

67936

**ÇİĞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN MAYA VE MAYA BENZERİ
MİKROORGANİZMALARIN DAĞILIMLARI VE BU
MİKROORGANİZMALARIN PROTEİNAZ ENZİM AKTİVİTELERİ**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANİSTON NO: 1392

İlknur YILDIRIM

BİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Eylül 1997

ANKARA

67996

**ÇİĞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN MAYA VE MAYA BENZERİ
MİKROORGANİZMALARIN DAĞILIMLARI VE BU
MİKROORGANİZMALARIN PROTEİNAZ ENZİM AKTİVİTELERİ**

İlknur YILDIRIM

BİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Eylül 1997

ANKARA

İlknur YILDIRIM tarafından hazırlanan ÇİĞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN MAYA VE MAYA BENZERİ MİKROORGANİZMALARIN DAĞILIMLARI VE BU MİKROORGANİZMALARIN PROTEİNAZ ENZİM AKTİVİTELERİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Tez Yöneticisi

Doç. Dr. Güven URAZ

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji..Anabilim Dalında Yüksek Lisans.....tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr.Sibel ERGÜVEN

Üye : Doç.Dr.Güven URAZ

Üye : Doç.Dr.Gülderen YENTÜR

Üye :

Üye :

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

B. A. H. 2014

**ÇİĞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN MAYA VE MAYA BENZERİ
MİKROORGANİZMALARIN DAĞILIMLARI VE BU
MİKROORGANİZMALARIN PROTEİNAZ ENZİM AKTİVİTELERİ
(Yüksek lisans tezi)**

İlknur Yıldırım

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eylül 1997**

ÖZET

Araştırmada 90 çiğ süt örneğinden toplam 50 maya ve maya benzeri mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların morfolojik görünimleri, biyokimyasal karakteristikleri, fermentasyon ve asimilasyon testleri çalışılarak tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir. Maya ve maya benzeri mikroorganizmalar içinde en sıklıkla rastlanan türler *Torulopsis* cinsine aittir(20)(%40). İzole edilen diğer cinsler *Trichosporon* (10) (%20), *Candida*(8)(16)ve*Cryptococcus*(7)(%14) olarak bulunmuştur. *Saccharomyces* (2)(%4), *Rhodotorula*(2)(%4) ve *Sporobolomyces*(1)(%2) türlerinin ise çok düşük oranlarda olduğu tespit edilmiştir. İzolatlar 28 farklı türü içermektedir. *Torulopsis candida* çiğ sütlerden en sıklıkla izole edilen türdür. Bu türü *Trichosporon cutaneum* ve *Torulopsis famata* izlemektedir. Adlandırması yapılan mikroorganizmaların proteinaz enzim aktiviteleri YCB-BSA (Yeast-

Carbon Base-Bovine Serum Albumin) agar ve Skim milk agar besiyerlerinde değerlendirilmiştir. İzolatların büyük bir çoğunluğu her iki besiyerinde proteolitik aktivite göstermiştir. Ancak YCB-BSA agarda Skim milk agara oranla daha kuvvetli proteolitik aktivite gözlenmiştir. Araştırmada en kuvvetli proteolitik aktiviteyi *Saccharomyces cerevisiae* türü göstermiştir.

Bilim kodu: 4010104

Anahtar kelimeler: Maya, Maya-benzeri, Çiğ süt, Proteinaz

Sayfa Adedi : 161

Tez yöneticisi:Doç.Dr.Güven URAZ



**THE DISTRIBUTIONS OF YEAST AND YEAST-LIKE
MIKROORGANISMS ISOLATED FROM RAW MILKS AND THEIR
PROTEINASE ENZYME ACTIVITIES
(M. Sc. Thesis)**

İlknur YILDIRIM

**Gazi UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
September 1997**

ABSTRACT

In this research, a total of 50 strains of yeast and yeast-like microorganisms were isolated from 90 raw milk samples. The morphological views, the biochemical characteristics, fermentation and assimilation tests of microorganisms isolated were studied and name of species were made real. The most widespread species within yeast and yeast-like microorganisms were found to belong to *Torulopsis* genus(20)(%40). The other genus were found as *Trichosporon* (10) (%20), *Candida* (8)(%16) and *Cryptococcus*(7)(%14). The species of *Saccharomyces*(2)(%4), *Rhodotorula*(2)(%4) and *Sporobolomyces*(1)(%2) were determined to be too low number of species. The isolates were included 28 different species. *Torulopsis candida* was isolated most frequently from raw milk, followed by *Trishosporon cutaneum* and *Torolopsis famata*. The proteinase enzyme activities of microorganisms, whose naming has been done, have been evaluated in the mediums of YCB-BSA(Yeast Carbon Base-Bovine Serum Albumin) agar and Skim milk agar. But great majority of isolates were shown proteolytic activity has been

observed compared to that of skim milk agar. In the research, the species of *Saccharomyces cerevisiae* showed the strongest proteolytic activity .

Science Code: 4010104

Key Words:Yeast, Yeast-like, Raw milk, Proteinase.

Page Number: 161

Supervisor:Doç.Dr.Güven URAZ



TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı bana veren, gerek konu seçiminde gerekse çalışmalarım boyunca yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Güven URAZ'a teşekkür ederim. Ayrıca araştırmada yardımcı olan G.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü asistanlarına ve değerli arkadaşım Yıldız MARAŞ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	v
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE METOT.....	35
2.1. Çiğ Süt Örneklerinden Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	37
2.1.1. Örnek alma ve örneklerin analize hazırlanması.....	37
2.1.2. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonu ve değerlendirilmesi.....	37
2.1.3. <i>Candida</i> 'ların adlandırılması.....	41
2.1.4. <i>Trichosporon</i> 'ların adlandırılması.....	43
2.1.5. <i>Cryptococcus</i> 'ların adlandırılması.....	45
2.1.6. <i>Torulopsis</i> 'ların adlandırılması.....	47
2.1.7. <i>Saccharomyces</i> 'ların adlandırılması.....	49
2.1.8. <i>Rhodoturula</i> 'ların adlandırılması.....	49
2.1.9. <i>Sporobolomyces</i> 'ların adlandırılması.....	51
2.2. Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların Proteinaz Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	52

2.2.1.	Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi.....	53
2.2.2.	Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda proteinaz aktivitelerinin belirlenmesi.....	54
2.3.	Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların İzolasyonlarında Kullanılan Temel Besiyerleri.....	54
2.3.1.	SDA(Sabouraud Dextrose Agar) Oxoid CM41.....	54
2.3.2.	Antibiyotikli SDA.....	54
2.4.	Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların Adlandırılmasında Kullanılan Temel Besiyerleri ve Uygulanan Testler.....	55
2.4.1.	Cornmeal-Tween 80 agar(Oxoid CM103).....	55
2.4.2.	Karbonhidrat asimilasyon besiyeri (Modified Wickerham Medium- slants).....	55
2.4.2.1.	Bazal ortam.....	55
2.4.2.2.	Stok karbonhidrat solüsyonu.....	56
2.4.3.	Karbonhidrat fermentasyon besiyeri.....	57
2.4.3.1.	Purple Broth Base(Difco).....	57
2.4.3.2.	Karbonhidrat solüsyonu.....	57
2.4.4.	Bacto Sabouraud Dextrose Broth(Difco).....	58
2.4.5.	Christensen's Urea Agar(Oxoid CM53).....	58
2.4.6.	Gorodkova Medium'da askospor testi.....	59
2.4.7.	Nitrat testi.....	60
2.4.7.1.	Solüsyon A.....	60
2.4.7.2.	Solüsyon B.....	60
2.4.8.	Germ Tube test.....	61
2.4.9.	Ringer Solution-1/4-Code BR5.....	61
2.5.	Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların YCB-BSA Agarda Proteinaz Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve Uygulanan Testler.....	62

2.5.1.	YEPD Broth.....	62
2.5.2.	YCB-BSA(Yeast Carbon Base-Bovine Serum Albumin)Agar.....	62
2.5.2.1.	Stok solüsyon.....	62
2.5.2.2.	%2'lik agar.....	63
2.5.3.	Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda proteinaz enzim aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan protein boyama çözeltisi.....	63
2.5.3.1.	Amidoblack içeren protein boyama çözeltisi.....	63
2.5.3.2.	Amidoblack içermeyen asetik asitli solüsyon.....	63
2.6.	Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların Skim Milk Agarda Proteinaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Besiyerleri ve Uygulanan Testler.....	64
2.6.1.	Skim milk agar.....	64
2.6.1.1.	Solüsyon A.....	64
2.6.1.2.	Solüsyon B.....	64
3.	BULGULAR.....	65
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		143
KAYNAKLAR.....		155
ÖZGEÇMİŞ.....		183

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1.3.1.Araştırmada <i>Candida</i> 'ların adlandırılmasında uygulanan testler.....	42
Çizelge 2.1.4.1.Araştırmada <i>Trichosporon</i> 'ların adlandırılmasında uygulanan testler.....	44
Çizelge 2.1.5.1.Araştırmada <i>Cryptococcus</i> 'ların adlandırılmasında uygulanan testler.....	46
Çizelge 2.1.6.1.Araştırmada <i>Torulopsis</i> ve <i>Saccharomyces</i> türlerinin adlandırılmasında uygulanan testler.....	48
Çizelge 2.1.8.1.Araştırmada <i>Rhodotorula</i> 'ların adlandırılmasında uygulanan testler.....	50
Çizelge 2.1.9.1.Araştırmada <i>Sporobolomyces</i> 'lerin adlandırılmasında uygulanan testler.....	52
Çizelge 3.1. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları ve izolasyon yüzdeleri.....	66
Çizelge3.2. Aynı çiğ süt örneğinde birden fazla izole edilen maya ve maya benzerlerinin dağılımları.....	67
Çizelge 3.3. Çiğ süt örneklerinden tek tür olarak izole edilen maya ve maya benzerlerinin dağılımları.....	69
Çizelge 3.4. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Torulopsis</i> türlerinin dağılımları.....	71
Çizelge 3.5. Araştırmada çalışılan <i>Torulopsis</i> türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları.....	75
Çizelge 3.6. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Trichosporon</i> türlerinin dağılımları.....	76

Çizelge 3.7. Araştırmada çalışılan <i>Trichosporon</i> türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları.....	77
Çizelge 3.8. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Candida</i> türlerinin dağılımları.....	81
Çizelge 3.9. Araştırmada çalışılan <i>Candida</i> türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları.....	86
Çizelge 3.10. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Cryptococcus</i> türlerinin dağılımları.....	87
Çizelge 3.11. Araştırmada çalışılan <i>Cryptococcus</i> türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları.....	90
Çizelge 3.12. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Saccharomyces</i> türlerinin dağılımları.....	91
Çizelge 3.13. Araştırmada çalışılan <i>Saccharomyces</i> türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları.....	94
Çizelge 3.14. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Rhodotorula</i> türlerinin dağılımları.....	96
Çizelge 3.15. Araştırmada çalışılan <i>Saccharomyces</i> türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları.....	98
Çizelge 3.16. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Sporobolomyces</i> türlerinin dağılımları.....	99
Çizelge 3.17. Araştırmada çalışılan <i>Sporobolomyces</i> türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları.....	100
Çizelge 3.18. Araştırmada çalışılan çiğ süt örneklerinin yörelere göre dağılımları.....	103
Çizelge 3.19. Burdur ve yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.....	104
Çizelge 3.20. Antalya ve yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.....	106
Çizelge 3.21. Afyon yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.....	107

Çizelge 3.22. Isparta yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.....	107
Çizelge 3.23. Ankara ve yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.....	108
Çizelge 3.24. Denizli yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.....	108
Çizelge 3.25. Bilecik yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.....	109
Çizelge 3.26. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Torulopsis</i> 'lerin YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	111
Çizelge 3.27. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Trichosporon</i> 'ların YCB-BSA agardadeğerlendirilen proteolitik zon çapları.....	112
Çizelge 3.28. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Candida</i> 'ların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	113
Çizelge 3.29. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Cryptococcus</i> 'ların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	114
Çizelge 3.30. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Rhodotorula</i> 'ların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	114
Çizelge 3.31. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Saccharomyces</i> 'lerin YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	115
Çizelge 3.32. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Sporobolomyces</i> türünün YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapı.....	115
Çizelge 3.33. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Torulopsis</i> 'lerin Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	125
Çizelge 3.34. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Trichosporon</i> 'ların Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	126
Çizelge 3.35. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Candida</i> 'ların Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	127

Çizelge 3.36. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Cryptococcus</i> 'ların Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	128
Çizelge 3.37. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Saccharomyces</i> 'lerin Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	129
Çizelge 3.38.. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Rhodotorula</i> 'ların Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.....	129
Çizelge 3.39. Çiğ sütlerden izole edilen <i>Sporobolomyces</i> türünün skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapı.....	130



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. <i>Torulopsis candida</i> 17i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Hücreleri yuvarlak ve ovaldır, pseudohif gözlenmemektedir. İmmersiyon yağı, (x100).....	72
Şekil 3.2. <i>Torulopsis etchellsii</i> 18i. Cornmeal Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Hücreleri yuvarlak ve ovaldır, pseudohif gözlenmemektedir. İmmersiyon yağı, (x100).....	73
Şekil 3.3. <i>Torulopsis sphaerica</i> 10i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25 °C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Yuvarlak, uzun-oval hücreler ve nadiren primitif pseudomiselyum gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).....	74
Şekil 3.4. <i>Trichosporon fermentans</i> 2i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Gerçek hif, hif boyunca blastasporlar ve artrosporlar gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).. ..	78
Şekil 3.5. <i>Trichosporon capitatum</i> 6i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Gerçek hif, hif boyunca blastosporlar ve artrosporlar gözlenmektedir.....	79

- Şekil 3.6. *Trichosporon cutaneum* 4i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından yapılan gram boyama sonucu gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Gerçek hifler, hif boyunca blastosporlar ve artrosporlar gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x40).....80
- Şekil 3.7. *Candida albicans* 1i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Pseudohiflerin terminal uçlarında bulunan kalın çeperli klamidosporlar *C. albicans* için karakteristiktir. İmmersiyon yağı, (x100).....82
- Şekil 3.8. *Candida albicans* için karakteristik germ tube oluşumu. *C. albicans*, steril insan serumunda 37°C’de 3 saat inkübasyon sonrası filamentöz bir büyüme olan germ tübü oluşturmaktadır. İmmersiyon yağı, (x100).....83
- Şekil 3.9. *Candida guilliermondii* 6i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm pseudohifler etrafında küçük blastospor kümeleri gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100). 84
- Şekil 3.10. *Candida guilliermondii* 6i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Pseudohifler ve "ağaca benzer" bir dizilim gösteren blastosporlar gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).....85
- Şekil 3.11. *Cryptococcus terreus* 4i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm Oval, yuvarlak ve kalın duvarlı hücreler gözlenmektedir İmmersiyon yağı, (x100).....88

- Şekil 3.12. *Cryptococcus laurentii* 2i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından gram boyama sonucu gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm yuvarlak, oval, tomurcuklanan hücreler gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).....89
- Şekil 3.13. *Saccharomyces cerevisiae* 2i. Cornmeal-Tween 80 agar da 25°'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Yuvarlak ve oval hücreler, nadiren kısa pseudohifler gözlenir. İmmersiyon yağı (x100).....92
- Şekil3.14. *Saccharomyces cerevisiae*'nin askosporları. Gorodkova medium'da 37°C'de 10 gün inkübasyon sonrası yapılan gram boyamada gözlenen mikroskopik görünüm. Askuslar içinde 1-4sayıda askospor bulunmaktadır. Blastosporlar gram (+), askosporlar gram (-) olarak boyanmaktadır, İmmersiyon yağı (x100).....93
- Şekil 3.15. *Saccharomyces delbrueckii*-li. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Yuvarlak oval hücreler ve tomurcuklanma gözlenmektedir. İmmersiyon yağı(x100).....95
- Şekil 3.16. *Rhodotorula flava*-li. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından yapılan gram boyama sonucu gözlenen mikroskopik görünüm. Hücreler yuvarlak, oval ve tomurcukludur. Nadiren primitif pseudomiselyum görülmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).....97
- Şekil 3.17. *Sporobolomyces albo-rubescens* 1i Kolonilerin rengi pembedir.....101

- Şekil 3.18 *Sporobolomyces albo-rubescens* 1i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskobik morfolojik görünüm. Yuvarlak ve tomurcuklanan hücreler görülmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).....102
- Şekil 3.19. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları
 31 → *Candida melinii* 7i, kuvvetli proteolitik aktivite (6mm)
 32 *T. etchellsii* 20i, kuvvetli proteolitik aktivite (9mm), 33 → *Trichosporon cutaneum* 4i, proteolitik aktivite gözlenmedi.
 34 → *Rhodotorula flava* 12i, kuvvetli proteolitik aktivite (10 mm).....117
- Şekil 3.20. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları
 35 → *Cryptococcus terreus* 7i, kuvvetli proteolitik aktivite (7mm) 36 → *Trichosporon behrendii* 8i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm), 37 → *Cryptococcus terreus* 4i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm) 38 → *Rhodotorula pallida* 2i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm).....118
- Şekil 3.21. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları. 7 → *Cryptococcus laurentii* 3i, kuvvetli proteolitik aktivite (7mm)
 8 → *Torulopsis sphaerica* 10i, kuvvetli proteolitik aktivite (6mm). 9 → *Torulopsis pinus* 13i, kuvvetli proteolitik aktivite (6mm).....119

Şekil 3.22. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri, 23→ *Candida guilliermondii* 6i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm). 24 → *Candida scottii* 5i, orta derecede proteolitik aktivite (2mm). 25→ *Candida catenulata* 3i, kuvvetli proteolitik aktivite (6mm). 26→ *Candida albicans* 1i, kuvvetli proteolitik aktivite (7mm).....120

Şekil 3.23. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları 43 → *Candida krusei* 8i, kuvvetli proteolitik aktivite (5mm). 44→ *Torulopsis stellata* 15i, kuvvetli proteolitik aktive (5mm) 45→ *Torulopsis etchellsii* 18i., kuvvetli proteolitik aktivite 8 mm 46 → *Torulopsis candida* 17i, orta derecede proteolitik aktivite (2mm).....121

Şekil 3.24. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları 39→ *Cryptococcus terreus* 5i, kuvvetli proteolitik aktivite (5mm). 40 → *Torulopsis famata* 14i, kuvvetli proteolitik aktivite (10mm) 41 → *Trichosporon sericeum* 10i, proteolitik aktivite gözlenmedi. 42 → *Torulopsis versatilis* 9i, kuvvetli proteolitik aktivite(3mm).....122

Şekil 3.25. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri

mikroorganizmaların YCB-BSA agarda

değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri.

5→*Saccharomyces cerevisiae* 2i, kuvvetli proteolitik

aktivite (18 mm) 6 →*Saccharomyces delbrueckii* 1i,

orta derecede proteolitik aktivite (2mm) 14 →*Sporobolomyces*

albo-rubescens 1i, orta derecede proteolitik aktivite (2mm). 15 →

Trichosporon fermentans 2i, proteolitik aktivite gözlenmedi....123

Şekil 3.26. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri

mikroorganizmaların YCB-BSA agarda

değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri 47 →*Torulopsis*

famata 8i, kuvvetli proteolitik aktivite (7 mm), 48 *Torulopsis*

gropengiesseri 1i, proteolitik aktivite gözlenmedi.

49 *Torulopsis aerea* 18i, proteolitik aktivite gözlenmedi

50 → *Trichosporon capitatum* 6i, kuvvetli proteolitik aktivite

(4mm).....124

Şekil 3.27. Araştırmada izole edilen maya ve maya benzeri

mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen

proteinaz enzim aktiviteleri. 88 → *Candida albicans* 1i,

proteolitik zon çapı 4mm, kuvvetli proteolitik aktivite.

87 → *Candida catenulata* 3i, proteolitik zon çapı 4mm

kuvvetli proteolitik aktivite. 89 → *Trichosporon cutaneum*

1i, proteolitik zon çapı 3 mm, kuvvetli proteolitik. aktivite

90 → *Torulopsis candida* 17i. proteolitik zon çapı 2 mm,

orta derecede proteolitik aktivite.....131

Şekil 3.28. Araştırmada izole edilen maya ve maya benzeri

mikroorganizmaların Skim milk agarda değerlendirilen
 proteinaz enzim aktiviteleri 75 → *Trichosporon cutaneum* 5i,
 proteolitik zon çapı (3 mm), kuvvetli proteolitik aktivite
 74→ *Trichosporon cutaneum* 4i, proteolitik zon çapı
 (4mm), kuvvetli proteolitik aktivite ,
 76→ *Trichosporon fermentans* 2i, proteolitik zon çapı
 (6mm), kuvvetli proteolitik aktivite 77 → *Trichosporon*
fermentans 3i, proteolitik zon çapı (7mm), kuvvetli
 proteolitik aktivite.....132

Şekil 3.29. Araştırmada izole edilen maya ve maya benzeri

mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen
 proteinaz enzim aktiviteleri. 79 → *Torulopsis gropengiesseri* 1i,
 proteolitik aktivite gözlenmedi. 80 → *Torulopsis pinus* 13i,
 proteolitik zon çapı, 2mm (orta derecede proteolitik aktivite).
 78 → *Cryptococcus laurentii* 2i, proteolitik zon çapı 4mm
 (kuvvetli proteolitik aktivite). 81 → *Cryptococcus laurentii* 3i,
 proteolitik zon çapı 4mm (kuvvetli proteolitik aktivite).....133

Şekil 3.30. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri

mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen
 proteinaz enzim aktiviteleri. 86 → *Torulopsis stellata* 5i,
 proteolitik zon çapı 4mm (kuvvetli proteolitik aktivite).
 63→*Trichosporon sericeum* 9i, proteolitik aktivite gözlenmedi
 64 → *Torulopsis etchellsii* 5i, proteolitik zon çapı 2 mm(orta
 derecede proteolitik aktivite). 65 → *Torulopsis aeria* 16i,
 proteolitik aktivite gözlenmedi.....134

Şekil 3.31. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 66 → *Sporobolomyces alborubescens* 1i, proteolitik zon çapı 2mm, (Orta derecede proteolitik aktivite) 58 → *Torulopsis sphaerica* 10i proteolitik zon çapı 3 mm (kuvvetli proteolitik aktivite 73 → *Candida krusei* 8i, proteolitik zon çapı 2 mm (orta derecede proteolitik aktivite). 53 → *Rhodotorula flava* 1i, proteolitik zon çapı 4 mm (kuvvetli proteolitik aktivite).....135

Şekil 3.32.Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 83 → *Candida scottii* 5i, proteolitik zon çapı 2 mm(orta derecede proteolitik aktivite). 62 → *Candida melinii* 7i, proteolitik zon çapı 4mm (kuvvetli proteolitik aktivite). 61 → *Candida guilliermondii* 6i, proteolitik zon çapı 2 mm (orta derecede proteolitik aktivite).....136

Şekil 3.33. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 95 → *Saccharomyces cerevisiae* 2i,proteolitik zon çapı 6 mm (kuvvetli proteolitik aktivite). 82 → *Rhodotorula pallida* 2i, proteolitik zon çapı 2mm, (orta derecede proteolitik aktivite). 60 → *Trichosporon capitatum* 6i, proteolitik zonçapı 3 mm (kuvvetli proteolitik aktivite) 70 → *Saccharomyces delbrueckii* 1i, proteolitik zon çapı 2 mm (orta derecede proteolitik aktivite).....137

Şekil 3.34. Araştırmada izole edilen maya ve maya benzeri

mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 65 → *Torulopsis versatilis* 9i, proteolitik zon çapı 2 mm, (orta derecede proteolitik aktivite. 68 → *Trichosporon behrendii* 8i, proteolitik zon çapı 3 mm, (kuvvetli proteolitik aktivite). 79 → *Cryptococcus terreus* 6i, proteolitik zon çapı 3mm (kuvvetli proteolitik aktivite. 72 → *Torulopsis famata* 11i, proteolitik zon çapı 2 mm (orta derecede proteolitik aktivite.....138

Şekil 3.35. Çiğ sütlerden izole edilen *Torulopsis*lerin Yeast-Carbon Base-Bovine Serum Albumine Agar(YCB-BSA) ve Skim Milk Agar besiyerlerinde değerlendirilen proteinaz enzim aktivitelerine bağlı zon çapları.....139

Şekil 3.36. Çiğ sütlerden izole edilen *Trichosporon*ların Yeast-Carbon Base-Bovine Serum Albumine Agar(YCB-BSA) ve Skim Milk Agar besiyerlerinde değerlendirilen proteinaz enzim aktivitelerine bağlı zon çapları.....140

Şekil 3.37. Çiğ sütlerden izole edilen *Candida*'ların Yeast-Carbon Base-Bovine Serum Albumine Agar(YCB-BSA) ve Skim Milk Agar besiyerlerinde değerlendirilen proteinaz enzim aktivitelerine bağ zon çapları.....141

Şekil 3.38. Çiğ sütlerden izole edilen *Cryptococcus*'ların Yeast-Carbon Base-Bovine Serum Albumine Agar(YCB-BSA) ve Skim Milk Agar besiyerlerinde değerlendirilen proteinaz enzim aktivitelerine bağlı zon çapları.....142

1. GİRİŞ

Çiğ süt, bakteri, küf ve mayalar için ideal bir üreme ortamı göstermektedir. Sütün küf ve bakterilerle bozulması hakkında yoğun çalışmalar yapılmasına rağmen mayaların sütün bozulmasındaki rolleri çok az çalışmayla gösterilmiştir. Bunun bir nedeni de bu mikroorganizmaların gelişiminin bakterilerden daha yavaş oluşudur. Son yıllarda mikrobiyologlar peynir, yoğurt, tereyağı gibi süt ürünleri ve çiğ sütlerde besin bozulmalarına neden olan mikroorganizmalar olarak mayalar üzerine dikkatleri çekmektedirler.

Nakae ve Yoneya 1976 yılında yaptıkları araştırmada depolama koşulları uygun olmadığında bazı maya ve maya benzeri mikroorganizmaların total süt asiditesi ve pH'ta yoğun değişimler oluşturabildiklerini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar birkaç günlük inkübasyon sonucunda lipolitik ve proteolitik aktivitelerin belirlendiğini de tespit etmişlerdir. Diğer yandan Amemiya ve Tashiro 1979 yılında çiğ sütlerdeki mantar kontaminasyonunu çalışmışlardır. Araştırmacılar ineklerdeki belli mastitik prosesler ile bazı mantarlar arasında potansiyel bir bağ bulunuşunun veterinerlik açısından ilginç olduğuna dikkatleri çekmişlerdir.

Mayalar doğada her yerde bulunan ve sıklıkla insan ve hayvanların gastrointestinal bölgelerinden izole edilen mikroorganizmalardır. Bu türlerin yalnızca küçük bir miktarı hayvanlarda hastalık ajanı olarak bulaşıcıdır. Maya ve maya benzeri mikroorganizmalar süt sığırlarındaki klinik mastitislerle ilişki göstermektedir. İnek klinik mastitislerinden izole edilen maya izolatlarının büyük bir kısmı *Candida* cinsi türlerine aittir. (Chengappa, et. al., 1993)

Çalışmamızda bu düşüncelerden hareket edilerek, çeşitli süt

işletmelerine gelen çiğ süt örneklerinden maya ve maya benzeri mikroorganizmalar izole edilerek adlandırılmıştır. Ayrıca bu mikroorganizmaların proteolitik aktiviteleri de değerlendirilmiştir.

Proteolitik enzimler, önemli hidrolitik enzimlerden olup, peptit bağının koparılması reaksiyonunu katalizlerler. Sütte bulunan maya ve maya benzerlerinin çoğunluğu proteolitik aktiviteye sahiptir ve sütte bulunan dikalsiyum kazeinatı, dikalsiyum parakazeinat haline getirmektedirler. Süt proteinlerinin parçalanması, sütün besin değeri ve kalitesini düşürerek bozulmalara sebep olmakta ve ayrıca insan sağlığı açısından da tehlike teşkil etmektedir (İnal,1990).

Maya proteinazları sütlerdeki olumsuz etkilerinin yanısıra olumlu etkileriyle de teknolojik açıdan önem taşırlar. Mayalar, proteolitik aktiviteleri nedeniyle çeşitli gıdaların, özellikle peynirlerin olgunlaştırılmasında kullanılırlar. Mayalar olgunlaşmanın normal geçmesini sağlayacak mikroorganizmalar için yararlı azotlu madde meydana getirirler. Bu suretle bakteriler hızlı bir gelişme olanağına kavuşurlar. Yapılan araştırmalar fazla maya kullanmanın olgunlaşmayı hızlandırdığını göstermiştir (İnal, 1990).

Son yıllarda çeşitli araştırmacılar proteinaz sekresyonunun bir patojenite kriteri olabileceğine dikkatleri çekmektedirler. Rüchel ve arkadaşlarının 1982 yılında yaptığı araştırmada, klinik izolatlardan rastgele seçilen 103 *C. albicans* suşunun proteinaz sekresyonu 3 farklı besiyerinde çalışılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında *Candida*'ların proteinaz üretiminin, besiyerinin özelliğine göre değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca *Candida*'ların proteinaz sekresyonunun, geleneksel stoplazmik ekstrakt antijenlerinden çok daha güvenilir bir diagnostik belirleyici olduğu da belirtilmiştir.

Proteolitik enzimler, sistematik adlandırmada C-N hidrolazları olarak

sınıflandırılmışlardır. Çünkü proteolitik enzimler tarafından katalizlenen reaksiyon, bir C-N bağının koparılması reaksiyonudur (Karlson, 1992).

Peptit bağını parçalayan enzimler; peptit zincirindeki saldırı noktasına göre de ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olarak ikiye ayrılırlar. Ekzopeptidazlar, yalnız peptit uçlarından başlayarak parçalanmaları, yani uçtaki aminoasitleri çözmeleri ile karakterize edilirler. Ayrıca peptit zincirine karboksil ucundan etkileyen ekzopeptidazlara karboksipeptidaz, amino ucundan etkileyenlere de aminopeptidazlar adı verilir. Birçok ekzopeptidazlar küçük parçalara, yani oligo ve polipeptitlere seçimli olarak etkiler ki, bu nedenle kısaca peptidaz olarak adlandırılırlar (Karlson, 1992).

Endopeptidazlar ise proteinleri zincirin ortasındaki belirli noktalardan parçalarlar ve zincir uçlarına atak yapmazlar. Daha çok proteinlere ve büyük polipeptitlere etki ederler ve proteinaz veya proteaz olarak da adlandırılırlar (Karlson, 1992).

Son yıllarda, süt ürünlerinde özellikle maya ve maya benzerlerinin izolasyonu ve tür dağılımları ile bu mikroorganizmaların proteinaz üretimleri üzerine çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Ayrıca mastitisli sütlerde mantar enfeksiyonlarının ağırlıklı olduğu da son yıllarda yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır. Bu nedenle de araştırmamız konusu seçilerek çalışılmıştır.

Chengappa ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları araştırmada sütlerden maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. 229 maya ve maya benzeri mikroorganizma izolatını morfolojik karakteristikler, üre hidrolizi ve API-20C mikrosistemi kullanarak teşhis etmişlerdir. Araştırmada inek klinik mastitislerinden en yoğun olarak elde edilen cinsin *Candida* olduğu belirtilmiştir. Total *Candida*'ların %71,4'ü *C.albicans*, *C.krusei*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* türlerine ait olarak

bulunmuştur. Diğer *Candida* türleri daha az sıklıkla izole edilmiş olup %28.6 oranındadır. Araştırmada *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Malassezia*, *Prototheca*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* ve *Trichosporon* cinsine mayalar da izole edilmiştir.

Kuo ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada 801 süt örneğinin 418'inde mastitis tespit etmişlerdir. Mastitisli süt örneklerinin %75'inde fungal izolasyon pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların %63.7'si *Candida* cinsine aittir. *C.tropicalis* en sıklıkla izole edilen suştur. (%16.5). Bu türü, *Geotrichum candidum* (%14.3), *Candida parapsilosis* (%11), *Trichosporon cutaneum* (%11), *Candida rugosa* (%9.9), *Candida albicans* (%6.6), *Candida guilliermondii* (%7.7), *Candida lipolytica* (%3.3), *Candida lusitaniae* (%3.3), *Torulopsis inconspicua* (%3.3), *Candida humicola* (%2.2), *Saccharomyces rosei* (%2.2), *Candida krusei* (%2.2), *Candida stellatoidea* (%1.1), *Hansenula anomala* (%1.1), *Torulopsis maris* (%1.1), *Torulopsis candida* (%1.1) ve *Trichosporon penicillatum* (%1.1) türleri takip etmektedir.

Costa ve arkadaşlarının 1993 yılındaki araştırmalarında 2078 süt örneğinden 208 maya 30 (%11,95) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen mayalar, *Cryptococcus* spp. (71 suş), *Rhodotorula* spp. (40), *Candida* spp. (68), *Trichosporon cutaneum* (21), *Aureobasidium pullulans* (7) ve *Pichia ohmeri* (1) olarak bulunmuştur.

Haridy, 1993 yılında El-Minia'da kırmızı mayalar üzerine yaptıkları araştırmada süt ürünlerinden 45 izolat elde etmiştir. *Rhodotorula mucilaginosa* ve *Cryptococcus albidus* süt ürünlerinde en dominant türler olarak bulunmuştur.

Haridy 1992 yılında El-Minia şehrindeki çiğ sütlerin maya mikrobiyotasını çalışmıştır. Araştırmada, 126 maya suşu süt satıcılarından toplanan çiğ süt örneklerinden izole edilmiştir. İzolatlar 13 cinse ait olarak

bulunmuştur. Bunlar *Debaryomyces* (27), *Clavispora* (24), *Trichosporon* (22), *Rhodotorula* (16) *Kluyveromyces* (10), *Torulospira* (8), *Cryptococcus* (6), *Hansenula* (4), *Saccharomyces* (4) ve *Candida* (2) olarak bulunmuştur. *Dekkera*, *Schwanniomyces* ve *Sporidiobolus* cinsleri ise tek bir suş olarak izole edilmiştir.

Rohm ve arkadaşları 1992 yılında yaptıkları çalışmada süt ürünlerindeki mayaların çeşitliliğini araştırmışlardır. Yoğurt, ekşi süt, yayıkayranı, çeşitli peynirler ve peyniraltı suyundan izole edilen 1013 mayanın biyokimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır. Standart tanımlamalarda değişken olarak tanımlanan % pozitif reaksiyonlardaki farklılıkların geleneksel seleksiyon mekanizmalarına işaret ettiği belirtilmiştir. Araştırmada ayrıca basitleştirilmiş üç identifikasyon metodu üzerine sonuçların etkileri tartışılmıştır.

Garrido ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları araştırmada, İspanya'nın Aracena bölgesindeki farklı bölgelerden toplanan Aracena peynirlerinin maya mikroflorasını çalışmışlardır. Çalışılan 15 örneğin 13'ü çiğ süt kullanılmak suretiyle elle yapılan peynirlerden, diğer 2 örnek ise pastörize süt kullanılarak yapılan peynirlerden elde edilmiştir. İzole edilen 145 suştan, 9 maya türü izole edilmiştir. Bu türler *Saccharomyces lactis*, *Candida curvata*, *Candida scottii*, *Trichosporon cutaneum*, *Debaryomyces subglobosus*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus laurentii*, *Torulopsis candida* ve *Torulopsis sphaerica*'dır. Baskın türler *Cryptococcus laurentii*, *Torulopsis sphaerica* ve *Torulopsis candida*'dır. (Sırasıyla %40.7; %15.9; % 15.2). *Cryptococcus laurentii* hem el üretimiyle yapılan, hem de endüstriyel peynirlerde kontaminant olarak bulunmuş ve olgunlaşma amaçları için önemli sayılmıştır.

