaritesi

V₁=I. Çözeltinin Hacmi (ml)

M₂=II. Çözeltinin Molaritesi

V₂=II. Çözeltinin Hacmi (ml) (Stephenson, 2003)

X Faktörüne Göre Konsantrasyonlar

Bir çözeltinin konsantrasyonunun bir katı olarak ifade edilen değer (Stephenson, 2003).

YM Agar (Merck)

YM Agar besiyeri saf maya suşlarının analizinde kullanılmak amacıyla hazırlanmaktadır. Besiyeri çözündürüldükten sonra 121 °C’de 15 dk sterilize edilip, petri kutularına 12.5-15.0 ml aktararak donması beklenir.

Yeast Ekstrakt 3.0 gr

Malt Ekstrakt 3.0 gr

Bacto Pepton	5.0 gr
Glikoz	10.0 gr
Damıtık Su	1.0 litre

YDP Broth-Agar

Maya DNA prosedürünün başlangıç aşamasında kullanılan besiyeridir. Bu besiyeri çözündürüldükten sonra 121 °C’de 15 dk sterilize edilip, petri kutularına 12.5-15.0 ml aktarılarak donması beklenir.

Yeast Ekstrakt (Merck)	5.0 gr
Bacto Pepton (Himedia)	10.0 gr
Glikoz (Merck)	10.0 gr
Damıtık Su	1.0 litre

Buffer A (Lysis) Çözeltisi

1 mm cam boncukla birlikte maya hücre zarının parçalanmasını sağlayan çözeltidir.

Triton X-100	%2
Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)	%1
NaCl (Tekkim KİM.)	100 mM
Tris-HCl (Merck)	10 mM, pH 8.0
EDTA (Sigma)	1 mM pH 8.0

Fenol: Kloroform: İzooamil Alkol (25:24:1, Sigma)

Mayaların genetik materyalinin (DNA ve RNA) ayrılmasını sağlayan çözeltidir. (pH 8.0)

Amonyum Asetat (Merck)

Bu çözelti RNA molekülün uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. 10 M stok çözeltisinden 8 ml alınıp üzerine son hacim 20 ml olacak şekilde ya ddH₂O veya ultra saf su konarak tamamlanır.

0.5 M TE (Tris/EDTA) Çözeltisi

Bu çözelti hem mayaların genetik materyalini (DNA ve RNA) hem de RNA molekülün uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır.

Tris-HCl (Merck)	10 mM, pH 8.0
EDTA (Sigma)	1 mM pH 8.0

Etil Alkol (% 99.8 ve % 70, Sigma)

Etil alkol maya DNA' sının ekstraksiyonu yapmak amacıyla kullanılmaktadır. % 70 etil alkol, stok etil alkolden 30 ml alınıp 100 ml' lik balonjojeye konularak 100 ml çizgisine kadar ddH₂O veya ultra saf su ile tamamlandıktan sonra 0.22 µm por çaplı filtrelerle steril edilerek falkon tüplerine konulup -18°C' de kullanılıncaya kadar saklanır.

%20 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (w/v)

SDS' yi ultra saf su ile karıştırdıktan sonra HCl ile pH 7.2 'ye ayarlanır. Ayarlanan çözelti 68°C' de çözününceye kadar karıştırılır. Ayarlı çözelti 0.22 µm por çaplı filtrelerle steril edilerek, steril falkon tüplerine konulup, oda koşullarında saklanır.

SDS	20 gr
Ultra Saf Su	100 ml

0.5 M EDTA (Disodyum Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Sigma, pH 8.0)

Toz haldeki EDTA' dan 18.61 gr alınıp üzerine 80 ml ultra saf su eklenir pH 8.0 olana kadar NaOH (Carlo Erba) eklenip çözelti 100 ml' ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 0.22 µm por çaplı filtrelerle steril edilerek, steril falkon tüplerine konulup kullanılıncaya kadar -18°C' de saklanır.

Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Sigma)	18.61 gr
Ultra Saf Su	100 ml

10 M Amonyum Asetat (Merck)

Hazırlanan çözelti 0.22 µm por çaplı filtrelerle steril edilerek steril falkon tüplerine konulup +4°C' de veya oda koşullarında kullanılıncaya kadar saklanır.

Amonyum Asetat	77 gr
Ultra Saf Su	100 ml

5 M NaCl (Tekkim KİM.)

Hazırlanan çözelti 0.22 µm por çaplı filtrelerle steril edilerek, steril falkon tüplerine konulup oda koşullarında kullanılıncaya kadar saklanır.

