

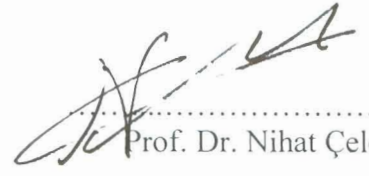
OTLU PEYNİR ÜRETİMİNDE KULLANILAN SALAMURA OTLARDAN  
MAYALARIN İZOLASYONU, MOLEKÜLER TANISI VE BAZI TEKNOLOJİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ERKAN GÜNEŞ

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2010

Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Onayı



Prof. Dr. Nihat Çelebi

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak gerekli çalışmaları yerine getirdiğini onaylarım.



Prof. Dr. H. Barbaros Özer

Bölüm Başkanı

Okuduğumuz bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak onaylanması, düşüncemize göre, amaç ve kalite olarak tamamen uygundur.



Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır

Tez Danışmanı

Jüri Üyeleri

İmza

1. Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır
2. Yrd. Doç. Dr. Mehmet Öztürk
3. Yrd. Doç. Dr. Seda Karasu Yalçın



## ÖZET

### OTLU PEYNİR ÜRETİMİNDE KULLANILAN SALAMURA OTLARDAN MAYALARIN İZOLASYONU, MOLEKÜLER TANISI VE BAZI TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Güneş, Erkan  
Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü  
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır

Temmuz 2010, 94 sayfa

Bu çalışmada otlu peynir üretiminde kullanılan salamura otlardan izole edilen yerel maya suşlarının izolasyonu, morfolojik ve biyokimyasal tanısı, 5.8S ve 18S rRNA ITS bölgesinin dizi analizi yöntemi ile moleküler tanıları yapıldıktan sonra bazı teknolojik özellikleri belirlenmiştir. Tanımlama testleri sonucunda salamura otlardan izole edilen türlerin *Saccharomyces servazii*, *Pichia membranifaciens*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces castellii*, *Pichia fermentans* ve *Kluyveromyces marxianus* olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen yerel maya suşlarının bazı teknolojik özelliklerinin belirlendiği çalışmalarda; maya suşlarının yüksek sıcaklıklarda gelişimi, düşük pH değerlerinde ve yüksek şeker derişimine sahip ortamda gelişme kabiliyetleri ile enzim profilleri belirlenmiştir. *D. hansenii*, *K. marxianus* ve *S. servazii* türlerinin teknolojik özelliklerinin daha iyi olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Maya, izolasyon, 5.8S ve 18S rRNA ITS, teknolojik özellikler

**ABSTRACT****ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF YEASTS FROM  
BRINED HERBS USED FOR PRODUCTION OF HERBY CHEESE AND  
DETERMINATION OF THEIR TECHNOLOGICAL PROPERTIES**

Güneş, Erkan  
MSc., Department of Food Engineering  
Supervisor: Asst. Prof. İbrahim Çakır

July 2010, 94 pages

In this study, some technological properties of endogenic yeast strains were determined after morphological, biochemical and molecular identification by 5.8S and 18S rRNA ITS region sequence analysis of isolated endogenic yeast strains from brined herbs that used for production of herby cheese. At the results of identification test, isolated yeast strains from brined herbs were belonging to the following genus: *Saccharomyces servazii*, *Pichia membranifaciens*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces castellii*, *Pichia fermentans* and *Kluyveromyces marxianus*. In the studies for the determination of some technological characteristics of the endogenic strains; growth capabilities at high temperatures, low pH values, high sugar concentration and enzyme profiles were performed. At the results of the technological properties of yeast strains, the species of *D. hansenii*, *K. marxianus* and *S. servazii* were found to have better technological properties.

**Key words:** Yeast, isolation, 5.8S and 18S rRNA ITS, technological properties

Aileme

## TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmam boyunca yol gösterici olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır'a; desteklerini gördüğüm, her zaman yanımda olan değerli aileme; çalışmam boyunca teknik konularda desteğini esirgemeyen Uzman M. Fatih İşleyen'e; izolasyon kaynağı olarak kullanılan salamura otlarla çalışma konusunu gündeme getiren ve otların temin edilmesinde destek olan Prof. Dr. Hayri Coşkun'a ve Yrd. Doç. Dr. Yusuf Tunçtürk'e (Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) ve desteklerinden güç aldığım çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                                                  | iii |
| ABSTRACT .....                                                              | iv  |
| İTHAF .....                                                                 | v   |
| TEŞEKKÜR .....                                                              | vi  |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....                                                    | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                     | xi  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                       | xii |
| 1. GİRİŞ .....                                                              | 1   |
| 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI .....                            | 5   |
| 2.1. Mayalar.....                                                           | 5   |
| 2.1.1. Mayaların Tanımlanmasında Morfolojik ve Fizyolojik Özellikler.....   | 7   |
| 2.1.2. Mayaların Tanımlanmasında Biyokimyasal ve Moleküler Özellikler ..... | 10  |
| 2.1.3. Mayaların Sınıflandırılması.....                                     | 11  |
| 2.2. Mayaların Gelişme Koşulları.....                                       | 13  |
| 2.2.1. Sıcaklık.....                                                        | 13  |
| 2.2.2. pH.....                                                              | 14  |
| 2.2.3. Su Aktivitesi .....                                                  | 14  |
| 2.2.4. Oksijen.....                                                         | 15  |
| 2.3. Peynirlerin Maya Florası.....                                          | 15  |
| 2.4. Peynirlerde Mayaların Starter Kültür Olarak Kullanımı.....             | 22  |

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5. Otlu Peynir Yapımında Kullanılan Otların Hazırlanması ve Bazı Özellikleri..... | 26 |
| 2.6. Mayaların Moleküler Karakterizasyonu.....                                      | 28 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                         | 34 |
| 3.1. Materyal.....                                                                  | 34 |
| 3.2. Yöntem .....                                                                   | 34 |
| 3.2.1. Mayaların İzolasyonu .....                                                   | 34 |
| 3.2.2. Mayaların Mikroskopik Morfolojilerinin Belirlenmesi .....                    | 35 |
| 3.2.3. Mayaların İdentifikasyonu.....                                               | 36 |
| 3.2.3.1. Maya İzolatlarının RYP Sistemi ile Tanımlanması. ....                      | 36 |
| 3.2.3.2. Maya İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması. ....                | 37 |
| 3.2.3.2.1. DNA İzolasyonu.....                                                      | 37 |
| 3.2.3.2.2. DNA Dizi Analizi.....                                                    | 39 |
| 3.3. Mayaların Teknolojik Özellikleri .....                                         | 39 |
| 3.3.1. Yüksek Sıcaklıkta Gelişme.....                                               | 39 |
| 3.3.2. Tuza Dayanıklılık Testi. ....                                                | 40 |
| 3.3.3. Yüksek Şeker Konsantasyonunda Gelişme.....                                   | 40 |
| 3.3.4. Farklı pH Değerlerinde Gelişme.....                                          | 41 |
| 3.3.5. Orta Derecede Ozmotik Basıncıta Gelişme.....                                 | 41 |
| 3.3.6. Üre Hidrolizi. ....                                                          | 41 |
| 3.3.7. Fermantasyon Hızı. ....                                                      | 42 |
| 3.3.8. Enzim Profillerinin Belirlenmesi. ....                                       | 42 |
| 3.3.9. Lipolitik Aktivite.....                                                      | 43 |
| 3.3.10. Proteolitik Aktivite.....                                                   | 45 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....                                             | 46 |



|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1. Mayaların Tanımlanması.....                                                                                         | 46 |
| 4.1.1. Mayaların RYP Sistemi ile Tanımlanması .....                                                                      | 46 |
| 4.1.2. Maya Suşlarından DNA İzolasyonu.....                                                                              | 49 |
| 4.1.3. DNA Dizi Analiz Sonuçları.....                                                                                    | 50 |
| 4.2. Mayaların Mikroskopik Morfolojileri.....                                                                            | 53 |
| 4.3. Mayaların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....                                                               | 54 |
| 4.3.1. Yüksek Sıcaklıkta Gelişme.....                                                                                    | 54 |
| 4.3.2. Tuza Dayanıklılık Testi.....                                                                                      | 56 |
| 4.3.3. Farklı pH Değerlerinde Gelişme.....                                                                               | 57 |
| 4.3.4. Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişme.....                                                                       | 57 |
| 4.3.5. Orta Derecede Ozmotik Basıncıta Gelişme.....                                                                      | 58 |
| 4.3.6. Üre Hidrolizi.....                                                                                                | 59 |
| 4.3.7. Fermantasyon Hızı.....                                                                                            | 59 |
| 4.3.8. Enzim Profillerinin Belirlenmesi....                                                                              | 61 |
| 4.3.9. Lipolitik Aktivite.....                                                                                           | 65 |
| 4.3.10. Proteolitik Aktivite.....                                                                                        | 65 |
| 5. SONUÇLAR.....                                                                                                         | 66 |
| KAYNAKLAR.....                                                                                                           | 69 |
| EKLER                                                                                                                    |    |
| EK A. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....                                                                          | 80 |
| EK B. Maya İzolatlarının RYP Panellerindeki Görüntüleri.....                                                             | 87 |
| EK C. Maya örnekleriyle gerçekleştirilen fermantasyonlar süresince izlenen<br>ağırlık azalmalarına ilişkin veriler ..... | 90 |
| EK D. Maya Suşlarının Filogenetik Analiz Sonucu Oluşturulan Dendogramları.....                                           | 91 |
| EK E. Maya İzolatlarının Enzim Profillerinde Gözlenen Renk Reaksiyonları.....                                            | 92 |

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| EK F. Maya Kùltürlerinin Mikroskobik Görüntüsü ..... | 93 |
|------------------------------------------------------|----|