Germin ve Beauchesne 1991 yılında MicroScan Hızlı Maya Identification Panel (RYI) inin değerlendirilmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. RYI paneli maya izolatlarının identifikasyonu için kullanılan 4

saatlik bir mikrodilüsyon sistemidir. RYI panel teşhisleri, API 20C sistem ve geleneksel metodlarla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Geleneksel testler, API20C sistem ve RYI panel arasındaki ayrılıklar konusunda karar vermek amacıyla kullanılmıştır. Bu testler, Mısırunu Tween80 agarda mikroskopik görünüm, karbonhidrat fermentasyon testleri ve nitrat testi, fenol oksidaz, üreaz, sikloheksimide duyarlılık testleri, 37 yada 42°C'de gelişim ve germ tübe testidir. Araştırmada kullanılan 357 izolat 11 cins ve 30 türe ait olarak bulunmuştur. Ve RYI panelin çok kısa bir zamanda sonuç vermesi nedeniyle klinik maya izolatlarının identifikasyonunda güvenilirlik ve zaman açısından uygun bir sistem olduğu belirtilmiştir.

Jordano ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları araştırmada İspanya'da ticari olarak üretilen kültür sütlerindeki maya kontaminasyonunu incelemeyi amaçlamışlardır. 50 örneğin 35'inde maya kontaminasyonu görülmüştür. Teşhis edilen tek maya türü *Torulopsis candida* olarak bulunmuştur.

Sandven 1990 yılında yaptığı araştırmada mayaların adlandırılmasında izlenen prosedürleri ve uygulanan testleri açıklamıştır. Araştırmada mayaların identifikasyonunun morfolojik ve biyokimyasal reaksiyonlara bağlı olduğu belirtilmiştir. Mayaların primer izolasyon ortamı olarak Sabouraud Dextrose Agarın (SAB) kullanımı, *Candida albicans*'ın teşhisinde kullanılan Germ tube testi, Mısırunu-Tween 80 agarda mikroskopik morfolojinin incelenmesi, karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri, Nitrat asimilasyonu, Üreaz testi, 37°C'de üreme, sıvı ortamda zar oluşumu ve sikloheksimide dirençlilik bakımlarından değerlendirilmeleri açıklanmıştır.

Rohm ve Lechner 1990 yılında yaptıkları çalışmada mayaların identifikasyonu için basitleştirilmiş bir metodun güvenilirliği ve değerlendirmesini araştırmışlardır. Kültür edilmiş süt ürünlerinden izole edilen 382 maya suşu, Deak ve Beuchat tarafından tanımlanan basitleştirilmiş bir

identifikasyon anahtarı ve Barnett ve arkadaşları tarafından tanımlanan computer metodu kullanılarak adlandırılmıştır. Basitleştirilmiş anahtar, identifikasyon sonuçlarıyla zayıf bir uyum göstermesi ile tür çeşitliliğini sağlamada yetersiz bulunmuştur. Araştırmada basitleştirilmiş anahtarın, yalnızca pratik sonuçlar verdiğine ve bu identifikasyon metodunun yeterli olmadığına işaret edilmiştir.

Carrasco ve Mendoza'nın 1989 yılında yaptıkları araştırmada *Candida* cinsine ait *Candida famata* süt ürünlerinden en sıklıkla izole edilen tür olarak bulunmuştur. İzole edilen diğer bazı önemli cinsler ise *Schizasacchoromyces*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces* ve *Kluvyeromyces* olarak tespit edilmiştir.

Machota ve arkadaşları 1987 yılında yaptıkları çalışmada çiğ sütlerdeki maya florasını araştırmışlardır. Madrid süt kooperatifi tanklarından toplanan 103 örneğin Ringer Solüsyonunda desimal dilüsyonları yapılarak, Malt ekstrakt agar ve SDA agar besiyerlerine inokülasyonları gerçekleştirilmiştir. Mayalar her iki kültür ortamında da dört mevsim boyunca çok yüksek yüzdelere belirmişlerdir. Araştırmada mantarların yanısıra mastitislere sebep olan *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon* ve *Cryptococcus* cinsine ait mayalar da izole edilmiştir.

Fleet ve Mian, 1987 yılında yaptıkları araştırmada perakende süt ürünlerinden alınan 161 örnekten mayaların izolasyonu ve dağılımlarını çalışmışlardır. En fazla maya populasyonu, yoğurt ve peynir örneklerinde bulunmuştur. Bu oran pastörize süt, krema, tereyağı ve dondurmada daha düşük miktarlarda bulunmuştur. *Candida famata*, *Kluvyeromyces marxianus*, *Cryptococcus diffluens* ve *Rhodotorula glutinis* en sıklıkla izole edilen türlerdir. Bu türlerin gelişimi ve baskınlığının protein ve yağları hidrolize eden enzimleri ile ilgili olabildiği ve bunların 5°C'de gelişebilme yeteneklerinin

bulunduğu belirtilmiştir.

Banks ve Board 1987 yılında yaptıkları çalışmada 101 süt örneğinden % 69 oranında küf ve maya izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmada en sıklıkla izole edilen maya türleri *Candida* cinsine ait olarak bulunmuştur. Bu cinsi *Debaryomyces*, *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türleri izlemektedir.

Engel, 1986 yılında çiğ sütlerde bulunan mayaları araştırmıştır. İzolasyonlar, Yeast-ekstrakt-kloramfenikol (YGC) agara yapılmıştır. Tampon çözelti olarak Ringer solüsyonu kullanılmış; ekimler 25-27°C'de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testlerde Lodder ve Kreger -Van-Rij'in kriterleri esas alınmıştır. Araştırma sonucunda 128 örneğin tamamında mayalara rastlanmıştır. *Candida curvata* çiğ süttten en sıklıkla izole edilen türdür. Bu türü *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida famata* türleri izlemektedir. İzole edilen diğerk türler *Candida glabrosa*, *Pichia membrifaciens*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Candida guilliermondii*, *Candida ingens*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida sake*, *Candida lambica*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra* *Cryptococcus laurentii* olarak bulunmuştur.

Quadri ve arkadaşları 1986 yılında yaptıkları çalışmada mayaların identifikasyonunda kullanılan 5 farklı metodu çabukluk, pahalılık ve güvenilirlik açısından karşılaştırmışlardır. Araştırmada kullanılan yarı otomatik 3 ticari metod; Abbotts yeast identification system using MS-2 (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Irving/TEXAS) Uni-Yeast-Tek (Flow labs, Inc., Maclean, VA) ve API-20C (Analytyab Products, Inc, Plainwey/NY)dir. Kullanılan diğerk 2 geleneksel metod modifiye boya-plur plak oksanografik metod (Modified dye-plur plate auxanographic metod) ve hızlı tüp asimilasyon metodunu içermektedir. Çalışmada 242 kodlu klinik izolat kullanılmıştır. Bu

izolatlar *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* ve *Trichosporon* cinslerinin 20'ser türüne aittir. Bu çalışmada kullanılan testler, Wickerham fermentasyon ve asimilasyon ortamının kullanımı, Christensen üre agar ve germ tübe testi, mikroskopik morfoloji için Mısırunu- Tween 80 agar, 37°C'de üreme, sıvı besiyeri üzerinde zar oluşumu ve askospor oluşumu için yeast askospor agar kullanımını içermektedir. Kültürler SDA besiyerinde korunmuş ve kullanılan metodların değerlendirilmesinde bilinmeyen kodlar şeklinde kullanılmıştır. Sonuçlar, 24 saatte Abbott's yeast identification system using MS-2; 6-48 saatte hızlı tüp asimilasyon metodu ve 72 saatte diğer sistemlere uygunluk göstermiştir (Hızlı tüp asimilasyon metodu) ve (Modified dye-plur plate auxorographic metod)'u laboratuvar ve materyal masraflar, bakımından en ekonomik metodlardır.

Deak ve Beuchat, 1986 yılında yaptıkları araştırmada mayaların identifikasyonlarını çalışmışlardır. Araştırmacılar 215 maya türünün identifikasyon anahtarını vererek, basitleştirilmiş identifikasyon metodlarını tartışmışlardır.

Schmidt ve Lamberet, 1981 yılında sütlerden yapılan Camembert peynirlerinden 523 maya suşu izole etmişlerdir. Teşhis edilen 482 suşun, %33.8'i *Candida pseudotropicalis*; %13.9'u *Torulopsis candida*, %5.4'ü *Saccharomyces cerevisiae* ve %3.7'side *Saccharomyces rouxii* olarak bulunmuştur.

Wagner ve Meyrath 1974 yılında sayısal taksonomi yoluyla laktozu asimile eden mayaların identifikasyonlarını çalışmışlardır. Bu amaçla çeşitli süt ürünlerinden izole edilen ve laktozu asimile eden maya suşlarının büyük çoğunluğu *Kluyveromyces fragilis*, *Candida intermedia* ve *Trichosporon cutaneum* olarak bulunmuştur. İzole edilen diğer suşlar, *Torulopsis candida*, *Rhodotorula minuta* ve *Cryptococcus laurentii*'dir. Araştırmacılar, Avusturya

süt ürünlerinde *Candida intermedia* türünün yüksek oranda bulunmasına dikkat çekmişlerdir.

Fatichenti ve Farris 1973 yılında koyun sütlerinden maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyonlarını çalışmışlardır. Araştırmada glukoz-pepton-yeast-ekstrakt agar besiyeri kullanılmış ve toplam 141 suş izole edilmiştir. Bu mayaların yalnızca % 36.84'ünde spor oluşumu görülmüştür. Teşhis edilen türlerden yalnızca *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis* ve *Kluyveromyces lactis* laktozu fermente eden mayalar olarak bulunmuştur.

Son yıllarda maya ve maya benzeri mikroorganizmaların proteolitik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Özellikle maya proteinazlarının patojenitedeki önemleri, uygulanabilirlikleri, çeşitli pH ve ısı derecelerindeki aktiviteleri ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Karabıçak ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları araştırmada patojen *Candida* türlerinde salgısal asit proteinaz (SAP) varlığını araştırmışlardır. Araştırmada *Candida* türü mayaların SAP aktivitesi sığır serum albumini içeren katı besiyerinde incelenmiştir. İki aşamada gerçekleştirilen bu çalışmada ilk aşamada vajen, idrar, BOS gibi çeşitli klinik örneklerden izole edilen 108 *Candida* izolatının proteinaz aktivitesi saptanmıştır. Türler göre proteinaz aktivitelerinin dağılımları değerlendirildiğinde, *C.albicans*'da 57/73 (%73.9), *C.parapsilosis*'de 5/7, *C.tropicalis*'de 4/8, *C.glabrata*'da 2/11 oranında proteinaz aktivitesi gösterilmiştir. İkinci aşamada ise, klinik örneklerden patojen etken olarak izole edilen 73 *C.albicans* suşu ile sağlıklı bireylerin boğaz ve gaita örneklerinden normal flora elemanı olarak izole edilen 34 *C.albicans* suşunun proteinaz aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Klinik izolatlarda %73.9, kontrol grubunda ise %29.4 oranında proteinaz enzim aktivitesi gözlenmiş olup klinik izolatlardaki SAP aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı

bir şekilde yüksek bulunmuştur ($P<0,001$). Araştırmada klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* türlerinin SAP aktivitelerinin normal floradakilerden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmasının, proteinaz aktivitesinin patojenitedeki önemini destekler nitelikte olduğu belirtilmiştir.

Uzun ve arkadaşları, 1996 yılında *Candida albicans* suşlarının proteinaz enzim aktivitelerinin araştırılması üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu amaçla bez dermatitli bebeklerin deri sürüntülerinden izole edilen 26; kistik fibrozlu hastaların balgamlarından izole edilen 12 ve sağlıklı bireylerin boğaz salgılarından izole edilen 6 *C.albicans* suşunun proteinaz enzim aktivitesi sığır serum albumin agarda (pH 4,5) araştırılmıştır. 26 suşun 14'ü (++), 6'sı (+), 9'u (++) 12 suşun 9'u (++) biri (+), proteinaz enzim aktivitesi gösterirken, kontrol grubundan izole edilen 6 suşun sadece biri kuvvetli (++) proteinaz enzim aktivitesi göstermiştir. Çalışmada hasta grubundan izole edilen suşlar, kontrol grubuna oranla daha yüksek oranda proteinaz enzim aktivitesi göstermiş ve aradaki fark istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuçlara göre proteinaz enziminin *Candida albicans* suşlarında bir patojenite kriteri olabileceği belirtilmiştir.

Guerzoni ve arkadaşları, 1993 yılında yaptıkları araştırmada çeşitli mayaların fizyolojik özellikleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Araştırmada elde edilen 62 izolat proteolitik ve litik aktivite, gelişme ısısı, depolama toleransları, gibi çeşitli fizyolojik karakteristikler açısından tartışılmışlardır. *Yarrowia lipolytica* en güçlü proteolitik ve litik aktiviteyi gösterirken; *Deboryomyces hansenii* izolatları düşük ısı derecelerinde yüksek oranda gelişim göstermeleriyle karakterize edilmişlerdir.

Kobatake ve arkadaşları 1992 yılında yaptıkları araştırmada çeşitli proteolitik mayaların izolasyonunu çalışmışlardır. Bu amaçla 6 cinse ait, 103 maya kültürü izole edilmiş olup, bu cinsler *Candida*, *Cryptococcus*,

Debaryomyces, *Rhodotorula*, *Sterigmatocytes* ve *Trichosporon* olarak bulunmuştur. İzolatların proteolitik aktivitesi 0-42°C'ler arasında skim milk agar kullanılarak çalışılmıştır. Suşların tümü çeşitli derecelerde proteolitik aktivite göstermiştir. Özellikle *Candida lipolytica*, *Trichosporon pullulans* ve *Candida scottii* düşük sıcaklıklarda aktif türler olarak bulunmuştur. Test edilen 35 suş arasında 10°C'deki total uçucu bazik nitrojen değeri en yüksek olan maya *C.lipolytica*'dır. Bu türü *T.pullulans*, *T.cutaneum* ve *C.scottii* türleri izlemektedir.

Ibanez ve arkadaşları 1992 yılında yaptıkları araştırmada, proteolitik aktivite üzerine farklı nitrojen ve karbon kaynaklarının etkisini çalışmışlardır. Araştırmacılar, nitrojen kaynağının yapısında ya da kültür ortamında bulunan şekerlerin miktarında değişme olduğunda proteolitik aktivite düzeylerinde büyük bir farklılık olduğunu göstermişlerdir.

Lagace ve Bisson 1990 yılında maya asit proteinazları üzerine bir çalışma yapmışlardır. Proteinaz üretiminin tespiti için Sığır serum albümini içeren Malt-Yeast ekstrakt Pepton-glukoz (MYPG) agar ortamı kullanılmıştır. Çalışılan 12 maya suşunun 8'i çok güçlü proteolitik aktivite göstermiştir. Bu türler *Candida olea*, *Pichia pinus*, *Torulopsis magnoliae* 5126, *Cryptococcus flavus*, *Yarrowia lipolytica*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Kloeckera apiculata* ve *Torulopsis monosa* olarak bulunmuştur.

Coppola ve arkadaşları 1988'de sütlerde bulunan maya ve maya benzeri mikroorganizmaları araştırmışlardır. İzole edilen cinsler *Candida*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* ve *Brettanomyces* olarak bulunmuştur. Araştırmada proteolitik aktivite ve asiditenin sütün tipi ve sıcaklık farklılıklarından geniş bir biçimde etkilendiği belirtilmiştir.

Bilinski ve arkadaşları 1987 yılında maya ekstrasellüler proteinazlarının

biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri üzerine bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada 100'den fazla maya izolatu ekstrasellüler proteinaz aktivitelerinin belirlenebilmesi amacıyla skim milk agar ve Brewer's wort jelatin besiyerlerinde test edilmiştir. Skim milk agarda, inkübasyon sonucu oluşan şeffaf zonlar gözlenmiş; Brewer's wort jelatin kültürleri de inkübasyon sonrası sıvı hale gelip gelmemeleri bakımından incelenmişlerdir. Ekstrasellüler proteinaz aktivitesinin en sıklıkla görüldüğü türler *Saccharomyces* cinsine ait olarak bulunmuştur.

Fukal ve arkadaşları 1986 yılında maya proteinazlarının özellikleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Araştırmada asit pH'derecelerinde maya proteolitik aktivitelerinde artış olduğu belirlenmiştir.

Rüchel ve arkadaşları 1982 yılında yaptıkları araştırmada farklı *C.albicans* suşlarının proteinaz sekresyonlarının karşılaştırılması üzerine bir çalışma yapmışlardır. *C.albicans* izolatları tek bir nitrojen kaynağı olarak bovine serum albumin (BSA)'de geliştirilmiştir. *C.albicans* suşlarının proteinaz sekresyonlarını tespiti için Staib'in BSA besiyeri, Yeast ekstakt-BSA agar besiyeri ve Yeast Carbon Base-BSA agar (YCB-BSA) besiyerleri kullanılmıştır. Sonuçların karşılaştırılması, proteinaz sekresyonunun kültür durumları üzerine güçlü bir şekilde bağlı olduğunu göstermiştir. Bazal ortamda gelişim yalnızca birkaç suşun güçlü proteolizine izin vermiştir. Ortama Yeast ekstrakt eklenmesi ve vitamin eklenmiş Yeast Carbon Base ortamının kullanımı proteolitik suşların verimini artırmıştır.

Greg ve arkadaşları 1978 yılında yaptıkları araştırmada *C.albicans*'ın proteolitik aktivitesini çalışmışlardır. Proteinaz üretiminin tespiti için Remold ve arkadaşlarının modifiye bir ortamı kullanılmıştır. 1000 ml. su için, 100 mg. Yeast ekstrakt, 20 g Glukoz, 2g BSA, 500 mg MgSO₄ ve 1 g KH₂PO₄ kullanılarak hazırlana besiyerinin PH'sı 4'e ayarlanmış ve filtrasyon yoluyla

steril edilmiştir. Araştırmacılar bazal ortama yeast ekstrakt eklenmesinin *C.albicans* suşlarının proteinaz aktivitelerini artırdığını belirtmişlerdir.

Saz ve arkadaşları 1977 yılında, mayalar yoluyla protein üretimi çalışmaları, izolasyon, identifikasyon ve etkili suşların seçimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çeşitli besin maddelerinden izole edilerek adlandırılan 90 maya suşu total nitrojen içeriği bakımından karşılaştırılmıştır. Maya suşlarının % total nitrojen içerikleri geniş olarak çeşitlilik göstermiştir. *Saccharomyces cerevisiae*, en yüksek total nitrojen (%10.86) içeriğini gösteren maya olarak bulunmuştur. Mayada yüksek nitrojen bulunmasının proteolitik aktiviteyi de artırdığı belirlenmiştir.

Lazarus ve Kaburger 1973 yılında yaptıkları araştırmada çeşitli proteolitik mayaların identifikasyonlarını çalışmışlardır. Araştırmada izole edilen 41 proteolitik mayanın identifikasyonu için %4 jelatin içeren standart plate-count-antibiyotik agar ortamında izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. İzole edilen proteolitik mayalar *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Bullera* ve *Sporobolomyces* cinslerine ait olarak bulunmuştur. Bunların metabolizmaların fermentatif değil, oksidatif olduğu ve sütlerdeki protein fraksiyonlarını hidrolize edebildikleri belirtilmiştir.

Patel ve arkadaşları 1972 yılında yaptıkları araştırmada süttten üretilen ısıya stabil bir mikrobial proteolitik enzim çalışması yapmışlardır. Bu amaçla pastörize bir süt örneğinden izole edilen ve psikrotrofik bir maya olan bir *Rhodotorula* türü skim milk agara inoküle edilmiştir. Skim milk agarda tespit edilen proteolitik enzim aktivitesi, kültür sütleri için normal pH değerlerinde normal olarak bulunmuştur (pH 4.8-5.2). Fakat pH 6.5-6.7'de geniş bir aktivite bulunduğu tespit edilmiştir. pH 7.2'de maximum aktivite bulunmuştur. Enzim 20°C'de en aktif olarak bulunmuştur, 5-7°C'de de önemli derecede aktivite göstermiştir. Enzim, 80°C'de 10 dakikada ısıtıldıktan sonra aktivitenin %25'i

kalmaktadır. Tamamen inaktivasyon için 20 dakika kaynama gerektiğinden, UHT işleminde enzimin yaşamasının mümkün olduğuna dikkat çekilmiştir.

Keay ve arkadaşları 1972 yılında mikrobial proteinazların izolasyon ve üretimleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Mikrobial proteinazların çeşitli pH oranlarındaki aktiviteleri temel alınarak 3 gruba ayrıldığı belirtilmiştir. Buna göre, birinci gruptaki asit proteinazlar mantar orijinlidir, pH 2-5 arasında maksimum aktivite gösterirler. Asit proteinazlar hayvanlarda bulunan rennin ve pepsin ile benzerlik göstererek, pepsin-benzeri ve rennin benzeri asit proteinazlar olarak 2 alt gruba ayrılır. Rennin benzeri enzimler daha çok sütü pıhtılaştırma özellikleri ile belgindirler. İkinci gruptaki nötral proteazlar hem mantar hem de bakterilerde geniş bir yayılım gösterirler. pH 7-8 arasında maksimum aktivite gösterirler, besin endüstrisinde kullanılırlar. Üçüncü gruptaki alkaline proteazlar da hem bakteri, hem de mantarlarda geniş bir yayılım gösterirler ve hayvanlarda bulunan tripsin ve kimotripsin ile benzerlik gösterirler. pH 5-9 arasında maksimum aktivite gösterirler. Deterjanlarda, besin ve deri endüstrisinde kullanılmaktadır.

MAYALAR

Mayalar, *Eumycetes* alt bölümünde, klorofil içermeyen, gerçek mantar olan, tek hücreli ve ökaryotik, gram pozitif mikroorganizmalardır. Yuvarlak, elipsoid, silindirik, yada köşeli yapıya sahip şekillerde bulunan mayaların büyüklükleri cinslerine göre değişmekle beraber genellikle 2-8 μ çapında ve 3-15 μ uzunluğundadır. Bazı türlerde bu uzunluk 100 μ 'u bulmaktadır (Çetin, 1983).

Mayalar, bakterilerden genellikle daha büyük ve nükleuslarının daha belirgin bulunması ile ayırdedilmektedir. Küflerden ise miselyum içermemeleri ile ayrılırlar. Ancak, bazı mayalar gerçek miselyum oluşturabildiklerinden maya benzeri olarak adlandırılırlar. Ökaryot olan maya hücresinin çevresinde yarı geçirgen bir hücre duvarı ve protoplastında stoplazma zarı, stoplazma, çekirdek, vakuoller, sentrozom, mitokondri ve metakromatik cisimler bulunur. Hücre hacminin %40'ını hücre duvarı teşkil etmekte olup, kalınlığı 1-2 μ arasında değişmektedir. Mayalar genellikle geniş bir pH sınırı içinde üreyebilmektedir. Bazı mayalar pH 3 olan asit ortamda ürediği gibi pH 7.5 olan alkali ortamda da üreyen mayalar bulunmaktadır. Fakat genel olarak optimum 4.5-5.0 pH derecesinde ürerler. Mayalar 47°C'nin üzerinde faaliyet gösteremedikleri gibi, 0°C'de de üreyemezler. Optimum üreme ısıları 25-37°C arasındadır. Sıcaklığın yükselmesi toksik metabolik artıkların fazlalaşmasına ve bu nedenle mayaların gereği gibi üremesine engel olmaktadır. Maya sporları, vegetatif hücrelere nazaran daha düşük ve daha yüksek sıcaklıklara karşı çok dayanıklıdır (Köşker, 1980).

Mayalar genel olarak %70 su ve %30 kuru madde ihtiva etmektedir. Kuru maddenin %50'sini azotsuz ve %45 kadarını azotlu ve %5'ini de madensel maddeler teşkil eder. Azotlu maddelerin %90'nını yüksek moleküllü

protein ve geri kalanını da küçük molekülü azotlu maddeler oluşturmaktadır. Maya proteinleri fosfoprotein, albumin ve nükleoproteinlerden oluşur. Bileşimlerinde bulunan karbonhidratların en önemlilerini glikojen ve hayvansal nişasta teşkil eder. İyi beslenen mayalarda %20-30 oranında yağ da mevcuttur (Köşker, 1980).

Mayalar anaerobik şartlarda alkol ve karbondioksit meydana getirmekte; aerobik şartlarda ise karbondioksit ve su oluşturmaktadırlar. Aerobik şartlarda, anaerobik şartlara oranla daha çabuk ürer ve daha fazla hücre meydana getirirler. Mayaların üremeleri üzerine nem ve ortam konsantrasyonunda etkisi bulunmaktadır. Kültür mayaları %20-25 oranındaki şeker konsantrasyonunda faaliyet gösterirler. Konsantrasyonun artışı maya faaliyetinin azalmasına sebep olur. Bu konsantrasyon %50'ye ulaştığında genellikle plazmoliz olayı kendini göstermekte ve faaliyet durmaktadır. Mayaların üremesi üzerine fermentasyon sırasında meydana gelen metabolizma ürünlerinin de etkisi bulunmaktadır. %2 alkol maya çoğalmasına etki eder ve konsantrasyonun %10'a erişmesi ile çoğalma durur. Sıcaklık, alkolün maya üzerine etkisini artırır. Fermentasyon sırasında meydana gelen karbondioksitin etkisi ise yok denecek kadar azdır (Köşker, 1980).

Mayalar beslenmeleri için gerekli birçok enzimleri ihtiva etmektedir. Bunlar karbonhidratları parçalayan (Glikojenaz, laktaz, sakkaraz, maltaz vb) ile yağları parçalayan (lipaz) ve proteinleri parçalayan (proteinaz) enzimlerini kapsamaktadır (Köşker, 1980).

Mayalar kendileri için gerekli olan azotu, proteinlerin hidroliz ürünlerinden sağlarlar. Maya proteinazları polipeptit zincirleri içindeki peptit bağlarını parçalarlar. Mayaların erimiş protein meydana getirme gücü ortamın asitliği ile ilgilidir. Çoğu enzimlerin tersine proteinazlar belirli proteinlere spesifik olmayıp peptit zincirinin belirli yapı biçimlerine spesifiktirler.

Örneğin pepsin, tripsin tarafından tüm proteinlere saldırılır (Karlson, 1992).

Proteolitik enzimler dört grupta incelenmektedir; asit proteinazlar, serin proteinazlar, sülfidril proteinazlar ve metal içeren proteinazlar (İnal, 1990).

Asit proteinazlar, optimum pH değerleri düşük olan enzimler grubudur. Pepsin, rennin, mikrobial ve fungal proteinazların büyük bir kısmı bu gruptadır. Rennin, dana midesinin bir ekstraktıdır ve peynir yapımında koagüle edici ajan yerine rennin ve pepsin karışımı veya mikrobial proteinazlar kullanılmaktadır. Renninin optimum pH'sı 3.5 olmakla beraber pH 5'te en kararlı formdadır. Buzağılar daha büyüdüklerinde ve sütün yanında diğer besinleri de yemeye başladıklarında mideleri rennin yerine pepsin üretmeye başlar. Pepsinin optimum pH'sı 2'dir ve enzim pH 2-5 aralığında stabildir. Asit proteinazlar peynir yapımında rennin yerine kullanılmalarının yanı sıra, mavi peynirlerin olgunlaşma prosedürlerinde de önemli rol oynarlar (İnal, 1990).

Serin proteinazlar kimotripsin, tripsin, elastaz, trombin ve subtilisin'i kapsar. Ham endopeptidazlardır ve ince barsakta etki gösteren pankreatik enzimlerdir. Zimojen formda üretilir ve proteoliz ile aktif forma dönüşürler (İnal, 1990).

SH-Proteinazların çoğu bitkisel kaynaklıdır ve gıda sanayiinde yaygın olarak kullanılır. Papain, fisin ve bromelin gibi çoğu önemli enzimler bu gruptadır. Etin yumuşatılması, biranın soğuğa dayanıklılığı ve stabilizasyonu gibi ticari alanlarda kullanılır (İnal, 1990).

Metal içeren proteinazlar aktiviteleri için bir metale gereksinim duyarlar ve metallerle şelat yapan bileşikler tarafından inhibe edilirler (İnal, 1990).

Proteolitik enzimler gıda sanayiinde büyük önem taşırlar ve besin işleme proseslerinde kullanım alanı bulurlar (İnal, 1990).

Mayalar proteolitik enzimlerin yanı sıra vitamin bakımından da zengin olup, B kompleks vitaminleri ile birlikte nikotinik asit, peptotenik asit, folik asit, E vitamini, biotin, inositol, provitamin a-c vitaminlerini de ihtiva ederler (Köşker, 1980).

Mayalarda üreme, bölünme, tomurcuklanma, sporlanma yada kopulasyon yolu ile olabilmektedir (Köşker, 1980).

Bölünme suretiyle çoğalmada hücre belli bir büyüklüğe erişince hafifçe uzamakta ve ortasından içeriye doğru bir girinti oluşmaktadır. Sonradan bu girinti yeri hücre duvarı şekline dönüşerek maya ikiye bölünmektedir. Çoğalmanın çok hızlı olması halinde hücreler birbirinden ayrılmayarak miselyum veya hücre zincirleri şeklini almaktadır. Böyle zincir yapan hücreler sonradan birbirlerinden ayrılırlar. Örneğin, *Schizosaccharomyces* cinsine ait mayalar bölünme suretiyle çoğalırlar (Köşker, 1980).

Tomurcuklanma suretiyle çoğalmada, ana hücrenin uç tarafında önce bir şişkinlik meydana gelir ve bu şişkinlik büyüyerek bir tomurcuk halini alır. Bu sırada yavru hücre ile ana hücre arasında bir kanal mevcuttur. Yavru hücre, ana hücrenin büyüklüğüne erişince bu kanal bir duvarla kaplanmakta ve böylece yeni bir hücre meydana gelmektedir. Tomurcuklanma ana hücrenin bir ucunda olduğu gibi her iki ucunda da oluşabilmektedir ve buna bipolar tomurcuklanma adı verilir. *Cryptococcaceae* familyasına ait mayalar tomurcuklanma yoluyla çoğalırlar (Lodder and Kreger-Van Rij, 1967; Köşker, 1980; Çetin, 1983).

Sporla çoğalmada önce maya hücresinin çekirdeğinde bölünmeler olmakta ve sonrada bölünen çekirdeklerin etrafındaki protoplazma yoğunlaşarak spora dönüşmektedir. Böylece oluşan sporlar hücre içinde kalmaktadır. Sporların içinde bulunduğu bu hücreye Ask (askus) ve sporlara da

Askospor adı verilmekte ve her askus içinde 1-8 spor bulunabilmektedir. Sporlar elverişli bir ortamda bulunduklarında ise çimlenmekte ve vegetatif hücre haline geçmekte ve böylece hücre tomurcuklanma suretiyle çoğalmaktadır. Örneğin, *Saccharomyces* cinsi mayalar tomurcuklanma suretiyle çoğaldıkları gibi sporlarda çoğalmaktadır (Lodder and Kreger, Van-Rij, 1967; Köşker, 1980; and Kreger, Van-Rij, 1967).

Kopulasyon ile çoğalmada iki hücre yanyana gelip, birbirleriyle temas ettikten sonra arada bir kanal oluşmakta ve bu şekildeki iki hücreye gamet adı verilmektedir. Gamet sonradan askus haline gelenek askosporlar teşekkül etmekte ve bundan da elverişli şartlarda vegetatif hücreler meydana gelmektedir (Köşker, 1980).

Seksüel kopulasyon; izogamik, heterogamik, intermedier ve askospor kopulasyonu olmak üzere 4 farklı şekilde gerçekleşebilmektedir (Köşker, 1980).

İzogamik kopulasyon birbirine benzeyen iki gamet arasında oluşur. Koloni içindeki iki hücrenin birbirleri ile teması sonucu aradaki duvar kalkmakta ve bir kopulasyon kanalı oluşmaktadır. Bu iki hücrenin içeriği birbirlerine karışarak tek bir hücre ve zigospor oluşmaktadır. Daha sonra nükleolus parçalanmakta ve her parçanın etrafını çeviren protoplazma koyulaşarak hücre duvarı meydana gelmektedir. Böylece bir zigospor, ascus halini alır (Köşker, 1980).

Heterogomik kopulasyon, birbirine benzemeyen iki gametin füzyonu yani iki hücre içeriğinin birbirine karışarak erimesi ile oluşur. Burada askus bir ana, bir de yavru hücreden meydana gelmektedir. Ancak yavru hücre içinde yeteri kadar yer bulunmadığından sporlar ana hücrede teşekkül eder. Yavru hücre erkek hücre olup, içeriği ana hücreye geçerek karışmaktadır (Köşker,

1980).

Askospor kopulasyonunda, askus içinde meydana gelen askosporlar arasında izogamik bir kopulasyon meydana gelir. 4 spor ihtiva eden bir askusta 2 spor birleşince arada bir kopulasyon kanalı oluşmakta ve nükleer materyal birbiri ile karışınca zigospor oluşmaktadır. Bu zigospor bir tüp halinde uzar, buna çimlenme borusu yada tüpü denir (Köşker, 1980).

Mayalar morfolojik, kültürel, ve biyokimyasal özellikleri gözönünde tutularak sınıflandırılmakta olup, 3 ana grupta incelenmektedir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Deak and Beuchat, 1986).

I. Ascosporeogenous Mayalar, yani aski ve askospor formundaki mayalar. Bu mayalar *Endomycetaceae* familyasında gruplandırılmaktadır. (Lodder and Kreger-Van-Rij 1967; Deak and Beuchat, 1986).

Endomycetaceae familyasında bulunan cinsler:

- | | |
|-------------------------------|----------------------------|
| 1. <i>Eremascus</i> | 9. <i>Hansenula</i> |
| 2. <i>Schizosaccharomyces</i> | 10. <i>Pichia</i> |
| 3. <i>Endomyces</i> | 11. <i>Debaryomyces</i> |
| 4. <i>Monosporella</i> | 12. <i>Saccharomyces</i> |
| 5. <i>Nematospora</i> | 13. <i>Schwanniomyces</i> |
| 6. <i>Coccidiascus</i> | 14. <i>Hanseniaspora</i> |
| 7. <i>Endomycopsis</i> | 15. <i>Saccharomycodes</i> |
| 8. <i>Lipomyces</i> | 16. <i>Nadsonia</i> |

II. Sterigmatadan kaynaklanan ve salgı bırakılması yoluyla dışarı verilen ballistospor formundaki mayalar. Bu mayalar *Sporobolomycetaceae* familyasında gruplandırılmaktadır. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Deak and Beuchat, 1986).

***Sporobolomycetaceae* familyasında bulunan cinsler**

1. *Sporobolomyces*
2. *Bullera*

III. Askospor ve ballistospor oluşturmayan ascosporogenous mayalar: Bu mayalar da *Cryptococcaceae* familyasında gruplandırılırlar. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Deak and Beuchat, 1986).