NaCl	29.2 gr
Ultra Saf Su	100 ml

0.5 M Tris-HCl [Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane-HCl] (Merck)

Bu çözelti pH 8.0 olana kadar HCl (Merck) eklenip, çözelti 100 ml' ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 0.22 µm por çaplı filtrelerle steril edilerek , steil falkon tüplerine konulup kullanılıncaya kadar +4°C' de veya oda koşullarında saklanır.

Tris Base	6.05 gr
Ultra Saf Su	100 ml

% 10 Triton X-100

Sıvı haldeki Triton X-100 su ile çözündürülür. Hazırlanan çözelti 0.22 µm por çaplı filtrelerle steril edilerek steril falkon tüplerine konulup kullanılıncaya kadar +4°C' de veya oda koşullarında saklanır.

Triton X-100	10 ml
Ultra Saf Su	100 ml

50X TAE (Tris/Asetate/EDTA) Elektroforez Tampon Çözelti (pH 8.5)

Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar steril otoklav şişesinde oda koşullarında saklanır.

Tris Base (Merck)	242 gr
Glacial Asetik Asit (Carlo Erba)	57.1 ml
Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Sigma)	37.2 gr
Ultra Saf Su	100 ml

Agaroz Jel

Agarozu TAE tampon çözeltisine DNA, PZR ve PZR-RFLP ürünlerini görüntülemek amacıyla sırasıyla % 1, % 1.5-2 ve % 1.5-3 oranında katılıp çözündürülmüştür.

GelRed Stok Hazırlanması

GelRed (10000 X Biotium) stoku 1/20 oranında ultra saf su ile sulandırılıp kullanılabilecek kadar +4 °C’ de saklandı (Anonymous, 2009).

Yükleme Tamponunu Hazırlanması

Stok 6 X Yükleme tamponu (Sigma) kontaminasyon olmaması için 1.5 ml eppendorf tüplerine 1.0 ml aktarılıp, kullanılabilecek kadar, stokla birlikte +4 °C’ de saklandı.

Agaroz Jelde Kalıp DNA, PZR ve PZR-RFLP Analizlerinde Kullanım Oranı

Agaroz jelde Kalıp DNA, PZR ve PZR-RFLP ürünlerini görüntülemek için agaroz jel kuyucuklarına konan miktarlar aşağıda verilmiştir.

DNA için;

Kalıp DNA	3.0 µl
6 X Yükleme Tamponu (Sigma)	1.0 µl
Gelred (Biotium)	0.5 µl
Steril Ultra Saf Su	1.5 µl
Toplam	6.0 µl

PZR ve PZR-RFLP ürünleri;

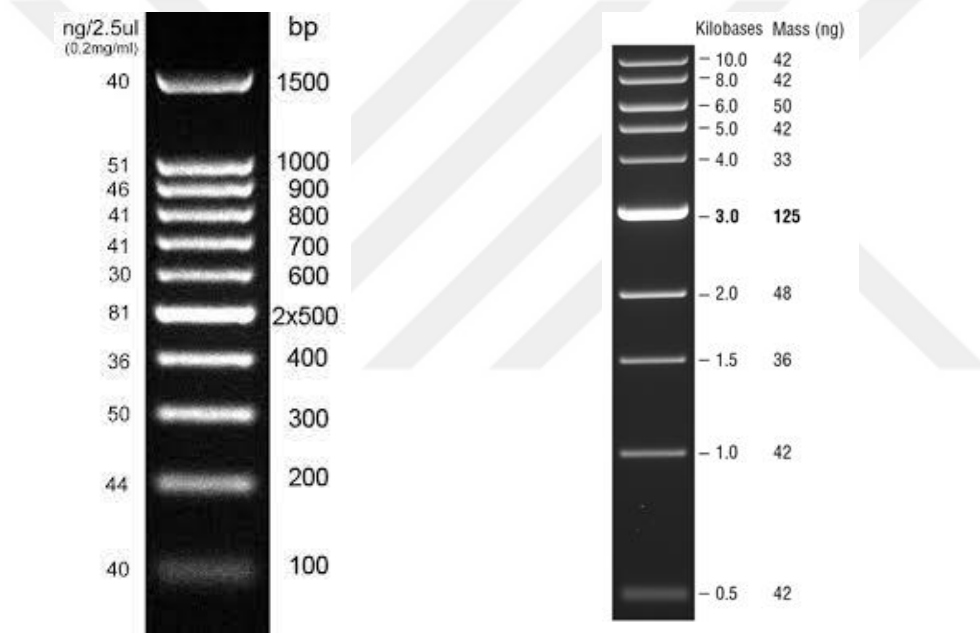
PZR ve PZR-RFLP ürünleri	1-3 µl
6 X Yükleme Tamponu (Sigma)	1.0 µl
Gelred (Biotium)	0.5 µl
Steril Ultra Saf Su	1.5-3.5 µl
Toplam	6.0 µl