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1. Mayaların karakterizasyonunda faydanılan özellikler .....                            | 10 |
| Çizelge 2. Mayaların sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal ve moleküler özellikler ..... | 11 |
| Çizelge 3. Otlı peynir yapımında kullanılan otların Latince ve yerel adları .....               | 27 |
| Çizelge 4. İzolasyonda kullanılan salamura otların kodları ve özellikleri.....                  | 35 |
| Çizelge 5. API-ZYM sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan renk skalası ....               | 44 |
| Çizelge 6. İzole edilen mayaların izolasyon kaynakları ve kodları.....                          | 47 |
| Çizelge 7. Maya izolatlarının RYP Sistemi ile tanımlama sonuçları .....                         | 48 |
| Çizelge 8. Maya izolatlarının moleküler tanı sonuçları .....                                    | 50 |
| Çizelge 9. Moleküler tanısı yapılan maya suşlarının bazı teknolojik özellikleri .....           | 55 |
| Çizelge 10. Maya türlerinin API-ZYM test sistemi ile belirlenen enzim profilleri ..             | 64 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Mayaların peynir üretiminde destek kültür olarak kullanımı .....                                              | 24 |
| Şekil 2. <i>C. crusei</i> M5.1 izolatının RYP kuyucuklarındaki reaksiyon sonucu .....                                  | 49 |
| Şekil 3. Maya suşlarından izole edilen DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü .....                                        | 52 |
| Şekil 4. <i>P. membranifaciens</i> M13.1 (a) ve <i>S. servazzii</i> M9.1 (b) izolatlarının mikroskopik görüntüsü ..... | 53 |
| Şekil 5. Maya türlerinin fermantasyon hızı test sonuçları .....                                                        | 60 |
| Şekil 6. Maya türlerinin fermantasyon hızı test sonuçları. ....                                                        | 60 |
| Şekil 7. Kontrol suşunun skim milk agarda oluşturduğu proteolitik zon görüntüsü .                                      | 65 |
| Şekil 8. <i>S. servazzii</i> M5.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....                     | 87 |
| Şekil 9. <i>S. servazzii</i> M5.2 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....                     | 87 |
| Şekil 10. <i>D. hansenii</i> M6.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....                     | 87 |
| Şekil 11. <i>D. castellii</i> M6.3 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....                    | 87 |
| Şekil 12. <i>S. servazzii</i> M6.4 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....                    | 87 |
| Şekil 13. <i>K. marxianus</i> M8.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....                    | 87 |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 14. <i>P. fermentans</i> M8.2 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....       | 87 |
| Şekil 15. <i>S. servazzii</i> M9.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....        | 87 |
| Şekil 16. <i>P. membranifaciens</i> M10.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü ..... | 88 |
| Şekil 17. <i>P. membranifaciens</i> M11.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü ..... | 88 |
| Şekil 18. <i>P. membranifaciens</i> M13.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü ..... | 88 |
| Şekil 19. <i>P. membranifaciens</i> M13.2 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü ..... | 88 |
| Şekil 20. <i>P. membranifaciens</i> M14.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü ..... | 88 |
| Şekil 21. <i>S. servazzii</i> M15.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....       | 88 |
| Şekil 22. <i>P. membranifaciens</i> M15.2 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü ..... | 88 |
| Şekil 23. <i>P. membranifaciens</i> M17.1 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü ..... | 88 |
| Şekil 24. <i>P. fermentans</i> M17.2 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....      | 89 |
| Şekil 25. <i>K. marxianus</i> M17.3 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk değişimi görüntüsü .....       | 89 |
| Şekil 26. <i>P. membranifaciens</i> M18.2 izolatının RYP panelde oluşturduğu renk                          |    |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| değişimi görüntüsü .....                                                   | 89 |
| Şekil 27. Maya izolatlarının RYP panellerdeki toplu görüntüsü.....         | 89 |
| Şekil 28. Maya izolatlarının API-ZYM renk reaksiyonlarının görüntüsü ..... | 92 |
| Şekil 29. Maya türlerinin mikroskopik görüntüsü.....                       | 93 |
| Şekil 30. Maya türlerinin mikroskopik görüntüsü.....                       | 94 |

## 1. GİRİŞ

Beslenme canlıların en temel ihtiyaçlarından biridir. Sağlıklı ve kaliteli bir yaşam sürdürebilmek için yeterli ve dengeli beslenmek gerekmektedir. Süt, insanın ihtiyaç duyduğu protein, yağ, karbonhidrat, mineral ve vitamin gibi besin maddelerini yeterli ve dengeli bir şekilde içermektedir. Fermente süt ürünleri karakteristik duysal özellikleri ve sağlık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle dünyada birçok ülkede beğenilerek tüketilmektedir.

Dünyada fermente süt ürünleri içerisinde en fazla tüketilen ürün peynirdir. Peynir içerdiği yüksek biyolojik değerli proteinler, yağda çözünen vitaminler, mineral maddeler ve özellikle kalsiyum ve fosfor bakımından zengindir. Peynirde bulunan proteinler olgunlaşma sürecinde parçalandıkları için sindirilme oranları artmaktadır (Dağdemir 2006). Olgunlaşma, her peynir çeşidinin kendine özgü tat, koku ve görünüşü alabilmesi için belirli koşullar altında, belirli sürede geçirdiği değişikliklerin toplamı olarak tanımlanabilir. Bu dönemde peynirin ana bileşenleri olan protein, laktoz ve yağ parçalanmakta, ortaya çıkan ürünler peynirlere özgün tat ve aroma kazandırmaktadır (Kesenkaş ve Akbulut 2006).

Son yıllarda tüketicilerin sağlıklı beslenme konusundaki bilinçli yaklaşımı ve talebi doğrultusunda peynir endüstrisi, yağı azaltılmış, tat, yapı ve aroma bileşenlerinin geliştirilmesi ile yeni ürün geliştirme çalışmalarına önem vermeye başlamıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmalardan bir tanesi de starter kültür geliştirme çalışmalarıdır. Türkiye’de süt ürünlerinde starter kültür kullanımı 1970’li yıllarda

başlamıştır. Başta Almanya ve Hollanda olmak üzere starter kültür üretiminde önde gelen ülkelerden önceleri sıvı, günümüzde ise liyofilize ve dondurulmuş kültürler ithal edilmekte ve kullanılmaktadır. Beyaz peynir üretiminde starter kültür kullanımında yaşanan en önemli sorunlardan birisi ithal edilen starter kültürün bu peynirlerin üretimi için tam uygun olmamasıdır. Beyaz peynir üretiminde tavsiye edilen kültürler *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*'dir. Laktokoklar yaygın olarak kullanılmakla birlikte yüksek tuza dirençlerinin az olması nedeniyle farklı alternatif kültür arayışları sürmektedir (Yaygın ve Toklu 2000; Dağdemir 2006).

Peynir üretiminde alternatif starter kültür arayışı çalışmalarda izlenen strateji, peynirin olgunlaşması sırasında hakim olan mikrofloranın tespit edilmesi ve buradan starter özellikleri yüksek nitelikte olan mikroorganizmaların starter olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi yönündedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda başta *Enterococcus* spp. olmak üzere *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus plantarum* gibi mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonuna dirençleri, olumsuz koşullara hızlı adaptasyonları ve antimikrobiyel madde üretimleri nedeniyle üzerinde en fazla çalışılan alternatif peynir starterleri arasında bulunmaktadır (Tunail 1999; Durlu ve ark. 2001).

Peynir üretiminde yeni ürün geliştirilmesi konusunda yapılan çalışmalardan biri de tat ve aroma gelişimine katkı sağlayacak destek starter kültürlerin (adjunct starter cultures) kullanımınıdır. Destek starter kültür çalışmalarında ise akla ilk gelen mikroorganizma mayalardır (Ferreira ve Viljoen 2003; Kesenkaş ve Akbulut 2006).

Mayalar düşük pH, düşük su aktivitesi, yüksek tuz konsantrasyonu ve soğukta depolama koşullarındaki stabilitesi nedeniyle birçok peynir çeşidinde mikrofloranın önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Peynir üretiminde mayalar iki



yönlü etkili olmaktadır. Bunlardan birincisi bazı peynir çeşitlerinin olgunlaşmasına, tat ve aroma gelişimine katkı sağlayarak yaptıkları olumlu etkiler (Abbas 2006), ikincisi ise peynirlerde gaz oluşumu, meyvemsi ve acımsı tat gelişimi ve renk ve yapıda meydana gelen bozulmalara neden olan olumsuz etkilerdir (Corbo ve ark. 2001; Durlu ve ark. 2005; Stratford 2006).

Ülkemiz diğer fermente ürünlerde olduğu gibi peynirde de zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Ülkemizde üretilen başlıca peynir çeşitleri, beyaz peynir, kaşar peyniri, tulum peyniri, otlu peynir, gravyer ve mihaliç peyniridir. Bilinen bu peynir çeşitlerimizin yanı sıra belirli bölgelerde aile ihtiyacını karşılamak üzere yapılan ve ilkel tekniklerle elde edilen 20 kadar mahalli peynir çeşidi vardır. Mahalli çeşitler arasında Sinop dolaylarında Abaza ve Çerkes, Milas köylerinde Kazıklı, Ayvalık yöresinde Kirlihanım, Çankırı civarında Küpecik, Erzincan bölgesinde Şafak, Elazığ yöresinde Şavak, Sivas yöresinde Küp, Çeşme ve Karaburun köylerinde Kopanisti, Erzurum ve Kars bölgesinde Tel, Karaburun-Foça-Ayvalık'ta Sepet, Denizli taraflarında Yörük, İç Anadolu Bölgesinde Dil, Doğu ve Marmara Bölgesinde Lor, Diyarbakır-Kars-Siirt-Van Bölgelerinde Otlı, Antalya, Akseki ve Manavgat'ta Çimi peynirleri sayılabilir. Divle tulum peyniri de Konya Ereğlisi'ne bağlı Divle Köyü ve çevresinde yapılan mahalli bir peynir çeşididir (Ateş 1999).

Otlı peynirler Doğu ve Güneydoğu illerimizde üretilen ve yaygın olarak tüketilen bir peynir çeşidimizdir. İyi bir besin kaynağı olduğu gibi yöre halkı içinde hatırı sayılır bir ekonomik değeri olan otlı peynirler en çok Kars, Van, Diyarbakır ve Siirt illerinde üretilmektedir. Otlı peynirler gerek üretim şekilleri ve gerekse içlerine katılan otlar bakımından üretildikleri yörelere göre az çok farklılıklar göstermektedirler (Coşkun 2005).

Van otlu peynirinde kullanılan heliz, dağ kekiği, sirmo, siyabo ve mendi dağlardan toplanarak büyük çuval içerisinde konulmaktadır. Toplanan otlar önce iyice yıkanır sonra kullanılacakları ürüne göre ayrılır. Van otlu peyniri ilkbaharda hem sütün hem de otun bol olduğu dönemde genellikle koyun sütünden yapılır. Otlar Van otlu peynirinin yapımında kullanılacak ise yıkandıktan sonra ince ince doğranır ve taze halde telemeye katılmaktadır (Alpaslan 2009).

Otlu peynir yapımında kullanılan salamura otlar, peynirin tat ve aromasını zenginleştirerek ve tüketici beğenisini kazanmış kendine özgü ürün oluşumuna katkı sağlamaktadır. Otlu peynirlerin kimyasal fiziksel ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi konusunda çok fazla çalışma yapılmış olmasına rağmen, salamura otların mikrobiyel florası konusunda çok az çalışma bulunmaktadır. Diğer yandan peynir üretiminde kullanılan laktik asit bakteri kültürlerine destek kültür olarak mayaların kullanımı üzerine son yıllarda artan bir eğilim bulunmaktadır. Bu çalışmada otlu peynir üretiminde kullanılan salamura otlardan izole edilen 20 adet yerel maya suşlarının izolasyonu, morfolojik ve biyokimyasal tanısı, 5.8S ve 18S rRNA ITS bölgesinin dizi analizi yöntemi ile moleküler tanıları yapıldıktan sonra bazı teknolojik özellikleri belirlenmiştir. Böylece destek kültür olarak kullanım potansiyeline sahip yerel izolatların veri tabanı oluşturulması amaçlanmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda oluşturulan kültür koleksiyonunda bulunan suşlardan uygun olanların, pilot ölçekli bir peynir üretim prosesinde kullanılarak, destek kültür olabilme potansiyellerinin belirlenmesi gerekmektedir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Mayalar

Mayalar taksonomide küf veya küf mantarları adı verilen diğer canlılarla birlikte, funguslar grubunu oluşturan tek hücreli canlılardır. Toprakta ve özellikle bağ topraklarında bol miktarda bulunan mayalar, doğada geniş ölçüde yayılım göstermektedir. Mayalar, klorofil içermeyen, gerçek mantar olan, tek hücreli ve ökaryotik mikroorganizmalardır. Yuvarlak, elipsoid, silindirik, ya da köşeli yapıya sahip şekillerde bulunan mayaların büyüklükleri cinslerine göre değişmekle beraber genellikle 2-8 µm çapında 3-15 µm uzunluğundadır. Bazı türlerde bu uzunluk 100 µm'yi bulmaktadır (Yıldırım 1997; Çakmakçı ve ark. 2008; Tunail 2009).