***Cryptococcaceae* familyasında bulunan cinsler:**

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1. <i>Trichosporon</i> | 6. <i>Pityrosporum</i> |
| 2. <i>Candida</i> | 7. <i>Brettanomyces</i> |
| 3. <i>Rhodotorula</i> | 8. <i>Cryptococcus</i> |
| 4. <i>Kloeckera</i> | 9. <i>Torulopsis</i> |
| 5. <i>Trigonopsis</i> | |

***Endomycetaceae* Familyası**

Bu familyaya dahil olan bütün mayalar askospor oluşturdıklarından ascomycetes sınıfına dahildirler. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Saccharomyces

Bu cinsin hücreleri çeşitli şekillerde olup, vegetatif üreme multilateral tomurcuklanma yoluyla olur. Pseudomiselyum oluşumu görülebilir. Sporlar genellikle yuvarlak, oval, bazen şapka şeklinde, köşeli yada böbrek biçimindedir. Genellikle her askusta 1-4 askus bulunur, spor kanjugasyonu olabilmektedir. Sıvı ortamların yüzeyinde yüzük halkası biçiminde zar oluştururlar. Eğer ince bir zar oluşumu varsa kuru ve donuktur. Şekerleri kuvvetle fermente ederler. Nitratı asimile etmezler. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967). *Saccharomyces* türlerinin yaygın yerleşim bölgeleri solunum sekresyonları, idrar, gastrik sıvılar, kan, vajina, deri, orofarinks, transtrakeal aspirasyon ve dışkıdır. Endokarditlere, nadir olarak akciğer enfeksiyonları ve

fungemiye sebep olurlar. (Lodder and Kreger-Van-Rij 1967; Cooper and Silva-Hutner, 1985). *Saccharomyces* cinsi kronolojik sıralamada varyetesiyle beraber 30 türü kapsamaktadır. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967)

Saccharomyces cerevisiae

S.cerevisiae* var. *ellipsoideus

S.cerevisiae türü glikoz, maltoz, sükroz ve galaktozu fermente etmektedir (Tümbay, 1982).

Genellikle patojen olmayan bu türün bebeklerin ağızlarında görülen pamukçuk hastalığına, hayvanların ayaklarında, özellikle atların tırnağının iç kısmında görülen cerahatli hastalıklara ve vulvovajinitlere sebep oldukları rapor edilmektedir. *S.cerevisiae* endüstriyel mikrobiyolojide çok önemli bir tür olup, etil alkol üretimi, ekmekçilik ve fermentasyon endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Köşker, 1980).

Saccharomyces delbrueckii

S.delbrueckii* var. *mongolicus

Bu tür diğer *Saccharomyces* türlerinden yalnızca glikoz ve maltozu fermente etmesiyle ayırdedilir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

***Sporobolomycetaceae* familyası**

Bu familyadaki mayalar ballistospor formundadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Sporobolomyces

Sporobolomyces hücreleri küçük, oval veya uzunca olup, ballisto hücrelerdir. Vegetatif üreme tomurcuklanma yoluyla olur. Gerçek miselyum veya pseudomiselyum bulunabilir. Sporları asimetrik, böbrek veya orak

biçimindedir. Sıvı ortamda yüzeyde zar oluşumu görülmektedir. Metabolizma oksidatifdir. Vegetatif hücreler üzerinde tipik olarak böbrek yada orak biçiminde ballistosporlar gelişir. Sporları olgunlaştıklarında özel bir mekanizma ile dışarı çıkarılırlar. Uygun koşullarda bu sporlar ya normal maya hücreleri formuna gelişirler, yada tekrar sporların geliştiği aerial sterigmata formunda olurlar.

Kronolojik sıralamada bu cins 7 türü kapsamaktadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Köşker, 1980).

Sporobolomyces albo-rubescens

Hücreleri büyüktür ve uzun-ovalden, silindirik şekline doğru değişiklik gösterir. Bu türün boyu (4-7)x(11-20) μ 'dur. Nitratı kullanmaz. Glukoz, sükroz ve maltozu kuvvetli, galaktozu ise zayıf olarak asimile eder (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Cryptococcaceae familyası

Bu familyadaki mayalar "Fungi Imperfecti" adı verilen iyi teşekkül etmemiş funguslara dahil bulunmaktadır (Köşker, 1980).

Cryptococcus

Cryptococcus türleri oval, yuvarlak veya düzensiz şekillerde olup, 3,5-8 μ yada daha fazla çapta olan maya benzeri mantarlerdir. Tomurcuklanma gözlenir, nadiren pseudohif görülmektedir. Hücre duvarı hayli incedir. Hücreler mukopolisakkarit bir kapsülün bulunuşuyla karakterize edilir. Kolonileri krem, pembe, sarı, kahverengi renklerde olabilir. Bu cinsin bütün üyeleri üreaz pozitifdir. Şekerleri fermente etmez, ancak asimile ederler. Kolonileri tipik olarak mukoiddir, ancak zamanla daha donuk ve kuru olurlar

(Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Tümbay, 1982).

Yaygın yerleşim alanları solunum sekresyonları, deri, idrar ve gastrik sıvılardır. (Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Cryptococcus cinsi kronolojik sıralamada 17 tür kapsamaktadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Emmons et.al., 1977).

Cryptococcus laurentii

Ak veya yeşilimsi koloni yapmaktadır, Pseudohif gözlenmemektedir. 37°C'de üreyebilir ve siklohekzimitli ortamda gelişebilir. Yaygın yerleşim alanları solunum sekresyonları, serebrospinal sıvı, gastrik sıvılar ve deridir. Genellikle enfeksiyonlara sebep olmamaktadır. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Cryptococcus terreus

Krem rengi koloni yapmaktadır, pseudohif gözlenebilmektedir. 37°C'de üreyebilir ve siklohekzimidli ortamda gelişemez. Bu türün yaygın yerleşim alanları solunum sekresyonları, deri ve burundur, patojen değildir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Cryptococcus neoformans

Klinik mikrobiyolojide çok önemli bir patojen olan *C.neoformans*, krem rengi koloni yapmaktadır, kolonileri giderek kahverengiye dönüştürmektedir. Nadiren pseudohif gözlenebilir. 25°C ve 37°C'de ürer. Siklohekzimidli ortamda gelişim gösteremez. Bu tür 25µm çapında bir kapsül içermesiyle karakteristiktir (Tümbay, 1982; Taubman, 1992).

C.neoformans kriptokokkoz etkenidir. Bu maya solunum yolundan girer ve önce akciğerlere belirtisiz ve hafif bir bulaşma yapar. Bulaş ya

kendiliğinden geçer ya da kan yolu ile yayılarak santral sinir sistemine geçerek çoğu kez ölümcül olan beyin ve beyinzarı yangısı yapar. Bu tür ayrıca menenjit, fungemi ve endokarditlere neden olmaktadır (Tümbay, 1982).

Araştırmamızda bu tür izole edilmemiş olmakla beraber, klinik önemi nedeniyle burada yer verilmiştir.

Torulopsis

Bu cinsin hücreleri yuvarlak, oval yada nadiren ince uzun şekildedir. Üreme multilateral tomurcuklanma yoluyla olur. Pseudomiselyum genellikle gözlenmemektedir. Karotenoid yapısında pigmentler içermezler. Genellikle şekerleri fermente ederler. Sıvı ortamada bir tortu veya yüzük halkası biçimde, yada ince bir zar şeklinde üreme gözlenir. Yüzeyde zar varsa asla kuru, donuk ve sarılcı tipte değildir. Bu cinse dair birçok tür *Saccharomyces* türlerinin gelişmemiş şekilleri olarak kabul edilirler. Genellikle *T.glabrata* dışındaki türler patojen değildir. *Torulopsis* türleri özellikle karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri ile ayırdedilirler (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Toubman, 1992).

Torulopsis cinsi kronolojik sıralamada bir varyetesiyle birlikte 22 tür içermektedir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis etchellsii

Bu tür yalnızca glukoz ve maltozu fermente etmektedir, ancak glukozu kuvvetli, maltozu ise zayıf fermente eder (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis candida

Glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktozu fermente eder. Glukoz ve sükroz fermentasyonu zayıftır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis pinus

Şekerleri fermente etmez, yalnızca glukozu asimile eder. Hücreleri yuvarlak olup, kültür mukoz yapıdadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis aerea

Şekerleri fermente etmez. Glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktozu asimile eder. Nitrati kullanır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis famata

Şekerleri fermente etmemekle beraber, nadiren glikoz ve sükrozun çok zayıf fermentasyonu gözlenmektedir. Glukoz, maltoz, sükroz ve galaktozu asimile eder (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis stellata

Torulopsis stellata var. cambresieri

T.stellata, glukoz ve sükrozu fermente ve asimile eder. Hücreleri yuvarlak ve geniş olarak ovaldir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis versatilis

Bu tür glukoz, maltoz, sükroz ve galaktozu kuvvetli, laktozu ise çok zayıf olarak fermante eder (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis gropengiesseri

Glukoz ve sükrozu fermente eder. Glukoz, sükroz ve galaktozu asimile eder. Nitrati kullanmaz (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis sphaerica

Glukoz, sükroz, laktoz ve galaktozu fermente eder (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Torulopsis glabrata

T.glabrata yalnızca glukozu fermente ve asimile etmesiyle diğer *Torulopsis* türlerinden ayırđedilir. Torulopsidoz etkenidir. Akciğer enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve sepsis yapar (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Araştırmamızda bu tür izole edilmemiş olmakla beraber, klinik mikrobiyolojide çok önemli bir patojen olduğundan burada değinilmiştir.

Candida

Hücreleri çeşitli biçimlerde dir. Üreme multilateral tomurcuklanma yoluyla olur. Klamidospor bulunabilir, pseudomiselyum ve bazen gerçek miselyum içerebilmektedir. Blastosporlar, pseudohife türe özgü bir şekilde bağlanmaktadır. Sıvı ortamların yüzeyinde yüzük halkası biçiminde yada ince bir zar oluştururlar. Türlerin adlandırılabilimleri amacıyla karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testlerine ihtiyaç duyulur (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Töre vd, 1994).

Candida'lar boğaz, üst solunum yolları, gastrointestinal kanal ve vagende normal flora üyesi olarak bulunurlar. Herhangi bir nedenle bulundukları bölgede miktarları artarsa veya florasız bölgelere ulaşırlarsa hastalık oluşturabilirler. Çoğu *Candida* türü Kandidoz etkenidir. Kandidoz, akut yada kronik; yüzeyel yada yayılmış bir mikozis enfeksiyonudur.

Hastalığın en sıklıkla rastlanılan etiyolojik ajanı *C.albicans*'tır. Etken olan diğer türler *C.guilliermondii*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.pseudotropicalis*, *C.stellatoidea* ve *C.pseudotropicalis*'tir (Emmons et.al., 1977; Tümbay, 1982; Töre vd, 1994).

Candida cinsi kronolojik sıralamada 6 varyete ile 30 türü kapsamaktadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Candida albicans

C.albicans pseudohifler ve pseudohif boyunca blastospor kümeleri oluşturur. Pseudohiflerin terminal uçlarında kalın duvarlı, bir veya birkaç tane ve bu tür için tanı koydurucu klamidosporeler görülmektedir. *C.albicans* içinde steril serum bulunan tüplerde 37°C'de 2-3 saat bekletildiğinde, germ tüp oluşturmaktadır. Glukoz, maltoz, sükroz ve galaktozu fermente ve asimile eder (Tümbay, 1982).

Akciğer enfeksiyonları, vajinit, üriner alan enfeksiyonları, dermatit, fungemi, menenjit, osteomiyelit, peritonit, miyokardit, endokardit ve pamukçuk enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Candida guilliermondii

Az sayıda kısa pseudohif ve pseudohif boyunca küçük blastospor kümeleri gözlenmektedir. Glukoz, sükroz ve galaktozu fermente eder. Glukoz, maltoz, sükroz ve galaktozu asimile eder (Tümbay, 1982).

Endokardit, fungemi, dermatit, onkomikoz, osteomiyelit ve üriner alan enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Candida krusei

C.krusei pseudohif ve uzun blastosporlar oluşturmaktadır. Blastosporlar

"ağaca benzer" bir dizilim gösterirler. Yalnızca glukozu fermente ve asimile eder (Tümbay, 1982).

Endokardit, vajinit üriner sistem enfeksiyonları ve fungemiye sebep olmaktadır (Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Candida melinii

C.melinii ince bir yapıda pseudohif ve blastosporlar oluşturmaktadır. Hücreleri küçüktür. Glikoz, maltoz ve sükrozu çok zayıf olarak fermente eder. Ayrıca bu şekerleri asimile de etmektedir. Genellikle patojen değildir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Candida catenulata

Pseudohif ve blastosporlar gözlenir. Yalnızca glukoz ve galaktozu fermente ve asimile etmesi, ve sıvı ortamda yüzeyde ince bir zar oluşturmasıyla diğer *Candida* türlerinden ayrılır. Genellikle patojen değildir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Candida scottii

Pseudohifler ve pseudohif boyunca blastosporlar gözlenir. Şekerleri fermente etmez, bazen çok zayıf fermentasyon gözlenebilir. Glukoz, maltoz, sükroz ve galaktozu asimile eder. Genellikle patojen değildir. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Yukarıda değinilen *Candida* türleri dışında araştırmamızda izole edilmeyen, fakat klinik önemi bulunan *Candida*'lar aşağıda verilmiştir.

Candida tropicalis

Pseudohifler ve pseudohif boyunca tek tek veya ufak kümeler yapacak

biçimde dizilim gösteren blastosporlar oluşturmaktadır. Bazen az sayıda klamidospor yapar. Glukoz, maltoz, sükroz ve galaktozu fermente ve asimile eder. (Tümbay, 1982).

Akciğer enfeksiyonları, vajinit, pamukçuk, endokardit, peritonit, fungemi, menenjit ve osteomiyelitlere sebep olmaktadır (Tümbay, 1982; Cooper and Silva-Hutner, 1985)

Candida pseudotropicalis

Pseudohifler ve uzun blastosporlar oluşturmaktadır. Blastosporlar çoğunlukla pseudohiften ayrılıp birbirlerine koştur bir dizilim gösterirler ve bu görünüşleri ile "ırmakta yüzen kütük dizileri"ni andırırlar. Glukoz, sükroz, laktoz ve galaktozu fermente ve asimile ederler (Tümbay, 1982)

Vajinit, üriner alan enfeksiyonları ve fungemiye sebep olurlar (Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Candida parapsilosis

Pseudohif ve pseudohif boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler yapacak biçimde dizilmiş blastospor oluşturmaktadır. Çok önemli bir özelliği, arada iri hiflerin görülmesidir; bunlara "dev gözeler"de denir. Glikoz ve galaktozu fermente eder. Glukoz, maltoz, sükroz ve galaktozu asimile eder (Tümbay, 1982).

Endokardit, vajinit, eksternal otomikozis, fungemi, onkomikoz gibi enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Trichosporon

Hücreleri çeşitli şekillerde olup, klamidosporlara rastlanılabilmektedir. Bol miktarda yalancı ve gerçek misel ile blastospor ve artrospor

oluşturmalarıyla karakteristiktir. Blastosporlar küçük zincirler yada çelenk biçimindedir. Sıvı ortamda tortu yada yüzük halkası biçiminde zar oluşumu gözlenir. Kolonileri başlangıçta krem renkli olup, giderek grimsiye dönüşür. *Trichosporon* türleri laboratuvarlarda bulaşmalara sebep olurlar (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Tümbay, 1982).

Yaygın yerleşim alanları solunum sekresyonları, deri, orofarinks ve dışkıdır. Akciğer enfeksiyonları, piedra ve beyin apselerine sebep olurlar (Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Trichosporon cinsi kronolojik sıralamada 1 varyetesiyle beraber 8 türü kapsamaktadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Trichosporon cutaneum

T. cutaneum var. multisporum

T. cutaneum, pseudohifler ve pseudohif boyunca tek tek veya kısa zincirler biçiminde dizilimler gösteren blastosporlar ve artrosporlar oluşturmaktadır. Şekerleri fermente etmez. Glikoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktozu asimile eder. Nitrati kullanmamaktadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Tümbay, 1982).

Bu tür ak piedra etkenidir. Ak piedra, kıllarda yumuşak, ak düğümcükler yapan bir bulaştır. Çoğunlukla sakal ve bıyıkta, bazen saçta ve pubis kullarında da görülebilmektedir (Tümbay, 1982).

Trichosporon capitatum

Miselyumları iyi gelişmiş olup, blastospor ve artrosporlar sıklıkla kümeler şeklindedir. Şekerleri fermente etmez. Glukozu kuvvetli, galaktozu ise zayıf bir şekilde asimile eder. Nitrati kullanmaz (Lodder and Kreger-Van-Rij,

1967).

Trichosporon sericeum

Miselyumlar genel olarak güçlü bir şekilde indirgenmiştir, blastospor ve artrosporlar kümeler oluşturmamaktadır. Şekerleri fermente etmez. Nitratı kullanmaz. Glukoz ve galaktozu asimile etmektedir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Trichosporon behrendii

Miselyumları iyi gelişmiştir. Glukoz ve sükrozu kuvvetli, galaktoz ve maltozu da zayıf bir şekilde fermente etmesiyle diğer *Trichosporon* türlerinden ayrılmaktadır. Nitratı kullanmamaktadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Rhodotorula

Hücreleri oval ve yuvarlak şekillerdedir. Üreme multilateral tomurcuklanma yoluyla olur. Pseudomiselyum gözlenebilir. Karotenoid yapısında kırmızı yada sarı pigment oluşumu gözlenmektedir. Bu cins şekerleri fermente etmez (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Yaygın yerleşim alanları solunum sekresyonları, idrar, gastrik sıvılar, kan, vajina, deri, orofarinks, dışkı, serebrospinal sıvı ve korneadır. Fungemi, endokardit ve mikotik keratitislere sebep olmaktadırlar (Cooper and Silva-Hutner, 1985).Kronolojik sıralamada bir varyete ile birlikte 7 türü kapsamaktadır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Rhodotorula flava

Bu tür glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktozu asimile eder ve nitratı kullanmaz (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).

Rhodotorula pallida

Bu tür yalnızca glukoz ve galaktozu asimile eder ve nitrati kullanmaz (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967).



2. MATERYAL VE METOD

Araştırmada 19.09.1995-08.04.1996 tarihleri arasında çeşitli süt işletmelerine gelen 90 çiğ süt örneği alınarak çalışılmıştır. Bu örneklerden 50 maya ve maya benzeri mikroorganizma izole edilerek adlandırılmıştır. Daha sonra bu mikroorganizmaların proteinaz enzim aktiviteleri iki farklı teknikle çalışılarak değerlendirilmiştir.

Araştırmada maya ve maya benzerlerinin çiğ sütlerden izolasyonu için SDA (Sabouraud Dextrose Agar- Oxoid CM 41) agar (Cooper and Silva-Hunter, 1985; Sandven, 1990) besiyeri kullanılmıştır. SDA besiyeri, hem kloramfenikol ve sikloheksimit antibiyotiklerini içerecek, hemde içermeyecek şekilde iki farklı biçimde hazırlanmıştır. SDA besiyerinde üreyen kolonilerden gram boyama yapılarak maya olup olmadıkları tespit edilmiştir. Maya kolonileri saf kültürlerinin elde edilebilmesi için tekrar SDA besiyerinde inkübe edilmişlerdir (Larone, 1976; Sandven, 1990).

Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların adlandırılabilmesi için ilk olarak germ tüp testi yapılmıştır. Germ tüp oluşturmayan maya izolatları, mikroskopik morfolojilerinin tayini ve klamidospore oluşumlarının gözlenmesi amacıyla %1 Tween 80 içeren Mısırunu Agar- Oxoid CM 103 besiyerine alınmışlardır. 24°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası maya kolonileri mikroskopik morfolojileri bakımından incelenmişlerdir. İzolatlar bu ortamda hif içerip içermemeleri bakımından sınıflandırılmış ve genellikle cins seviyesinde ayırdedilebilmişlerdir (Larone, 1976; Sandven, 1990).

Mikroorganizmalar daha sonra çeşitli şekerleri kullanma ve gaz oluşturma yeteneklerini test edilebilmesi amacıyla karbonhidrat fermentasyon besiyeri (Pruple Broth Base-Difco)'ne alınmışlardır. Bu amaçla glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktoz karbonhidratları kullanılmıştır (Larone,

1976; Chengappa et. al., 1983).

Maya izolatları daha sonra tek bir karbonhidrat substratında üreme yeteneklerinin belirlenebilmesi amacıyla karbonhidrat asimilasyon besiyeri (Modified Wickerham Medium Slants)'ne alınmışlardır. Bu amaçla glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır (Larone, 1976).

Araştırmada üreaz testi, potasyum nitrat testi, Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, askospor testi, sikloheksimitli ortamda gelişim testi, kırmızı-pembe pigmentasyon bulunuşu ve koloni görünimleri test edilerek tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir. (Chengappa et.al, 1983; Cooper and Silva-Hutner, 1985).

Adlandırması yapılan maya ve maya benzerlerinin proteinaz enzim aktiviteleri YCB-BSA (Yeast Carbon Base-Borine Serum Albumin) Agar (Rüchel, 1982; Karabıçak, 1996) ve Skim Milk Agar-Oxoid L31 (Larone, 1976; Bilinski et.al., 1986) besiyerlerinde test edilerek değerlendirilmiştir.

YCB-BSA agarda proteolitik aktivitenin test edilebilmesi amacıyla izolatlar ilk olarak YEPD (Yeast extract-Peptide-Dextrose) sıvı besiyerine alınmışlar ve 30°C'de 12 saat inkübasyona bırakılmışlardır. YCB-BSA agar plaklarına kağıt diskler (Whatman No: 17) yerleştirilmiş ve YEPD sıvı besiyerine inoküle edilen maya süspansiyonlarından otomatik pipetle 20µl miktarlarda disklere emdirilmiştir. Plaklar 30°C'de 6 gün inkübe edildikten sonra özel bir protein boyası olan Amidoblack (Merck) boyası ile boyanmışlardır. Boyama sonrası disklerin etrafındaki şeffaf alanlar incelenmiş ve proteolitik zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Disk etrafında şeffaf alan oluşmamışsa proteolitik aktivite negatif olarak belirtilmiştir (Rüchel, 1982; Karabıçak, 1996).

Araştırmada izolatların proteolitik aktivitelerinin test edildiği diğer bir metodda skim milk agar besiyeri kullanılmıştır. Skim milk agar besiyerine inoküle edilen izolatlar 37°C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. Ekimi yapılan bölge etrafındaki şeffaf alanlar belirlenerek, proteolitik zon çapları kaydedilmiştir. Şeffaf alan oluşmamışsa proteolitik aktivite negatif olarak belirtilmiştir (Bilinski et.al., 1986).

2.1. Çiğ Süt Örneklerinde Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

2.1.1. Örnek alma ve örneklerin analize hazırlanması

Araştırmada çiğ süt örnekleri Türk Standartları Enstitüsünde (TSE-1018) belirtilen esaslara göre 200 ml'lik steril şişelere alınmış ve analiz için direk laboratuvara getirilmiştir. Ringer Solüsyonu ¼-BR52 kullanılarak çiğ süt örneklerinin 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} 'lük desimal dilüsyonları hazırlanmıştır. İlk olarak Ringer solüsyonu -¼ steril tüplere 9'ar ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Çiğ süt örneğinden steril pipetle pipetaj yapılarak 1 ml alınmış ve 1 nolu tübe aktarılmıştır. Bu 10^{-1} desimal dilüsyondur. Bu tüpten de sırasıyla 10^{-2} ve 10^{-3} dilüsyonlar hazırlanmıştır. Çalışmada 10^{-3} dilüsyon sıvısından 0,1 ml alınmış ve besiyerlerine yayma şeklinde ekimler gerçekleştirilmiştir (Engel, 1986; Machota et.al., 1987).

2.1.2. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonu ve değerlendirilmesi

Araştırmada mikroorganizmaların izolasyonu için SDA besiyeri kullanılmıştır. SDA besiyeri hem kloramfenikol ve sikloheksimit katılmak suretiyle, hem de katılmaksızın hazırlanmıştır. Besiyerine katılan sikloheksimit saprofitik mantarların gelişimini inhibe ederken, ortama eklenen kloramfenikol bakterilerin üremesini engellemekte ve mayalar için zengin bir besiyeri ortamı oluşturmaktadır. Ancak bazı maya ve maya benzeri mikroorganizmalar bu

antibiyotiklerin eklenmesiyle inhibe olduklarından ortam siklohekzimit ve kloramfenikol içermeyecek şekilde de hazırlanmıştır (Larone, 1976; Sandven, 1990).

Her iki şekilde hazırlanan SDA besiyerlerine ekimleri yapılan çiğ süt örnekleri 25°C ve 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Besiyerinde üreyen kolonilerden gram boyama yapılarak maya olup olmadıklarına bakılmıştır. Saf kültürün elde edilebilmesi amacıyla üreyen maya kolonileri tekrar SDA besiyerine alınmışlardır (Larone, 1976; Sandven, 1990).

İzolatların adlandırılabilmesi amacıyla ilk olarak germ tube testi yapılmıştır. Bu test için gerekli steril insan serumu Gazi Üniversitesi Tıp Fak. Hematoloji Lab. ve D.D.Y. Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.'dan temin edilmiştir. Germ tube testi, steril bir tüpte bulunan 1ml steril insan serumu içine bir öze dolusu maya kolonisinin inoküle edilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyon 37°C'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra süspansiyonun bir damlası lam-lamel arası preparatla incelenmiştir. Germ tüp, maya hücresinden gelişen filamentöz bir üreme olup, bu test *Candida albicans* ve *C. stellatoideae* türlerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu iki tür de sükroz asimilasyon testiyle ayırdedilmiştir (Larone, 1976; Tümbay, 1982).

Daha sonra germ tüp oluşturmeyen maya izolatlarının Mısırunu-Tween 80 agara ekimleri yapılmıştır. Üzerlerine bir lamel kapatılarak 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılan maya kolonileri daha sonra düşük objektifli bir mikroskopla lamel kenarında oluşturdukları mikroskobik morfolojiler bakımından incelenmişlerdir. Agarla mikroskop objektifinin kontaminasyonunu önlemek lamel ile mümkün olmuştur. Ayrıca en güzel mikroskobik morfoloji lamel kenarında gözlenmektedir. Bu ortamda geliştirilen maya ve maya benzerleri hif, blastospor, klamidospore yada

artrospor varlığı için incelenmişlerdir. Eğer hif varsa, ilk önce bunun tomurcuklanma yoluyla oluşan hücre zincirleri olan pseudohif mi; yoksa hifin parçalanarak oluşturduğu artrosporlardan meydana gelen gerçek hif mi olduğu saptanmıştır. Pseudohif oluşumu gözlenmişse bunların düzenli aralıklarla olup olmadığına da bakılmıştır. Maya izolatları bu ortamda mikroskopik morfoloji temel alınarak genellikle cins seviyesinde sınıflandırılabilmiştir (Larone, 1976; Cooper and Silva-Hutner, 1985; Sandven, 1990).

İzolatlar daha sonra farklı karbonhidratlardan gaz oluşturma yeteneklerinin belirlenebilmesi amacıyla karbonhidrat fermentasyon testine tâbi tutulmuşlardır. Bu amaçla glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktoz karbonhidratları kullanılmıştır. Besiyerine inoküle edilen maya kolonileri 37°C'de 10-14 gün inkübe edilmişlerdir. Karbonhidrat fermentasyonu durham tüplerindeki gaz oluşum ile belirlenmiştir. Sarı renk ise asit oluşumunu göstermiştir (Sandven, 1990).

İzolatlar ayrıca tek bir karbonhidrat substratında üreme yeteneklerinin test edildiği karbonhidrat asimilasyon besiyerine inoküle edilmişlerdir. 25°C'de 7-14 gün inkübasyondan sonra mikroorganizmalar, bu ortamda gelişmeleri ve sarı renk oluşturmaları bakımından değerlendirilmişlerdir. (Larone, 1976).

Maya izolatları üreyi parçalama yeteneğine sahip olan üreaz enziminin varlığının belirlenebilmesi amacıyla üreaz testine tâbi tutulmuşlardır. Çalışmamızda üreaz üretim yeteneği Christensen's Urea Agar-Oxoid CM53 kullanılarak test edilmiştir. Besiyerine inoküle edilen izolatlar 25°C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sarı renkten, pembe yada kırmızıya değişim pozitif reaksiyon olarak tanımlanmıştır (Larone, 1976; Sandven, 1990).

Mayalar, nitrojen kaynağı olarak yalnızca nitrati kullanma yeteneklerinin test edilebilmesi amacıyla potasyum nitrat testine alınmışlardır.

Bu amaçla nitrat besiyeri içeren iki ayrı tübe inoküle edilen izolatlar 30°C'de 3-7 gün inkübe edilmişlerdir. Tüplerden biri kontrol amacıyla kullanılmış ve ekimden sonra parafinlerek kapatılmıştır. İnkübasyon sonrası parafinlenmemiş tübe belli oranlarda α -naphtylamine ve sulfanilic acid içeren asetik asitli solüsyonlardan damlatılmıştır. Tüpte koyu pembe-kırmızı renk görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Koneman, et.al.,1988).

Maya izolatları daha sonra sıvı ortamların yüzeyindeki zar oluşumlarının belirlenebilmesi amacıyla Bacto Sabouraud Dextrose Broth (Difco)'a alınmışlardır. Sıvı besiyerine inoküle edilen koloniler 37°C'de 48-72 saat inkübe edilerek, tübün yüzeyinde oluşturdukları zarlar bakımından değerlendirilmiştir (Larone, 1976; Sandven, 1990).

Çeşitli mayaların sikloheksimide karşı duyarlı yada dirençli olmaları da, çalışmamızda teşhise yardımcı bir özellik olarak kullanılmıştır. Bu amaçla SDA besiyerine belirli miktarlarda sikloheksimit ve kloramfenikol eklenmiştir. Besiyerine ekimleri yapılan maya kolonileri 25°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve bu ortamda gelişebilme yetenekleri test edilmiştir (Larone, 1976; Tümbay, 1982).

Rhodotorula ve *Sporobolomyces* cinsleri kırmızı yada pembe pigmentasyona sahip olduklarından, bu cinslerin ayırımında koloninin rengi çok önemli bir kriter olarak alınmıştır (Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).

Bazı maya türlerinde bulunan askospor oluşumunun test edilmesi amacıyla izolatlar Gorodkova Medium'a alınarak, 37°C'de 7-10 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası yapılan gram boyamada askuslar içinde 1-4 askospor gözlenmiştir. Blastosporlar, gram pozitif ve askosporlar gram negatif olarak görülmüştür (Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1988).

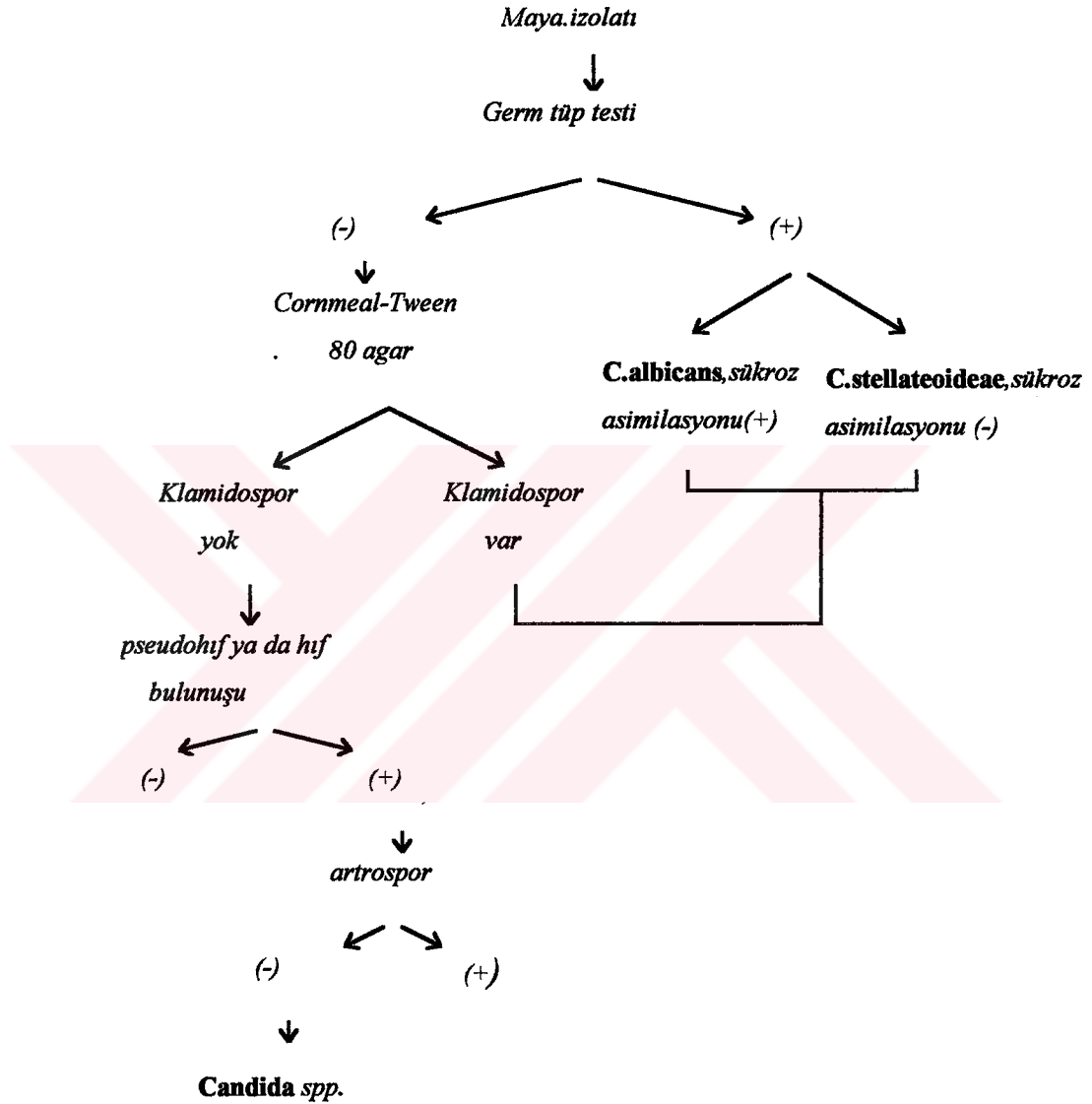
Yapılan tüm bu testler sonucunda maya izolatları adlandırılmıştır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982,.).

2.1.3. *Candida*'ların adlandırılması

Araştırmada izole edilen mikroorganizmalar ilk olarak Germ tüp testine tabi tutulmuşlardır. Germ tüp oluşturan maya izolatları ya *C.albicans* yada *C.stellatoideae* türlerine aittir. Bu iki tür birbirinden süktroz asimilasyon testiyle ayırdedilmişlerdir. *C.albicans* süktrozu asimile eder, *C.stellatoideae* etmez (Larone, 1976; Tümbay, 1982).

Germ tüp oluşturmeyen maya izolatları Mısırunu-Tween 80 agara alınarak, 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Mısırunu-Tween 80 agardaki üremede pseudohif ve blastospor gözlenmişse, bilinmeyen mayaların *Candida* cinsine ait olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca pseudohiflerin terminal uçlarında bulunan klamidospore oluşumları da *C.albicans* için ayırdedici bir kriter olarak incelenmiştir. *Candida* cinsine ait türlerin adlandırılabilirmeleri amacıyla karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri yapılmıştır. Karbonhidrat fermentasyon testleri için glukoz, maltoz, süktroz, laktoz ve galaktoz karbonhidratları; asimilasyon testleri içinde glikoz, maltoz, süktroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Ayrıca üreaz testi, Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, sikloheksimitli ortamda gelişim, nitrat ve askospor testleri de yapılarak *Candida*'lar adlandırılmışlardır (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982).