100 bp (Bioron) ve 1 Kb (NEB) Marker için;

Marker	1.0 µl
6 X Yükleme Tamponu (Sigma)	1.0 µl
Gelred (Biotium)	0.5 µl
Steril Ultra Saf Su	3.5 µl
Toplam	6.0 µl

100 bp (Bioron) ve 1 Kb (NEB) Marker' ların Özellikleri

Bu markerlar kullanılıncaya kadar -18 °C' de saklandı. 100 bp (Bioron) ve 1 Kb (NEB) marker' ların özellikleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Anonymous, 2020b; Anonymous, 2022d).



100 bp (Bioron) Marker

1 Kb (NEB) Marker

Çalışmada Kullanılan Primerler ve özellikler

Çalışma için kullanılan primerler Macrogen Firmasında temin edilmiştir. Bu primerlerin özellikleri aşağıda verilmiştir.

ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (19 Mer); Tm=61.7°C, MOPC saflıkta (White et al. 1990).

ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (20 Mer); Tm=56.4°C, MOPC saflıkta (White et al., 1990).

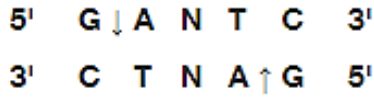
Taq Polimeraz Mixleri

Çalışmada birçok farklı marka mix ve taq polimeraz enzimi kullanılmıştır. Ancak ideal olan “OneTaq® 2X Master Mix (NEB)” ve “EconoTaq® PLUS 2X Master Mix (Lucigen)” PZR mixlerin olduğu belirlenmiştir.

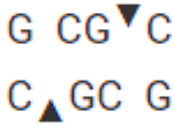
PZR-RFLP Yönteminde Kullanılan Restriksiyon Enzimleri ve Özellikleri

Kaynak araştırılması sonucu PZR-RFLP analizi için kullanılacak restriksiyon enzimlerinin *Hin* I, *Cfo*I (*Hha* I) ve *Hae* III (*Bsu*R I) olduğuna karar verilip analizi yapıldı (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Bu enzimlerin özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Hin I (Thermo Fisher Scientific) Kesim Bölgesi (Anonymous, 2012a)



*Cfo*I (*Hha* I) (Promega) Kesim Bölgesi (Anonymous, 2012b)



Hae III (*Bsu*R I) Kesim Bölgesi (Anonymous, 2012c)



Kullanılan Aletler

1. İnkübatör (Nüve ve Elektromag)
2. Çalkalamalı Su Banyosu (Nüve)
3. Santrifüj (Nüve)
4. Mikrosantrifüj (Nüve ve Sigma)
5. Elektroforez Tankı (Scie-Plas)
6. Güç Kaynağı (Consort)
7. PCR Thermal Cycler (Pqclab Primus)
8. Otomatik Pipet (Eppendorf, Axygen ve Microlit)
9. Nanodrop (Titertek Berthold)

10. Mikrodalga Fırın (Arçelik ve Samsung)
11. Ceketli Isıtıcı (İsolab)
12. UV Transillüminatör (Elektroforez Jel Görüntüleyici) ?

Kullanılan Bilgisayar Programları

1. MS OFFİCE 2016
2. Pdraw32 (v. 1.1.76)
3. ImageJ/Fiji 1.46 (v. IJ 1.46r)
4. GelQuantnet (v. 1.8.2)
5. Freetree (v. 0.9.1.50)
6. Chormas (v. 2.6.6 Demo)
7. FinchTV (v. 1.4.0 Demo)
8. CodonCode Aligner (v. 10.0.1 Demo)
9. Bioedit (v. 7.2.5 software)
10. Unipro UGENE (v. 38.1 software)
11. Mega XI (v.11.0.10)
12. ClustalX (v.1.8)
13. Network (v. 4.6)
14. PAUP 4 (v. *4.0 a169)
15. PHYML (v. 3.0)
16. DnaSP6 (v. 6.12.03)
17. jModelTest1 (v. 0.1.1)

Kullanılan Web Sayfaları

1. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
2. <https://theyeasts.org/page/Polyphasic%20identification>

ÖZ GEÇMİŞ

Mustafa APAN, Samsun 19 Lisesi'ni bitirdikten sonra Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden 2002 yılında mezun oldu. 2007 yılında OMÜ Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programını bitirdi. Lisans mezuniyetinden bu yana OMU Terme MYO' da Öğr. Gör. olarak görev yapmaktadır orta derecede İngilizce bilmektedir.