Mayalar endüstriyel açıdan etanol, gliserol, ekmek mayası, vitamin, çeşitli enzimler, karatenoidler ve lipid üretiminde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, mayalar proteince zengin organizmalar oldukları için tek hücre proteini üretiminde kullanılan değerli mikroorganizmalardır. İnsanoğlu 8000 yıldan beri fermentasyonla ilgilenmektedir. Mayaların alkol ürettiklerinin M.Ö. 6000 yıllarında Sümerler ve Babillerce bilindiği düşünülmektedir. Daha sonraki yıllarda (M.Ö. 4000) Mısırlılar bira mayasını ekmek yapımında kullanmışlardır. Sümer, Babil ve Ur topluluklarının kültürlerini yansıtan 4000 yıl öncesinden yapılan sanat çalışmalarında bu görüşün desteklediği ortaya çıkarılmıştır. Mısırlılar ekmeğin mayalanıp pişirilmesini tasvir eden resimler yapmışlardır (Albayram 2007; McNeil ve Harvey 2008).

Mayalar, bakterilerden genellikle daha büyük ve nükleuslarının daha belirgin bulunması ile ayırt edilebilmektedir. 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 µm arasında değişmektedir. Mayalar genellikle geniş bir pH sınırı içinde üreyebilmektedir. Bazı mayalar pH'sı 3 olan asit ortamda gelişebildiği gibi pH 7.5 olan alkali ortamlarda üreyen mayalar da bulunmaktadır. Genel olarak mayalar optimum 4.5-5.0 pH aralığında gelişim göstermektedir. Mayalar 47 °C'nin üzerinde faaliyet gösteremedikleri gibi, 0 °C'de de üreyemezler. Optimum üreme sıcaklıkları 25-37 °C arasındadır. Sıcaklığın yükselmesi toksik metabolik artıkların fazlalaşmasına ve bu nedenle mayaların gereği gibi üremesine engel olmaktadır. Mayalar genel olarak %70 su ve %30 kuru madde ihtiva etmektedir. Kuru maddenin %50'sini azotsuz, %45'ini azotlu ve %5'ini de mineral maddeler oluşturmaktadır. Azotlu maddelerin %90'nını yüksek moleküllü protein ve geri kalanını da küçük moleküllü azotlu maddeler oluşturmaktadır. Maya proteinleri fosfoprotein, albümin ve nükleoproteinlerden oluşmaktadır. Bileşimlerinde bulunan karbonhidratların en önemlilerini glikojen ve hayvansal nişasta teşkil etmektedir. Optimum koşullarda geliştirilen mayalarda %20-30 oranında yağ bulunabilmektedir (Yıldırım 1997; Romano ve ark. 2006).

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 konsantrasyonunun da 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 fermantasyon 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 arttırır. Fermantasyon sırasında meydana gelen karbondioksit ise yok denecek kadar azdır. Mayalar beslenmeleri için gerekli birçok enzimleri ihtiva etmektedir. Bunlar karbonhidratları parçalayan (Glikojenaz, laktaz, invertaz, maltaz vb) ile yağları parçalayan (lipaz) ve proteinleri parçalayan (proteinaz) enzimlerini kapsamaktadır (Köşker ve akmakı 1985; Yıldırım 1997; Viljoen 2006; akmakı ve ark. 2008; Tunail 2009).

Mayalar morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre karakterize edilir, sınıflandırılır ve identifiye edilirler (Kreger-van Rij 1987; Esen 2008).

### **2.1.1. Mayaların Tanımlanmasında Morfolojik ve Fizyolojik zellikler**

Mayalar uygun ortamlarda yalancı misel oluştursalar da tek hücreli, büyük (5-8µm çapında), oval, uzun, eliptik veya yuvarlak hücre Şekilleri ile ve bölünme esnasında tomurcuk oluşturmaları nedeniyle bakteri ve küflerden ayrılırlar. Geniş pH, Şeker ve alkol sınırları içerisinde gelişebilirler. Krem renginden pembe kırmızıya kadar değişen renkte pigmentler oluşturabilirler (Ayhan 2000).

Maya hücreleri özellikle üreme sırasında düz veya dallı zincirler oluşturmaktadır. Bazı koşullarda hücreler filament oluşturmakta ancak bunlar normal

hücre şekillerinin dışında kabul edilmektedir. Mayalar, genel olarak bakterilerden büyüklük ve şekil açısından farklılık gösterdikleri gibi küflerlerden de miselyum oluşturmamalarıyla ayrılmaktadır (Çakmakçı ve ark. 2008).

Mayalar hem eşeyli, hem eşeysiz olarak iki ayrı şekilde çoğalma yeteneğine sahiptir (Anonim 2006). Mayalarda çoğalma:

1. Eşeyli çoğalma
2. Eşeysiz çoğalma
  - Vejetatif
    - Tomurcuklanma
    - Bölünme
  - Sporla
    - Kese içi
    - Kese dışı

**Eşeyli çoğalma:** İki farklı bireyi oluşturan iki hücrenin birleşerek ve çeşitli basamaklardan sonra mayoz bölünme ile çoğalması tamamlanır. Sporlar kapalı bir kese içinde oldukları için endospor durumundadır ve askospor olarak isimlendirilmektedir. Cinslere göre askospor sayılarının farklı olmasının yanında spor şeklinde ve sporlanma sürelerinde de farklılıklar bulunmaktadır.

**Tomurcuklanarak çoğalma:** Mayalara özgü bir çoğalma şeklidir. Gelişmiş bir maya hücresi ortam koşulları uygunsa uzun eksen doğrultusunda, hücre duvarı açılarak bir şişkinlik meydana gelir Kromozomlar iki eşit parçaya bölünür, her biri kendi çekirdek zarını oluşturur. Böylece iki çekirdek meydana gelir. Büyüyen tomurcuk kendi hücre duvarını inşa ederek kendi şeklini alır. Yavru hücre gelişirken ana hücre başka bir noktadan tomurcuklanma olayını başlatır.

**Bölünme:** Bölünerek çoğalma mayaların çok az bölümünde görülür. Hücre erginliğe ulaştığında hücrenin orta kısmından hücreyi ikiye bölecek şekilde ara zarla bölünür. Çekirdek zarı çözünür ve iki yeni çekirdek meydana gelir. Bölünme

tamamlandığında ana ve yavru hücre birbirinden ayrılarak, normal hücre boyutuna gelince yeniden bölünerek çoğalmaya devam eder.

**Sporla çoğalma:** Yalnızca yabancı mayalarda görülür. Kalmidospor ve artrospor şeklinde görülür. Kalmidospor, örtülü spor anlamına gelir (kese içi) ve tomurcuklanarak çoğalma sırasında tomurcuklar kalın bir zarla çevrilir. Artrospor (kese dışı), hif oluşturma yabancı mayalarda görülen bir çoğalma şeklidir. Artrospor hiflerin parçalanması yani bölünme ile olur (Anonim 2006; Köşker ve Çakmakçı 1985; Çakmakçı ve ark. 2008; Esen 2008).

Eşeyli üreme yapıları olarak askus içerisinde askospor oluşturanlar Ascomycetes, telispor ve basidiospor oluşturanlar Basidiomycetes ve eşeyli üremesi bilinmeyenler Fungi Imperfecti sınıfı içerisinde değerlendirilmektedir. Mayalar endüstriyel açıdan etanol, gliserol, ekmek mayası, vitamin, çeşitli enzimler, karatenoidler ve lipid üretiminde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, mayalar proteince zengin organizmalar oldukları için tek hücre proteini üretiminde kullanılan değerli mikroorganizmalardır (Güneri 1993).

Fizyolojik testler, vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak gözlemlenmesi ile bağlantılı olarak tür identifikasyonu için gereklidir. Türlerin tanınmasında çeşitli karbon ve azot bileşenlerinde büyüme ile fermantasyon özellikleri önemlidir. Mayaların şekerleri fermente etme yeteneği, karbondioksit üretimi ölçülerek belirlenir. Bazı türler kuvvetli fermantasyon yeteneğine sahipken (*Saccharomyces* spp.), bazı türler ise zayıf fermantasyon yeteneğine sahiptir veya fermantasyon yetenekleri yoktur (*Rhodotorula*). Şeker ve diğer karbon bileşenleri ayırıcı testlerde kullanılır. Diğer testler nitrata yanıt verme, vitamin yokluğunda üreme, yüksek şeker konsantrasyonuna, cycloheximide veya koruyuculara inkübasyon sıcaklığı gereksinimlerine tolerans olarak özetlenebilir (Deak ve Beuchat 1996; Esen 2008).

Çizelge 1’de mayaların karakterizasyonunda geleneksel olarak kullanılan özellikler gösterilmiştir (Deak ve Beuchat 1996).

**Çizelge 1.** Mayaların karakterizasyonunda faydanılan özellikler

| <b>Morfolojik</b>          | <b>Fizyolojik</b>                 | <b>Biyokimyasal</b>         |
|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Eşeyli Üreme               | Şekerlerin fermantasyonu          | Diazonyum blue B reaksiyonu |
| Konjugasyon Şekli          | Karbon kaynaklarının asimilasyonu | Üreaz reaksiyonu            |
| Spor ve sporangio formu    | Vitamin gereksinmesi              |                             |
| Basidiospor formu          | Gelişme sıcaklığı                 |                             |
| Vejetatif Üreme            | Düşük su aktivitesinde gelişme    |                             |
| Tomurcuklanma              | Siklohekzimide dayanma            |                             |
| Ortadan bölünme            | Nişasta oluşumu                   |                             |
| Arthroconidia              | Asetik asit üretimi               |                             |
| Ballistoconidia            |                                   |                             |
| Mikroskobik Gelişme        |                                   |                             |
| Hücre şekli ve büyüklüğü   |                                   |                             |
| Hif ve Yalancı hif         |                                   |                             |
| Klamidospor                |                                   |                             |
| Makroskobik gelişme        |                                   |                             |
| Katı besiyerinde koloniler |                                   |                             |
| Sıvı kültürler             |                                   |                             |

### 2.1.2. Mayaların Tanımlanmasında Biyokimyasal ve Moleküler Özellikler

Mayaların geleneksel karakterizasyonunda kullanılan morfolojik ve fizyolojik özelliklerin güvenilirliği sıkça sorgulanmaktadır. Biyokimyasal testler yıllardır mayaların karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Deak ve Beuchat 1996; Esen



2008). Çizelge 2’de mayaların sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal ve moleküler özellikler gösterilmiştir.

**Çizelge 2.** Mayaların sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal ve moleküler özellikler (Deak ve Beuchat 1996; Esen 2008)

| <b>Bileşik</b>  | <b>Ölçüm</b>                                                                                                                                               |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Karbonhidratlar | Hücre duvarı kompozisyonu<br>Tüm hücre karbonhidrat kompozisyonu                                                                                           |
| Lipidler        | Uzun zincirli uçucu yağ asidi modeli                                                                                                                       |
| Proteinler      | Protein elektroforetik model<br>İzoenzimler                                                                                                                |
| Nükleik asitler | Guanin + Sitozin molekül oranı<br>DNA – DNA homolojisi<br>DNA restriksiyon fragmentleri<br>rRNA gen dizilimi<br>Gen araştırması<br>Kromozom karyotiplemesi |

### 2.1.3. Mayaların Sınıflandırılması

Mayalar, morfolojik, kültürel ve fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılır. Bu amaçla; hücre şekli, hücrelerin birbirleriyle birleşme tarzları, tomurcuklanma durumları, miselyum ve pseudomiselyum, askospor, artrospor, ballistospor oluşturma durumları, spor biçimi, askospordaki spor sayısı gibi morfolojik özellikler incelenir. Kültürel özelliklerinden ise, sıvı besiyerinde zar oluşturma, katı besiyerindeki koloni şekilleri, kolonilerin renk ve kıvamları, renk maddesi oluşturma özellikleri, çeşitli sıcaklık derecelerindeki üreme durumları belirlenir. Fizyolojik ve biyokimyasal özellikler arasında ise, çeşitli şekerler üzerine yaptıkları oksidatif ve fermentatif

etkiler, nitrat kullanma gibi özellikler incelenir. Ancak herhangi bir maya türünü taksonomideki yerine yerleştirmek oldukça zordur. Bu nedenle, morfolojik bakımdan benzerlik gösteren mayaların birbirinden ayrılmasında fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin tespiti çok yararlı olmaktadır. Son zamanlarda gerçekleştirilen maya genom veri tabanı çalışmaları, sınıflandırmada yeni olanaklar ortaya koymuştur. Özellikle ökaryotik hücre genetiği ile ilgili temel bilgilerin gelişmesi, yeni yaklaşımlar sağlamıştır (Romano ve ark. 2006; Çakmakçı ve ark. 2008; Tunail 2009).