Çizelge 2.1.3.1.Araştırmada *Candida*'ların adlandırılmasında uygulanan testler

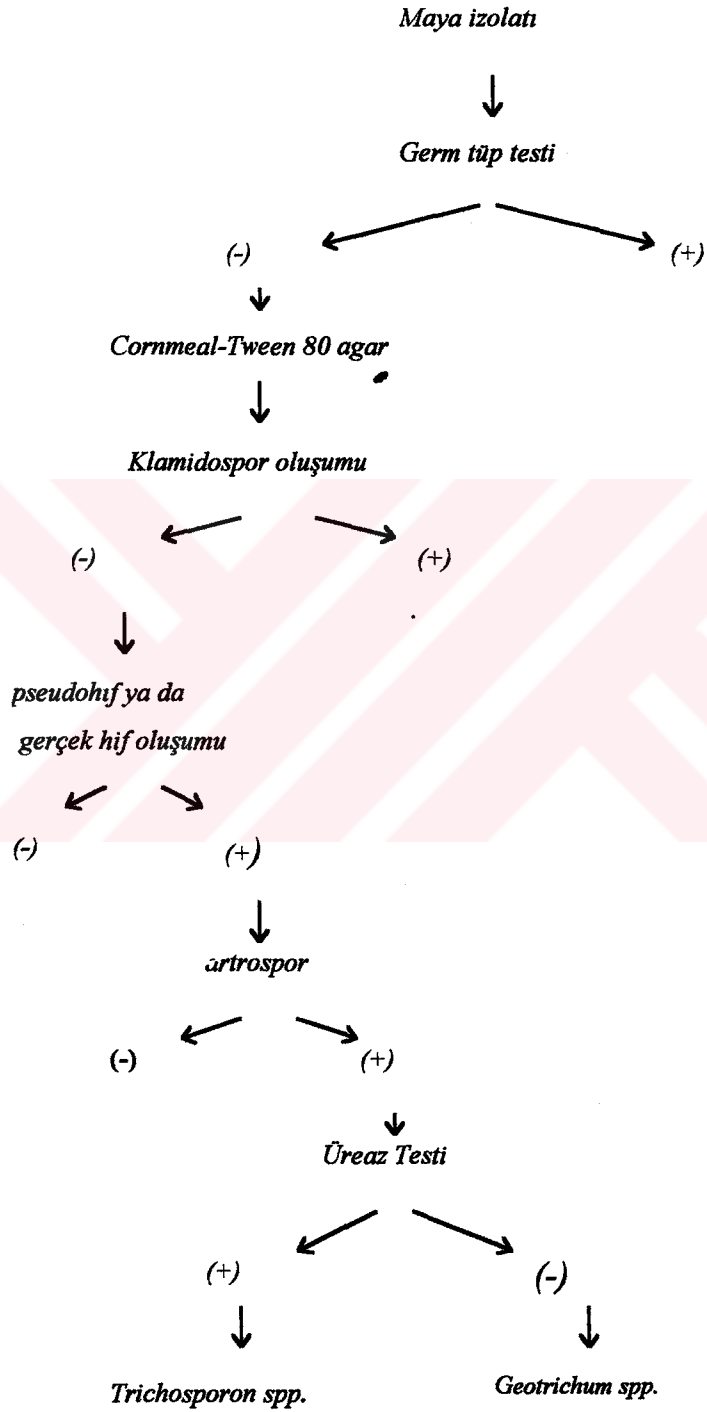


Candida türleri karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri, üreaz testi, sabouraud besiyeri zar oluşumu, nitrat testi, siklohekzimitli ortamda gelişim ve askospor testleri ile ayırd edilmişlerdir (Lodder, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).Yapılan testler sonucunda *Candida* cinsine ait *C.albicans*, *C.krusei*, *C.guilliermondii*, *C.melinii*, *C.scottii* ve *C.catenulata* türleri izole edilmiştir.

2.1.4. *Trichosporon*'ların adlandırılması

Germ tüp oluşturmayan maya izolatları, Mısırunu-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmış ve hif içerip içermemeleri bakımından incelenmişlerdir. Hif içeren mayaların blastospor ve artrospor oluşumları değerlendirilmiştir. Artrospor içeren mayalar ya *Trichosporon* yada *Geotrichum* cinslerine aittir. *Trichosporon*lar hif boyunca blastospor içermeleri ve üreaz (+) olmaları ile *Geotrichum* cinsinden ayırđedilmiřlerdir. Karbonhidrat fermentasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz; karbonhidrat asimilasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Ayrıca Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, sikloheksimitli ortamda gelişim, nitrat ve askospor testleri yapılarak *Trichosporon*'ların tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay 1982).

Çizelge 2.1.4.1.Araştırmada *Trichosporon*'ların
adlandırılmasında uygulanan testler



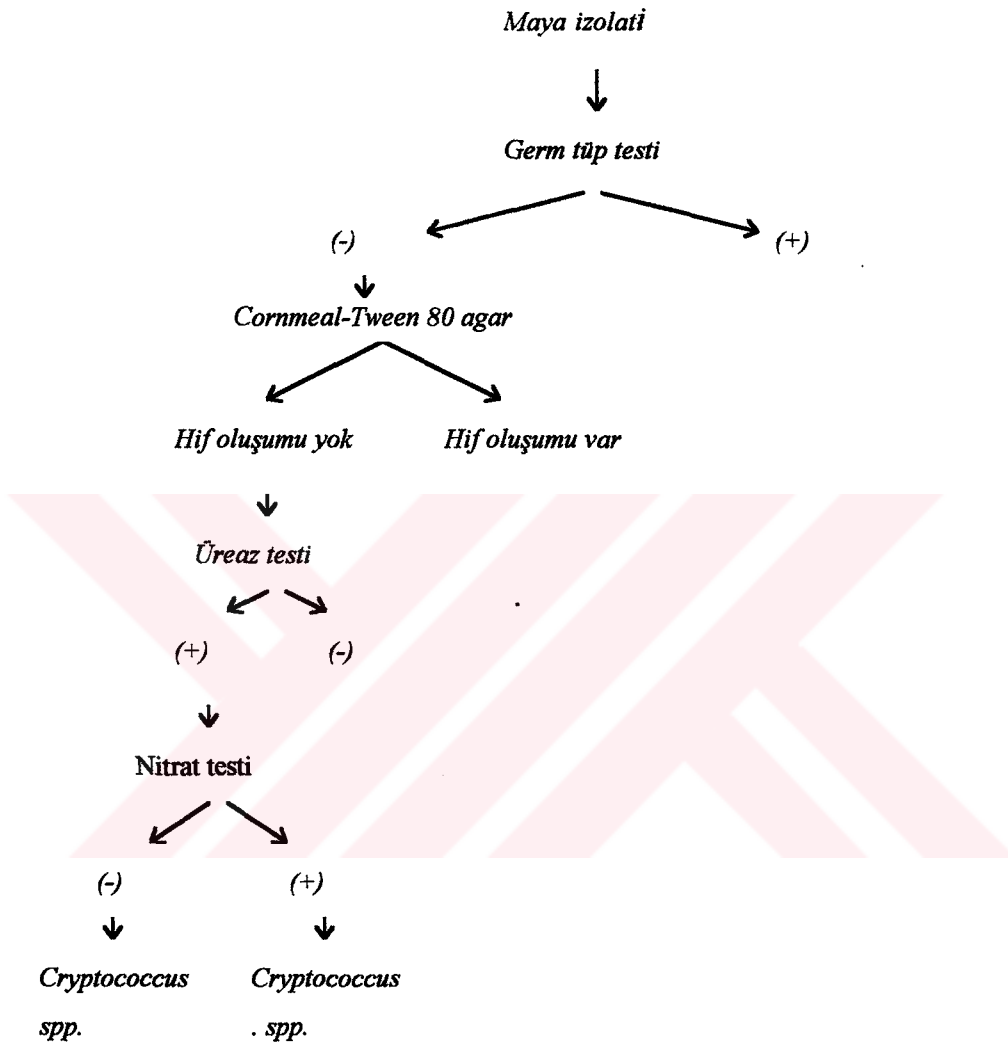
Trichosporon türleri karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri, üreaz testi, sabouraud besiyerinde zar oluşumu, nitrat testi, siklohekzimitli ortamda gelişim testi ve askospor testleri ile ayırdedilmişlerdir. Araştırmamızda *Geotrichum* cinsi izole edilmemiştir. (Lodder and Kreger-Van Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).

Yapılan testler sonucunda *T.cutaneum*, *T.behrendii*, *T.fermentans*, *T.sericeum*, *T.capitatum* türleri izole edilmiştir.

2.1.5. *Cryptococcus*'ların adlandırılması

Germ tüp oluşturmeyen maya izolatları Mısırunu-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra hif içerip içermemelerine göre değerlendirilmişlerdir. Hif içermeyen maya izolatları üreaz testine tabi tutulmuştur. Üreaz (+) maya izolatları nitrat testine alınmışlardır. Nitrat (-) ya da nitrat (+) olabilen *Cryptococcus*'ların karbonhidrat ve asimilasyon testleri yapılmıştır. Karbonhidrat asimilasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Ayrıca Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, siklohekzimitli ortamda gelişim ve askospor testleri de yapılarak *Cryptococcus*'ların tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir (Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).

Çizelge 2.1.5.1.Araştırmada *Cryptococcus*'ların adlandırılmasında uygulanan testler



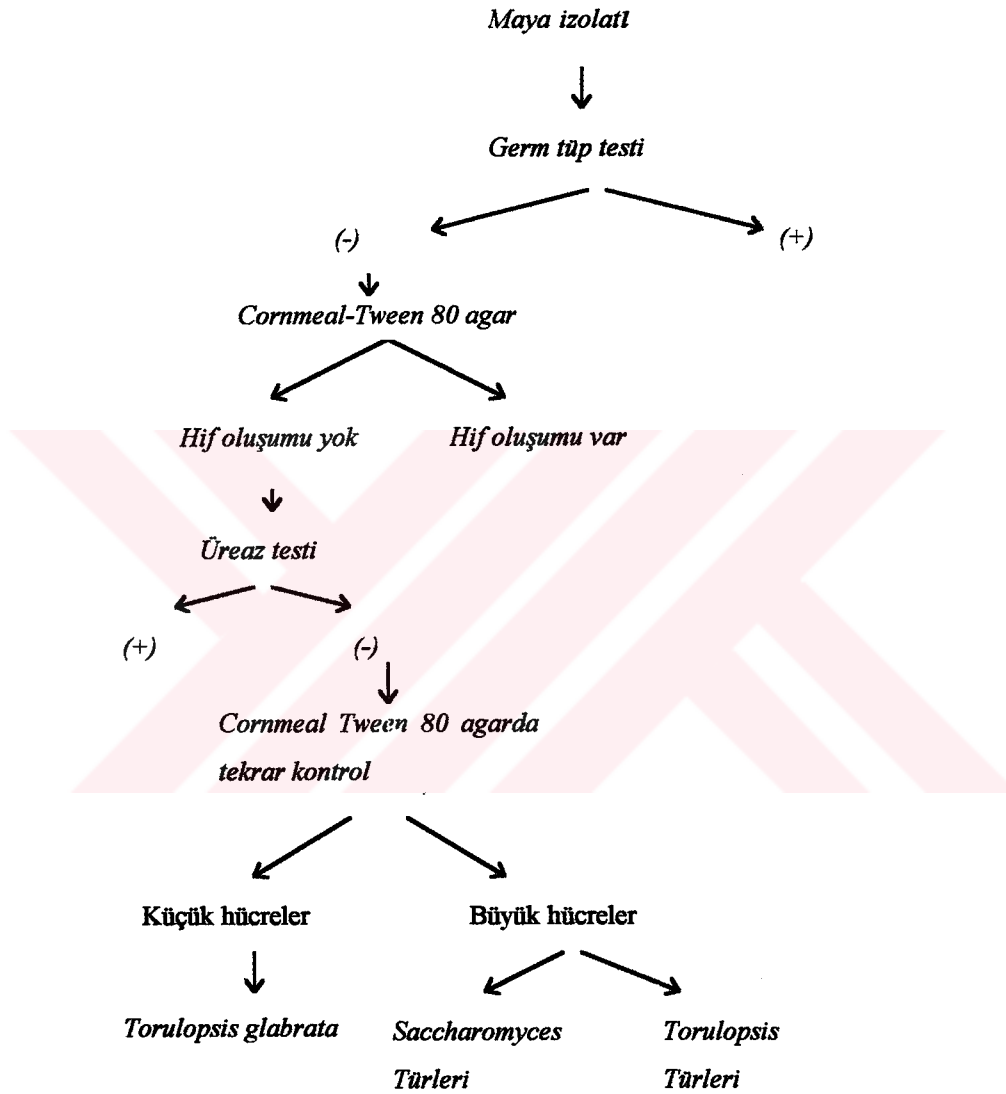
Cryptococcus türleri, karbonhidrat asimilasyon testleri, üreaz testi, Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, nitrat testi, siklohekzimitli ortamda gelişim ve askospor testleri ile ayırd edilmişlerdir (Lodder, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven 1990).

Yapılan testler sonucunda *C.terreus* ve *C.laurentii* türleri izole edilmiştir.

2.1.6. *Torulopsis*'lerin adlandırılması

Germ tüp oluşturmayan maya izolatları Mısırunu-Tween agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Hif içerip içermemelerine göre incelenen izolatlardan hif içermeyenler üreaz testine tâbi tutulmuşlardır. Üreaz (-) maya izolatları Mısırunu-Tween 80 agarda oluşturdıkları morfolojik görünümeler açısından tekrar incelenmişlerdir. Küçük hücreler *Torulopsis glabrata* türüne ait olup, karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleriyle adlandırılırlar. Büyük hücreler ise ya *Saccharomyces* ya da *Torulopsis* türlerine aittir ve karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri ile ayırdedilirler. Araştırmada karbonhidrat fermentasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktoz karbonhidratları; asimilasyon testleri içinde glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Ayrıca Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, nitrat testi siklohekzimitli ortamda gelişim testleri de yapılarak *Torulopsis*'lerin tür adlandırılmaları gerçekleştirilmiştir (Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).

Çizelge 2.1.6.1. Araştırmada *Torulopsis* ve *Saccharomyces* türlerinin adlandırılmasında uygulanan testler



Torulopsis ve *Saccharomyces* türleri üreaz testi, karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri, Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, nitrat testi, Sikloheksimitli ortamda gelişim testi ve askospor testleri ile ayırt edilirler (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven 1990)

Araştırmada *Torulopsis* cinsine ait olarak *T. candida*, *T.sphaerica*, *T.etchellsii*, *T.versatilis*, *T.famata*, *T.pinus*, *T.aeria*, *T.stellata* ve *T.gropengiesseri* türleri izole edilmiştir.

Saccharomyces cinsine ait olarak *S.delbrueckii* ve *S.cerevisiae* türleri izole edilmiştir.

2.1.7. *Saccharomyces*'lerin adlandırılması

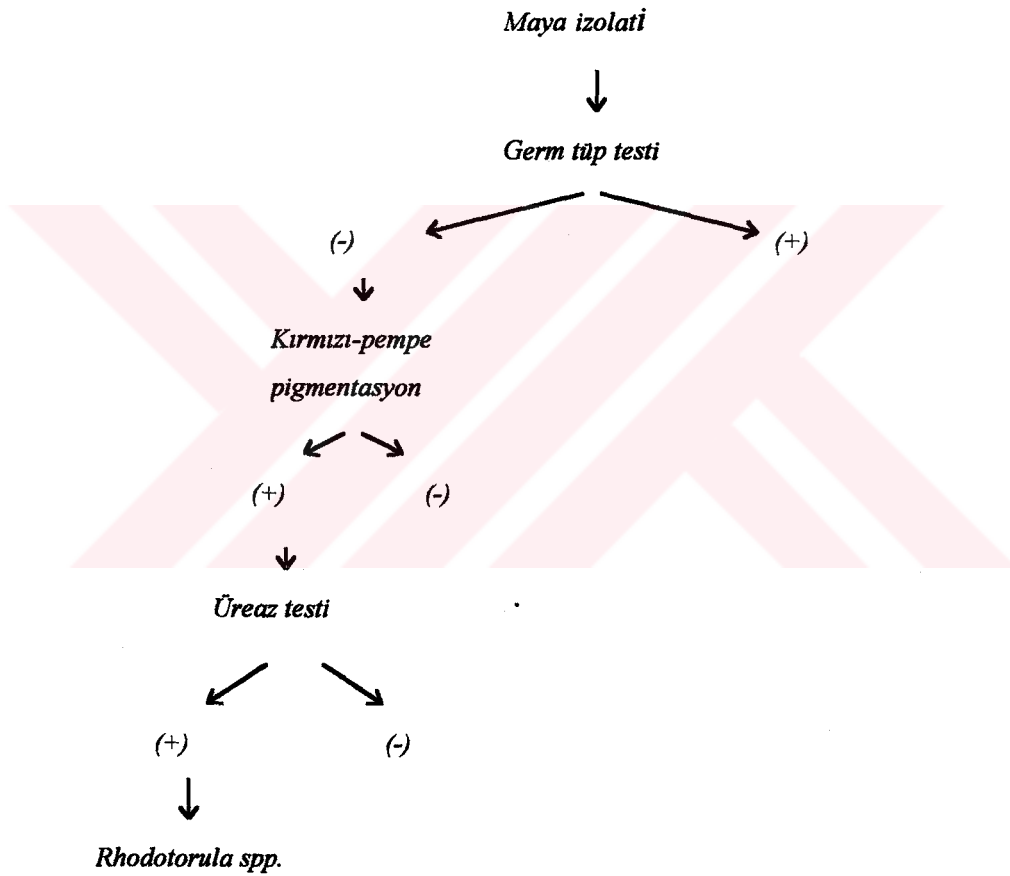
Germ tüp oluşturmeyen maya izolatları Mısırunu-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Hif içermeyen izolatlar üreaz testine tabi tutulmuşlardır. Üreaz (-) maya izolatlar *Saccharomyces* ve *Torulopsis* cinslerine ait olarak bulunmuştur. İzolatlar daha sonra karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testine tabi tutulmuşlardır. Karbonhidrat fermentasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktoz; karbonhidrat asimilasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Ayrıca askospor testi, Siklohekzimitli ortamda gelişim testi ve Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, testleri de yapılarak *Saccharomyces*'lerin tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir (Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990)(Bkz. Çizelge 2.1.6.1).

2.1.8. *Rhodotorula*'ların adlandırılması

Araştırmada germ tüp testi (-) olup, kırmızı yada pembe pigmentasyona sahip maya kolonileri, üreaz testine tâbi tutulmuşlardır. Üreaz pozitif maya izolatları *Rhodotorula* cinsine ait olarak bulunmuştur. Şekerleri fermente etmeyen *Rhodotorula*'lar karbonhidrat asimilasyon testi ile ayırt edilirler. Bu amaçla glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Sabouraud besiyerinde zar oluşumu,

sikloheksimitli ortamda gelişim, nitrat ve askospor testleri de yapılarak *Rhodotorula*'lar adlandırılmıştır. (Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).

Çizelge 2.1.8.1. Araştırmada *Rhodotorula*'ların adlandırılmasında uygulanan testler



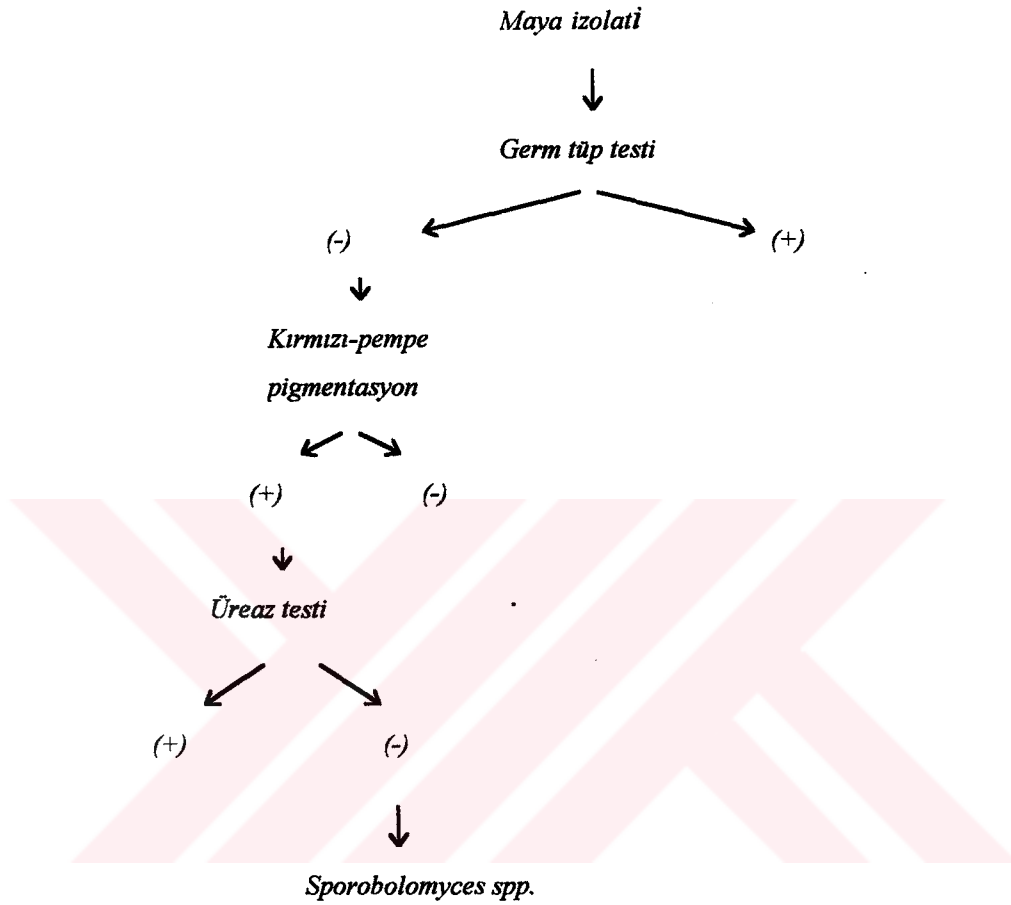
Rhodotorula türleri karbonhidrat asimilasyon testleri, sabouraud besiyerinde zar oluşumu, sikloheksimitli ortamda gelişim, nitrat ve askospor testleri ile ayırdedilirler. (Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).

Yapılan testler sonucunda *Rhodotorula* cinsine ait *R.flava* ve *R.pallida* türleri izole edilmiştir.

2.1.9. *Sporobolomyces*'lerin adlandırılması

Germ tüp oluşturmayan ve kırmızı-pembe pigmentasyon içeren maya izolatları üreaz testine tâbi tutulmuşlardır. Üreaz negatif koloniler *Sporobolomyces* cinsine aittir. Pseudohif yada gerçek hif içerebilen bu cins türleri, karbonhidrat asimilasyon testleri ile ayırdedilmiştir. Bu amaçla glikoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Nitrat testi, Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, sikloheksimitli ortamda gelişim testi ve askospor testleri de yapılarak *Sporobolomyces*'lerin tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir. (Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).

Çizelge 2.1.9.1. Araştırmada *Sporobolomyces*'lerin adlandırılmasında uygulanan testler



Sporobolomyces türleri karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri, Sabouroud besiyerinde zar oluşumu, sikloheksimitli ortamda gelişim testi, nitrat ve askospor testleri ile ayırdedilirler. (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990).

Araştırmada bu cinse ait tek bir tür izole edilmiş olup, bu tür *S. alborubescens*'dir.

2.2. Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların Proteinaz Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Araştırmada maya izolatlarının proteolitik aktivitelerinin

belirlenmesinde iki farklı metod kullanılmıştır. Bu metodlardan biri YCB-BSA agarda, diğeri de Skim milk agarda izolatların proteinaz enzim aktivitelerinin saptanmasını kapsamaktadır (Rüchel, 1982; Bilinski et.al., 1986).

2.2.1. *Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi*

Araştırmada maya izolatlarının SDA'daki 24 saatlik taze pasajlarından YEPD besiyerine inokülasyonları yapılmıştır. YEPD besiyeri mikroorganizmaların aktifleştirilmesi için kullanılmıştır. İzolatlar 30°C'de 12 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra sıvı besiyerinden yapılan lam-lamel arası preparat ile üremenin saflığı kontrol edilmiştir.

Daha sonra proteinaz enzim aktivitesinin gösterileceği YCB-BSA agar besiyeri hazırlanmıştır (Rüchel, 1982; Karabıçak, 1996). YCB-BSA agar içeren petrilerin her birine 4'er adet 6mm çapındaki kağıt diskler (Whatman No.17) yerleştirilmiştir. Bu kağıt diskler üzerine YEPD besiyeri inkübe edilen maya süspansiyonlarından otomatik pipetle 20µl miktarlarda disklere emdirilmiştir. Plaklar 30°C'de 6 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon sonrası plaklar önce amidoblack içeren protein boyama çözeltisi ile 5 dakika boyanmıştır. Boyamanın ardından plaklar, önce asetik asitli solüsyonla ve sonra çeşme suyuyla 5-10 kez yıkanmışlardır. Proteolitik aktivitesi pozitif diskler etrafında şeffaf bölgeler meydana gelmiştir. Proteolitik aktivitesi negatif diskler etrafından ise, herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Disk çevresindeki şeffaf alanlar lizis zonları olarak tanımlanmıştır. Disk çevresinde lizis zonu yok ise proteolitik aktivite negatif, disk çevresinde 1-2 mm'lik alanda lizis zonu varsa orta derecede proteolitik aktivite (+) ve disk kenarında 3mm ve daha fazla alanda lizis zonu varsa kuvvetli proteolitik aktivite (++) şeklinde değerlendirmeleri yapılmıştır (Rüchel, 1982; Karabıçak, 1997).

2.2.2. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda proteinaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Araştırmada maya izolatlarının proteolitik aktivitelerinin belirlenebilmesi için kullanılan diğer bir metotta skim milk agarda oluşan proteolitik zonların ölçülmesidir. Bu amaçla maya izolatları skim milk agara ekilerek 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Ekimi yapılan bölge etrafındaki şeffaf alanlar belirlenerek, proteolitik zon çapları ölçülmüştür. İzolatların proteolitik aktiviteleri YCB-BSA agarda olduğu gibi zayıf, orta ve kuvvetli şeklinde tanımlanmıştır (Larone, 1976; Bilinski et.al., 1986).

2.3. Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların İzolasyonlarında Kullanılan Temel Besiyerleri

2.3.1. SDA (Sabouraud Dextrose Agar) Oxoid CM41

Mycological peptone	10 gr
Glucose	40 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml.

pH 5,6 $\pm$ 0,2 ayarlanarak, tamamen erimesi için ısıtılır. 121°C'de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilir.

Bu besiyeri, maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonunda ve stok kültürlerin korunmasında kullanılmıştır.

2.3.2. Antibiyotikli SDA

Sikloheksimit	0,5 gr
Kloramfenikol	0,05 gr

10 ml asetona 0,5 gr sikloheksimit eklenerek karıştırılır. %95'lik 10 ml etanole de 0,05 gr kloramfenikol eklenerek iyice karıştırılır. Yukarıda anlatılan

şekilde hazırlanan SDA besiyerine otoklavlamadan önce bu antibiyotikler eklenir. 121°C'de 15 dakika steril edilir.

Bu besiyeri, maya ve maya benzerlerinin antibiyotik içeren ortamda gelişebilme yeteneklerini test etmek amacıyla kullanılmıştır.

2.4. Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların Adlandırılmasında Kullanılan Besiyerleri ve Uygulanan Testler

2.4.1. Mısırunu-Tween 80 agar Oxoid CM103

Mısırunu Extract	2 gr
Agar	15 gr
Tween-80 (Polysorbate 80)	10 ml
Distile Su	1000 ml

PH 6,0 $\pm$ 0,2 ayarlanıp, tamamen erimesi için kaynatılır. 121°C'de 15 dakika otoklavlama yoluyla sterilize edilir.

Bu besiyeri maya ve maya benzeri mikroorganizmaların mikroskopik morfolojilerinin ve klamidospor oluşumlarının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Besiyerine %1 oranında Tween 80 eklenmesi ortamdaki klamidospor oluşumunu ve morfolojik görünümü zenginleştirmektedir.

2.4.2. Karbonhidrat asimilasyon besiyeri (Modified Wickerham Medium-Slants)

2.4.2.1. Bazal ortam

Bacto Brom Cresol Purple (%1,6)	0,2 gr
1/10 Normal NaOH	1.0 ml
Noble Agar	2.0 gr
Distile su	90.0 ml

Bu karışım erimesi amacıyla ısıtılmıştır.

2.4.2.2. Stok karbonhidrat solüsyonu

Karbonhidrat	1.00 gr
(Eğer rafinoz kullanılırsa)	2.00 gr
Yeast Nitrogen Base	0.67 gr
Distile su	10.00 ml

Bu solüsyon erimesi için karıştırılmış ve hafifçe ısıtılmıştır.

Araştırmamızda karbonhidrat asimilasyon testleri için glukoz, maltoz, süroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır.

Hazırlanışı;

1. Stok karbonhidrat solüsyonu erimiş agar ortamına eklenmiştir.
2. İyice karıştırılarak pH 7.0'ye ayarlanmıştır.
3. Tüplere 5'er ml. olacak şekilde dağıtılmış, otoklavlama yolu ile 121°C'de 10 dakika steril edilmiştir.
4. Tüpler yatık pozisyonda katılaşmaya bırakılmış ve buzdolabında 4°C'de muhafaza edilmiştir.

İnokülasyon ve inkübasyon;

1. Bir öze dolusu saf maya kültürü 9 ml. Distile suda süspanse edilir.
2. Süspansiyonun 0,2ml.si yatık asimilasyon ortamına inoküle edilir.
3. İnokülüm 25°C'de 7-14 gün arasında inkübe edilir ve maya hücresinin gelişimi ve asit üretimi (sarı renk) bakımından incelenir (Adams and Cooper, 1974).

Bu test maya ve maya benzerlerinin tek bir karbonhidrat substratında üreme yeteneklerinin test edilmesi amacıyla yapılmıştır.

2.4.3. Karbonhidrat fermentasyon besiyeri (Difco Manual)

2.4.3.1. Purple Broth Base (Difco)

Proteose Peptone No.3	10gr
Lab lemco Powder	1 gr
Sodium Chloride	5 gr
Brom Cresol Purple	0,02 gr
Distile su	1000 ml

PH $6,8 \pm 0,2$ ayarlanıp indikatör madde ilave edildikten sonra içinde durham tüpü bulunan tüplere 9ml. miktarda pipetlenerek 121°C 'de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilmiştir.

2.4.3.2. Karbonhidrat solüsyonu

Glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz (%1)

Karbonhidrat 1 gr.

Distile su 10 ml.

Yukarıda adı geçen şeker solüsyonları membran filtre ($0,2 \mu\text{m}$) ile steril edilmiştir.

Karbonhidrat Temel Besiyeri 9 ml.

Karbonhidrat Solüsyonu 1 ml.

9 ml'lik karbonhidrat besiyerine 1ml karbonhidrat solüsyonu ilave edilerek hazırlanmıştır.

Besiyerine ekim yapılarak 37°C'de 10-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif reaksiyonda besiyerin rengi sarıya dönüşmüştür. Fermente olan tüm karbonhidratlar aynı zamanda asimile de olmuşlardır, ancak asimile olan birçok karbonhidratın fermente olması şart değildir.

Bu test, maya ve maya benzerlerini farklı karbonhidratlardan gaz oluşturma yeteneklerinin belirlenebilmesiyle amacıyla yapılmıştır.

2.4.4. Bacto Sabouraud Dextrose Broth (Difco)

Neopeptone	10 gr
Bacto Dextrose	20 gr
Distile Su	1000 ml

PH $5,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlanıp tüplere 9 ml pipetlenerek 121°C'de 15 dakika otoklavlama yoluyla sterilize edilir.

Maya ve maya benzerlerini sıvı ortamda yüzeyde zar oluşturma yeteneklerini test etmek amacıyla yapılmıştır. Sıvı besiyerine ekimleri yapılan mikroorganizmalar 37°C'de 2 gün inkübe edilerek, yüzeyde zar oluşumları bakımından incelenmişlerdir.

2.4.5. Christensen's Urea Agar Oxoid CM53

Peptone	1 gr
Glucose	1 gr
Sodium Chloride	5 gr
Disodium Phosphate	1,2 gr

Potassium Dihydrogen Phosphate 0,8 g.

Phenol Red 0,012 gr

Agar 15 gr

2,4 gr alınmış ve 95 ml. distile su ilave edilmiştir. pH $6,8 \pm 0,2$ ayarlanıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilmiştir. Daha sonra 5 ml. %40'luk steril üre ilave edilerek steril tüplere taksim edilmiştir.

Urea agara inoküle edilen mayalar, 25°C 'de 4 gün inkübe edilmiştir. Sarı renkten, pembe ya da kırmızıya değişim pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

2.4.6. *Gorodkova medium'da askospor testi*

Dextrose 0,63 gr

NaCl 1,30 gr

Lablemco powder 2,50 gr

Agar 2,50 gr

Distile su 250 ml

Hazırlanan karışım tüplere 9'ar ml dağıtılarak 121°C 'de 15 dakika otoklav yolu ile sterilize edilir. Tüpler yatık pozisyonda katılaşmaya bırakılır (Larone, 1976).

Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların askospor oluşturma yeteneklerini test etmek amacıyla kullanılmıştır. Besiyerine ekimleri yapılan izolatlar 37°C 'de 7-10 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrası yapılan gram boyamada blastosporlar gram pozitif ve askosporlar gram negatif

olarak gözlenmektedir. (Tümbay, 1982; Larone, 1976).

2.4.7. Nitrat testi

Peptone	10 gr
Sodium Chloride	5 gr
Potasyum nitrat	2 gr
Agar	3 gr
Distile su	1000 ml

PH 7,0 ayarlanıp tüplere 5 ml. Taksim edilerek 121°C'de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilmiştir.

2.4.7.1. Solüsyon A

Sulfanilic acid	0,8 gr
Acetic acid, 5N	100 ml

2.4.7.2. Solüsyon B

α -naphthylamina	0,5 gr
Acetic acid, 5N	100ml

Stok kültürden öze ile bir koloni alınarak 2 ayrı potasyum nitratlı besiyerine ekim yapılmıştır. Tüplerden birisi kontrol amacı ile parafinlenerek kapatılmıştır. Her iki tüpte 30°C'de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda parafinlenmemiş tübe 1ml Solüsyon A, 1 ml solüsyon B'den aktarılmıştır. Bu tüpte kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyonu göstermektedir. (Koneman et.al., 1988).

Bu test maya ve maya benzerlerinin nitrojen kaynağı olarak nitrati kullanma yeteneklerini test etmek amacıyla yapılmıştır.

2.4.8. Germ tube test

1. 1,0 ml. steril insan serumu içine bir öze dolusu maya kolonisi inoküle edilir.
2. 37°C'de 2-3 saat inkübasyona bırakılır
3. İnkübasyon sonrası süspansiyonun bir damlası lâm üzerine alınır, bir lamel ile üzeri kapatılır.
4. Mikroskopik olarak germ tüp oluşumu için test edilir.

Bu test *Candida albicans* ve onun bir varyantı olan *C. stellatoideae*'nin teşhisi için kullanılmaktadır. Germ tüp, maya hücresinden gelişen filamentöz bir üremedir (Larone, 1976; Sandven, 1990).