24.06.2022

ORCID ID: 0000-0002-1842-7358

Yayınlanmış Çalışmalar:

Konferans Bildirisi

1. Mustafa EVREN, Mustafa APAN, Vildan AKIN MUTLU, İbrahim ÖZKOÇ Beyaz Peynir Yüzeyinde Bozulma Etmeni Mayaların PCR-RFLP Yöntemiyle Tanımlanması , 3 / 2017, Türkiye 1. Tarım ve Gıda Etiği Kongresi/ ANKARA [Uluslararası]
2. Mustafa EVREN, Esra Tutkun ŞIVGIN, Mustafa APAN t ve Ürünlerinde Hormon Kullanımı , 3 / 2017, Türkiye 1. Tarım ve Gıda Etiği Kongresi / ANKARA [Uluslararası]
3. Mustafa EVREN, Mustafa APAN, Esra Tutkun ŞIVGIN Fermente Fonksiyonel Gıdalar , 3 / 2017, Türkiye 1. Tarım ve Gıda Etiği Kongresi / ANKARA [Uluslararası]
4. Mustafa Evren, Mustafa Apan, Esra Tutkun Şıvgın, Nuray İnan Mikrobiyel kaynaklı antioksidanlar , 4 / 2015 [Ulusal]
5. Mustafa Evren, Esra Tutkun Şıvgın, Mustafa Apan, Nuray İnan Mikroenkapsülasyon yöntemlerinin gıdalarda uygulanması , 4 / 2015, NEVŞEHİR [Ulusal]
6. Mustafa Apan, Mustafa Evren, Esra Tutkun Şıvgın, Nuray İnan Fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemler, 4 / 2015, NEVŞEHİR [Ulusal]
7. Nuray İnan, Mustafa Evren, Esra Tutkun Şıvgın, Mustafa Apan Alfa – amilaz enzimi üretiminde rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı , 4 / 2015, NEVŞEHİR [Ulusal]
8. Mustafa Evren, Nuray İnan, Esra Tutkun Şıvgın, Mustafa Apan Hayvansal ürünlerde saksitoksin ve önemi , 4 / 2015, NEVŞEHİR [Ulusal]
9. Mustafa Evren, Esra Tutkun Şıvgın, Nuray İnan, Mustafa Apan Gıda ambalajlamada nanoteknoloji uygulamaları , 4 / 2015, NEVŞEHİR [Ulusal]

- 10.** Avrupa Birliği Sürecinde Türkiye’de Gıda Güvenliği , 4 / 2014, Mustafa EVREN, Mustafa APAN, Esra TUTKUN ŞIVGIN, Mukaddes ARIGÜL , ADANA [Ulusal]
- 11.** Mustafa EVREN, Nuray İNAN, Esra TUTKUN ŞIVGIN, Mustafa APAN, Mukaddes ARIGÜL Fermente Et Ürünlerinde Aflatoxin B1 Ve Okratoksin A Oluşumu , 4 / 2014, ADANA [Ulusal]
- 12.** Mustafa EVREN, Mustafa APAN, Esra TUTKUN ŞIVGIN, Mukaddes ARIGÜL Deniz Ürünleri Kaynaklı Fonksiyonel Gıda Maddeleri, 4 / 2014 [Ulusal]
- 13.** Mustafa EVREN, Esra KILINÇ, Mustafa APAN, Esra TUTKUN ŞIVGIN, Merve ANAR Fermente Et Ürünlerinde Probiyotik Kullanımı, 4 / 2014, ADANA [Ulusal]
- 14.** Mustafa EVREN, Esra TUTKUN ŞIVGIN, Mustafa APAN, Esra KILINÇ Geleneksel Süt Ürünlerinde Kullanılan Küf Starter Kültürlerinin Önemi, 4 / 2014, ADANA [Ulusal]
- 15.** Mustafa EVREN, Mukaddes ARIGÜL, Esra TUTKUN ŞIVGIN, Mustafa APAN, Nuray İNAN Kütahya’nın Geleneksel Bir Çorbası: Sıkıcık, 4 / 2014, ADANA [Ulusal]
- 16.** Mustafa EVREN, Esra TUTKUN ŞIVGIN, Mustafa APAN, Esra KILINÇ Laktik Asit Bakterilerinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, 4 / 2014, ADANA [Ulusal]
- 17.** Mustafa EVREN, Mustafa APAN, Esra TUTKUN ŞIVGIN, Merve ANAR Tuzlama Yönetimiyle Muhafaza Edilen Balıkların Mikrobiyel Kalitesi , 4 / 2014, ADANA [Ulusal] 1.