Mayaların geleneksel ve filogenetik sınıflandırmaları mevcut olmakla birlikte, son yıllarda moleküler biyolojinin de sınıflandırma üzerine etkileri görülmektedir. Aşağıda mayaların sınıflandırılması verilmiştir (Kreger-van Rij 1987; Barnett ve ark. 1990; Deak ve Beuchat 1996).

Alem: Fungi

Bölüm: *Eumycota*

Alt Bölüm: *Ascomycotina*

Sınıf: *Hemiascomycetes*

Takım: *Endomycetales*

Familiya: *Spermophthoracea*

Cins: *Holleya, Nematospora*

Familiya: *Saccharomycetaceae*

Alt Familiya: *Nadsonioideae*

Cins: *Hanseniaspora, Nadsonia, Saccharomycodes,*

*Wicherhamia*

Alt Familiya: *Schizosaccharomycetoideae*

Cins: *Hasegawaea, Schizosaccharomyces*

Alt Familiya: *Saccharomycetoideae*

Cins: *Ambrosiozma, Arthoascus, Arxiozma, Botryoascus, Citeromyces, Clavispora, Cyniciomyces, Debaryomyces, Dekkera, Dipodascus, Endomyces, Endomycopsella, Galactomyces, Guilliermondella, Hansenula,*

*Hormoascus, Hyphopichia, Issatchenki, Kluveromyces, Lodderomyces, Metschnikowia, Pachyticospora, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Schwanniomyces, Sporopachdermia, Strephanoascus, Torulaspora, Wickerhamiella, Williopsis, Wingea, Yarrowia, Zygoascus, Zygosaccharomyces, Zygozoma*

Alt Familya: *Lipomycetoideae*

Cins: *Lipomyces, Waltomyces*

Alt Bölüm: *Basidiomycotina*

Takım: *Ustilaginales*

Familya: *Filobasidiaceae*

Cins: *Chionoshphaera, Flobasidella, Filobasidium, Tremellales*

Familya: *Teliospore-forming yeast*

Cins: *Cytofilobasidium, Leucosporidium, Mrakia, Rhodosporidium,*

*Sporidiobolus*

Takım: *Tremellales*

Familya: *Tremellaceae*

Cins: *Holtermannia, Tremella*

Familya: *Unclassified*

Cins: *Sterigmatosporidium*

Alt Bölüm: *Deuteromycotina*

Sınıf: *Blastomycetes*

Familya: *Sporobolomycetaceae*

Cins: *Aciculoconidium, Candida, Cryptococcus, Eeneilla,*

*Fellomyces, Geotrichum, Kloeckera, Malassezia, Mastigomyces, Myxozyma,*

*Oosporidium, Phaffa, Rhodotorula, Saitoella, Sarcinosporon, Schzoblastodporion,*

*Sterigmatomycessympodiomyces, Trichosporon, Trignopsis*

## 2.2. Mayaların Gelişme Koşulları

### 2.2.1. Sıcaklık

Mayaların gelişme gösterebildikleri sıcaklık sınırları 0°C'nin üstündeki sıcaklıklar ile 50°C'nin altındaki dereceler arasında değişmektedirler Mayaların

alışmasına en uygun sıcaklık, 20-30°C arasında değişir. Sıcaklığın yüksekliği toksik metabolik artıkların fazlalaşmasına neden olur ve mayaların gereği gibi çalışmasını engeller (Deak ve Beuchat 1996).

Hemen hemen tüm mayalar mezofilik olmakla birlikte, az bir kısmı psikrofilikdirler; fakat henüz termofilik özellikli bir maya tanımlanmamıştır. Sıcaklığın yükselmesi, optimum seviyeye ulaşana kadar mayaların metabolizma hızını da artırır. 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda mayaların metabolizması yavaşlamaya başlar. Sıcaklık enzimlerdeki proteinleri denatüre etmeye başladığında ise, maya metabolizması hızlı bir düşüşe geçer. Mayaların büyük kısmının optimum üreme sıcaklığı 24°C' dir. Çok az bir kısım maya 24°C'nin altında gelişebilen psikrofilik mikroorganizmalar iken yüksek sıcaklıklarda gelişme yeteneği olan termofilik maya tespit edilmemiştir (Esen 2008).

### **2.2.2. pH**

Mayalar genellikle geniş bir pH aralığında çalışır. Bazı mayalar pH'sı 3.0 olan asit ortamlarda, bazıları ise pH 7.5'te yani alkali ortamlarda gelişir. Ancak mayaların gelişmesi için en uygun pH 4.5-5.0'tir (akmakı ve ark. 2008).

### **2.2.3. Su Aktivitesi**

Maya hücreleri azalan su aktivitesine ( $a_w$ ) uyum gösterme yeteneğine sahiptirler. Birçok maya türü düşük  $a_w$  değerlerine bakterilerden daha toleranslıdırlar. Su aktivitesi  $a_w$  skalasında mayaların yeri 0.9999 ile 0.60 arasındadır (Pitt ve Hocking 1997).

Bakteriler gibi mayalarında besinlerini hücre içine alabilmeleri veya metabolizma artıklarını dışarıya atabilmeleri, suyla mümkün olmaktadır. Osmofilik mayalar, son derece düşük su aktivitesinde gelişebilmektedirler. Yüksek şeker derişimlerinde dayanıklıdır. Bu derişimlerin üstünde gelişebilen maya sayısı sınırlıdır. Osmofilik mayalar, %65-70 şeker içeren gıdalarda son derece yavaş gelişebilir (Çakmakçı ve ark. 2008).

#### **2.2.4. Oksijen**

Mayaların oksijensiz ortamda geliştiğı ilk kez Pasteur tarafından belirlenmiştir. Pasteur tarafından yapılan deneyler, mayaların anaerobik şartlarda, alkol ve CO<sub>2</sub>; aerobik şartlarda ise su ve CO<sub>2</sub> oluşturduğunu ortaya koymuştur. Mayalar aerobik şartlarda, anaerobik şartlara göre daha çabuk ürer ve daha fazla hücre meydana getirir (Anonim 2006).

#### **2.3. Peynirlerin Maya Florası**

Mayaların özellikle peynirlerde sıklıkla görülmesi ürün içinde yaşama ve süt bileşenlerini kullanabilme kabiliyetini işaret eder. Bu durum mayaların düşük sıcaklık, pH ve su aktivitesinde ( $a_w$ ) ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilme yetenekleri ile desteklenebilir. Süt işletmelerinin çevre koşullarının mayaların gelişimi için uygun olması, hava ve çiğ sütte doğal kontaminant olarak bulunmaları da bir diğerk faktördür. Buna ilaveten peynir salamurası maya kontaminasyonu için bilinen en önemli kaynaktır (Kesenkaş ve Akbulut 2006).

Mayalar Laktik asiti metabolize edip pH'yı yükseltmek suretiyle proteolitik bakterilerin gelişimine izin vererek, bazı tip peynirlerin olgunlaşmasında rol oynarlar. Mayalar olgunlaşmaya yardımcı olmaları, peynirin aroma ve lezzeti üzerine etkileri olmasının yanı sıra istenmeyen duyuşal değışiklikler ve yumuşamaya yol açabilir (Deak ve Beuchat 1996).

Mayalar pek çok peynir türünde en sık görünen kontaminantlardır. Tilbury ve ark. (1974) Cheddar, krem ve süzme peynirlerde en sık *Debaryomyces hansenii*'yi, daha seyrek olarak da *Candida versatilis*, *Candida intermedia* ve *Pichia anomala*'yı izole etmiştir.

Schmidt ve Lamberet (1981) sütlerden yapılan Camembert peynirlerinden 523 maya suşu izole etmişlerdir. Tanımlanan 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.

Callon ve ark. (2005) Fransa'da yaptıkları bir araştırmada SSCP-PCR parmak izi yöntemi uygulanılarak peynirlerin maya florasını incelemişlerdir. İzole edilen mayalar arasında *Debaryomyces hansenii*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae* türleri bulunmaktadır.

Tzanetakis ve ark. (1987) tarafından Yunan peyniri ile yapılan bir çalışmada *Pichia membranaefaciens* ve *Pichia fermentans* en sık rastlanan türler olarak bildirilmiştir.

Şahin ve Öztürk (1998), 1996-1997 yıllarında Tekirdağ ve Bursa yörelerinden sağladıkları toplam 52 adet peynir örneğinin maya florası ve kimyasal yapısını araştırmışlardır. Bu örneklerden izole edilen 113 adet maya suşunun tanısı için morfolojik ve biyokimyasal testler uygulamışlar, elde edilen bulguların

değerlendirilmesinde izole edilen maya suşlarının *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* ve *Trichosporon* cinslerine ait olduklarını saptamışlardır.

Garrido ve ark. (1991) yaptıkları araştırmada, İspanya'nın Aracena bölgesindeki farklı bölgelerden toplanan Aracena peynirlerinin maya mikroflorasını çalışmışlardır. Çalışılan 15 örneğin 13'ü çiğ süt kullanılmak üzere 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 sırasıyla %40.7'i *Cryptococcus laurentii*, %15.9'u *Torulopsis sphaerica* ve % 15.2 si *Torulopsis candida*'dır. *Cryptococcus laurentii* hem el üretimiyle yapılan hem de endüstriyel peynirlerde kontaminant olarak bulunmuş ve olgunlaşma için önemli sayılmıştır.

Westall ve Filtenborg'un 1998 yılında Danimarka'da yaptıkları araştırmada, 3 farklı mandıradan alınan peynir örneklerinden maya izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. A mandırasında *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, B mandırasında *C. butyriand*, *Debaryomyces hansenii*, C mandırasında ise *Yarrowia lipolytica* türleri izole edilmiştir.

Coppola ve ark. (1988) toplam 16 Mozeralla peynir altı suyunun mikroflorasında Bütrik ve Propionik asit bakterisi, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli* bakterilerinin yanında *Candida*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* ve *Brettanomyces* cins mayaların da bulunduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak proteolitik aktiviteye sahip suşların gelişmesinin, peynir üretiminde kullanılan süt tiplerine ve sıcaklığa bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Cosentino ve ark. (2001) İtalya’da yaptıkları araştırmada, keçi sütünden yapılan Sardinian peynirinden bazı maya ve maya benzeri mikroorganizmaları izole etmişler ve bunların proteolitik, lipolitik aktiviteleri farklı derecelerde, farklı tuz konsantrasyonlarında üremeleri ve laktat, sitrat, laktoz, glukoz, galaktoz, laktik asidi fermente edebilme yeteneklerini incelemişlerdir. Baskın türün *Debaryomyces hansenii*, olduğunu belirtmişlerdir. Diğer izole edilen türler ise *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* türlerini ve *Pichia*, *Candida*, *Dekkera*, *Yarrowia*, *Rhodotorula* cinsleri olarak belirlemişlerdir.