2.4.9. Ringer solution- 1/4 - Code BR52

Sodium chloride	2,25 gr
Potassium chloride	0,105 gr
Calcium chloride 6H ₂ O	9,12 gr
Sodium bicarbonate	0,05 gr
Distile su	500 ml

pH 7.0 ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilir (Oxoid, Manual). Bu solüsyon araştırmada maya ve maya benzerlerinin çiğ sütlerden izolasyonunda tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

2.5. Maya ve Maya Benzerlerinin YCB-BSA Agarda Proteinaz Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve Uygulanan Testler

2.5.1. YEPD Broth

Yeast-extract (Difco)	1 gr
Peptone (Difco)	2 gr
Dextrose (Difco)	2 gr
Distile su	100ml

pH 5.0 ayarlanıp, tüplere 5'er ml. taksim edilir. 121°C'de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilir.

YEPD broth, maya ve maya benzerlerinin proteinaz enzim aktivitelerinin belirlenmesinde mikroorganizmaların aktifleştirilmesinde kullanılmıştır. Çalışmada izolatlar ilk olarak YEPD brota inoküle edilerek 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Aktif kültürler buradan YCB-BSA agara alınmışlardır (Karabıçak vd., 1997).

2.5.2. YCB-BSA(Yeast Carbon Base-Bovine Serum Albumin) Agar

2.5.2.1. Stok solüsyon

Yeast Carbon Base (Difco)	11,7 gr
Yeast Extract (Difco)	0,1 gr
Distile Su	60 ml
Bovine Serum Albumin (Difco)	40 ml

2.5.2.2. %2'lik agar

Agar	2 gr
Distile Su	100 ml

Yeast Carbon Base ve Yeast extract distile suda eritmek suretiyle, 40 ml BSA (Difco) eklenip pH 5'e ayarlanarak stok solüsyon hazırlanmıştır. Stok solüsyon 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Minisart, Sartorius, Germany) süzülerek steril edilmiştir. Ayrıca %2'lik agar hazırlanarak kapaklı tüplere 18'er cc dağıtılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. 90 mm çapındaki steril petrilere 2 ml stok YCB-BSA ve eritilip 55°C'de soğutulmuş 18 ml'lik agar dökülerek karıştırılmış ve besiyeri hazırlanmıştır (Rüchel, 1982).

2.5.3. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların proteinaz enzim aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan protein boyama çözeltisi

2.5.3.1. Amidoblack içeren protein boyama çözeltisi

Metanol	45 ml
Asetik Asit	10 ml
Distile su	45 ml
Amidoblack	0,6 gr

Hazırlanan boya plaklar 5 dakika süre ile boyanmıştır.

2.5.3.2. Amidoblack içermeyen asetik asitli solüsyon

Metanol	45 ml
Asetik Asit	10 ml

Distile su	45 ml
------------	-------

Yukarıdaki gerçekleştirilen boyamanın ardından plaklar amidoblacak içermeyen asetik asitli solüsyonla 5-10 kez yıkanmıştır. En son olarak çeşme suyuyla 5-10 kez yıkanan plaklar şeffaf proetolitik zonların bulunuşu bakımından incelenmişlerdir. (Rüchel, 1982; Karabıçak vd., 1996).

2.6. Maya ve Maya Benzeri Mikroorganizmaların Skim Milk

Agarda Proteinaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesinde

Kullanılan Besiyerleri ve Uygulanan Testler

2.6.1. Skim milk agar

2.6.1.1. Solüsyon A

Nutrient Broth	1,3 gr
Agar	1,6 gr
Distile su	90 ml

pH 6.3 ± 0.2 ayarlanarak 121°C 'de 15 dakika otoklavlama yolu ile steril edilir.

2.6.1.2. Solüsyon B

%10'luk Skim milk besiyeri için

Skim milk	1 gr
Distile su	10 ml

1,5 atm. basınçta 8 dakika otoklavlama yolu ile steril edilir. Her iki besiyeri karıştırılarak plaklara dökülerek hazırlanmıştır. 37°C 'de 48 saat inkübasyon sonucu izolatların oluşturduğu şeffaf alanlar gözlenmiştir (Bilinski et.al., 1986)

3. BULGULAR

Araştırmamızda çeşitli süt işletmelerine gelen 90 çiğ süt örneği alınarak çalışılmıştır. Bu örneklerin 33'ünden maya ve maya benzeri mikroorganizmalar izole edilerek adlandırılmıştır. 90 çiğ süt örneğinden geriye kalan 57 örnekte anılan mikroorganizmalara rastlanmamıştır. Araştırmada izole edilen mikroorganizmaların morfolojik görünümüleri ve fizyolojik karakteristikleri çalışılarak tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir.

Bazı örneklerden birden fazla tür izolasyonu gerçekleştirildiği için maya ve maya benzeri izolat sayısı 50 olarak tespit edilmiştir.

Araştırmada izole edilen maya ve maya benzerleri 20 *Torulopsis*, 10 *Trichosporon*, 8 *Candida*, 7 *Cryptococcus*, 2 *Saccharomyces*, 2 *Rhodotorula* ve 1 *Sporobolomyces* cinsine ait türler olarak bulunmuştur.

İzole edilerek adlandırılan türlerin proteinaz enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. Proteinaz enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla YCB-BSA agar ve Skim milk agar besiyerleri kullanılmıştır. Her iki testte de maya ve maya benzerlerinin besiyerindeki proteini lizis ederek şeffaf bir zon oluşturup oluşturmadıkları değerlendirilmiştir.

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 50 maya ve maya benzeri mikroorganizmanın cinslere göre dağılımı ve izolasyon yüzdeleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları ve izolasyon yüzdeleri.

İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	İzolasyon sayısı	İzolasyon Yüzdeleri
<i>Torulopsis</i>	20	% 40
<i>Trichosporon</i>	10	% 20
<i>Candida</i>	8	% 16
<i>Cryptococcus</i>	7	% 14
<i>Saccharomyces</i>	2	% 4
<i>Rhodotorula</i>	2	% 4
<i>Sporobolomyces</i>	1	% 2
Toplam	50	% 100

Araştırmada, çiğ süt örneklerinden izole edilen maya ve maya benzerleri içinde, en yaygın olarak görülen türler *Torulopsis*(% 40) cinsine ait olup, bu cinse ait 20 izolasyon gerçekleştirilmiştir. *Torulopsis*leri sıra ile *Trichosporon* (10) (%20), *Candida* (8) (%16), *Cryptococcus* (7) (%14) cinsleri izlemektedir. *Saccharomyces* (%4), *Rhodotorula* (%4) ve *Sporobolomyces* (%2) türlerinin ise çok düşük sayılarda oldukları görülmüştür (Çizelge 3.1.)

Araştırmada çalışılan 90 örneğin 33'ünden maya ve maya benzeri mikroorganizmalar izole edilerek adlandırılmıştır. 33 örneğin 21'inde maya ve maya benzerleri tek izolat olarak elde edilmiştir. Geriye kalan 29 örnekte birden fazla mikroorganizmaya rastlandığından 29 izolat bulunmuştur. Böylece toplam 50 mikroorganizma izole edilerek adlandırılmıştır.

Çiğ süt örneklerinde birden fazla izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar Çizelge3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Aynı çiğ süt örneğinde birden fazla izole edilen maya ve maya benzerlerinin dağılımları

Örnek Tür. No Adı	10	12	22	35	37	44	48	51	72	79	80	81
<i>Torulopsis sphaerica</i>	+											
<i>Torulopsis candida</i>		+	+		+		+		+			
<i>Torulopsis aerea</i>			+									
<i>Torulopsis famata</i>				+				+	+			
<i>Torulopsis pinus</i>					+							+
<i>Torulopsis versatilis</i>						+						
<i>Torulopsis etchellsii</i>						+					+	
<i>Torulopsis stellata</i>											+	
<i>Trichosporon cutaneum</i>	+			+								
<i>Trichosporon capitatum</i>							+					
<i>Trichosporon sericeum</i>		+										
<i>Trichosporon behrendii</i>										+		
<i>Trichosporon fermentans</i>		+										
<i>Cryptococcus terreus</i>				+					+			+
<i>Cryptococcus laurentii</i>							+			+		
<i>Candida melinii</i>		+										
<i>Sporobolomyces albo-rubescens</i>								+				
Toplam29 izolat	2	4	2	3	2	2	3	2	3	2	2	2

Çizelge 3.2. incelendiğinde aynı çiğ süt örneğinde birden fazla izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar görülmektedir. Araştırmada 10. örnekten *Torulopsis sphaerica* 10i ve *Trichosporon cutaneum* 1i türleri; 12. örnekten *Torulopsis candida* 7i, *Trichosporon sericeum* 9i, *Trichosporon fermentans* 2i, *Candida melinii* 7i türleri; 22. örnekten *Torulopsis candida* 6i, *Torulopsis aerea* 16i türleri; 35. örnekten *Torulopsis famata* 14i, *Trichosporon cutaneum* 5i, *Cryptococcus terreus* 5i türleri; 37. örnekten *Torulopsis candida* 4i ve *Torulopsis pinus* 12i türleri; 44. örnekten *Torulopsis versatilis* 9i ve *Torulopsis etchellsii* 20i türleri; 48. örnekten *Torulopsis candida* 3i, *Trichosporon capitatum* 6i ve *Cryptococcus laurentii* 2i türleri; 51. örnekten *Torulopsis famata* 19 i ve *Sporobolomyces albo-rubescens* 1i türleri; 72.

örnekte *Torulopsis candida* 2i, *Torulopsis famata* 11i ve *Cryptococcus terreus* 4i türleri; 79. örnekte *Trichosporon behrendii* 8i ve *Cryptococcus laurentii* 3i türleri; 80. örnekte *Torulopsis etchellsii* 5i ve *Torulopsis stellata* 15i türleri, 81. örnekte *Torulopsis pinus* 13i, *Cryptococcus terreus* 6i türleri izole edilmiştir. Çalışılan 12 örnekte toplam 29 maya ve maya benzeri mikroorganizma elde edilmiştir.

Araştırmada çalışılan örneklerin 21'inde maya ve maya benzerleri tek izolat olarak elde edilmiştir.

Çiğ süt örneklerinden tek tür olarak izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar Çizelge 3.3.'de verilmiştir.



1

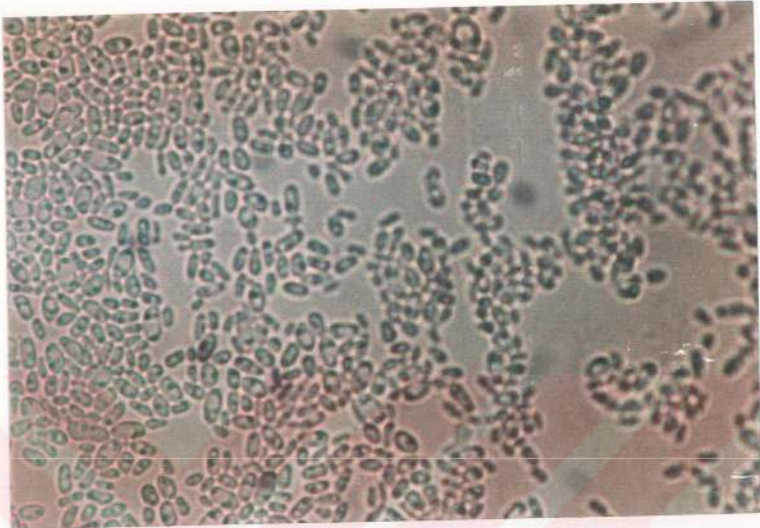
Çizelge 3.3. incelendiğinde çiğ süt örneklerinden tek tür olarak izole edilen maya ve maya benzerlerinin dağılımı görülmektedir. 1. örnekten *Candida albicans* 1i, 2. örnekten *Candida catenulata* 3i, 4. ornekten *Torulopsis gropengiesseri* 1i türü; 8. örnekten *Cryptococcus terreus* 1i,; 13. örnekten *Trichosporon cutaneum* 4i, 16. örnekten *Candida krusei* 4i, 18. örnekten *Torulopsis etchellsii* 18i, 24. örnekten *Candida guilliermondii* 6i, 25. örnekten *Candida krusei* 8i, 27. ve 36. örneklerden sırasıyla *Trichosporon cutaneum* 10i ve *Trichosporon cutaneum* 7i türleri; 39. örnekten *Torulopsis famata* 8i, 41. örnekten *Torulopsis candida* 17i, 43. örnekten *Trichosporon fermentans* 3i, 50. örnekten *Cryptococcus terreus* 7i, 53. örnekten *Rhodotorula pallida* 2i, 65. örnekten *Saccharomyces cerevisiae* 2i, 68. örnekten *Saccharomyces delbrueckii* 2i, 74. örnekten *Candida albicans* 2i, 83. örnekten *Candida scottii* 5i, 85. örnekten *Rhodotorula flava* 1i türleri izole edilmiştir. Araştırmada toplam 21 tür çiğ sütlerden tek olarak izole edilmiştir.

Araştırmada çiğ süt örneklerinden en sıklıkla izole edilen türler *Torulopsis* cinsine ait olarak bulunmuştur. Bu cinsin 9 farklı türüne ait 20 izolasyon gerçekleştirilmiştir.

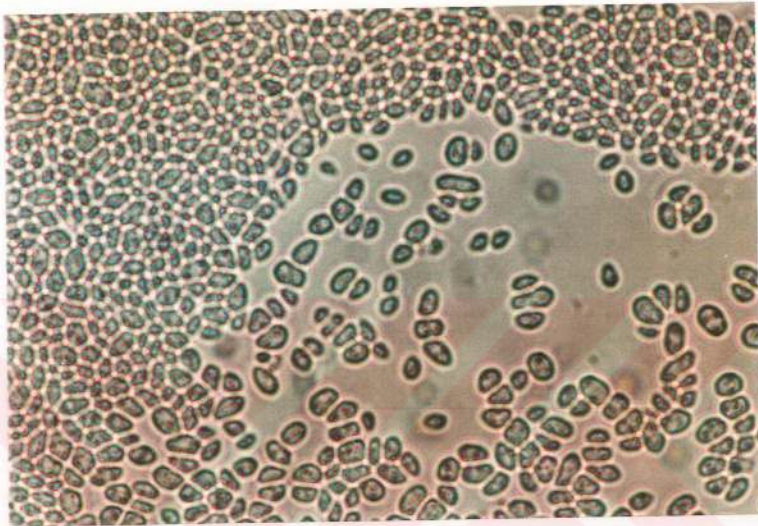
Çizelge 3.4. Çiğ sütlerden izole edilen *Torulopsis* türlerinin dağılımları.

Çiğ Sütlerden İzole Edilen <i>Torulopsis</i> Türleri	<i>Torulopsis</i> izolasyon sayısı
<i>T. candida</i>	6
<i>T.famata</i>	4
<i>T.etchellsii</i>	3
<i>T.pinus</i>	2
<i>T.gropengiesseri</i>	1
<i>T.sphaerica</i>	1
<i>T.versatilis</i>	1
<i>T.aeria</i>	1
<i>T.stellata</i>	1
TOPLAM	20

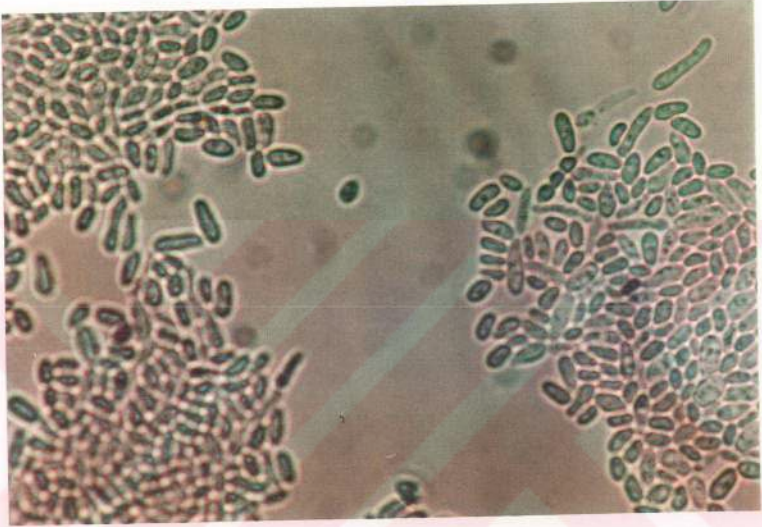
Çizelge 3.4. incelendiğinde, çiğ süt örneklerinden izole edilen *Torulopsis*'ler görülmektedir. Bu türler *T. candida* (6), *T.famata*(4), *T.etchellsii* (3), *T.pinus* (2), *T.gropengiesseri* (1), *T.sphaerica* (1), *T.versatilis* (1), *T.aeria* (1) ve *T.stellata* (1) olarak bulunmuştur



Şekil 3.1. *Torulopsis candida* 17i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Hücreleri yuvarlak ve ovaldır, pseudohif gözlenmemektedir. İmmersiyon yağı, (x100).



Şekil 3.2. *Torulopsis etchellsii* 18i. Mısırunu Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Hücreleri yuvarlak ve ovaldır, pseudohif gözlenmemektedir. İmmersiyon yağı (x100).



Şekil 3.3. *Torulopsis sphaerica* 10i. Mısırunu-Tween 80 agarda 25 °C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Yuvarlak, uzun-oval hücreler ve nadiren primitif pseudomiselyum gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100)

Çizelge 3.5. Araştırmada çalışılan *Torulopsis* türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982)

<i>İzole Edilen Türler</i>	<i>Germ Tube Testi</i>	<i>Karbohidrat Fermantasyon Testleri</i>				<i>Üreaz Testi</i>	<i>Karbohidrat Asimilasyon Testleri</i>					<i>KNO₃ testi</i>	<i>Akso- spor Testi.</i>	<i>Subon- rad brota gelişim.</i>	<i>Siklotek- zimli ortamda gelişim.</i>	<i>Comment-Tween 80 ağartı mikroskopik morfoloji</i>	
<i>T. lanata</i>	-	G	S	L	Ga	-	G	M	S	L	Ga	R	K	-	-	-	Hif blastosporlar var
	ZF	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Hif blastosporlar var
<i>T. groenlandensis</i>	-	ZF	ZF	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	Hif blastosporlar var
<i>T. sphaerica</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	Hif blastosporlar var
<i>T. versatilis</i>	-	+	+	+	ZF	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Hif blastosporlar var
<i>T. etchellsii</i>	-	ZF	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Hif blastosporlar var
<i>T. scellata</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	ZA	-	-	-	-	Hif blastosporlar var
<i>T. aerea</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Hif blastosporlar var
<i>T. pinus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Hif blastosporlar var
<i>T. cunicula</i>	-	ZF	ZF	-	-	-	ZA	+	+	ZA	+	+	+	-	-	-	Hif blastosporlar var

*=değişebilir reaksiyon

+ =pozitif reaksiyon ZF=zaıf fermantasyon G=glikoz M=maltoz S=sükroz L=laktatoz

- =negatif reaksiyon ZA=zaıf asimilasyon R=rifinoz G=galaktoz K=ksiloz

*=değişebilir reaksiyon

ZF=zayıf fermantasyon G=glikoz M=maltoz S=sükroz L=laktöz

+ =pozitif reaksiyon ZA=zayıf asimilasyon R=rafinoz G=galaktoz K=ksiloz

- =negatif reaksiyon

Hifler
yavrulak kültür müköz

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Hifler
yavrulak ve
ovul

Araştırmada çiğ sütlerden 10 *Trichosporon* izole edilmiş olup, bu cinse ait 5 farklı tür bulunmuştur.

Çizelge 3.6. Çiğ sütlerden izole edilen *Trichosporon* türlerinin dağılımları.

Çiğ sütlerden izole edilen <i>Trichosporon</i> türleri	<i>Trichosporon</i> izolasyon sayısı
<i>T. cutaneum</i>	5
<i>T. fermentans</i>	2
<i>T. behrendii</i>	1
<i>T. capitatum</i>	1
<i>T. sericeum</i>	1
TOPLAM	10

Çizelge 3.6.'da görüldüğü gibi, araştırmada *Torulopsis* türlerinden sonra en yaygın olarak görülen türler *Trichosporon* cinsine ait olup, 5 *T. cutaneum*, 2 *T. fermentans*, 1 *T. behrendii*, 1 *T. capitatum* ve 1 *T. sericeum* türü izole edilmiştir.

Çizelge 3.7. Araştırmada çalışılan *Trichosporon* türlerinin kültürel ve and Kieger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982)

biyokimyasal reaksiyonları(Lodder

İzde Edilen Türle	Germ Tube Testi	Karbohidrat Fermentasyon Testleri	Üreaz Testi	Karbohidrat Asimilasyon Testleri	KNO ₃ testi	Azko- spor Testi.	Sabun- rnat brota filn.	Silolek- zimli ortamda gelişim.	Cornmeal-Tween 80 agarda mikroskopik morfoloji
<i>T. cutaneum</i>	-	G - S L Ga -	+	G + M ⁺ S ⁺ L ⁺ Ga + R ⁺ K -	-	-	+	+	Hif,artrospor blastosporlar var.
<i>T. fermentans</i>	-	+ - - - +	+	+ - - - +	-	-	+	+	Hif,artrospor blastosporlar var.
<i>T. capitatum</i>	-	- - - - *	+	+ - - - *	-	-	+	+	blastosporlar var. gelişmiş miseller,blas tospor ve artrospor kütaneleri var.
<i>T. versutum</i>	-	- - - - +	+	+ - - - +	-	-	+	+	az sayıda misel var blastosporlar artrosporlar kütne oluşturmazlar
<i>T. lebrunii</i>	-	+ ZF ⁺ - ZF ⁺ +	+	+ + + ZA ⁺ +	-	-	+	+	Hif,artrospor blastosporlar var

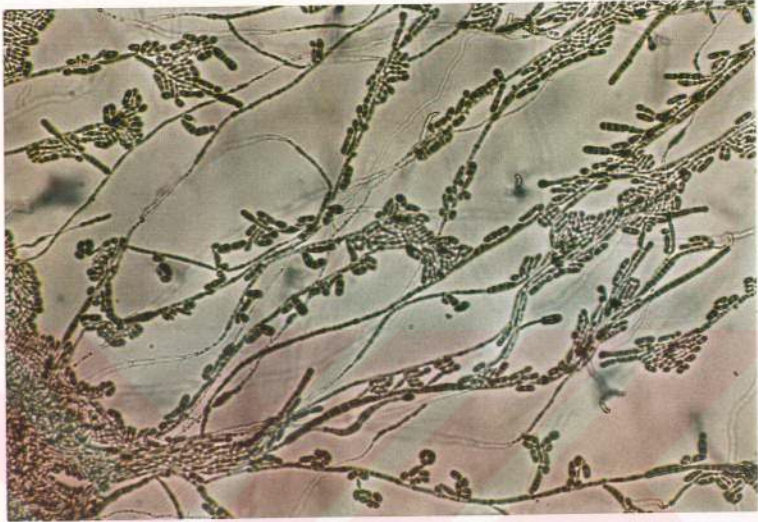
*=değişebilir reaksiyon

+ =pozitif reaksiyon ZF=zayıf fermentasyon G=glikoz M=maltoz S=sükroz L=laktöz

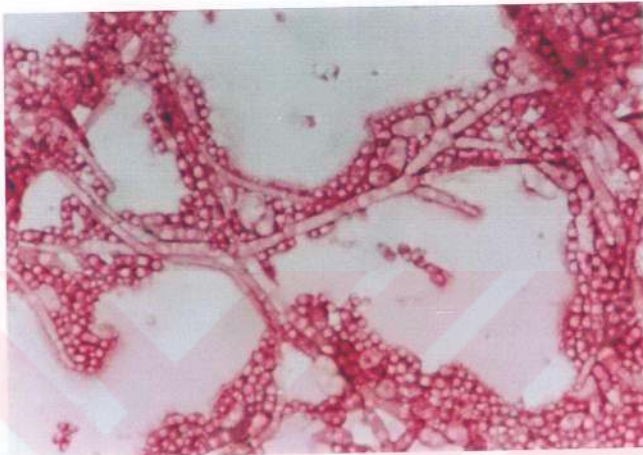
--=negatif reaksiyon ZA=zayıf asimilasyon R=ratnoz G=galaktöz K=ksilöz



Şekil 3.4. *Trichosporon fermentans* 2i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından gözlenem mikroskopik morfolojik görünüm. Gerçek hif, hif boyunca blastasporlar ve artrosporlar gözlenmektedir. İmmersiyon yağı (x100).



Şekil 3.5. *Trichosporon capitatum*'ün Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Gerçek hif, hif boyunca blastosporlar ve artrosporlar gözlenmektedir. İmmersiyon yağı (x100).



Şekil 3.6. *Trichosporon cutaneum* 4i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından yapılan gram gram boyama sonucu gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Gerçek hifler, hif boyunca blastosporlar ve artrosporlar gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x40).

Araştırmada çiğ sütlerden 8 *Candida* izole edilmiş olup, bu cinse ait 6 farklı tür bulunmuştur.

Çizelge 3.8. Çiğ sütlerden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımları.

Çiğ sütlerden izole edilen <i>Candida</i> türleri	<i>Candida</i> izolasyon sayısı
<i>C. albicans</i>	2
<i>C. krusei</i>	2
<i>C. catenulata</i>	1
<i>C. guilliermondii</i>	1
<i>C. melinii</i>	1
<i>C. scottii</i>	1
TOPLAM	8

Araştırmamızda izole edilen *Candida* türleri; 2 *C. albicans*, 2 *C. krusei*, 1 *C. catenulata*, 1 *C. guilliermondii*, 1 *C. melinii* ve 1 *C. scottii* olarak bulunmuştur (Çizelge 3.8.)



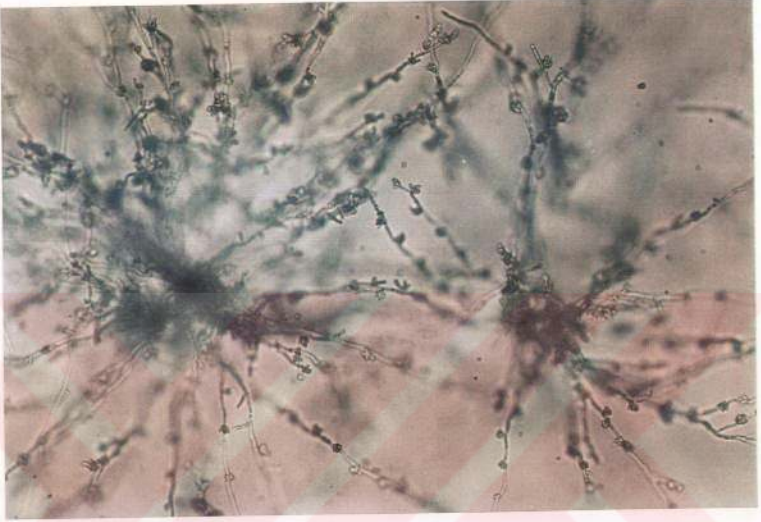
Şekil 3.7. *Candida albicans* 1i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Pseudohiflerin terminal uçlarında bulunan kalın çeperli klamidosporlar *C. albicans* için karakteristiktir. İmmersiyon yağı, (x100).



Şekil 3.8. *Candida albicans* için karakteristik germ tube oluşumu *C. albicans*, steril insan serumunda 37°C'de 3 saat minkübasyon sonrası filamentöz bir büyüme olan germ tübü oluşturmaktadır. İmmersiyon yağı, (x100).



Şekil 3.9. *Candida guilliermondii* 6i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm pseudohifler etrafında küçük blastospor kümeleri gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).



Şekil 3.10. *Candida krusei* 41. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Pseudohifler ve "ağaca benzer" bir dizilim gösteren blastosporlar gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).

Çizelge 3.9. Araştırmada çalışılan *Candida* türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982)

İzole Edilen Türler	Germ Tube Testi	Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	Üreaz Testi	Karbonhidrat Asimilasyon Testleri	KNO ₃ testi	Asko-spor Testi.	Sabouraud besiyeri ortamda gelişim.	Mastarm-Tween 80 agarda mikroskopik morfoloji
<i>C. albicans</i>	+	G + S + L - Ga +	-	G + M + S + L - Ga + R - K +	-	-	+	Klamidosporlar ve pseudohifler boyunca blastosporlar
<i>C. krusei</i>	-	+ - - - - +	+	+ - - - - -	-	+	-	pseudohifler ve uzun blastosporlar var. Ağaca benzer görünüm
<i>C. guilliermondii</i>	-	+ - + - + -	-	+ + + - + -	-	-	+	az sayıda pseudohif ve blastospor kümeleri
<i>C. catenulata</i>	-	+ - - - - -	-	+ - - - - -	-	-	+	pseudohifler ve buna paralel blastosporlar
<i>C. melinii</i>	-	ZF ZF ZF - -	-	+ + + - - -	ZA ZA -	-	+	ince pseudohifler ve zincir yapımı blastosporlar
<i>C. scottii</i>	-	- - - - - -	-	+ + + - - -	-	-	-	uzun ve ince pseudohifler ve blastosporlar

+ = pozitif reaksiyon
- = negatif reaksiyon

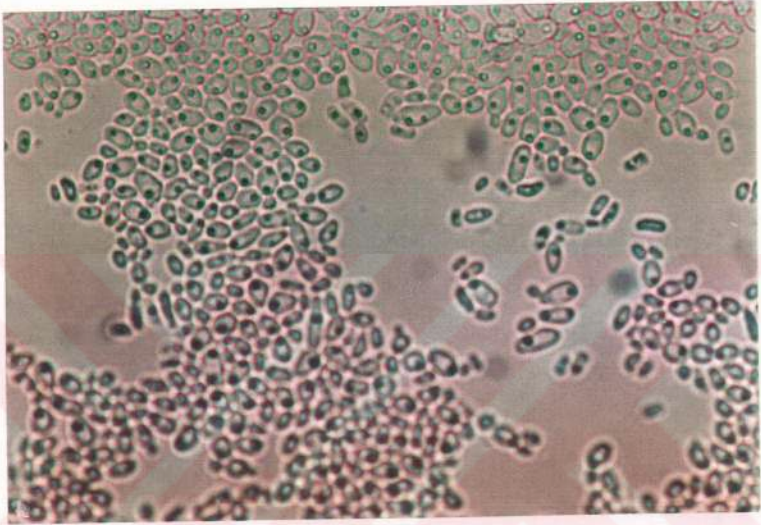
ZF = zayıf fermentasyon G = glukoz M = maltoz S = sukroz L = laktoz G = galaktoz K = ksiloz
ZA = zayıf asimilasyon R = rafinöz * = değişebilir reaksiyon.

Araştırmada çiğ süt örneklerinden 2 farklı türe ait 7 *Cryptococcus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

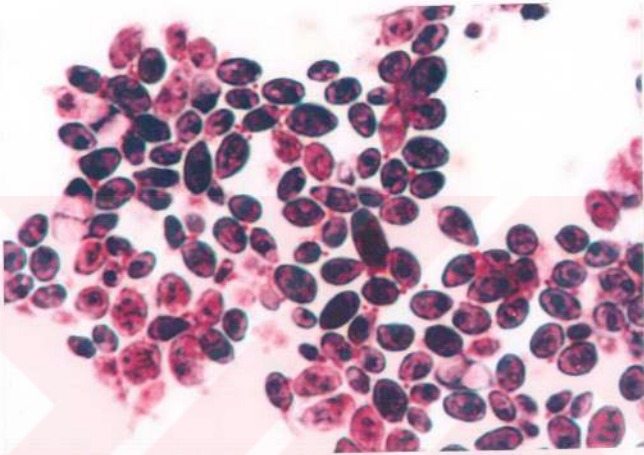
Çizelge 3.10. Çiğ sütlerden izole edilen *Cryptococcus* türlerinin dağılımları.

Çiğ sütlerden izole edilen <i>Cryptococcus</i> türleri	İzolasyon sayısı
<i>C. terreus</i>	5
<i>C. laurentii</i>	2
Toplam	7

Araştırmada izole edilen 7 *Cryptococcus* türünün 5'i *C. terreus* ve 2'side *C. laurentii* olarak bulunmuştur. (Çizelge 3.10).



Şekil 3.11. *Cryptococcus terreus* 4i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Oval, yuvarlak ve kalın duvarlı hücreler gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).



Şekil 3.12. *Cryptococcus laurentii* 2i. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından gram boyama sonucu gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm yuvarlak, oval, tomurcuklanan hücreler gözlenmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).

Çizelge 3.9. Araştırmada çalışılan *Cryptococcus* türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları(Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982)

<i>Isale Edilen Türler</i>	<i>Germ Tube Testi</i>	<i>Karbonhidrat Fermantasyon Testleri</i>	<i>Üreaz Testi</i>	<i>Karbonhidrat Asimilasyon Testleri</i>	<i>KNO₃ testi</i>	<i>Ako- spor Testi.</i>	<i>Sabun- radı brıta film.</i>	<i>Siklohek- zimitli ortamda gelişim.</i>	<i>Commercial-Tween 80 agarda mikroskopik morfoloji</i>
<i>C.guerezi</i>	-	G - S - L - Ga -	+	G + M + S - L - Ga - R - K -	+	-	-	+	yuvarek ve oval hücreler pseudohif gözetilmiyor.
<i>C.laurantii</i>	-	- - - - -	+	+	+	+	+	+	yuvarek ve oval hücreler pseudohif gözetilmiyor.

+ = pozitif reaksiyon
- = negatif reaksiyon

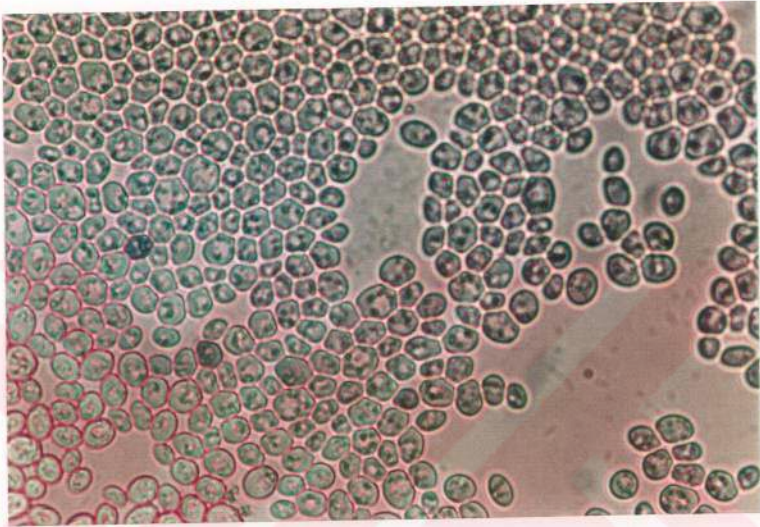
ZF = zayıf fermantasyon G = glikoz M = maltoz S = sukroz L = laktöz G = glikaktöz K = ksioz
ZA = zayıf asimilasyon R = rafinoz * = değişilbilir reaksiyon.

Araştırmada *Saccharomyces* cinsine ait 2 farklı tür izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

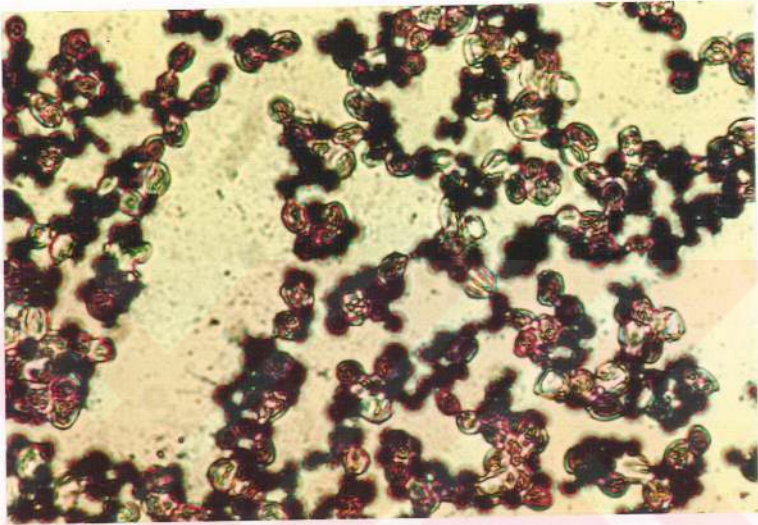
Çizelge 3.12. Çiğ sütlerden izole edilen *Saccharomyces* türlerinin dağılımları.