Welthagen ve Viljoen (1999) tarafından, Cheddar peynirinin yapımı sırasında bulaşabilen mayaların kaynağını ve bulaşan maya türlerini belirlemeye yönelik olarak peynir fabrikasında yürütülen araştırmada, peynirin üretimi ve olgunlaştırılması sırasında toplam 77 maya türü tanımlanmıştır. İncelenen tüm peynir türlerinde sayılan maya miktarının  $9 \times 10^2$  ile  $1.4 \times 10^7$  kob/g arasında değiştiği ve baskın türlerin *Debaryomyces hansenii* ve *Cryptococcus albidus* olduğu saptanmıştır. Bu iki türün kullanılan ekipmanlardan ve elden bulaşabildiği, üretim hattında ise *Debaryomyces hansenii*’nin peynir altı suyunda, tuzlamadan önceki pıhtıda ve peynir yüzeyinde; *Cryptococcus albidus*’un peynir yüzeyinde tespit edildiği belirtilmiştir.

Romano ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, Akdeniz ülkelerinde keçi, koyun, inek sütünden üretilen artisanal peynirler incelenmiş ve birçok maya türü izole edilmiştir. Bu mayalar arasında *Candida kefir*, *Debaryomyces hansenii*, *C. famata*, *Saccharomyces cerevisiae* bulunmaktadır.

Fadda ve ark. (2004) tarafından yapılan bir araştırmada, İtalya’da Fiore Sardo peynirinden bazı maya ve maya benzeri mikroorganizmaları izole etmişler ve bunların proteolitik ve lipolitik aktivitelerini incelemişlerdir. İzole edilen maya ve maya benzerleri *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Geotrichum*



*candidum*, *Candida zeylanoides* ve *Candida lambica*'dır.

Corbo ve ark. (2001) peynir üretiminde starter kültür seçimi için farklı hayvan orijinli sütlerden ve tipik Apulia bölgesinde üretilen peynirlerden izole edilen 105 maya suşunun tanımlamasını yapmışlardır. İnek, koyun, keçi ve mandadan sağlanan toplam 26 süt örneği ve bir çeşit sert İtalyan peyniri olan Canestrato pugliese peynirinde 12 örneğin analiz edildiği çalışmada, peynir üretiminin başlangıç aşamalarında peynirlerdeki mayaların önemsiz olduğu, fakat olgunlaşma sırasında mikrofloranın önemli unsurlarından biri olduğunun gözlemlendiği, süt ürünlerinden izole edilen 36 tür arasında en sık rastlanılan mayaların (% 15.24) *Trichosporon cutaneum*, (% 1.48) *Candida catenulata*, (% 8.57) *Yarrowia lipolytica*, (% 4.76) *C. zeylanoides* ve (% 4.76) *C. sake* türleri olduğu belirtmişlerdir.

Besençon ve ark. (1992) Fransa'da rokfor peynirlerinin maya florasını incelemişler ve 401 izolat elde etmişler ve adlandırmışlardır. Dominant türler arasında *D. hansenii* (*C. famata*), *K. lactis*, *C. sphaerica* olarak bulmuşlardır. Tuzlama safhasından önce *D. Hanseii* peynire inoküle edilmesine rağmen olgunlaşma safhası boyunca miktarı %50'yi geçmemiştir. Her türün %80 'i %15'lik tuz konsantrasyonuna dayanıklı bulunmuştur.

Savova ve Nikolova (2002) tarafından Bulgaristan'ın farklı yörelerinde geleneksel süthane ürünlerindeki mayaların izolasyon ve sınıflandırılmasının yapıldığı çalışmada, keçi ve inek yoğurdu, keçi ve inek peyniri, çökelek (lor peyniri) ve tereyağ' dan izole edilen 12 maya çeşidi sınıflandırılmıştır. İzolasyon işleminde rutin mikrobiyolojik işlemler ve selektif besi ortamı (% 4 dekstroz, % 1 pepton, % 2 agar) kullanılmıştır. Suşların tanımlanmasının Kurtzman ve Fell, Kreger van Rij ve Barnett ve ark. tarafından açıklanan işleme göre yapıldığı araştırma sonucunda, inek yoğurdunda *Kluyveromyces marxianus*, keçi yoğurdunda *Trichonosporon beigeli*,

*Deboryomyces hansenii* var *hansenii*, *Candida krusei* var *marxianus* ve *K. marxianus* var *bulgaricus*, *C. rugosa*; çökelekte *C. famata* var *famata* ve *Candida sphaerica*; inek ve keçi peynirlerinde *Deboryomyces hansenii* var. *hansenii*, *K. lactis* var *lactis*, *C. famata* var *famata* maya türlerinin tanımlandığı belirtilmekle birlikte Peynir örneklerinde miktar olarak % 50 *D. hansenii*, % 40 *K. lactis* var *lactis*, % 7-8 *C. famata* ve % 2-3 *C. sphaerica* türlerinin tanımlandığı belirtilmektedir.

Pereira Dias ve ark. (2000) tarafından yapılan bir araştırmada, Portekiz’de çiğ süttten üretilen yarı sert keçi peynirinin üretimi sırasındaki çeşitli aşamalarında maya florasını incelemişler ve rastgele 344 maya izole etmişlerdir. 344 maya izolatının 150’si API ID 32C ile tanımlanmış ve 3 *Candida* türü izole edilmiştir.

Gadaga ve ark. (2000) Zimbabwe’ de bulunan ev, küçük çiftlik ve süt merkezlerinden 30 adet geleneksel fermente süt örneklerini sağlayarak maya sayımını ve tanımlamasını yapmışlardır. Maya sayısının  $10^1$ - $10^9$  kob/g olarak saptandığı çalışmada, maya izolatlarının tanımlanmasında API ID 32C maya tanımlama test kitini ve geleneksel identifikasyon metotlarını kullanmışlardır. 30 örnekte toplam 20 farklı maya türü tanımlamışlardır. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lusitaniae*, *C. colliculosa* ve *S. dairenensis*’ in ortama hakim türler olduğunu, *Dekkera bruxillensi*, *C. lipolytica* ve *C. tropicalis*’ in tanımlama sıklığının daha az olduğunu belirtmektedirler. Yedi *S. cerevisiae* izolatın DL-laktozu asimile edebildiği, *C. kefir* izolatlarının DL-laktozu asimile edebildiği halde sitratı asimile edemediği belirtilmektedir.

Apan (2007) beyaz peynir yüzeyinde gelişen ve peynirde potansiyel bozulma etmeni olan maya suşlarının izolasyonu ve tanımlanması konusunda çalışmışlardır. Bu çalışmada, 40 adet peynir örneğinde uygulanan ön işlemlerden sonra izole edilen 90 maya suşu, biyokimyasal ve morfolojik tanı testlerinin sonuçlarına göre

sınıflandırılmıştır. Araştırmada elde edilen bulgulardan beyaz peynirlerin maya açısından büyük ölçüde kontamine olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan tanı testlerinin sonuçlarına göre, izole edilen maya suşlarından tanımlanabilenleri *Kluyveromyces* (19), *Pichia* (18), *Cryptococcus* (17), *Candida* (12), *Metschnikowia* (6), *Trichosporon* (6), *Debaryomyces* (5), *Rhodotorula* (2) cinslerine giren türlerin oluşturduğu belirtilmiştir.

Valdes-Stauber ve ark. (1997) Brick peynirlerinin yüzey mikroflorası üzerine yaptıkları çalışmada 5 çiftlikten aldıkları örneklerde  $\text{cm}^2$ ' de  $2 \times 10^5$  -  $4 \times 10^7$  kob/g düzeyinde maya tespit etmişlerdir. Dominant türler *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens* ve *Debaryomyces hansenii* olup, *Candida intermedia*, *Candida catenulata*, *Yarrowia lipolitica*, *Galactomyces geotrichum*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon beigelii* ve *Torulospira delbrueckii* takip eden türlerdir.

Petersen ve ark. (2002) tarafından *Debaryomyces hansenii*' nin özel önemini vurgulayarak maya ve bakterileri birlikte içeren kompleks bir mikrofloradan oluşan bir yüzey tabakasına sahip olan Danbo tipi peynirde *Debaryomyces hansenii* suşlarının incelendiği çalışmada, Danimarka' da bir mandıradan pastörize süt, salamura ve olgunlaşma sırasında peynir yüzeyinden alınan örnekler incelenmiştir. Peynirin olgunlaşmasının başlangıç döneminde *Trichosporon spp.*, *Rhodotorula spp.*, ve *Candida spp.*, gibi maya türleri düşük miktarlarda bulunurken, başlangıçtan itibaren tüm olgunlaşma süresi boyunca baskın maya türünün *D. hansenii* olduğu ve üretim esnasında bu suşun çevre koşullarına diğer suşlardan daha iyi adapte olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, laktoz ile suşların büyüme yeteneklerinin değiştiği, olgunlaştırmanın ilk günlerinde mayaların baskın olmasına karşın, olgunlaştırmadan yaklaşık beş gün sonra maya popülasyonunun azaldığı vurgulanmaktadır.

#### 2.4. Peynirlerde Mayaların Starter Kültür Olarak Kullanımı

Günümüzde tüketiciye, standart ve iyi kalitede peynirler sunmak için yeni peynir çeşitleri üretilmiş, modern alet ve ekipmanlarla yapım tekniğinde standardizasyona ağırlık verilmiş bunların yanında üretimde iş gücü azaltılmıştır. Buna ek olarak birçok peynir türünde üretimin ayrılmaz bir parçası olan olgunlaşma yöntemleri ile ilgili bazı yeni uygulamalara gidilmiştir (Kesenkaş ve Akbulut 2006).

Peynir ve diğer fermente süt ürünleri üretimi fermente gıda sanayinin önemli bir sektörünü oluşturur. Başlangıçta ilke olarak fermente süt üretimi yapımında, süt kendi haline bırakılarak doğal olarak içerdiği floranın etkisiyle ekşimesi yani asitliğinin gelişmesi sağlanırdı. Ancak bu yöntem her zaman istenilen sonuçları vermez ve elde edilen ürünlerin kalitesi büyük değişiklikler gösterirdi. Daha sonra fermente sütün, peynir altı suyunun veya yayık altının bir kısmını ayırarak sonraki üretimde kullanılan süte veya kremaya katma uygulaması gelişmiş ve böylece starter kültürlerin ilk şekli ortaya çıkmıştır (Ateş 1999).

Olgunlaşma, her peynir çeşidinin kendine özgü tat, koku ve görünüşü alabilmesi için belirli koşullar altında, belirli sürede geçirdiği değişikliklerin toplamı olarak tanımlanabilir. Bu dönemde peynirin ana bileşenleri olan protein, laktoz ve yağ parçalanmakta, ortaya çıkan ürünler peynirlere özgün tat ve aroma kazandırmaktadır (Kesenkaş ve Akbulut 2006).

Üretimlerinde mikrobiyel bir olgunlaşma dönemine gerek olan gıdaların, mümkün olduğunca kısa sürede yapı, koku, lezzet, renk, görünüm ve miktarca üstün düzeyde gelişmesi ve aynı kaliteyi sürekli koruması amacıyla starter kültürlerden yararlanılmaktadır (Yaygın 1988).

Hastalık etkeni aktif organizmaların yıkımı için, peynire işlenecek süt

pastörize edilmekte, bunun sonucunda yararlı mikroflora da büyük zarar görmektedir. Meydana gelebilecek tat ve aroma eksikliklerini gidermek ve istenen tekstürel özellikleri kazandırmak için, peynire işlenecek sütlere, peynir çeşidine göre spesifik laktik starter kültürler ilave edilmekte böylece peynirlerin olgunlaşma süresi, tat ve aromaları kontrol edilmeye çalışılmaktadır (Tunçtürk 2004).

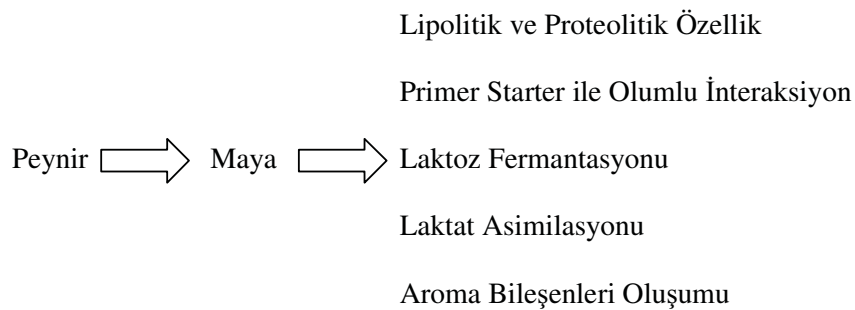
Bunun yanında;

- Olgunlaşma sıcaklığını artırmak,
- Yüksek basınç uygulamaları,
- Çeşitli lipolitik ve proteolitik enzim preparatlarının kullanımı,
- Zayıflatılmış starter kültürlerin kullanımı,
- Genetik olarak modifiye edilmiş laktik kültürlerin kullanımı bilinen diğer yöntemlerdir (Tunçtürk 2004; Kesenkaş ve Akbulut 2006).

Mayalar ürettikleri enzimlerle karbonhidrat, protein ve yağları parçalarlar ve parçalanma sonunda yeni birçok maddeler oluşur. Doğada çok yaygın olarak bulunurlar ve birçok gıdanın bozulmasına neden olurlar. Kuvvetli proteolitik aktivite gösteren ve yapışkanlık yapan mayalar da peynir yapımında kullanılmazlar. Peynirlerde tespit edilen acı lezzet, bazı arzulanmayan mayaların üremesinden kaynaklanır. Yüzeyleri kırmızı kültürle sıvanmış yumuşak peynirlerde laktik asidi okside eden mayalar olgunlaşmaya iyi bir katkıda bulunurlar. Özellikle zayıf proteolitik aktivite gösteren mayalar, bu tip peynirlerde tipik lezzetin oluşumunu sağlarlar. Bu amaçla fizyolojik özellikleri göz önünde bulundurularak ayrılan *Mycoderma*, *Torula* ve *Oospora* türleri ayrı ayrı veya karışık kültürler halinde üretilirler. Mayalardan endüstride çok yararlanılır. Kefir, şarap, ispiro ve bira üretiminde en önemli mikroorganizma mayalardır. Örneğin; süt endüstrisinde *Saccharomyces kefir* ile *Candida kefir*, bira endüstrisinde *Saccharomyces*

*carlsbergensis* ile *Saccharomyces cerevisiae*, ispirto endüstrisinde *Saccharomyces cerevisiae*, kuru sucuk yapımında *Debaryomyces spp.* ve ekmek endüstrisinde ise *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces etigus* ile *Candida tropicalis* sayılabilir (Ateş 1999).

Mayaların olgunlaşma süresince başlıca katkısı, özellikle ortam pH'sını azaltan laktik asidi kullanarak bakteriyel gelişmeyi desteklemek ve olgunlaşmanın ikinci kademesini başlatmaktır. Mayaların olgunlaşma süresince peynir pH'sında meydana getirdiği bu değişiklik sadece laktik asit kullanımı ile ilgili olmayıp, proteolizden kaynaklanan alkali metabolizma ürünleri de pH'yı düşürebilmektedir. Bunun yanında mayaların peynir lezzet ve aromasına katkıları, bazı türlerin genellikle laktozu fermente etme ve bunun sonucu olarak etanol, asetaldehit, etil asetat ve etil butirat oluşturmalarına bağlanabilir (Kesenkaş ve Akbulut 2006). Bazı mayaların yüksek lipolitik ve proteolitik aktiviteye sahip olmaları, aminoasit, yağ asitleri ve esterler gibi aroma oluşumuna öncülük eden maddelerin meydana gelmesinde büyük rol oynamakta, bununla birlikte mayalar, diğer mikroorganizmalar için gerekli B vitaminleri; pantotenik asit, niasin, riboflavin ve biotin gibi bazı gelişme faktörlerini salgılayarak gelişimi desteklemektedir. Mayaların peynir üretiminde kontrollü destek kültür olarak kullanımı ile özellikleri Şekil 1'de özetlenmiştir (Jakopsen ve Narvhus 1996).



**Şekil 1.** Mayaların peynir üretiminde destek kültür olarak kullanımı

Peynir olgunlaşmasında yaygın olarak laktik asit bakterilerinden ve mikrobiyal kaynaklı enzimlerden yararlanılsa da günümüzde *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Pichia jadinii*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Yarrowia lipolytica* gibi mayaların peynir olgunlaşmasında da kullanılabilirliği konusunda çalışmalar yapılmaktadır (Kesenkaş ve Akbulut 2006).

Kosikowski (1978) bazı peynir çeşitlerinin olgunlaştırılmasında yalnızca mayaların kullanılmasının söz konusu olamayacağını ancak biyolojik olarak küflerle olgunlaştırmada mayaların kullanılmasının önemli katkılarının olduğunu belirtmiştir. Küflerle birlikte *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis* ve *Hansenula* gibi mayaların kullanıldığı durumlarda, olgunlaştırma odaları raflarına yerleştirilen peynirlerin yüzeyinde öncelikle mayaların geliştiğini; mayaların peynirde bulunan laktik asidi yıkarak yüzey pH'sının yükselmesini sağladıklarını, bunun da aerob gelişen bakteri ve küflerin gelişmesi için uygun bir ortam teşkil ettiğini saptamıştır. Aynı zamanda mayaların güçlü proteolitik ve lipolitik aktiviteleri ile olgunlaştırma kültürü olarak kullanılan mikroorganizmalar için uygun bir ortam sağlamada etkili olduğunda belirtmiş; Fransız Camembert peynir fabrikalarında maya varlığının, şampanya benzeri hoş giden koku ve aroma ile karakterize edildiğini ileri sürmüştür.

Reps (1993) kalıp peynirlerden izole ettiği proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip mayaların sentezlediği maddelerle, *Micrococcus caseolyticus*, *M. freudenreichii* ve *M. varians* türlerinin gelişmesini teşvik ettiğini belirtmiştir. Araştırmacının bulgularına göre, mayalar özellikle *Debaryomyces* ve *Trichosporon* cinslerine ait türlerin, endoproteinaz enzimleri sentezler. Peynir yüzeyindeki pH, *Debaryomyces* ve *Trichosporon* cinsi mayaların endoproteinaz aktivitesi ile uygun düzeye yaklaşır. Bu da Trapsit peynirinin yüzey tabakasındaki serbest aminoasit içeriğinin, yüzey mayaları ile *Brevibacterium linens*'in birlikte bulunması durumunda oldukça yüksek olduğu gerçeği ile kanıtlanmıştır. Mayaların, peynirlerin olgunlaştırılmasında kullanılan startere katkılarından dolayı önemli rollerinin olduğu vurgulanmıştır.

## 2.5. Otlu Peynir Yapımında Kullanılan Otların Hazırlanması ve Bazı Özellikleri

Van bölgesinde üretilen “Otlu Van Peyniri” veya “Otlu Van Kaşarı” diye anılan Van otlu peynirlerinin üretimi genel hatları ile şöyle yapılmaktadır:

Van ilinde otlu peynir imalatı Mayıs ve Haziran aylarında yapılmakta olup kullanılan süt çoğunlukla koyun sütüdür. Peynir yapılacak süt önce 30°C’de mayalanır. 1.5-2 saat içinde oluşan pıhtı içine sirmo, helis, mendo, kekik, nane, dereotu vb. otları katılarak torbalara doldurulur. Torba içindeki 5-6 saatlik baskı sonrası oluşan teleme, 2-3 cm kalınlıkta dilimlenir, kuru tuz ile tuzlanarak 3-5 gün serin bir yerde bekletilir. Sonra ya salamuraya konulur ya da önceden hazırlanmış cacıkla bir sıra peynir bir sıra cacık olmak üzere küp, teneke veya bidonlara hava almayacak bir şekilde doldurulur. Serin bir yerde sonbahara kadar olgunlaşmaya bırakılır (Ergün ve ark. 1992).

Son zamanlarda, otlu peynirin endüstriyel olarak üretimi başlatılmıştır (Özer ve ark. 2002). Otlu peynire yöresel olarak sirmo (*Allium* sp.), mendi (*Chaerophyllum macropodum*), helis (*Prangos ferulacea*) ve siyabo (*Ferula rigidula*) gibi isimlerle bilinen otlar katılmaktadır. Bu otların peynire değişik tat, koku ve aroma katmasının yanı sıra peynirin olgunlaşmasında da etkili olduğu belirtilmektedir (Coşkun ve Tunçtürk 2000; Tarakçı ve ark. 2005).

Son yıllarda tüm dünyada doğal beslenmeye doğru bir eğilim gelişmiştir. Bu eğilimin güç kazanması ile dikkatler doğada kendiliğinden yetişen kültüre alınmamış bitkilere de yönelmeye başlamıştır. Ülkemizde doğadan bitki toplayarak tüketim hala birçok yörede yaygınlığını korumaktadır. Tüketim gıda amaçlı olabildiği gibi hastalıkları iyileştirme amaçlıda olabilmektedir. Bitkilerin hastalıklara karşı kullanılması tarihin en eski çağlarına kadar dayanır. Eski kültürler baharat ve



bitkileri kullanarak, onların tıbbi ve gıda koruyucusu olarak değerini anlamış ve tanımlamışlardır. Amerikan yerlileri 1625 bitki türünden gıda ve 2564 bitki türünden de ilaç olarak faydalanmışlardır. Hipokrat'ın 300-400 kadar tıbbi bitkiden faydalandığı belirtilmektedir. Uzun savaş dönemlerinde, sebzenin pek bulunmadığı dönemlerde halkımızın çoğu dağlarda bulabildiği bazı yabani otları sebze olarak kullanmışlardır. Bu nedenle özellikle kırsal kesimde yaşayanların bazı yabani otları sebze olarak kullanmaktadır (Alpaslan 2009).

Van yöresi el değmemiş yaygın alanları ile doğadaki bitki çeşitliliğini ve bunların tüketim kültürünü devam ettiren sayılı bölgelerimizden birisidir. Yaygın kanıya göre 200 yıl kadar önce, İran'dan Van'a gelen bir Ermeni hekim, otlu peynirin de formülünü yanında getirmiş. O zamanlar, bu peynirin kimi hastalıklara iyi geldiğine inanılmış. Koyun sütü ve özel olarak hazırlanmış peynir mayası ile çeşitli otların karışımından yapılan otlu peynirde dağ ve yaylalardan toplanan yabani sarımsak (sirmo), dağnanesi, mustafaçiçeği (mendi), kekik, helisi, siyabo (çaşur) gibi otlar kullanılmaktadır (Anonim 2004). Otlu Peynir yapımında kullanılan otların yerel isimleri ve Latincele Çizelge 3'te verilmiştir (Coşkun 2005; Hayaloğlu 2008).