Çiğ sütlerden izole edilen <i>Saccharomyces</i> türleri	İzolasyon sayısı
<i>S.cerevisiae</i>	1
<i>S.delbrueckii</i>	1
Toplam	2

Araştırmada çiğ sütlerden izole edilen *Saccharomyces* türleri *S.cerevisiae* ve *S.delbrueckii* olarak bulunmuştur(Çizelge 3.12.)



Şekil 3.13. *Saccharomyces cerevisiae* 2i. Cornmeal-Tween 80 agar da 25°'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Yuvarlak ve oval hücreler, nadiren kısa pseudohifler gözlenir. İmmersiyon yağı (x100).



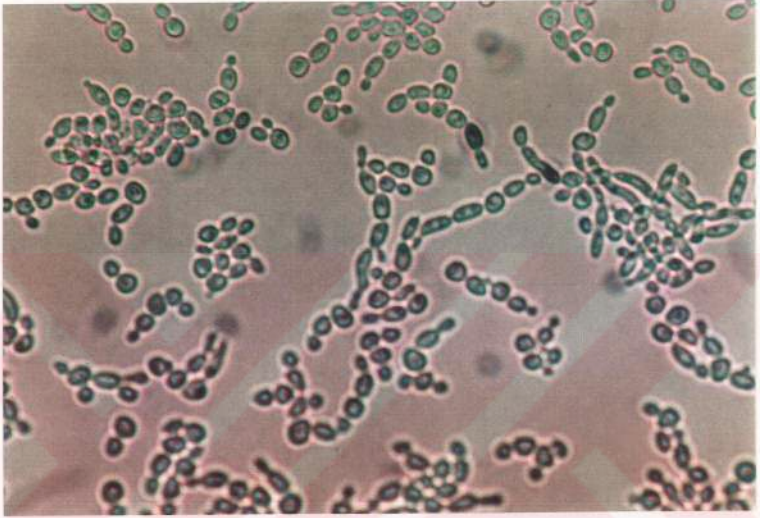
Şekil 3.14. *Saccharomyces cerevisiae*'nin askosporları. Gorodkova medium' da 37°C' de 10 gün inkübasyon sonrası yapılan gram boyamada gözlenen mikroskopik görünüm. Askuslar içinde 1-4 sayıda askospor bulunmaktadır. Blastosporlar gram (+), askosporlar gram (-) olarak boyanmaktadır, İmmersiyon yağı (x100).

Çizelge 3.13. Araştırmada çalışılan *Saccharomyces* türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları (Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tünbay, 1982)

İzole Edilen Türler	Germ Tube Testi	Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	Üreaz Testi	Karbonhidrat Asimilasyon Testleri	KNO ₃ testi	Asko- spor Testi.	Sabun- radı brota jlm.	Siklotek- zimül ortamda gelişim.	Commercial-Tween 80 agarda mikroskopik morfoloji
<i>S.cerevisiae</i>	-	G + S + L - Ga +	-	G + M + S + L Ga + R + K +	-	+	-	-	Commensal-Tween 80 agarda mikroskopik morfoloji
<i>S.mellinbeckii</i>	-	+ - - - + -	-	+ - ZA - + - ZA -	-	*	-	-	psudohif yok,yuvartık ve oval blastosporlar gözleniyor.

+ = pozitif reaksiyon
- = negatif reaksiyon

ZF = zayıf fermentasyon G = glikoz M = maltoz S = sukroz L = laktoz G = glikoliz K = ksiloz
ZA = zayıf asimilasyon R = rafinoz * = değişebilir reaksiyon.



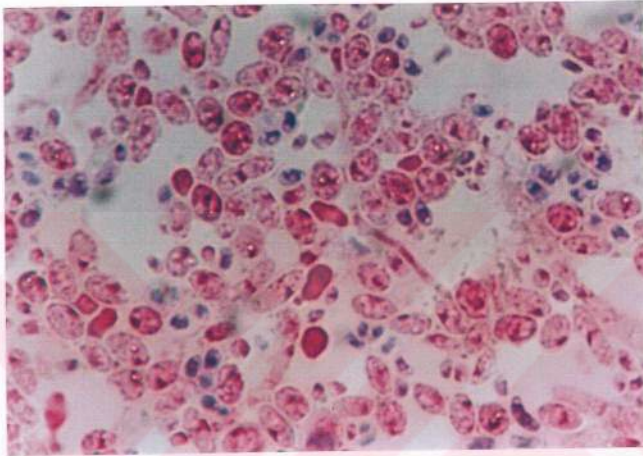
Şekil 3.15. *Saccharomyces delbrueckii*-li. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Yuvarlak oval hücreler ve tomurcuklanma gözlenmektedir. İmmersiyon yağı(x100).

Araştırmada çiğ sütlerden 2 *Rhodotorula* türü izole edilmiştir.

Çizelge 3.14. Çiğ sütlerden izole edilen *Rhodotorula* türlerinin dağılımları.

İzole edilen <i>Rhodotorula</i> türleri	<i>Rhodotorula</i> izolasyon sayısı
<i>R. flava</i>	1
<i>R. pallida</i>	1
TOPLAM	2

Çizelge 3.14.'de görüldüğü gibi izole edilen *Rhodotorula*'lar 1 *R.pallida*; ve 1'de *R. flava* türlerine ait olarak bulunmuştur.



Şekil 3.16. *Rhodotorula flava*-li. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarından yapılan gram boyama sonucu gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Hücreler yuvarlak, oval ve tomurcukludur. Nadiren primitif psimiselyum görülmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).

Çizelge 3.15. Araştırmada çalışılan *Rhodotorula* türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları
(Lodder and Kreger-Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tumbay, 1982)

İzole Edilen Türler	Çerm Tube Testi	Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	Üreaz Testi	Karbonhidrat Asimilasyon Testleri	KNO ₃ testi	Asko- spor Testi.	Sabun- rand besiyeri zar.	Siklohek- zimitli ortamda gelişim.	Mısrırın-Tween 80 agarında mikroskopik morfoloji
<i>R.flava</i>	-	G - S - L - Ga -	+	G + M + S + L + Ga + R + K +	-	-	-	+	yıvarlak ve büyük blastosporlar var.pseudohif yok
<i>R.pallida</i>	-	- - - - -	+	+	-	-	-	+	pseudohif yok,yıvar- lak ve küçük blastosporlar gözleniyor.

+ = pozitif reaksiyon
- = negatif reaksiyon

ZF = zayıf fermentasyon G = glikoz M = maltoz S = şeker L = laktoz G = galaktöz K = ksiloz
ZA = zayıf asimilasyon R = rafinoz * = değişebilir reaksiyon.

Çizelge 3.16. Çiğ sütlerden izole edilen *Sporobolomyces* türlerinin dağılımları

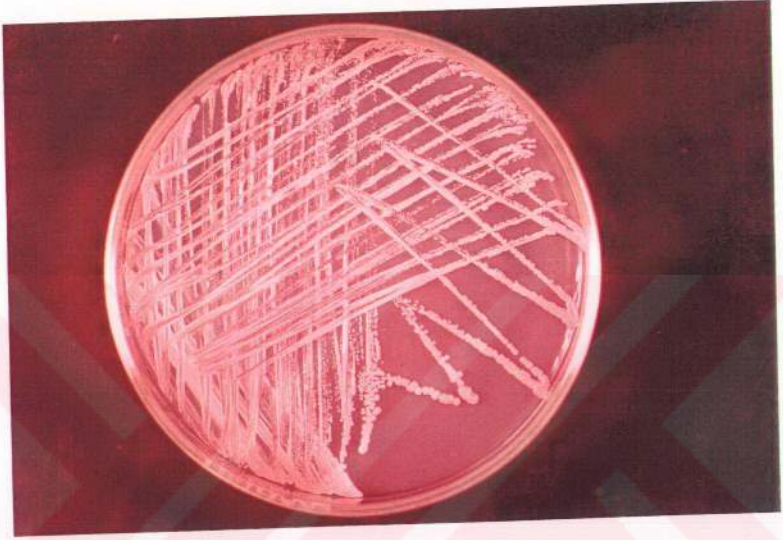
İzole edilen <i>Sporobolomyces</i> türleri	izolasyon sayısı
<i>S. albo-rubescens</i>	1

Araştırmada çiğ sütlerden tek bir *Sporobolomyces* türü izole edilmiş olup, bu tür, *S. albo-rubescens*'dir (Çizelge 3.16.)

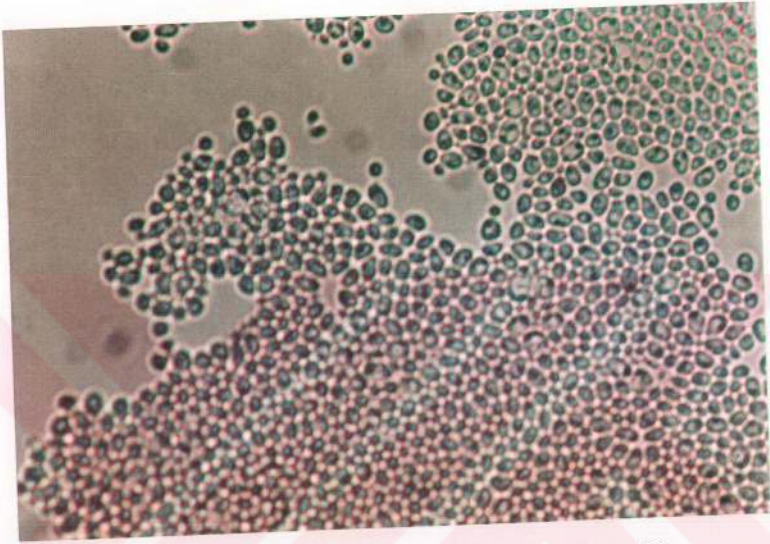
Çizelge 3.17. Araştırmada çalışılan *Sporobolomyces* türlerinin kültürel ve biyokimyasal reaksiyonları(Lodder and Kreger-

Van-Rij, 1967; Larone, 1976; Tümbay, 1982)

Isale Edilen Türler	Gum Tube Testi	Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	Üreaz Testi	Karbonhidrat Asimilasyon Testleri	KNO ₃ testi	Askor- por Testi:	Sabun- rand brota filn.	Siklohek- zimli ortamda gelişim.	Commeal-Tween 80 agarda mikroskopik morfoloji
<i>S. alba- rubescens</i>	-	G - S - L - Ga -	-	G + M + S + L - Ga + R + K +	-	-	yüzeyde çok ince bir filn var.	+	hücreler uzun-oval ya da silindirik biçimlerde
+ pozitif reaksiyon -negatif reaksiyon		ZF=zayıf fermentasyon ZA=zayıf asimilasyon		G=glikoz M=maltöz S=sikroz L=laktöz Ga=galaktöz K=ksiloz R=rafinöz *=değişebilir reaksiyon.					



Şekil 3.17. *Sporobolomyces albo-rubescens* li .Kolonilerin rengi pembedir.



Şekil 3.18 *Sporobolomyces albo-rubescens* 11. Cornmeal-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası lamel kenarında gözlenen mikroskopik morfolojik görünüm. Yuvarlak ve tomurcuklanan hücreler görülmektedir. İmmersiyon yağı, (x100).

Araştırmada çalışılan çiğ süt örnekleri, çeşitli yörelerden süt işletmelerine gelen örneklerdir. Örneklerin alındığı bu yöreler, Burdur ve yöresi, Antalya ve yöresi, Afyon, Isparta, Ankara ve yöresi, Denizli, Konya, Kütahya ve Bilecik'tir.

Araştırmada çiğ süt örneklerinin çalışıldığı yöreler ve bu yörelerden alınan örnek sayıları Çizelge 3.18.'de verilmiştir.

Çizelge 3.18. Araştırmada çalışılan çiğ süt örneklerinin yörelere göre dağılımları

Çiğ süt örneklerinin çalışıldığı yöreler	Çalışılan çiğ süt örnek sayısı	Toplam maya ve maya benzeri mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilen örnek sayısı
Burdur	33	16
Antalya	14	8
Afyon	12	2
Isparta	7	2
Ankara	6	3
Denizli	6	1
Konya	5	-
Kütahya	5	-
Bilecik	2	1
TOPLAM	90	33

Çizelge 3.18. incelendiğinde 90 çiğ süt örneğinin alındığı yöreler ve toplam maya ve maya benzeri mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilen örnek sayıları görülmektedir. Buna göre; Burdur yöresinden çalışılan 33 örneğin 16'sından; Antalya yöresinden çalışılan 14 örneğin 8'inden; Afyon yöresinden çalışılan 12 örneğin 2'sinden; Isparta yöresinden çalışılan 7 örneğin 2'sinden; Ankara yöresinden çalışılan 6 örneğin 3'ünden; Denizli yöresinden çalışılan 6 örneğin 1'inden ve Bilecik yöresinden çalışılan 2 örneğin 1'inden maya ve maya benzeri mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Konya ve Kütahya yörelerinden çalışılan 5'er örnekte ise

anılan mikroorganizmalara rastlanmamıştır.

Çizelge 3.19. Burdur ve yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.

Çalışılan Örnek No	Burdur yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Toplam izolat sayısı
1	<i>Candida albicans</i> -1i	1
2	<i>Candida catenulata</i> -3i	1
4	<i>Torulopsis gropengiesseri</i> -1i	1
10	<i>Torulopsis sphaerica</i> -10i <i>Trichosporon cutaneum</i> -1i	2
12	<i>Torulopsis candida</i> -7i <i>Candida melinii</i> -7i <i>Trichosporon fermentans</i> 2i <i>Trichosporon sericeum</i> -9i	4
13	<i>Trichosporon cutaneum</i> -4i	1
22	<i>Torulopsis candida</i> -6i <i>Torulopsis aerea</i> -16i	2
24	<i>Candida guilliermondii</i> -6i	1
36	<i>Trichosporon cutaneum</i> -7i	1
41	<i>Torulopsis candida</i> -17i	1
43	<i>Trichosporon fermentans</i> -3i	1
44	<i>Torulopsis versatilis</i> -9i. <i>Torulopsis etchellsii</i> -20i.	2
51	<i>Torulopsis famata</i> -19i. <i>Sporobolomyces albo-rubescens</i> -1i.	2
72	<i>Torulopsis candida</i> -2i. <i>Torulopsis famata</i> -11i. <i>Cryptococcus terreus</i> -4i.	3
79	<i>Trichosporon behrendii</i> -8i. <i>Cryptococcus laurentii</i> -3i.	2
82	<i>Saccharomyces delbrueckii</i> -1i.	1
Toplam 16 örnek		Toplam 26 izolat

Çizelge 3.18’de Burdur yöresinden izolasyonu gerçekleştirilen maya ve maya benzerleri görülmektedir. Araştırmada 1. örnekten *Candida albicans*-1i, 2. örnekten *C. catenulata*-3i, 4. örnekten *Torulopsis gropengiesseri*-12i, 10. örnekten *Torulopsis sphaerica*-10i ve *Trichosporon cutaneum*-1i türleri, 12. örnekten *Torulopsis candida*-7i, *Candida melinii* 7i, *Trichosporon fermentans*-2i ve *T.sericeum*-9i türleri; 13. örnekten *T.cutaneum*-4i, 22. örnekten, *Torulopsis aerea*-16i ve *T. candida*-6i türleri; 24. örnekten *Candida guilliermondii*-6i; 36. örnekten *Trichosporon cutaneum*-7i, 41. örnekten, *Torulopsis candida*-17i, 43. örnekten, *Trichosporon fermentans*-3i, 44. örnekten *Torulopsis versatilis*-9i, *T.etchellsii*-20i türleri, 51. örnekten, *T. famata*-19i ve *Sporobolomyces albo-rubescens*-1i türleri, 72. örnekten *Torulopsis candida*-2i, *T.famata*-11i, *Cryptococcus terreus*-4i, 79. örnekten, *Trichosporon behrendii*-8i ve *Cryptococcus laurentii*-3i türleri, ve 82. örnekten, *Saccharomyces delbrueckii*-1i türleri izole edilmiştir.

Araştırmada Burdur yöresinden çalışılan 33 örneğin 16’sından toplam 29 izolat elde edilmiştir.

Çizelge 3.20. Antalya ve yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları

Çalışılan Örnek No	Antalya ve yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Toplam İzolat Sayısı
16	<i>Candida krusei</i> -8i	1
27	<i>Trichosporon cutaneum</i> -10i	3
35	<i>Torulopsis famata</i> -14i <i>Trichosporon cutaneum</i> -5i <i>Cryptococcus terreus</i> -5i	2
37	<i>Torulopsis candida</i> 4i <i>Torulopsis pinus</i> -12i	1
39	<i>Torulopsis famata</i> -8i	1
48	<i>Torulopsis candida</i> -3i <i>Trichosporon capitatum</i> -6i <i>Cryptococcus laurentii</i> -2i	3
50	<i>Cryptococcus terreus</i> -7i.	1
83	<i>Candida scottii</i> -5i.	1
Toplam 8 örnek Sayısı 8		13

Çizelge 3.20’da Antalya ve yöresinden izolasyonu gerçekleştirilen maya ve maya benzerleri görülmektedir. Araştırmada çalışılan 16.örnekten *Candida krusei*-8i, 27. örnekten, *Trichosporon cutaneum*-10i, 35. örnekten *Torulopsis famata*-14i, *Trichosporon cutaneum*-5i ve *Cryptococcus terreus*-5i türleri, 37. örnekten, *Torulopsis candida*-4i ve *T.pinus*-12i türleri; 39. örnekten *T.famata*-8i, 48. örnekten, *T. candida*-3i, *Trichosporon capitatum*-6i ve *Cryptococcus laurentii*-2i türleri, 50. örnekten *Cryptococcus terreus*-7i ve 83. örnekten *Candida scottii*-5i türleri izole edilmiştir.

Antalya yöresinden çalışılan 14 örneğin 8’inden toplam 13 izolat elde edilmiştir. Diğer 6 örnekte maya ve maya benzerlerine rastlanmamıştır.

Çizelge 3.21. Afyon yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları

Çalışılan Örnek No	Afyon yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Toplam İzolat Sayısı
18	<i>Torulopsis etchellsii</i> -18i	1
80	<i>Torulopsis etchellsii</i> -5i <i>Torulopsis stellata</i> -15i.	2
Toplam 2 örnek		3

Çizelge 3.21’de Afyon yöresinden izolasyonu gerçekleştirilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar görülmektedir. 18. örnekten *T.etchellsii*-18i, 80. örnekten, *T.etchellsii*-5i ve *T.stellata*-15i türleri izole edilmiştir. Araştırmada Afyon yöresinden çalışılan 12 örneğin 2’sinden 3 izolasyon gerçekleştirilmiş; diğer 10 örnekte bu mikroorganizmalara rastlanmamıştır.

Çizelge 3.22. Isparta yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları

Çalışılan Örnek No	Isparta yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Toplam izolat sayısı
25	<i>Candida krusei</i> -8i.	1
74	<i>Candida albicans</i> -2i.	1
Toplam 2 örnek		2

Çizelge 3.22’de görüldüğü gibi Isparta yöresinden alınan 25. örnekten *C.krusei*-8i ve 74. örnekten *C. albicans*-2i türleri izole edilmiştir. Isparta yöresinden çalışılan 7 örneğin 2’sinden 2 tür izolasyonu gerçekleştirilmiş,

diğer 5 örnekten maya ve maya benzeri mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmemiştir.

Çizelge 3.23. Ankara ve yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.

Çalışılan Örnek No	Ankara ve yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Toplam İzolat Sayısı
53	<i>Rhodotorula pallida</i> -2i.	1
65	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -2i.	1
81	<i>Torulopsis pinus</i> -13i. <i>Cryptococcus terreus</i> -6i.	2
Toplam Örnek sayısı 3		4

Ankara ve yöresinden çalışılan 53. örnekten, *R.pallida*-2i, 65. örnekten, *S. cerevisiae*-2i ve 81. örnekten, *T. pinus*-13i ve *C. terreus*-6i türleri izole edilmiştir. Ankara ve yöresinden 6 örnek çalışılmış; bu örneklerin 3'ünden 4 izolasyon gerçekleştirilmiştir. (Çizelge 3.23.)

Çizelge 3.24. Denizli yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları

Çalışılan Örnek No	Denizli yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Toplam İzolat Sayısı
8	<i>C. terreus</i> -1i.	1

Denizli yöresinden çalışılan 6 örneğin 1'inden 1 izolasyon gerçekleştirilmiş olup, bu tür 8. örnekten izole edilen, *C. terreus*-1i'dir (Çizelge 3.24.).

Konya ve Kütahya yörelerinden çalışılan 5'er örnekte ise maya ve maya benzerlerine rastlanmamıştır.

Çizelge 3.25. Bilecik yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları.

Çalışılan Örnek No	Bilecik'ten izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Toplam izolat sayısı
85	<i>Rhodotorula flava</i> -li	1

Araştırmada Bilecik'ten çalışılan 2 örneğin 1'inden maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu tür 85. örnekten izole edilen *R.flava*-li. türüdür (Çizelge 3.25.).

Araştırmada, izole edilerek adlandırılan maya ve maya benzeri mikroorganizmaların proteinaz enzim aktivitesi iki farklı yöntemle çalışılmıştır.

Birinci yöntemde YCB-BSA agar besiyeri kullanılmıştır. Bu yöntem, sığır serum albumini içeren katı besiyerinde, maya ve maya benzerlerinin, proteinaz enzim aktivitelerinin gösterilmesine dayanmaktadır. Bu amaçla, YEPD besiyeri 30°C'de 12 saat bekletilen maya kolonilerinden 20 µl. alınmış ve YCB-BSA agar plaklarına yerleştirilen kuru disklere emdirilmiştir. Plaklar, 30°C'de 6 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu oluşan zonlar, çıplak gözle görülemediğinden, plaklar özel bir protein boyama çözeltisi olan "Amidoblack" ile boyanmışlardır. Boyama ve yıkama işlemi sonucunda, proteinlerin lizise uğradığı alanların boya almayarak şeffaflaşması beklenmiştir. Proteolitik aktivitenin gözlemlendiği şeffaf zon çapları ölçülmüştür. Disk çevresinde 1-2 mm'lik alanda açıklık varsa orta derecede proteolitik aktivite (+); 2 mm. den fazla alanda açıklık varsa kuvvetli proteolitik aktivite (++), açıklık hiç yoksa proteolitik aktivite yok (-) şeklinde değerlendirmeleri

yapılmıştır.

Diğer bir yöntemi test etmek amacıyla, izolatlarımız bu kez skim milk agar besiyerine inoküle edilmişlerdir. Plaklar, 37°C'de 2 gün inkübe edilmiş ve ekimi yapılan bölge etrafında zonların bulunuşu bakımından değerlendirilmişlerdir.

Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların proteinaz enzim aktivitelerinin belirlenmesinde YCB-BSA agarın kullanımı, araştırmamızda esas olarak alınan bir tekniktir.

Araştırmada diğer bir yöntem olarak Skim milk agar besiyerinde proteinaz enzim aktivitesi çalışılmıştır. Bu metod literatürlerde bir önceki metod kadar sıklıkla kullanılmamıştır. Buna rağmen biz araştırmamızda bu metodu da deneyerek, maya ve maya benzeri mikroorganizmalar için YCB-BSA agar besiyeri gibi kullanılıp kullanılamayacağını göstermeye çalıştık.

Araştırma sonucunda skim milk agarın YCB-BSA agarla paralel sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Araştırmada YCB-BSA agarda proteinaz enzim aktiviteleri değerlendirilen 20 *Torulopsis*'in 18'inde proteolitik aktivite görülmüş, diğer 2 türde ise proteolitik aktivite gözlenmemiştir

Çiğ sütlerden izole edilen *Torulopsis*'lerin YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.26.'de verilmiştir.

Çizelge 3.26. Çiğ sütlerden izole edilen *Torulopsis*'lerin YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.

İzole edilen <i>Torulopsis</i> 'ler	YCB-BSA agarda gözlenen proteolitik aktivite	Disk çevresinde gözlenen proteolitik zon çapı (mm)
<i>T. candida</i> 2i	++	4
<i>T. candida</i> 3i	+	2
<i>T. candida</i> 4i	+	2
<i>T. candida</i> 6i	+	2
<i>T. candida</i> 7i	+	2
<i>T. candida</i> 17i	+	2
<i>T. famata</i> 11i	++	3
<i>T. famata</i> 14i	++	10
<i>T. famata</i> 19i	++	3
<i>T. famata</i> 8i	++	7
<i>T. etchellsii</i> 18i	++	8
<i>T. etchellsii</i> 20i	++	9
<i>T. etchellsii</i> 5i	++	10
<i>T. pinus</i> 12i	++	10
<i>T. pinus</i> 13i	++	6
<i>T. gropengiesseri</i> 1i	-	-
<i>T. sphaerica</i> 10i	++	6
<i>T. versatilis</i> 9i	++	3
<i>T. aeria</i> 16i	-	-
<i>T. stellata</i> 15i	++	5

Çizelge 3.26. incelendiğinde 18 *Torulopsis*'in 13'ünün kuvvetli proteolitik aktivite gösterdiği görülmektedir. Bu *Torulopsis*'ler, *T. candida* 2i (4mm), *T. famata* 11i (3mm), *T. famata* 14i (10 mm) *T. famata* 19i (3 mm), *T. famata* 8i (7mm), *T. etchellsii* 18i(8mm) *T. etchellsii* 20i (9mm), *T. etchellsii* 5i (10mm), *T. pinus* 12i (10mm), *T. pinus* 13i (6mm), *T. sphaerica* 10i(6mm), *T. versatilis* 9i(3mm), *T. stellata* 15i (5mm) olarak bulunmuştur.

Proteolitik aktivitenin gözlemlendiği diğer 5 *Torulopsis* YCB-BSA agarda orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir. Bu *Torulopsis*'ler *T. candida* 3i

(2mm), *T. candida* 4i (2mm), *T. candida* 6i (2mm), *T. candida* 7i(2mm) ve *T. candida* 17i (2mm) olarak bulunmuştur.

T.gropengiesseri 1i ve *T.aeria* 16i türlerinde proteolitik aktivite gözlenmemiştir.

Araştırmada çalışılan *Torulopsis*'ler içinde en kuvvetli proteolitik aktivite *T.famata* 14i, *T.etchellsii* 5i ve *T.pinus* 12i türlerinde 10mm'lik zon çapı şeklinde gözlenmiştir (Çizelge 3.25).

YCB-BSA agarda proteinaz enzim aktiviteleri değerlendirilen 10 *Trichosporon*'un 2'si kuvvetli proteolitik aktivite göstermiş, diğerlerinde proteolitik aktivite gözlenmemiştir

Çiğ sütlerden izole edilen *Trichosporon*'ların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.27' de verilmiştir.

Çizelge 3.27. Çiğ sütlerden izole edilen *Trichosporon*'ların

YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları

İzole edilen <i>Trichosporon</i> 'lar	YCB-BSA agarda gözlenen proteolitik aktivite	Disk çevresinde gözlenen proteolitik zon çapı(mm)
<i>T. cutaneum</i> 4i	-	-
<i>T. cutaneum</i> 5i	-	-
<i>T. cutaneum</i> 1i	-	-
<i>T. cutaneum</i> 10i	-	-
<i>T. cutaneum</i> 7i	-	-
<i>T.behrendii</i> 8i	++	4
<i>T. capitatum</i> 6i	++	4
<i>T. sericeum</i> 9i	-	-
<i>T. fermentans</i> 2i	-	-
<i>T. fermentans</i> 3i	-	-

Çizelge 3.27 incelendiğinde YCB-BSA agarda *T.behrendii*-8i (4mm) ve *T.capitatum* 6i (4mm) türlerinin kuvvetli proteolitik aktivite gösterdikleri görülmektedir. *T.sericeum*, *T.cutaneum* ve *T.fermentans* türlerinde ise

proteolitik aktivite gözlenmemiştir.

Araştırmada çalışılan *Candida*'ların tümü YCB-BSA agarda proteolitik aktivite göstermiştir. 8 *Candida*'nın 7'sinde kuvvetli, 1'inde orta derecede proteolitik aktivite gözlenmiştir.

Çizelge 3.28. Çiğ sütlerden izole edilen *Candida*'ların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.

İzole edilen <i>Candida</i> türleri	YCB-BSA agar da gözlenen proteolitik aktivite değerleri	Disk çevresinde gözlenen proteolitik zon çapı (mm.)
<i>C. albicans</i> 1i	++	7.
<i>C. albicans</i> 2i.	++	5
<i>C. catenulata</i> 3i	++	6
<i>C. krusei</i> 4i	++	5
<i>C. krusei</i> 8.	++	5
<i>C. guilliermondii</i> 6i	++	4.
<i>C. melinii</i> 7i	++	6
<i>C. scottii</i> 5i	+	2

Çizelge 3.28. incelendiğinde *C. albicans* 1i (7mm), *C. albicans* 2i (6mm), *C. catenulata* 3i (6mm), *C. krusei* 4i (5mm), *C. krusei* 8i (5mm), *C. guilliermondii* 6i (4mm) ve *C. melinii* 7i (6mm) türlerinin kuvvetli proteolitik aktivite gösterdiği görülmektedir.

C.scottii 5i(2mm) suşu ise orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir.

Araştırmada, çalışılan *Cryptococcus* türlerinin tamamı YCB-BSA agarda kuvvetli proteolitik aktivite göstermiştir

Çiğ sütlerden izole edilen *Cryptococcus* türlerinin YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.29 da verilmiştir.

Çizelge 3.29. Çiğ sütlerden izole edilen *Cryptococcus*'ların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları

İzole edilen <i>Cryptococcus</i> türleri	YCB-BSA agarda gözlenen proteolitik aktivite	Disk çevresinde gözlenen proteolitik zon çapı (mm.)
<i>C. laurentii</i> 2i	++	6
<i>C. laurentii</i> 3i	++	7
<i>C. terreus</i> 1i	++	4
<i>C. terreus</i> 4i	++	4
<i>C. terreus</i> 5i	++	5
<i>C. terreus</i> 6i	++	7
<i>C. terreus</i> 7i	++	7

Çizelge 3.29. incelendiğinde, tüm *Cryptococcus* türlerinin kuvvetli proteolitik aktivite gösterdiği görülmektedir. *C. laurentii* 2i (6mm) *C. laurentii* 3i(7mm), *C. terreus* 1i (4mm), *C. terreus* 4i (4mm), *C. terreus* 5i (5mm), *C. terreus* 6i (7 mm), *C. terreus* 7i (7mm) lik zon çapı ile kuvvetli proteolitik aktivite göstermişlerdir.

Araştırmada çalışılan 2 *Rhodotorula* türü de YCB-BSA agarda kuvvetli proteolitik aktivite göstermiştir

Çiğ sütlerden izole edilen *Rhodotorula*'ların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.30. da verilmiştir.

Çizelge 3.30. Çiğ sütlerden izole edilen *Rhodotorula*'ların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.

İzole edilen <i>Rhodotorula</i> türleri	YCB-BSA agarda gözlenen proteolitik aktivite	Disk çevresinde gözlenen proteolitik zon çapı (mm).
<i>R.pallida</i> 2i	++	4
<i>R.flava</i> 1i	++	10

Çizelge 3.30. incelendiğinde *R. pallida* 2i(4mm) ve *R. flava* 1i'nin (10 mm) lik zon çapları ile kuvvetli proteolitik aktivite gösterdikleri görülmektedir.

Çiğ sütlerden izole edilen 2 *Saccharomyces* türü de YCB-BSA agarda proteolitik aktivite göstermiştir. Çiğ sütlerden izole edilen *Saccharomyces* türlerinin YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.31.de verilmiştir.

Çizelge 3.31. Çiğ sütlerden izole edilen *Saccharomyces*lerin YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları

İzole edilen <i>Saccharomyces</i> türleri	YCB-BSA agarda gözlenen proteolitik aktivite	Disk çevresinde gözlenen proteolitik zon çapı (mm.)
<i>S. cerevisiae</i> 2i	++	18
<i>S. delbrueckii</i> 1i	+	2

Çizelge 3.31. incelendiğinde, *S. cerevisiae* 2i'nin (18 mm) lik zon çapı ile kuvvetli, *S. delbrueckii* 1i türünün ise orta derecede proteolitik aktivite gösterdiği görülmektedir (2mm)

Araştırmada izole edilen *Sporobolomyces* albo-rubescens türü YCB-BSA agarda proteolitik aktivite göstermiştir.

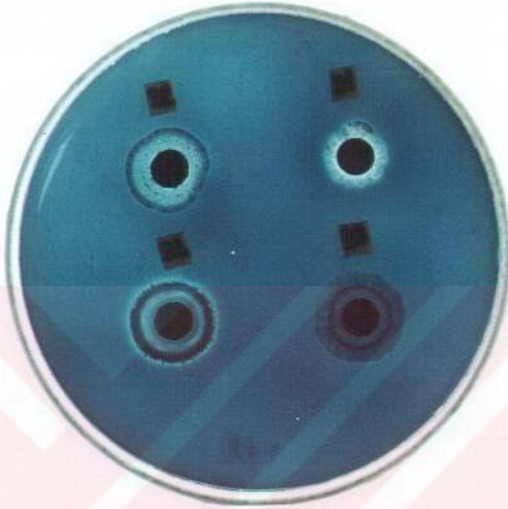
Çiğ sütlerden izole edilen *Sporobolomyces* türünün YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktivitesi Çizelge 3.32. de verilmiştir.

Çizelge 3.32. Çiğ sütlerden izole edilen *Sporobolomyces* türünün YCB-BSA agarda değerlendirilen proteolitik zon çapı

İzole edilen <i>Sporobolomyces</i> türü	YCB-BSA agarda gözlenen proteolitik aktivite değerleri	Disk çevresinde gözlenen proteolitik zon çapı (mm).
<i>S.albo-rubescens</i> 1i.	+	2

Çizelge 3.31 incelendiğinde *Sporobolomyces albo-rubescens* 1i türünün 2 mm'lik zon çapı ile orta derecede proteolitik aktivite gösterdiği görülmektedir.

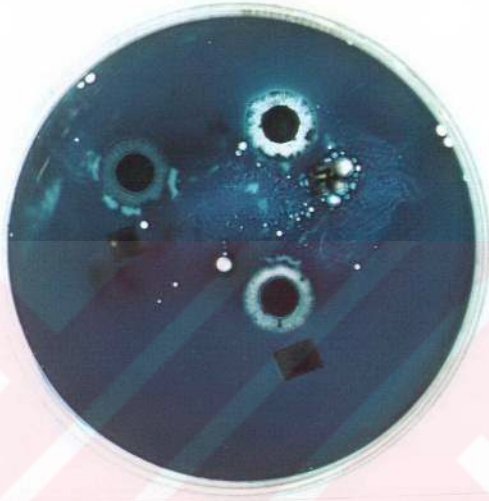
Araştırmada, YCB-BSA agarda proteolitik aktiviteleri değerlendirilen maya ve maya benzerleri içinde en kuvvetli proteolitik aktivite *Saccharomyces cerevisiae* 2i türüne ait olarak bulunmuş olup; 18 mm. lik zon çapı şeklinde belirmiştir.