**Çizelge 3.** Otlı peynir yapımında kullanılan otların Latince ve yerel isimleri

| Latince Adı          | Yerel Adı           |
|----------------------|---------------------|
| <i>Allium</i>        | Sirmo               |
| <i>Chaerophyllum</i> | Mendi               |
| <i>Anthriscus</i>    | Mendo               |
| <i>Silene</i>        | Siyabo              |
| <i>Mentha</i>        | Yarpuz, yabani nane |
| <i>Ocimum</i>        | Reyhan, fesleğen    |
| <i>Heracleum</i>     | Sov                 |
| <i>Ferula</i>        | Heliz               |

Otlı Peynir yapımında kullanılan bazı otların kültürel ve botanik özellikleri; Siyabo, 70-120 cm yükseliğinde, yapraklı çok parçalı ve tüysüz çiçekleri sarı renkli ve çok yıllık otsu bir bitkidir. Orta ve Doğu Anadolu dağlarında yetişir. Halk arasında çağşır, çaşır, çaşur ve çavşır olarak da adlandırılmaktadır. Sirmo, Doğu Anadolu bölgesinde yetişir. Kuvvetli kokuya sahip olan sirmonun yaprakları köylüler tarafından çorba, peynir, börek içine koku verici olarak ilave edilmektedir. Sirmo (yabani sarımsak) yemeklere koku vermek ve tad vermesi için çok sık olarak ve sarımsak yerinde kullanılmaktadır. Dağ kekiği, 20-30 cm yükseklikte, çalı görünüşünde, tüylü ve beyaz çiçekli bir bitkidir. Van otlı peynirinde katılmaktadır (Baytop 1984; Tabata ve ark. 1994). Yarpuz (*Menthae pulegium* L. püjan, havşan), 10-40 cm yükseklikte, çok yıllık bir otsu bitkidir. Yaprakları kısa saplı az veya çok tüylüdür. Yarpuzun mide bulantılarını kesici ve ferahlatıcı etkisi vardır. Sulak çayırlarda bol olarak bulunmaktadır. Salatalarda kullanılmaktadır (Baytop 1984).

## 2.6. Mayaların Moleküler Karakterizasyonu

Mayalar geleneksel olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Ancak bu yöntemler, kültürel koşullardan çok fazla etkilenmekte ve yanlış sınıflandırmalara yol açabilmektedirler. Geleneksel biyokimyasal yöntemlerle mayaların tür düzeyinde tanımlanmaları için, 60-90 arasında testin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu işlem karmaşık, zahmetli ve zaman alıcıdır. Moleküler yöntemler ise, hızlı, kolay ve klasik biyokimyasal yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir (Guillamón ve ark. 1998; Arroyo-Lopez ve ark. 2006).

Morfolojik ve biyokimyasal fenotipler, bilinmeyen bir izolatin

identifikasyonu için temel kriter olmaya devam etmekle birlikte, bu fizyolojik karakterlerin genomun sadece küçük bir fraksiyonu tarafından belirlenebileceği ifade edilmektedir. Bu nedenle, maya sistematğinde kullanılan fenotipik karakterler, moleküler esaslı kriterlerle kombine edilmektedirler (de Barros Lopes ve ark. 1998).

Mayaların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine dayalı yöntemlerin karmaşık, zaman alıcı olmaları ve zaman zaman hatalı sınıflandırmalara yol açabilmeleri nedeniyle, mayaların identifikasyonu ve karakterizasyonunda DNA bazlı teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikler arasında; DNA-DNA hibridizasyonu, elektroforetik karyotipleme, kromozomal ve mitokondriyel DNA'ya RFLP yönteminin uygulanması, ribozomal DNA (rDNA) dizisinin belirlenmesi yer almaktadır. Bu moleküler teknikler içerisinde, PCR bazlı metotlar, hem tür içi ayırma hem de maya izolatlarının tür bazında identifikasyonuna olanak sağlamaktadırlar. Maya identifikasyonunda kullanılan yararlı bir metot, farklı ribozomal RNA gen bölgelerinin restriksiyon analizidir. Bu teknik, rRNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve elde edilen PCR ürününün restriksiyon enzimleri yardımıyla kesilmesidir. Bu teknik, yalnızca PCR ürünü ile identifikasyon ve tiplendirmeyi gerçekleştiren yeni PCR metotlarına kıyasla daha yavaştır. Bu yeni PCR metotlarının birçoğu, maya genomundaki değişik tekrarlanan sekansların (mikrosatelitler, Ty transpozonun delta elementleri, intron splice bölgeleri gibi) amplifikasyonuna dayanmaktadır. REP (Repetitive extragenic palindromic) ve ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) elementleri gibi benzer tekrarlanan sekanslar bakterilerde tanımlanmıştır. Öbakteriyel türlerin PCR çalışmaları, bu tekrarlanan sekansların bakteriyel türler ve tür içerisindeki suşlar için spesifik olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, REP ve ERIC elementleri bakterileri tanımlamada ve bakteriyel türler arasındaki taksonomik ilişkileri belirlemede kullanılmaktadır (Hierro ve ark. 2004).

Mayalar arasındaki filogenetik ilişkiler, ribozomal RNA genlerinin sekanslarının karşılaştırılması ile belirlenebilmektedir. Bu yöntemin en önemli avantajı; ribozomların tüm organizmalarda ortak bir evrimsel kökeni paylaşması nedeniyle, hem benzer hem de uzak türlerin karşılaştırılmasını sağlamasıdır (de Barros Lopes ve ark. 1998). Moleküler yöntemler içerisinde 5S, 5.8S, 18S, 26S gibi ribozomal RNA genlerini kodlayan DNA'nın ve kodlanmayan ITS (internal transcribed spacer) ve IGS (intergenic spacer) bölgelerinin restriksiyon analizine dayalı olanların, pek çok maya türünün tanımlanmasında etkili oldukları görülmektedir. Çünkü ribozomal genler, düşük intraspesifik polimorfizm ve yüksek interspesifik değişkenlik göstermektedirler. *Saccharomyces* ve *Kluyveromyces* türlerinin sınıflandırmalarında ve son yıllarda, şarap maya türlerinin identifikasyonunda bu genlerden yararlanılmaktadır. 5.8S-ITS bölgesi, 18S ve 26S rRNA genlerine kıyasla çok daha yüksek oranda interspesifik farklılıklar gösterdiğinden, yakın akraba türlerin ayırımına olanak sağlayabilmektedir. Ayrıca, 18S ve 26S rRNA genlerinden daha küçük boyutta olması yöntemin uygulanmasını kolaylaştırmaktadır (Fernández-Espinar ve ark. 2000; Esteve-Zarzoso ve ark. 1999; Arroyo-López ve ark. 2006).

Son yıllarda, rRNA ITS bölgesindeki farklılıklar maya türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. 5.8S rRNA geni (kodlanmış ve korunmuş) ve yanında 2 adet değişken ve kodlanmamış ITS1 ve ITS2 bölgelerini içeren ITS bölgesi, düşük tür içi değişkenlik ve yüksek türler arası polimorfizm göstermektedir. Bu ribozomal bölgelerin PCR ile amplifikasyonunun ardından restriksiyon analizleri ile mayaların tanımlanmaları gerçekleştirilebilmektedir (Heras-Vazquez ve ark. 2003).

Botes ve ark. (2007) boza örneklerinde yaptıkları çalışmalarda 3 boza

örneğinin 2 tanesinde  $1.3 \times 10^2$  cfu/mL ile  $1.8 \times 10^3$  kob/mL seviyelerinde maya örnekleri izole etmişlerdir. Mayaların tanımlama sonuçları D1/D2 rDNA bölgesinin sekanslarına göre elde edilmiş olup buna göre boza örneklerinden izole edilen mayalar; *Candida diversa*, *Candida inconspicua*, *Candida pararugosa*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia fermentans*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia norvengensis*, *Rhodotorula mucilaginosa* ve *Torulaspora delbrueckii* olarak belirlenmiştir.

Lopandic ve ark. (2006) süt ürünlerinde mayaların tanımlanmasında geleneksel ve moleküler tekniklerden faydalanmışlardır. Çeşitli süt ürünlerinden izole edilen mayaların fenotipik (morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik karakterleri) ve genotipik (RAPD-PCR, 26S rRNA kodlanmış genin D1/D2 bölgesinin sekansı) yöntemlerin entegre biçimde kullanılmasıyla tanımlamaları yapılmıştır. Toplam 513 izolattan 460'ı Ascomycetes 53'ü Basidiomycetes mayalardır. Maya izolatları biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin temel alınması ile 26S rDNA'nın D1/D2 bölgelerinin karakterize edilmesi ile tanımlanmıştır. Bu çalışmada en sık izole ettikleri maya suşları *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica* ve *Candida zeylanoides* olarak tespit edilmiştir.

Alvares-Martin ve ark. (2007) Cabrales peynirinin yapılması ve olgunlaşması esnasında izole edilen 74 maya suşunun sınıflandırılmasında fenotipik ve moleküler yöntemleri denemişlerdir. Araştırmacılar fenotipik sınıflandırmada ticari test kitleri ve klasik biyokimyasal analizleri, moleküler sınıflandırmada ise ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin RFLP profillerini belirleyerek tanı yapmışlardır. İzole ettikleri mayalardan 41 maya suşunu fenotipik testler kullanarak tanımlamışlardır. Tanımlanan suşlar arasında 14'ü *Debaryomyces hansenii*, 11'i *Kluyveromyces lactis* ve 9'u *Pichia fermentans* olarak belirlenmiştir. Sınıflandırmalar *Hae* III ve *Hinf* I RFLP profilleri

ve ilgili nükleotid sekanslarının karşılaştırılması ile doğrulanmıştır. Fenotipik testler farklı diğer suşların sınıflandırılmasında sonuç vermemiştir. Aynı araştırmacılar 16 maya suşunu *Zygosaccharomyces* ile ilişkilendirilmiş olup bu türlerinde genetik olarak *Pichia* spp. (13 izolat) ve *Saccharomyces* spp. (3 izolat) ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar bazı maya suşlarının sınıflandırılmasını yapamamış, bunların yeni türler olduğunu veya bu türlerin sekanslarının veri tabanlarında olmadığı belirtmişlerdir.

Psomas ve ark. (2001) bebek dışkılarında ve feta peynirlerinde maya izolasyonu için yaptıkları çalışmada mayaları fenotipik kriterler, RAPD-DNA-PCR ampilifikasyonu ve mitokondriyal DNA'nın restriksiyon analizleri ile karakterize etmişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda mayaların fenotipik karakterizasyonu ile tür düzeyinde RAPD-PCR sonuçları arasında iyi bir uyum olduğu belirtilmiştir. Ayrıca suş düzeyinde RAPD-PCR sonuçlarının mitokondriyal DNA restiriksiyon analizleri kadar iyi ayırt ettiğini belirtmişlerdir.

El-Sharoud ve ark. (2009) taze ve depolanmış Domiati peynirinde, Kariesh peynirlerinde ve Matared kremadan 40 maya izolatını 5.8S-ITS rDNA bölgesinin RFLP'si ve 26S rRNA geninin D1 ve D2 bölgelerinin sekanslarına göre tanımlamışlardır. Tanımlanan mayaların 13 tanesi *Issatchenkia orientalis*, 4 tanesi *Candida albicans*, 9 tanesi *Clavispora lusitaniae*, 1 tanesi *Pichia ohmeri*, 6 tanesi *Kluyveromyces marxianus* ve 7 tanesinde *Candida catenulata* olarak adlandırmışlardır.