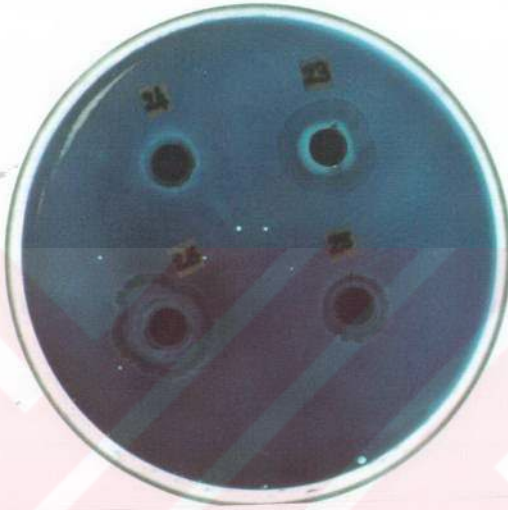
Şekil 3.19. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları 31 → *Candida melinii* 7i, kuvvetli proteolitik aktivite (6mm) 32 *Torulopsis etchellsii* 20i, kuvvetli proteolitik aktivite (9mm), 33 → *Trichosporon cutaneum* 4i, proteolitik aktivite gözlenmedi. 34 → *Rhodotorula flava* 12i, kuvvetli proteolitik aktivite (10 mm).



Şekil 3.20. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları
35 → *Cryptococcus terreus* 7i, kuvvetli proteolitik aktivite (7mm) 36 → *Trichosporon behrendii* 8i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm), 37 *Cryptococcus terreus* 4i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm) 38 → *Rhodotorula pallida* 2i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm)



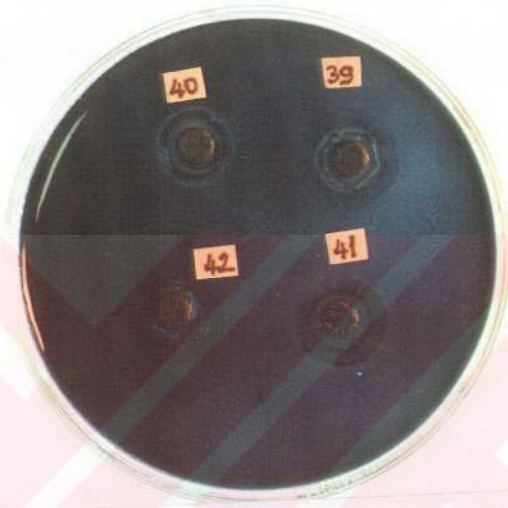
Şekil 3.21. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları. 7→*Cryptococcus laurentii* 3i, kuvvetli proteolitik aktivite (7mm)
8 →*Torulopsis sphaerica* 10i, kuvvetli proteolitik aktivite (6mm). 9 →*Torulopsis pinus* 13i, kuvvetli proteolitik aktivite (6mm).



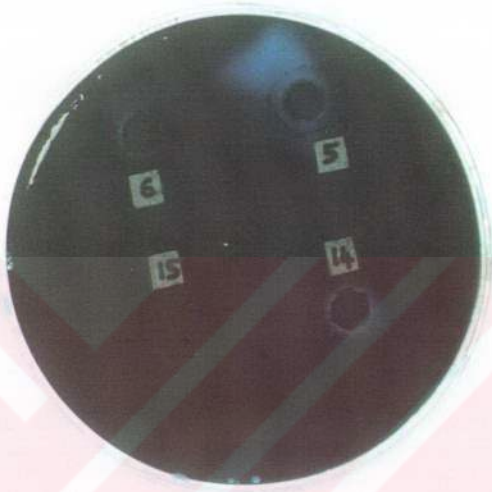
Şekil 3.22. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri, 23→ *Candida guilliermondii* 6i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm). 24 → *Candida scottii* 5i, orta derecede proteolitik aktivite (2mm). 25 → *Candida catenulata* 3i, kuvvetli proteolitik aktivite (6mm). 26→ *Candida albicans* 1i, kuvvetli proteolitik aktivite (7mm).



Şekil 3.23. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları 43 → *Candida krusei* 8i, kuvvetli proteolitik aktivite (5mm). 44 → *Torulopsis stellata* 15i, kuvvetli proteolitik aktive (5mm) 45 *Torulopsis etchellsii* 18i., kuvvetli proteolitik aktivite 8 mm 46 → *Torulopsis candida* 17i, orta derecede proteolitik aktivite (2mm).



Şekil 3.24. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri ve zon çapları
 39→ *Cryptococcus terreus* 5i, kuvvetli proteolitik aktivite (5mm). 40 → *Torulopsis famata* 14i, kuvvetli proteolitik aktivite (10mm) 41 → *Trichosporon sericeum* 10i, proteolitik aktivite gözlenmedi. 42 → *Torulopsis versatilis* 9i, kuvvetli proteolitik aktivite(3mm)



Şekil 3.25. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 5→*Saccharomyces cerevisiae* 2i, kuvvetli proteolitik aktivite (18 mm) 6 →*Saccharomyces delbrueckii* 1i, orta derecede proteolitik aktivite (2mm) 14 →*Sporobolomyces albo-rubescens* 1i, orta derecede proteolitik aktivite (2mm). 15 → *Trichosporon fermentans* 2i, proteolitik aktivite gözlenmedi.



Şekil 3.26. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların YCB-BSA agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri 47 → *Torulopsis famata* 8i, kuvvetli proteolitik aktivite (7 mm), 48 *Torulopsis gropengiesseri* 1i, proteolitik aktivite gözlenmedi. 49 *Torulopsis aerea* 18i, proteolitik aktivite gözlenmedi 50 → *Trichosporon capitatum* 6i, kuvvetli proteolitik aktivite (4mm).

Araştırmada çalışılan 20 *Torulopsis*'in 18'i Skim milk agarda proteolitik aktivite göstermiş, diğer 2 suşta proteolitik aktivite gözlenmemiştir. 18 *Torulopsis*'in 6'sı kuvvetli, 12'si orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir

Çiğ sütlerden izole edilen *Torulopsis* türlerinin Skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.32 de verilmiştir.

Çizelge 3.33. Çiğ sütlerden izole edilen *Torulopsis*'lerin Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.

İzole edilen <i>Torulopsis</i> türleri	Skim milk agarda gözlenen proteolitik aktivite	Skim Milk agarda gözlenen proteolitik zon çapı (mm).
<i>T. candida</i> 2i	+	2
<i>T. candida</i> 3i	+	2
<i>T. candida</i> 4i	+	2
<i>T. candida</i> 6i	+	2
<i>T. candida</i> 7i	+	2
<i>T. candida</i> 17i	+	2
<i>T. famata</i> 11i	+	2
<i>T. famata</i> 14	+	2
<i>T. famata</i> 19i	+	2
<i>T. famata</i> 8i	+	2
<i>T. etchellsii</i> 18i	++	3
<i>T. etchellsii</i> 20i	++	3
<i>T. etchellsii</i> 5i	+	2
<i>T. pinus</i> 2i	++	5
<i>T. pinus</i> 13i	+	2
<i>T. gropengresseri</i> 1.	-	-
<i>T. sphaerica</i> 10i	++	3
<i>T. versatilis</i> 9i	++	3
<i>T. aeria</i> 16i	-	-
<i>T. stellata</i> 15i	++	4

Çizelge 3.33. incelendiğinde Skim milk agarda kuvvetli proteolitik aktivite gösteren *Torulopsis*'ler, *T.etchellsii* 18i (3mm), *T.etchellsii* 20i

(3mm), *T.pinus* 12i (5mm), *T.sphaerica* 10i (3mm), *T.stellata* 15i ve *T.versatilis* 9i (3mm) olarak görülmektedir.

Orta derecede proteolitik aktivite gösteren *Torulopsis*ler *T. candida* 2i(2 mm), *T. candida* 3i (2mm) *T. candida* 4i (2mm), *T. candida* 6i (2 mm), *T. candida* 7i (2 mm), *T. candida* 17i (2mm) *T. famata* 11i (2mm), *T. famata* 14i (2mm), *T. famata* 19i (2mm), *T. famata* 8i (2mm), *T. etchellsii* 5i (2mm), *T. pinus* 13i (2mm) olarak bulunmuştur.

T.gropengiesseri 1i ve *T.aeria* 16i türleri proteolitik aktivite göstermemişlerdir.

Torulopsis'ler içinde *T.pinus* 12i (5mm) lik zon çapı ile en kuvvetli proteolitik aktiviteyi gösteren suş olmuştur.

Skim milk agarda çalışılan *Trichosporon*lar içinde yalnızca *T.sericeum* türünde proteolitik aktivite gözlenmemiştir. Diğer tüm *Trichosporon* türleri kuvvetli proteolitik aktivite göstermişlerdir.

Çiğ sütlerden izole edilen *Trichosporon* türlerinin Skim milk agarda deerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.34. de verilmiştir.

Çizelge 3.34. Çiğ sütlerden izole edilen *Trichosporon*'ların Skim milk agarda deerlendirilen proteolitik zon çapları

İzole edilen <i>Trichosporon</i> türleri	Skim milk agarda proteolitik aktivite	Skim milk agarda gözlenen proteolitik zon çapı (mm)
<i>T.cutaneum</i> 4i	++	4
<i>T.cutaneum</i> 5i	++	3
<i>T.cutaneum</i> 1i	++	3
<i>T.cutaneum</i> 10i	++	7
<i>T.cutaneum</i> 7i	++	3
<i>T.behrendii</i> 8i	++	3
<i>T.capitatum</i> 6i	++	3
<i>T.sericeum</i> 9i	-	-
<i>T.fermentans</i> 2i	++	6
<i>T.fermentans</i> 3i	++	7

Çizelge 3.34'de Skim milk agarda proteolitik aktiviteleri değerlendirilen *Trichosporon*'lar görülmektedir. Araştırmada 9 *Trichosporon* suşu skim milk agarda kuvvetli proteolitik aktivite göstermiştir. bu *Trichosporon*'lar, *T. cutaneum* 4i (4mm), *T. cutaneum* 5i(3mm), *T. cutaneum* 1i (3mm), *T. cutaneum* 10i (7mm), *T. cutaneum* 7i (3mm), *T. behrendii* 8i (3mm), *T. capitatum* 6i (3mm), *T. fermentans* 2i(6mm) ve *T. fermentans* 3i (7 mm) dir.

Trichosporon'lar içinde en kuvvetli proteolitik aktivite *T. cutaneum* 10i ve *T. fermentans* 7i türlerinde 7 mm 'lık zon çapı şeklinde belirmiştir.

T. sericeum 9i suşunda ise proteolitik aktivite gözlenmemiştir.

Araştırmada *Candida*'ların tamamı Skim milk agarda proteolitik aktivite göstermiştir. 8 *Candida*'nın 6'sında kuvvetli, 2'sinde orta derecede proteolitik aktivite gözlenmiştir.

Çiğ sütlerden izole edilen *Candida* türlerinin Skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.35. de verilmiştir.

Çizelge 3.35. Çiğ sütlerden izole edilen *Candida*'ların Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları

İzole edilen <i>Candida</i> türleri	Skim milk agarda gözlenen proteolitik aktivite	Skim milk agarda gözlenen proteolitik zon çapı (mm)
<i>C. albicans</i> 1i	++	4
<i>C. albicans</i> 2i	++	4
<i>C. catenulata</i> 3i	++	4
<i>C. krusei</i> 4i	++	4
<i>C. krusei</i> 8	++	4
<i>C. guilliermondii</i> 6i	+	2
<i>C. melinii</i> 7i	++	4
<i>C. scottii</i> 15i	+	2

Çizelge 3.35.'de görüldüğü gibi, *C. guilliermondii* 6i(2mm) ve *C.*

scottii 5i (2mm) suşları orta derecede, *C. albicans* 1i(4mm), *C. albicans* 2i(4mm), *C. catenulata* 3i (4mm), *C. krusei* 4i (4mm), *C. krusei* 8i (4mm), *C. melinii* 7i (4mm) suşları ise kuvvetli proteolitik aktivite göstermişlerdir.

Araştırmada *Cryptococcus* türlerinin tamamı skim milk agarda proteolitik aktivite göstermiştir. 7 *Cryptococcus*'un 5'inde kuvvetli, 2'sinde de orta derecede proteolitik aktivite gözlenmiştir.

Çiğ sütlerden izole edilen *Cryptococcus* türlerinin Skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.36. da verilmiştir.

Çizelge 3.36. Çiğ sütlerden izole edilen *Cryptococcus*ların Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.

İzole edilen <i>Cryptococcus</i> türleri	Skim milk agarda gözlenen proteolitik aktivite	Skim milk agarda gözlenen proteolitik zon çapı (mm)
<i>C. laurentii</i> 2i	++	4
<i>C. laurentii</i> 3i	++	4
<i>C. terreus</i> 1i	+	2
<i>C. terreus</i> 4i	+	2
<i>C. terreus</i> 5i	++	3
<i>C. terreus</i> 6i	++	3
<i>C. terreus</i> 7i	++	4

Skim milk agarda kuvvetli proteolitik aktivite gösteren *Cryptococcus*'lar *C. laurentii* 2i (4mm), *C. laurentii* 3i (4mm), *C. terreus* 5i (3mm), *C. terreus* 6i (3mm) ve *C. terreus* 7i (4mm) olarak bulunmuştur. *C. terreus* 1i ve *C. terreus* 4i suşları orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir.

Araştırmada çalışılan 2 *Saccharomyces* türü de skim milk agarda proteolitik aktivite göstermiştir.

Çiğ sütlerden izole edilen *Saccharomyces* türlerinin skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.37.de verilmiştir.

Çizelge 3.37. Çiğ sütlerden izole edilen *Saccharomyces*lerin Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları.

İzole edilen <i>Saccharomyces</i> türleri	Skim milk agarda gözlenen proteolitik aktivite	Proteolitik zon çapı (mm)
<i>S.cerevisiae</i> 2i	++	6
<i>S.delbrueckii</i> 1i	+	2

Skim milk agarda *S. cerevisiae* 2i türü kuvvetli (6mm), *S.delbrueckii* türünde orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir (2mm) (Çizelge 3.37.)

Araştırmada çalışılan 2 *Saccharomyces* türü de skim milk agarda proteolitik aktivite göstermiştir

Çiğ sütlerden izole edilen *Rhodotorula* türlerinin Skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri Çizelge 3.38. de verilmiştir.

Çizelge 3.38. Çiğ sütlerden izole edilen *Rhodotorulalar*ın Skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapları

Çiğ sütlerden izole edilen <i>Rhodotorula</i> türleri	Skim milk agarda gözlenen proteolitik aktivite	Proteolitik zon çapı (mm)
<i>R.pallida</i> 2i	+	2
<i>R. flava</i> 1i	++	4

Çizelge 3.38. de görüldüğü gibi Skim milk agarda *R. pallida* 2i türü orta derecede (2mm), *R. flava* 1i türü de kuvvetli proteolitik aktivite (4 mm) göstermiştir.

Araştırmada çalışılan *Sporobolomyces albo-rubescens* 1i skim milk agarda proteolitik aktivite göstermiştir

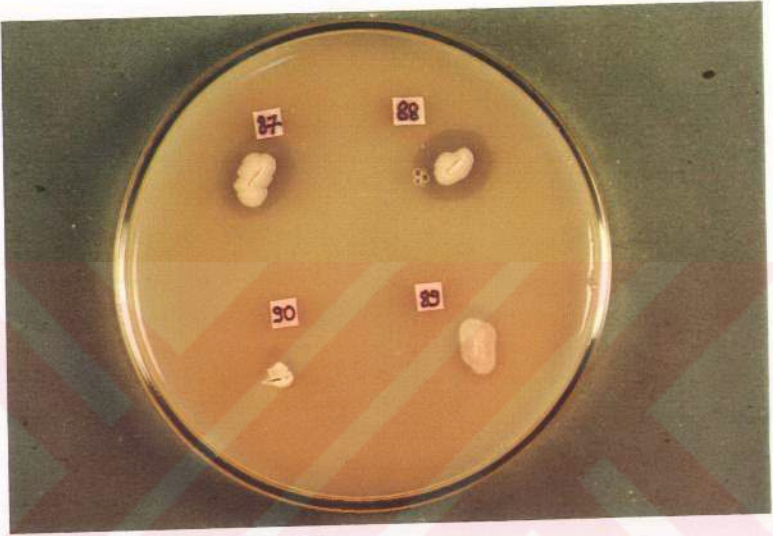
Çiğ sütlerden izole edilen tek *Sporobolomyces* türünün skim milk

agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktivitesi Çizelge 3.39.' da verilmiştir.

Çizelge 3.39. Çiğ sütlerden izole edilen *Sporobolomyces* türünün skim milk agarda değerlendirilen proteolitik zon çapı

İzole edilen <i>Sporobolomyces</i> türü	Skim milk agarda gözlenen proteolitik. aktivitesi	proteolitik zon çapı(mm)
<i>S. albo-rubescens</i> 1i	+	2

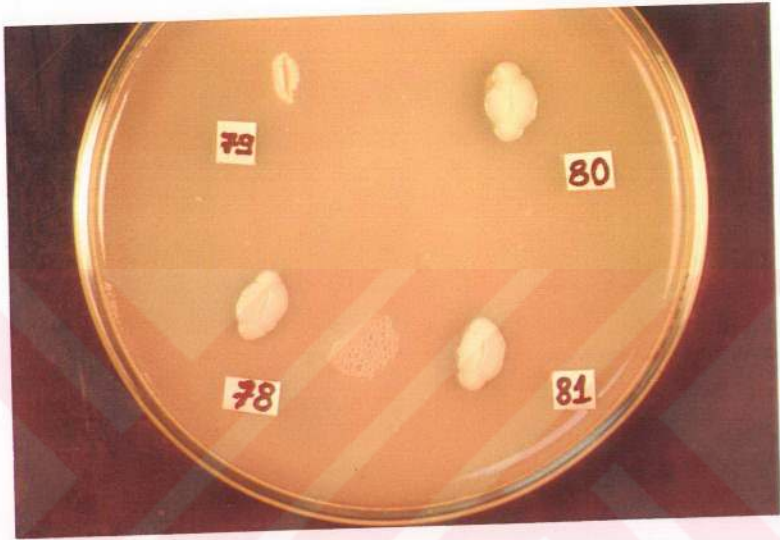
Araştırmada *S.albo-rubescens* (2mm)'lik zon çapı ile orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir (Çizelge 3.39.).



Şekil 3.27. Araştırmada izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 88 → *Candida albicans* 1i, proteolitik zon çapı 4mm, kuvvetli proteolitik aktivite. 87 → *Candida catenulata* 3i, proteolitik zon çapı 4mm kuvvetli proteolitik aktivite. 89 → *Trichosporon cutaneum* 1i, proteolitik zon çapı 3 mm, kuvvetli proteolitik. aktivite 90 → *Torulopsis candida* 17i. proteolitik zon çapı 2 mm, orta derecede proteolitik aktivite.



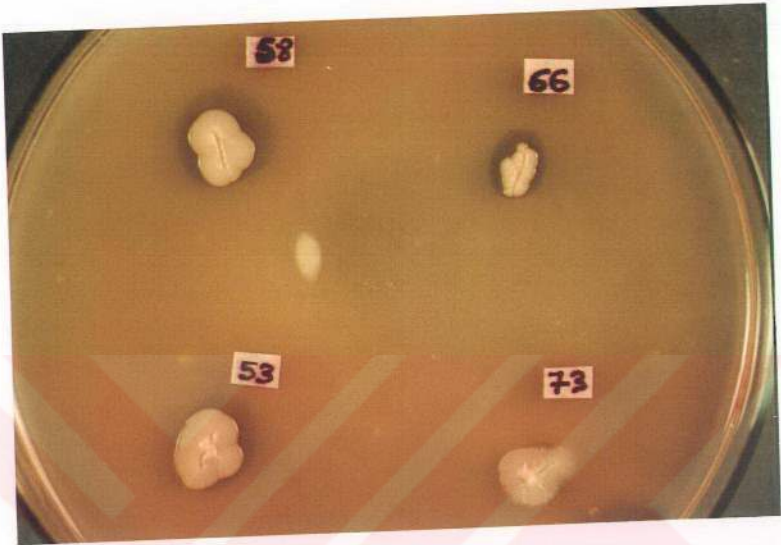
Şekil 3.28. Araştırmada izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların Skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri 75 → *Trichosporon cutaneum* 5i, proteolitik zon çapı (3 mm), kuvvetli proteolitik aktivite 74 → *Trichosporon cutaneum* 4i, proteolitik zon çapı (4mm), kuvvetli proteolitik aktivite , 76 → *Trichosporon fermentans* 2i, proteolitik zon çapı (6mm), kuvvetli proteolitik aktivite 77 → *Trichosporon fermentans* 3i, proteolitik zon çapı (7mm), kuvvetli proteolitik aktivite.



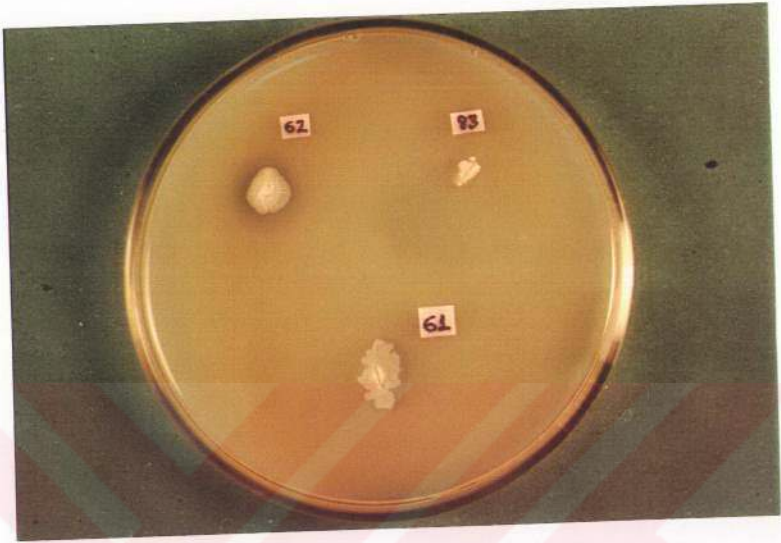
Şekil 3.29. Araştırmada izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 79 → *Torulopsis gropengiesseri* 1i, proteolitik aktivite gözlenmedi. 80 → *Torulopsis pinus* 13i, proteolitik zon çapı, 2mm (orta derecede proteolitik aktivite). 78 → *Cryptococcus laurentii* 2i, proteolitik zon çapı 4mm (kuvvetli proteolitik aktivite). 81 → *Cryptococcus laurentii* 3i, proteolitik zon çapı 4mm (kuvvetli proteolitik aktivite).



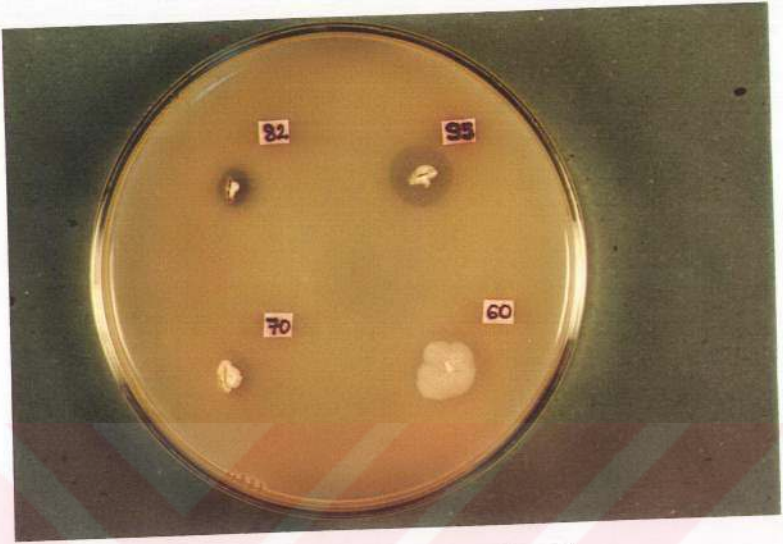
Şekil 3.30. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz proteolitik enzim aktiviteleri. 86 → *Torulopsis stellata* 5i, proteolitik zon çapı 4mm (kuvvetli proteolitik aktivite). 63 → *T.sericeum* 9i, proteolitik aktivite gözlenmedi 64 → *T.etchellsii* 5i, proteolitik zon çapı 2 mm(orta derecede proteolitik aktivite). 65 → *T.aeria* 16i, proteolitik aktivite gözlenmedi.



Şekil 3.31. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 66 → *Sporobolomyces alborubescens* 1i, proteolitik zon çapı 2mm, (Orta derecede proteolitik aktivite) 58 → *Torulopsis sphaerica* 10i proteolitik zon çapı 3 mm (kuvvetli proteolitik aktivite 73 → *Candida krusei* 8i, proteolitik zon çapı 2 mm (orta derecede proteolitik aktivite). 53 → *Rhodotorula flava* 1i, proteolitik zon çapı 4 mm (kuvvetli proteolitik aktivite).



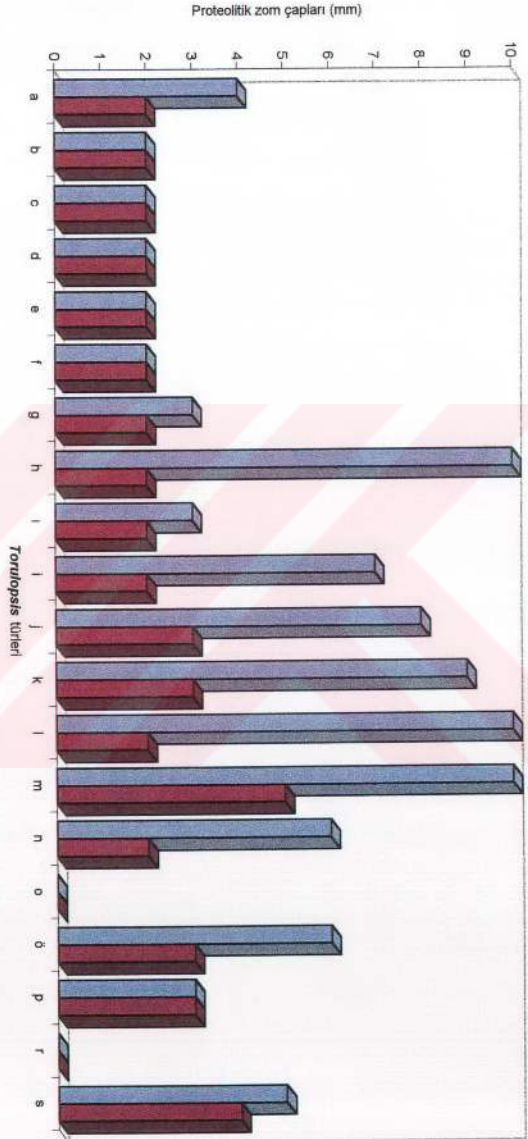
Şekil 3.32. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 83 → *Candida scottii* 5i, proteolitik zon çapı 2 mm(orta derecede proteolitik aktivite). 62 → *Candida melinii* 7i, proteolitik zon çapı 4mm (kuvvetli proteolitik aktivite). 61 → *Candida guilliermondii* 6i, proteolitik zon çapı 2 mm (orta derecede proteolitik aktivite).



Şekil 3.33. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz genzim aktiviteleri. 95 → *Saccharomyces cerevisiae* 2i, proteolitik zon çapı 6 mm (kuvvetli proteolitik aktivite). 82 → *Rhodotorula pallida* 2i, proteolitik zon çapı 2mm, (orta derecede proteolitik aktivite). 60 → *Trichosporon capitatum* 6i, proteolitik zon çapı 3 mm (kuvvetli proteolitik aktivite) 70 → *Saccharomyces delbrueckii* 1i, proteolitik zon çapı 2mm (orta derecede proteolitik aktivite).

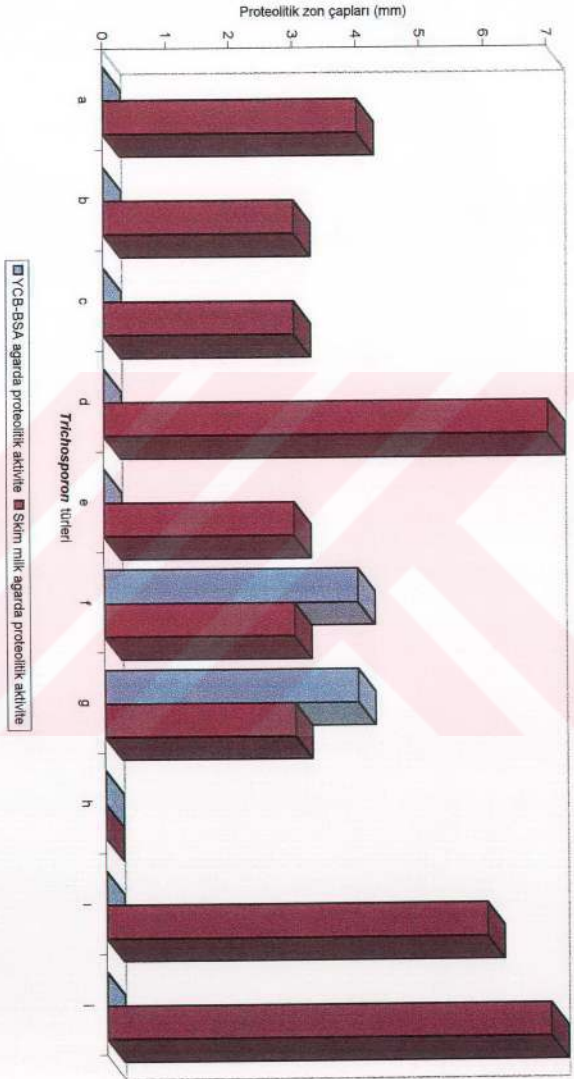


Şekil 3.34. Araştırmada izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların skim milk agarda değerlendirilen proteinaz enzim aktiviteleri. 65 → *Torulopsis versatilis* 9i, proteolitik zon çapı 2 mm, (orta derecede proteolitik aktivite). 68 → *Trichosporon behrendii* 8i, proteolitik zon çapı 3 mm, (kuvvetli proteolitik aktivite). 79 → *Cryptococcus terreus* 6i, proteolitik zon çapı 3mm (kuvvetli proteolitik aktivite). 72 → *Torulopsis famata* 11i, proteolitik zon çapı 2 mm (orta derecede proteolitik aktivite).



Şekil 3.35. Çiğ sütte izole edilen *Torulopsis*'lerin Yeast Carbon Base-Bovine Serum Albumine Agar (YCB-BSA) ve Skim Milk Agar besiyerlerinde değerlendirilen proteolaz enzim aktivitelerine bağlı zon çapları

- | | | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| a: <i>T. candida</i> 2i | e: <i>T. candida</i> 7i | i: <i>T. famata</i> 19i | ö: <i>T. sphaerica</i> 10i |
| b: <i>T. candida</i> 3i | f: <i>T. candida</i> 17i | j: <i>T. famata</i> 8i | p: <i>T. versatilis</i> 9i |
| c: <i>T. candida</i> 4i | g: <i>T. famata</i> 11i | k: <i>T. etchellsii</i> 18i | r: <i>T. aeria</i> 16i |
| d: <i>T. candida</i> 6i | h: <i>T. famata</i> 14i | l: <i>T. etchellsii</i> 20i | s: <i>T. stellata</i> 15i |
| | | m: <i>T. pinus</i> 12i | |
| | | n: <i>T. pinus</i> 13i | |
| | | o: <i>T. groenigresseri</i> 1i | |

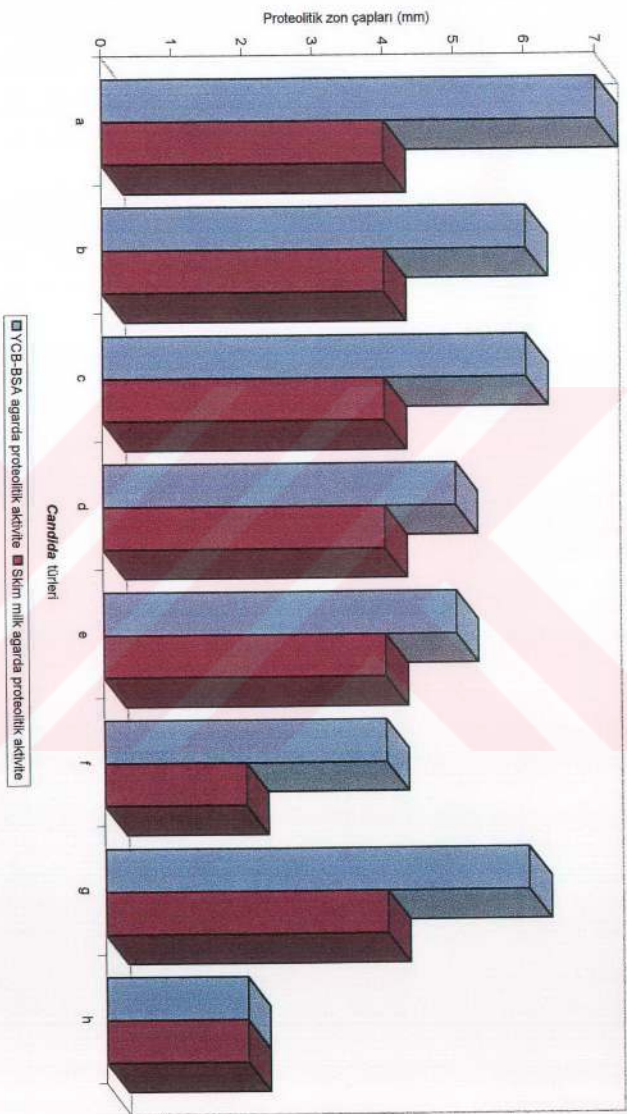


Şekil 3.36. Çiğ siltlerden izole edilen *Trichosporon*'ların Yeast Carbon Base-Bovrine Serum Albumine Agar (YCB-BSA) ve Skim Milk Agar besiyerlerinde değerlendirilen proteinaz enzim aktivitelerine bağlı zon çapları

a: *T. cutaneum* 4i
b: *T. cutaneum* 5i
c: *T. cutaneum* 1i
d: *T. cutaneum* 10i

e: *T. cutaneum* 7i
f: *T. behrendii* 8i
g: *T. capitatum* 6i

h: *T. sericeum* 9i
i: *T. fermentans* 2i
j: *T. fermentans* 3i



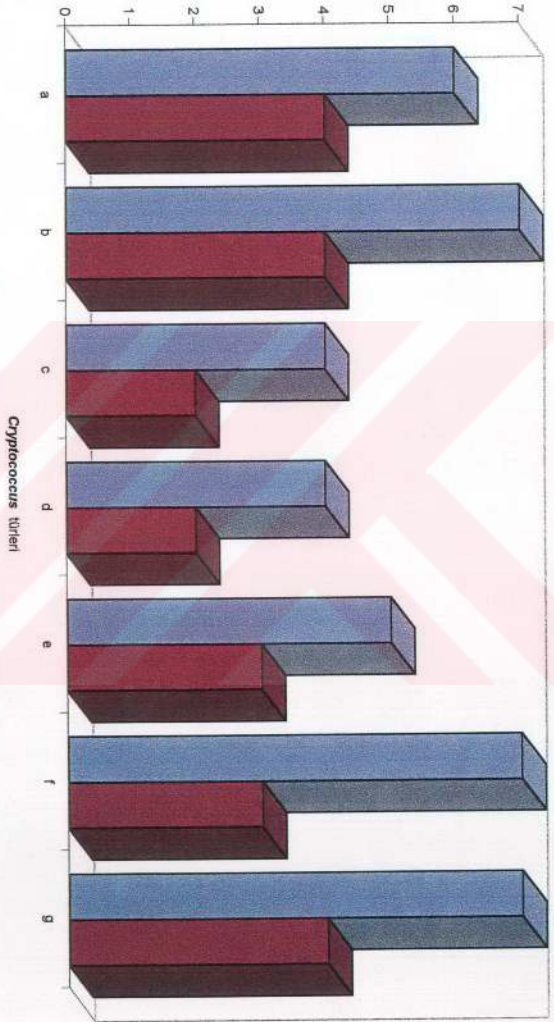
Şekil 3.37. Çiğ sütlerden izole edilen *Candida* ların Yeast Carbon Base-Bovine Serum Albumine Agar (YCB-BSA) ve Skim Milk Agar besiyerlerinde değerlendirilen proteinaz enzim aktivitelerine bağlı zon çapları

a: *C. albicans* 1i
b: *C. albicans* 2i
c: *C. catenulata* 3i

d: *C. krusei* 4i
e: *C. krusei* 8i
f: *C. guilliermondii* 6i

g: *C. melinii* 7i
h: *C. scottii* 5i

Proteolitik zon çapları (mm)



Şekil 3. 38. Çiğ sütte den izole edilen *Cryptococcus* ların Yeast Carbon Base-Bovine Serum Albumine Agar (YCB-BSA) ve Skim Milk Agar besiyerlerinde değ erlendirilen proteinaz enzim aktiv itelerine ba ğ lı zon çapları.

a: *Cryptococcus laurentii* 2i
b: *Cryptococcus laurentii* 3i

c: *Cryptococcus terreus* 1i
d: *Cryptococcus terreus* 4i
e: *Cryptococcus terreus* 5i

f: *Cryptococcus terreus* 6i
g: *Cryptococcus terreus* 7i

SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda çiğ sütlerde bozulmalara yol açan maya ve maya benzeri mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Sütler, sağımdan fabrikalara gelene kadar uzun bir süreçten geçtikleri için çeşitli nedenlerle fungal sporlarla kontamine olabilirler. Bunun yanı sıra, elle yapılan sağımlarda sütler direkt olarak bulundukları atmosferle temas halinde olduklarından yine fungal sporlarla kontamine olabilmektedirler. Sütler insanlar tarafından da en sıklıkla tüketilen gıda maddelerindendir. Bu yüzden içerdikleri patojenler açısından halk sağlığını tehdit etmektedirler.

Çiğ sütlerde bulunan maya ve maya benzeri mikroorganizmaların büyük bir kısmı saprotif sayılmakta, çok azı da potansiyel patojen olarak kabul edilmektedir. İnsan ve hayvanlarda görülen maya ve maya benzeri enfeksiyonlarında tekrarlayan mikroorganizma izolasyonu patojenite ve enfeksiyon için sıklıkla bir kriter olarak kullanılmaktadır. Özellikle insanlarda enfeksiyonlara sebep olan *Candida*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* ve *Torulopsis* cinslerine ait bazı türler klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Hayvanlarda da mastitislere sebep olan bu türler meme bezleri yoluyla süte karışabilmektedir. Özellikle mastitisli ineklerden elde edilen maya izolatlarının büyük bir kısmı *Candida* cinsi türlerine aittir.

Sütte bulunan mayaların bir kısmı patojen olabildikleri ölçüde, protein yapılarını hidrolize eden enzimleri de salgılayabilirler. Özellikle maya proteinazları peptit bağının parçalanması reaksiyonunu katalizlemektedir. Bu yüzden sütlerde bulunduklarında ekonomik açıdan kayıplara sebep olurlar.

Maya proteinazları olumsuz etkilerinin yanı sıra olumlu etkileriyle de çeşitli süt ürünlerinde örneğin peynirlerde olgunlaşma amaçları için

kullanılabilirler. Bu enzimlerin peynirlerde olgunlaşmayı hızlandırdıkları çeşitli literatürlerde belirtilmektedir. Bu nedenlerle mayalar sütlerde bulunduklarında önem taşırlar.

Araştırmamızda bütün bu düşüncelerden hareket edilerek çiğ sütlerdeki maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izole edilerek adlandırılması ve bu mikroorganizmaların proteolitik aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışılan çiğ süt örneklerinden *Candida*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* ve *Torulopsis* cinslerine ait 50 izolat elde edilmiştir. İzole edilen türler arasında sütlerde bozulmalara ve mastitislere sebep olan, ayrıca insan sağlığını tehdit eden mayalarda elde edilmiştir. Çeşitli araştırmacıların bu konuda yaptıkları çalışmalar, bizim izolasyonlarımızın önemini vurgulamaktadır.

Araştırmamızda çiğ sütlerden 20 *Torulopsis* (%40), 10 *Trichosporon* (%20), 8 *Candida* (%16), 7 *Cryptococcus* (%14), 2 *Saccharomyces* (%4), 2 *Rhodotorula* (%4) ve 1 *Sporobolomyces* (%2) cinslerine ait türler izole edilmiştir. Buna göre araştırmamızda en sıklıkla *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Candida* ve *Cryptococcus* cinsleri izole edilmiştir. *Saccharomyces*, *Rhodotorula* ve *Sporobolomyces* cinsleri ise çiğ sütlerde çok daha az yüzdelerle izole edilmiştir (bkz. Çizelge 3.1).

Araştırmamızda çiğ sütlerden 20 *Torulopsis* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlar *T. candida* (6) *T. famata* (4), *T. etchellsii* (3), *T. pinus* (2), *T. gropengiesseri* (1), *T. sphaerica* (1), *T. versatilis* (1), *T. aeria* (1) ve *T. stellata* (1) şeklinde 9 farklı türe ait olarak bulunmuştur. Buna göre en sık izole edilen *Torulopsis* türü *T. candida*'dır (bkz. Çizelge 3.4).

Araştırmamızı destekler doğrultuda Kuo ve arkadaşlarının 1993 yılındaki çalışmalarında mastitisli sütlerden *T. candida* türünün sıklıkla izole edilmesi bu türün çiğ sütlerde bulunuşunun önemini vurgulamaktadır. Yine

Jordano ve arkadaşları 1991 yılındaki çalışmalarında çiğ süt kullanılmak suretiyle elle yapılan peynirlerden maya izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. İzole edilen 145 suş içinde baskın olan türler *T. candida* (%15,9) ve *T.sphaerica* (%15,2) olarak bulunmuştur. Jordano ve arkadaşlarının 1991 yılındaki çalışmalarında 50 süt örneğinin 35'inden maya izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izolatların tamamı *T. candida* türüne ait olarak bulunmuştur. Machota ve arkadaşlarının 1987 yılındaki çalışmalarında çiğ sütlerden mastitislere sebep olan *Torulopsis*'lerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yine araştırmamız doğrultusunda Schmidt ve Lamberetin 1981 yılındaki çalışmalarında çiğ sütlerden yapılan peynirlerden % 33,8 oranında *T.sphaerica*, ve % 13,9 oranında *T. candida* türü izole edilmiştir. Wagner ve Meyrath'ın 1974 yılındaki çalışmalarında süt ürünlerinden izole edilen *Torulopsis*'ler *T. candida* türüne ait olarak bulunmuştur. Tüm bu araştırma sonuçları, bizim çalışmalarımızı desteklemektedir.

Araştırmamızda çiğ sütlerden 5 farklı türe ait 10 *Trichosporon* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatlar 5 *T.cutaneum*, 2 *T.fermentans*, 1 *T.behrendii*, 1 *T.capitatum* ve 1 *T.sericeum* türlerine ait olarak bulunmuştur. Özellikle *T.cutaneum* bulunduğu ortamda kontaminant olarak kabul edildiğinden araştırmamızda bu türün sıklıkla izolasyonu sütlerde bozulmalara ve mastitislere yol açması ve ayrıca insan sağlığı için tehlike teşkil etmesi açısından önem taşımaktadır.

Araştırmamıza paralel olarak Kuo ve arkadaşlarının 1993 yılındaki çalışmalarında mastitisli süt örneklerinden % 11 oranında *T.cutaneum* izole edilmiştir. Costa ve arkadaşları 1993 yılındaki çalışmalarında sütlerden 208 maya izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. İzolatların 21'i *T.cutaneum* türüne ait olarak bulunmuştur ve bu tür izole edilen tek *Trichosporon* türüdür. Yine araştırmamız doğrultusunda Haridy *T.cutaneum*'un halk sağlığını tehdit ettiği

ve açıkta satılan sütleri alırken dikkat edilmesi gerektiği üzerinde önemle durulmuştur. Jordano ve arkadaşları 1991 yılındaki çalışmalarında, çiğ sütlerden elle yapılan peynirlerden, Engel, 1986 yılındaki çalışmasında çiğ sütlerden; Wagner ve Meyrath 1974 yılındaki çalışmalarında çeşitli süt ürünlerinden *T.cutaneum* türünü sıklıkla izole etmişlerdir ve bu türün mastitis etkeni olabileceği üzerinde durmuşlardır. Tüm bu araştırma sonuçları bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Araştırmamızda çiğ sütlerden 6 farklı türe ait 8 *Candida* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu isolatlar 2 *C. albicans*, 2 *C. krusei*, 1. *C. catenulata*, 1 *C. guilliermondii*, 1 *C. melinii* ve 1 *C. scottii* olarak bulunmuştur. Bu izolasyonlar içinde *C. albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* ve *C. scottii*'nin mastitislere sebep oldukları ve insan sağlığını tehdit ettikleri çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmektedir. Özellikle *C. albicans* klinik açıdan çok büyük önem taşıyan bir mayadır.

Araştırmamız doğrultusunda Kuo ve arkadaşlarının 1993 yılındaki çalışmalarında mastitisli süt örneklerinden izole edilen *C. albicans* (%6,6), *C. guilliermondii* (%7,7) ve diğer *Candida* türleri izolasyonlarımızın önemini vurgulamaktadır. Yine Jordano ve arkadaşları 1991 yılındaki çalışmalarında çiğ süt kullanılarak elle yapılan peynirlerden *C. scottii* türünü sıklıkla izole etmişlerdir. Machota ve arkadaşlarının 1987 yılındaki çalışmalarında çiğ süterden mastitislere sebep olan *C. albicans*, *C. guilliermondii* ve diğer *Candida* türleri izole edilmiştir. Banks ve Board 1987 yılındaki çalışmalarında 101 süt örneğinden en sıklıkla izole edilen mayaları *Candida* cinsine ait olarak bulmuşlardır. Engel 1986 yılındaki araştırmasında çiğ sütlerden en sıklıkla izole edilen mayaların *Candida* cinsine ait olarak bulunduğu göstermiştir ve araştırmada izole edilen *C. guilliermondii* türü, bizim çalışmamızda da izole edilmiştir. Bütün bu araştırma sonuçları bizim

bulgularımızı desteklemektedir.

Araştırmamızda çiğ sütlerden 7 *Cryptococcus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu isolatlar *C.terreus* (5) ve *C.laurentii* (2) türlerine ait olarak bulunmuştur. Araştırmamıza paralel olarak Haridynin 1993 yılındaki çalışmasında süt ürünlerinden 45 maya suşu izole edilmiştir. Araştırmada suşların büyük bir miktarı *C.laurentii* türüne ait olarak bulunmuştur. Yine Costa ve arkadaşları 1993 yılındaki çalışmalarında sütlerden izole edilen 208 maya suşunun 71'ini *Cryptococcus* cinsine ait olarak bulmuşlardır. Yine araştırmamız doğrultusunda Jordano ve arkadaşlarının 1991 yılındaki çalışmalarında çiğ sütlerden elle yapılan peynirlerden 145 maya suşu izole edilmiş olup, bu suşların %40,7'si *C.laurentii* türüne ait olarak bulunmuştur. Araştırmacılar bu türün elle yapılan ve ticari olarak üretilen peynirlerde kontaminant olarak bulunduğunu ve peynirlerin olgunlaşmasında önemli olduğunu vurgulamışlardır. Machota ve arkadaşları 1987 yılındaki çalışmalarında bazı *Cryptococcus* türlerinin mastitislere sebep olduğu belirtmişlerdir. Yine Engel 1986 yılındaki çalışmasında çiğ sütlerden; Wagner ve Meyrath'da 1974 yılındaki çalışmalarında çeşitli süt ürünlerinden *C.laurentii* türünü sıklıkla izole etmişlerdir. Bu çalışmalarda bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Araştırmamızda çiğ sütlerden 2 *Saccharomyces* izolasyonu gerçekleştirilmiş olup, bunlardan biri *S.cerevisiae*, diğeri de *S. delbrueckii* türlerine ait olarak bulunmuştur. Çiğ sütlerde *S.cerevisiae*'nin bulunuşu mastitislere yol açması ve insan sağlığı için tehlike teşkil etmesi bakımından çok önemlidir. Araştırmamız doğrultusunda Kuo ve arkadaşları 1993 yılındaki çalışmalarında mastitisli sütlerden % 1.1 oranında *S.cerevisiae* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Yine araştırmamıza paralel olarak Schmidt ve Lamberet'in 1981 yılındaki çalışmalarında çiğ sütlerden yapılan peynirlerden

523 maya izolasyonu gerçekleştirmiştir. İzolasyonların % 5,4'ü *S.cerevisiae* olarak bulunmuştur. Araştırmacıların sonuçları bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Araştırmamızda izole edilen mikroorganizmaların proteolitik aktivitelerinin değerlendirilmesinde YCB-BSA agar ve Skim milk agar olmak üzere iki farklı besiyeri kullanılmıştır. Maya proteinazları asit pH'da yüksek bir aktivite gösterdiklerinden YCB-BSA agarda pH 5'e Skim milk agarda da pH 6 ya ayarlanarak çalışılmıştır. İzolatlar YCB-BSA agarda 30°C'de 6 gün; Skim milk agarda 37°C de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında her iki besiyeri de paralel sonuçlar vermiştir. Ancak YCB-BSA agar besiyeri, Skim milk agar besiyerine göre daha kuvvetli proteolitik aktivite göstermiştir. Araştırmada kullanılan YCB-BSA agar besiyerinin Skim milk agara oranla daha asit bir pH da oluşunun proteolitik aktiviteyi artırdığı düşünülebilir.

YCB-BSA agar maya ve maya benzerlerinin proteolitik aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan spesifik bir besiyeridir. Skim milk agar ise çeşitli bakteri ve fungusların proteinaz enzim aktivitelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmakla beraber, birkaç araştırmacı mayalar içinde bu besiyerini kullanmışlardır. Bizde araştırmamızda bu literatürlere dayanarak bu besiyerini de kullandık.

İzolatların proteolitik aktiviteleri kullanılan kültür ortamına güçlü olarak bağlıdır. Bu yüzden iki besiyeri arasındaki zon farklılıkları besiyerlerine bağlı olarak açıklanabilir. Araştırmamızda maya izolatlarının çok büyük bir kısmı her iki besiyerinde de birbirine paralel proteolitik aktivite göstermiştir. Ancak çalışılan bazı *Trichosporon* türleri iki besiyerinde farklı sonuçlar vermiştir. *T.cutaneum* ve *T.fermentans* suşlarının tümü skim milk agarda kuvvetli proteolitik aktivite gösterirken, YCB-BSA agarda proteolitik aktivite

göstermemiştir. *Trichosporon*lar için YCB-BSA agar, skim milk agar besiyeri kadar uygun olmayabilir.

Araştırmamıza paralel olarak Kobatake ve arkadaşlarının 1992 yılında, Lazarus ve Kaburger'in 1973 yılındaki çalışmalarında izole edilen tüm *Trichosporon*'lar Skim milk agar besiyerinde kuvvetli proteolitik aktivite göstermişlerdir. Araştırmamızda çalışılan *Trichosporon*lar içinde en kuvvetli proteolitik aktivite Skim milk agar besiyerinde *T.cutaneum* 10 i ve *T.fermentans* 3i suşlarında 7 mm'lik (++) zon çapı şeklinde belirlemiştir. Aynı suşlar YCB-BSA agarda proteolitik aktivite göstermemiştir. Yine Kobatake ve arkadaşlarının 1992 yılında yapmış olduğu çalışmada *T.cutaneum* türleri Skim milk agar besiyerinde en kuvvetli proteolitik aktiviteyi gösteren suşlar olarak görülmüştür.

Araştırmamızda çalışılan *Candida* türlerinin tümü de her iki besiyerinde proteolitik aktivite göstermişlerdir. *C.scottii* 5i suşu haricinde tüm *Candidalar*ın iki besiyerinde gösterdiği sonuçlar karşılaştırıldığında izolatlar YCB-BSA agarda skim milk agara oranla daha kuvvetli proteolitik aktivite göstermişlerdir. *C.scottii* 5i suşu her iki besiyerinde de orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir. *Candida*'lar içinde en kuvvetli proteolitik aktivite *C.albicans* 1i suşunda YCB-BSA agarda 7 mm (++) olarak belirlemiştir. YCB-BSA agarda 8 suşun 7'si (++) ,1'i (+) proteolitik aktivite; Skim milk agarda ise 8 suşun 6'sı (++) , 2'si (+) proteolitik aktivite göstermiştir.

Araştırmamız doğrultusunda Karabıçak ve arkadaşları 1996 yılındaki çalışmalarında hasta ve sağlıklı bireylerden izole ettikleri *Candida* türlerinin proteinaz enzim aktivitelerini çalışmışlardır. Bu amaçla YCB-BSA agar (PH 5) besiyeri kullanılmıştır. Klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* suşlarının % 73,9'unda; sağlıklı bireylerden izole edilen *C.albicans* suşlarının da % 29,4'ünde proteinaz enzim aktivitesi gözlenmiştir. Klinik izolatlarda proteolitik

aktivitenin daha yüksek oranda bulunmasının proteinaz aktivitesinin patojenitedeki önemini destekleyeceği vurgulanmıştır. Yine Uzun ve arkadaşlarının 1996 yılındaki çalışmalarında hasta ve sağlıklı bireylerden izole edilen *C.albicans* suşlarının proteinaz enzim aktiviteleri YCB-BSA agarda (PH 4,5) değerlendirilmiştir. Hasta bireylerden izole edilen *C.albicans*'ların sağlıklı bireylerden izole edilenlere göre daha yüksek oranda proteolitik aktivite göstermelerinin patojenite kriteri olabileceğine dikkat çekilmiştir.

Araştırmamızda Bovine Serum Albumine içeren agar ortamına Yeast Carbon Base eklenmiş ve güçlü bir proteolitik aktivite gözlenmesi amaçlanmıştır. Rüchel ve arkadaşlarının 1982'deki araştırmalarında klinik örneklerden izole edilen 113 *C.albicans* suşunun proteinaz enzim aktivitesi 3 farklı besiyeri kullanılarak test edilmiştir. Araştırmacılar Staib'in BSA besiyeri, Yeast extract- BSA besiyeri ve vitamin eklenmiş YCB-BSA agar besiyerlerini kullanmış ve izolatları 26°C'de 10 gün inkübasyona bırakmışlardır. Plaklar amidoblack boyasıyla boyanmış ve sonuçta Staibin BSA agar besiyerinde yalnızca birkaç suş güçlü proteolitik aktivite göstermiştir. BSA agar ortamına yeast ekstrakt yada vitamin eklenmiş Yeast Carbon Base katılmasıyla proteolitik aktivite oranında çok büyük bir artış gözlenmiştir. Araştırmacının sonuçları bulgularımızı desteklemektedir.

Araştırmamız doğrultusunda Kobatake ve arkadaşlarının 1992 yılında yaptıkları çalışmada *Candida*'ların proteolitik aktiviteleri Skim milk agar kullanılarak çalışılmıştır. Çalışılan tüm *Candidalar* proteolitik aktivite göstermiş özellikle *C.scottii* suşunda güçlü bir proteolitik aktivite gözlenmiştir.

Araştırmada çiğ sütlerden 2 *Saccharomyces* suşu izole edilmiş olup, *S.cerevisiae* ve *S.delbrueckii* türlerine aittir. Bunlardan *S.cerevisiae* 2i suşu YCB-BSA agarda çalışılan tüm izolatlar içinde, 18 mm'lik (++) zon çapıyla en kuvvetli proteolitik aktiviteyi gösteren suş olarak bulunmuştur. Aynı suş skim

milik agarda 6mm.lik (++) zon çapıyla yine kuvvetli proteolitik aktivite göstermiştir. *S.delbrueckii* 1i suşu ise her iki besiyerinde de 2 mm.lik (+) zon çapıyla orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir.

Halasz ve arkadaşlarının 1993 yılında, Bilinski ve arkadaşlarının 1987 yılında, Saz ve arkadaşlarının 1977 yılında yaptıkları araştırmalarda proteolitik aktiviteleri değerlendirilen mayalar içerisinde en kuvvetli proteolitik aktivite *S.cerevisiae* suşlarında gözlenmiştir. Sonuçlarımız bu araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Araştırmamızda izole edilen 20 *Torulopsis*'in 6'sı *T. candida*, 4'ü *T.famata*, 3'ü *T.etchellsii*, 2'si *T.pinus*, 1'i *T.gropengiesseri*, 1'i *T.sphaerica*, 1'i *T.versatilis*, 1'i *T.aeria*, 1'i de *T.stellata* olarak adlandırılmıştır. 20 *Torulopsis*'in proteinaz enzim aktiviteleri her iki besiyerinde değerlendirildiğinde YCB-BSA agarda 20 suşun 13'ünde kuvvetli (++) , 5 inde orta derecede (+) proteolitik aktivite gözlenmiştir. Skim milk agarda ise 20 suşun 6'sı kuvvetli (++) , 12'si orta derecede (+) proteolitik aktivite göstermiştir. YCB-BSA agarda en kuvvetli proteolitik aktivite *T.famata*14i, *T.etchellsii* 5i ve *T.pinus* 12i türlerinde 10 mm.lik zon çaplarıyla belirmiştir. Skim milk agarda ise proteolitik aktivite daha zayıf olarak belirlenmiştir ve en kuvvetli proteolitik aktivite *T.pinus* 12i suşunda 5 mm.lik zon çapı şeklinde görülmüştür.

Araştırmamıza paralel olarak Lagace ve Bisson 1990 yılındaki çalışmalarında mayalarda asit proteaz üretiminin tespiti için BSA içeren agar ortamı kullanmışlar ve *Torulopsis* türlerinde kuvvetli proteolitik aktivite tespit etmişlerdir. Bu araştırma sonuçları da bulgularımızı desteklemektedir.

Araştırmamızda izole edilen 7 *Cryptococcus*'un iki besiyerindeki (YCB-BSA agar ve skim milk agar) proteolitik aktiviteleri karşılaştırıldığında

izolatların YCB-BSA agarda daha kuvvetli proteolizis oluşturdıkları gözlenmiştir. 7 *Cryptococcus*un tamamı YCB-BSA agarda kuvvetli (++) proteolitik aktivite göstermiştir. Skim milk agarda ise izolatların 5'i kuvvetli (++) 2'si orta (+) derecede proteolitik aktivite göstermiştir. *Cryptococcus*'lar içinde *C.laurentii* 3i *C.terreus* 6i ve *C.terreus* 7i YCB-BSA agarda 7 mm'lik (++) zon çapıyla en kuvvetli proteolitik aktiviteyi gösteren suşlar olarak bulunmuştur. Skim milk agarda ise *C.laurentii* 2i, *C.laurentii* 3i ve *C.terreus* 7i 4 mm'lik (++) zon çapıyla en kuvvetli proteolitik aktiviteyi gösteren suşlar olarak bulunmuşlardır.

Kobatake ve arkadaşları 1992 yılında Skim milk agar besiyeri kullanarak, Lagace ve Bisson'da 1990 yılındaki çalışmalarında BSA içeren MYPG agar besiyeri kullanarak çeşitli *Cryptococcus* türlerinde kuvvetli proteolitik aktivite bulunduğunu göstermişlerdir. Sonuçlarımız bu araştırmalarla paralellik göstermektedir.

Araştırmamızda izole edilen 2 *Rhodotorula* türü her iki besiyerinde de proteolitik aktivite göstermiştir. *R.flava* 1i suşu YCB-BSA agarda 10 mm'lik (++) , Skim milk agarda da 4 mm'lik (++) zon çapıyla orta derecede proteolitik aktivite göstermişlerdir. Araştırmamız doğrultusunda, Kobatake ve arkadaşlarının 1992 yılındaki çalışmalarında skim milk agar kullanarak çeşitli *Rhodotorula*'ların proteolitik aktiviteleri çalışılmıştır. *Rhodotorula*'lar çeşitli derecelerde proteolitik aktivite göstermiştir. Araştırmacıların sonuçları bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Araştırmamızda tek *Sporobolomyces* türü olarak *S.albo-rubescens* izole edilmiş olup ,her iki besiyerinde de 2mm lik zon çapıyla orta derecede proteolitik aktivite göstermiştir.

Araştırmamıza paralel olarak Lazarus ve Kaburger'in 1973 yılındaki

çalışmalarında proteolitik mayaların identifikasyonları için %4 jelatin içeren standart Plate Count Antibiyotik agar besiyeri kullanılmış ve çeşitli *Sporobolomyces* türleri izole edilmiştir. Bu mayaların oksidatif metabolizmaya sahip oldukları ve sütlerdeki proeinleri parçalayabildikleri vurgulanmıştır. Araştırmacıların sonuçları bulgularımızı desteklemektedir.

Araştırmamızda maya ve maya benzerlerinin çiğ sütlerden izolasyonu için Ringer solüsyonunda yapılan desimal dilüsyonlardan SDA besiyerine ekimler gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bu mikroorganizmaların adlandırılabilmesi amacıyla morfolojik ve biyokimyasal özellikler kullanılmıştır. Çeşitli araştırmacılar mayaların adlandırılmasında bizim kullandığımız yöntem ve testleri takip etmişlerdir.

Araştırmamıza paralel olarak Machota ve arkadaşlarının 1987 yılındaki çalışmalarında çiğ süt örneklerinin desimal dilüsyonlarını Ringer solüsyonunda gerçekleştirmişler ve izolasyon amacıyla SDA besiyerini kullanmışlardır. Yine Engel 1986 yılındaki araştırmasında çiğ süt örneklerinin dilüsyonlarını Ringer solüsyonunda gerçekleştirmiştir. Yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucu Lodder ve Kreger-Van-Rij'in identifikasyon anahtarı esas alınarak maya izolatları - adlandırılmıştır. Bizim araştırmamızda da Lodder and Kreger-Van-Rij'in identifikasyon anahtarı esas alınmıştır.

Sandven 1990 yılındaki araştırmasında mayaların adlandırılmasında izlenen prosedürleri ve uygulanan testleri açıklamıştır. Araştırmada mayaların identifikasyonunun morfolojik ve biyokimyasal reaksiyonlara bağlı olduğu belirtilmiştir. Bu amaçla SDA besiyerinde izolasyon, Germ tüp testi, sıvı ortamda zar oluşumu ve sikloheksimitli ortamda gelişim testlerinin kullanımı açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda da maya izolatlarının adlandırılması amacıyla bu testler yapılmıştır.

Quadri ve arkadaşları 1986 yılındaki araştırmalarında mayaların identifikasyonunda kullanılan maya izolatlarının adlandırılması bu ticari ve geleneksel metodları tartışmışlardır. Bu çalışmada kullanılan prosedürler Wickerham fermentasyon ve asimilasyon ortamının kullanımı, Christensen Urea Agar, germ tüp testi, Mısırunu - Tween 80 agarda mikroskopik morfolojik görünüm, Saburo besiyeri zar oluşumu ve askospor testlerini kaspamaktadır. Kùltürler SDA besiyerinde korunmuştur. Araştırmacılar ticari ve geleneksel metodların güvenilir olduğunu belirterek, ticari metodların kısa zamanda sonuç verdiği ve çok pahalı olduğunu, geleneksel metodların ise uzun zaman almasına rağmen ekonomik ve güvenilir olduğunu vurgulamaşlardır. Bizim araştırmamızda da izolatların adlandırılması geleneksel yöntemlerle yapılmıştır.

Sonuç olarak çiğ sùtlerden izolasyonlarını gerçekleştirdiğimiz *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* ve *Sporobolomyces*'lerin proteolitik aktiviteleri gösterilerek, sùtlerde bulunma sıklıkları ve önemleri vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR

Amemiya, J., Tashiro, T., 1979, The fungi contaminating in raw milk, Bull. Fac. Agric., 29, 121-126.

Banks, J., Board, R., 1987, Some factors influencing the recovery of yeast and moulds from chilled foods, International Journal of foods Microbiology, 4, 3, 197-206.

Bilinski, C. A, Russell, I., Stewart, G., 1987, Applicability of yeast extracellular proteinases in brewing: physiological and biochemical aspects, Applied and Environmental Microbiology, 53, 3, 495-499.

Carrasco-De Mendoza, 1988, Taxonomic study of yeast strains isolated in dairy products, Revista de la Facultad de ingenieria Quimica Universidad nacional del litoral, 48, 29-36.

Chengappa, M., Maddux, R., Greer, S., Pincus, D., Geist, L., 1984, Isolation and identification of yeast and Yeast-like organisms from clinical veterinary sources, Journal of Clinical Microbiology, 427-428.

Cooper, S., Silva-Hutner, M., 1985, Yeasts of medical importance Manual of Clinical Microbiology, In E. Lennette, A. Balows, W. Hausler, H. Shadomy, Manual of clinical microbiology, 4th. ed. American Society for Microbiology, Washington, 526-541.

Coppola, S., Parente, E., Dumontet, S., Peccerella, A., 1988, The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk, Lait, 68, 3, 295-309.

Costa, E., Gandra, C., Pires, M., Coutinho, S., Castilho, W., Teixeira, C.,
1993, Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the state of
Sao Paulo Brazil, *Mycopathologia*, 124, 1, 13-17.

Çetin, E., 1983, Endüstriyel Mikrobiyoloji, İst.Üniv.Mikrobiyoloji ve
Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı, 86-90, İstanbul, Türkiye.

Emmons, C., Binford, C., Utz, J., Chung, K., 1977, *Medical Mycology*, 185-
226.

Engel, G., 1986, Yeasts in silage and raw milk, *Milchwissenschaft*, 41, 10,
633-637.

Engel, G., 1986, Yeasts and moulds in feed, raw milk and milk products,
Deutsche Molkerei Zeitung, 107, 39, 1286-1288.

Fatichenti, F., Farris, F., 1973, Yeasts from Sardinian ewes milk, *Scienze
Tecnica Lattiero Casearia*, 24, 6, 386-390.

Fleet, G., Mian, M., 1987, The occurrence and growth of yeast in dairy
products, *International Journal of Food Microbiology*, 4, 2, 145-155.

Fucal, L., Kas, J., Rauch, P., 1986, Properties of yeast proteinases, *Journal of
the Institute of brewing*, 92, 4, 357-359.

Garrido, M., Inigo, B., Barcenilla, J., 1991, Microbiological and physiological
study of Aracena cheese yeast microflora, *Chemie Microbiologie*

Technologie, der Lebensmittel, 13, 112, 4-6

Germaine, G., Tellefson, L., Johnson, G., 1978, Proteolytic activity of *Candida albicans*: Action on Human Salivary Proteins, Infection and Immunity, 22, 3, 861-866.

Guerzoni, M., Lanciotti, R., Marchetti, R., 1993, Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods, International Journal of Food Microbiology, 17, 4, 329-341.

Haridy, M., 1992, Yeast flora of raw milk in El-Minia city, Egypt, Cryptogamie, Mycologie, 1992, 13, 4, 321-326.

Ibanez, A., Altuna, B., Diaz de Villegas, M., 1992, Effect of Different Nitrogen and Carbon Sources on the proteolytic activity, Acta Biotechnol., 12, 3, 187-190.

İnal, T., 1990, Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi, 34-50, İstanbul.

Jordano, R., Medina, L., Salmeron, J., 1991, Contaminating mycoflora in fermented milk, Journal of Food Protection, 54, 2, 131-132.

Karabıçak, N., Akbaş, E., Güvener, E., 1996, Patojen *Candida* türlerinde Salgısal Asit Proteinaz varlığının araştırılması, XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 1996, Antalya.

Karlson, P., 1992, Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya, 155-160, İstanbul.

- Keay, L., Moseley, M., Anderson, R., Q'connor, R., Wild, B., 1972,
Production and Isolation of Microbiological Proteases, *Biotechnol & Bioeng. Symp*, 3, 63-92.
- Kobatake, M., Kreger-Van-Rij, N., Placido, M., Uden, N., 1992, Isolation of
proteolytic psychrotrophic yeasts from fresh raw seafoods, *Letters in Applied Microbiology*, 14, 2, 37-42.
- Kuo, C., Chang, C., 1993, Isolation of fungi from mastitis milk of dairy cattle,
Journal of the Chinese Society of Veterinary Science, 19, 4, 221-227.
- Lagace, L., Bisson, L., 1990, Survey of yeast acid proteases for effectiveness
of wine haze reduction, *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 2, 147-155.
- Larone, H., 1976, *Medically Important Fungi: A guide to Identification*,
Harper and Row publisher, Hagerston, 35-43.
- Lazarus, C., Koburger, J., 1973, Identification of proteolytic yeasts from meats
and seafoods, *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, 73, 24.
- Lodder, J., Kreger-Van-Rij, N., 1967, *The Yeast, A Taxonomic Study*, North
Holland Publishing Company Amsterdam, 2nd. ed.

- Machota, V., Paya Vicens, M., Cutuli de Simon, M., Suarez Fernandez, G., 1987, Raw milk mycoflora, *Milchwissenschaft*, 42, 2.
- Nakae, T., Yoneya, T., 1976, Yeasts in raw milks, *Jap. J. Dairy Food Sci*, 25, A113-A118.
- Patel, G., Ingledev, W., Blankenagel, G., 1972, A heat stable microbial proteolytic enzyme produced in milk, *Canadian, Institute of Food Technology Journal*, 5, 3, 145-148.
- Qadri, S., Flournay, D., Qadri, G., Ramirez, E., 1986, Rapid identification of yeasts by semi-automated and conventional methods, *Med. Microbiol. Immunol*, 157, 307-316.
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., Braeues, M., 1992, Diversity of yeasts in selected dairy products, *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 5, 370-376.
- Rohm, H., Lechner, F., 1990, Evaluation and reliability of a simplified method for identification of food-borne yeasts, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 5, 1290-1295.
- Rüchel, R., Tegeler, R., Trost, M., A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*, *Sabouraudia*, 1982, 20, 233-244.
- Sandven, P., 1990, Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates, *Acta Odontol Scand*, 48, 27-36.

Saz, M., Abdel-Hafez, A., El Sawy, M., Ramadan, E., 1977, Studies on protein production by yeasts. Isolation, identification and screening of efficient strains, *Infectionskrankheiten und Hygiene*, 132, 4, 326-334.

Schmidt, J., Lamberet, G., 1981, The yeasts of Camambert cheese-main species and possible effects in ripening, *International Fermentation Symposium 6th. Symposiums*, 485-490.

Taubman, S., 1992, *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, 224, Washington.

Töre.O., Gedikoğlu, S., Günal, G., Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Helvacı, S., 1994, *Klinik Mikrobiyoloji*, 368-371, İstanbul.

Tümbay, E., 1982, *Pratik Tıp Mikolojisi*, Bilgehan Basımevi, 45-60, İzmir.

Uzun, M., Kiraz, N., 1996, *Candida albicans* suşlarının proteinaz enzim aktivitelerinin araştırılması, XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 1996, Antalya.

Wagner, K., Meyrath, J., 1974, Identification of lactose assimilating yeasts by numerical taxonomy, *Journal of Applied Bacteriology*, 110, 5, 243.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Polatlı'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Polatlı'da tamamladı. Yüksek öğrenimini Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde yaparak, 1994 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu Yüksek Lisans programını kazandı.