Şenses-Ergül ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada gıdalarda geleneksel ve moleküler testleri kullanarak bazı mayaları izole ederek tanısını yapmışlardır. İzole edilen 22 maya suşunun 11 cinse dahil 12 türe ait olduğunu bulmuşlardır. Bu mayalar *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*,

*Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus albidus*, *Aureobasidium* spp., *Hanseniaspora valbyensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Pichia anomala*, *Geotrichum candidum* ve *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanmıştır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Bu çalışmada kullanılan mayalar Van ve yöresinde Otlı Peynir yapımında kullanılan salamura edilmiş Sirmo, Mendo, Heliz, Sov (Sah) ve Çahşır otlarından izole edilmiştir. Otlar, peynir altı suyu ve su içeren salamura içerisinde doğal fermantasyon ile üretilmiş ve depolanmıştır. İzolasyon kaynağı olarak kullanılan otların özellikleri Çizelge 4’de verilmiştir.

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Mayaların İzolasyonu**

Mayaların izolasyonu amacıyla salamura içerisindeki otlardan 10 g alınarak 90 mL fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) içerisinde 3 dakika homojenize edildikten sonra  $10^{-5}$ ’e kadar seyreltilmiş ve ardışık 3 seyreltiden PDA (Merck) besiyerine ekim yapılarak 28°C de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her petri kutusundan birbirinden farklı morfolojik özellik özelliklere sahip koloniler seçilerek izole edilmiştir. İzolatlar saflık kontrolleri yine aynı besiyerine sürme yöntemi ile ekim yapıldıktan sonra aynı koşullarda inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir.



Saf maya kültürleri çalışma yapıncaya kadar %20 gliserol ortamında -18°C’de muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 4.** İzolasyonda kullanılan salamura otların kodları ve özellikleri

| <b>Salamura Kodu</b> | <b>Salamuranın Yapılış Tarihi</b> | <b>Özelliği</b>                                               |
|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1                    | 10.05.2008                        | Peyniraltı suyu ilaveli- Eski sirmo salamurada (önceki yılın) |
| 2                    | 10.05.2008                        | PAS ilaveli salamura- Taze sirmo                              |
| 3                    | 10.05.2008                        | Sulu salamura - % 80-85 mendo, çok az sirmo ve heliz (taze)   |
| 4                    | 10.05.2008                        | %100 mendo (taze) PAS salamura                                |
| 5                    | 10.05.2008                        | Eski sirmo - PAS ilaveli salamura                             |
| 6                    | 17.05.2008                        | Mendo - PAS ilaveli salamura                                  |
| 7                    | 30.05.2008                        | Mendo - PAS ilaveli salamura                                  |
| 8                    | 17.05.2008                        | Heliz – PAS ilaveli salamura                                  |
| 9                    | 17.05.2008                        | Sirmo – PAS ilaveli salamura                                  |
| 10                   | 30.05.2008                        | Mendo - Su salamura                                           |
| 11                   | 30.05.2008                        | Sirmo + Mendo, sulu salamura                                  |
| 12                   | 30.05.2008                        | Çağır - PAS ilaveli salamura                                  |
| 13                   | 02.06.2008                        | Mendo + çok az sirmo ve nane - PAS ilaveli salamura           |
| 14                   | 30.05.2008                        | Heliz - sulu salamura                                         |
| 15                   | 30.05.2008                        | Sirmo – PAS ilaveli salamura                                  |
| 16                   | 02.06.2008                        | Sirmo + çok az Mendo+çok az nane - PAS ilaveli salamura       |
| 17                   | 02.06.2008                        | Sov (Sah) - PAS ilaveli salamura                              |
| 18                   | 02.06.2008                        | Sirmo – PAS ilaveli salamura                                  |
| 19                   | 03.06.2008                        | Sirmo – sulu salamura                                         |
| 20                   | 03.06.2008                        | Sirmo – PAS ilaveli salamura                                  |
| 21                   | 03.06.2008                        | Sov (Sah) - PAS ilaveli salamura                              |

### 3.2.2. Mayaların Mikroskopik Morfolojilerinin Belirlenmesi

Mayaların morfolojilerinin incelenmesinde sıvı maya kültüründen bir öze dolusu örnek alınarak lam üzerinde damıtık suda yayma, kurutma, tespit işlemleri

yapılarak preparat hazırlanmıştır. Metilen mavisi ile basit boyama yapıldıktan sonra aydınlık saha mikroskopunda (Boeco, Almanya), x100 objektifte görüntüleri incelenmiştir (Temiz 2000).

### **3.2.3. Mayaların İdentifikasyonu**

#### **3.2.3.1. Maya İzolatlarının RYP Sistemi ile Tanımlanması**

Maya izolatlarından RapID Yeast Plus System (RYP, Remel) ile tanımlanması amacıyla PDA (Merck) besiyerlerine ekim yapıldı. Daha sonra besiyerleri 28°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Yeterli büyüme gösteren kültürler RapID inokülasyon sıvısı kullanılarak 3 McFarland standart bulanıklığına ayarlandıktan sonra 15 dk içinde kislere yüklendi. RYP sistemi konvansiyonel ve renk veren substratları içeren 18 kuyucuktan oluşan bir test panelidir. Bu sistemdeki testler; glukoz, maltoz, sukroz, trehaloz ve rafinozun kullanımı ve yağ asitlerinin hidrolizi, p-nitrofenil-N-asetil-β, D-galaktosaminit, p-nitrofenil-α-D-glukozit, p-nitrofenil-β- D-glukozit, o-nitrofenil-β-D-galaktozit, p-nitrofenil-α-D-galaktozit, p-nitrofenil-β-D-fukozit, p-nitrofenil fosfat, p-nitrofenil fosforilkolin, üre, prolin β-naftilamid, histidin β-naftilamid ve lösilglisil β-naftilamid'tir. Panel 30°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 1.'den 6. kuyucuğa kadar olan kuyucuklarla 15. ci kuyucuğa reaktif ilave etmeden renk değişimleri okunmuştur. 7.'den 14. kuyucuğa kadar olanlara RapID Yeast Plus Reaktif A'dan 1 damla damlatılıp 30-60 sn arasında okumaları yapılmıştır. 16., 17. ve 18. kuyucuklara da RapID Yeast Plus Reaktif B'den 1 damla damlatılıp 30-60 sn arasında okuma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar kuyucuklardaki renk değişimlerine göre değerlendirilmiş olup renk

değişimi olup olmadığında göre panel değerlendirme kartlarına pozitif veya negatif olarak işaretlenmiştir. Bu kartlardaki veriler daha sonra üretici firma tarafından sağlanan veri tabanında bilgisayar ortamında (ERIC, Remel) değerlendirilerek maya izolatlarının tanıları RYP sistemine göre yapılmıştır (Smith ve ark. 1999).

### **3.2.3.2. Maya İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması**

#### **3.2.3.2.1. DNA İzolasyonu**

Maya hücrelerinin DNA izolasyonu için 2 farklı yöntem kullanılmıştır. İlk olarak Genomic DNA İzolasyon Kiti K0512 (Fermentas) kullanılarak Maya hücrelerinin DNA'ları izole edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, YPG Agar besiyerinde 28°C'de 48 saatte gelişen maya kolonilerinden 1 öze dolusu 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Maya hücresi içeren mikrosantrifüj tüplerine 200µL TE tampon çözeltisi (1M Tris pH: 8.0, 0.5 M EDTA pH: 8.0) eklenmiş olup tüplerin her birine 400 µL liziz çözeltisi eklenerek 65°C'de 5 dk su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hemen 600 µL kloroform eklenerek 3-5 defa ters düz edilerek emülsifiye edildikten sonra tüpler 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra presipitasyon çözeltisi hazırlamak için; 80 µL 10X konsantre presipitasyon çözeltisi 720 µL steril deiyonize su ile karıştırılmıştır. Santrifüj işleminden sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı (DNA içeren) faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 800 µL taze hazırlanmış presipitasyon çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 1-2 dk ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden hemen sonra süpernatant tamamen uzaklaştırılmış ve DNA peletinin 100 µL 1.2 M NaCl içerisinde çözünmesi için

düşük hızda vortekslenmiştir. Bu aşamada peletin tamamen çözünmesi sağlanmalıdır. Daha sonra üzerine 300 µL saf soğuk etanol eklenmiş ve DNA'nın çöktürülmesi amacıyla 10 dk (veya 12 saat) -20°C'de bekletilmiştir. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pelet %70'lik soğuk etanol ile tekrar yıkanmış ve elde edilen pelet 100 µL steril deiyonize suda pipetlenerek çözündürülmüştür. Gerçekleştirilen işlemlerden sonra elde edilen DNA çözeltisi moleküler analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. İzole Edilen DNA'lar %1 (w/v)'lik agaroz jele yüklenerek TBE tamponunda elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonunda kullanılan diğer yöntem ise Harju ve ark. (2004) tarafından uygulanan yöntemin kısmen modifikasyonu ile hazırlanan protokoldür. Bu yöntemde; YPG agarda gelişmiş olan maya kolonilerinden 1 öze dolusu alınarak YPG broth besiyerine ekim işlemi yapılmıştır. YPG broth besiyerinde 30°C'de 24 saat aktiveleştirilen maya örneklerinden daha sonra 1.5 mL alınarak 20000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelete 200 µL lizis çözeltisi (%2 TritonX-100, %1 SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH: 8.0, 1mM EDTA pH: 8.0) eklenmiştir. Tüpler 5 dk -27°C'de derin dondurucuda bekletildikten sonra 1 dakika süreyle 95°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Bu işlem 1 kez daha tekrarlandıktan sonra tüpler 30 sn yüksek hızda vortekslenmiştir. Daha sonra tüplere 200 µL kloroform eklenerek 2 dk daha vortekslenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 20000 g'de 3 dk santrifüjlendikten sonra üstte kalan sıvı faz, 400 µL soğuk saf etanol içeren mikrosantrifüj tüplerine tranfer edilmiştir. Karışım hafifçe ters düz edilerek karıştırılmıştır. Tüplerdeki karışımlar 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20000 g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Pastör pipeti ile süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pelet 0.5 mL %70'lik soğuk etanolle yıkanmıştır. Ardından 20000 g'de 5 dk santrifüjleme işlemi yapılarak pastör pipeti ile süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde

edilen pelet oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 30 µL deiyonize suda çözündürülmüştür. Elde edilen DNA'lar %1 (w/v)'lik agaroz jelde elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3.2.2. DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi, REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'nden hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi, Bigdye Cycle Sequencing (v.3.1.) kitinde önerilen protokol izlenerek, ABI 3130 XL Genetic Analyzer cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen baz dizileri BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak analiz edilmiştir. BLAST, aranan baz dizi sırasını veri tabanında bulunan mayalara ait baz dizileri ile karşılaştırarak aynı veya en yakın olan dizi sırasının ait olduğu mikroorganizmayı, % yaklaşımla veren bir programdır. Tarama sonucu, aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesi ve veri tabanı erişim numarası ile birlikte gösterilir (Altschul ve ark. 1997; Tang ve ark. 1998).

## **3.3. Mayaların Teknolojik Özellikleri**

### **3.3.1. Yüksek Sıcaklıkta Gelişme**

Mayaların yüksek sıcaklıkta gelişme yetenekleri belirlenirken, 28°C'de 24 saat boyunca YPG broth besiyerinde aktifleştirilen maya kültürleri, YPG broth besiyerine (10 mL) 1 öze dolusu inoküle edilmiş, 37°C ve 42°C'de 5 gün

inkübasyona bırakılarak gelişmeleri incelenmiştir (Nikolaou ve ark. 2006; Bağder 2008).

### **3.3.2. Tuza Dayanıklılık Testi**

Mayaların tuza dayanıklılık testleri %7.5, %10 ve %12.5 tuz içeren 10'ar mL YPG broth besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Buna göre 121°C' de 15 dk otoklavda sterilize edilerek hazırlanmıştır. Genç kültürlerden bir öze dolusu inoküle edilen tüpler 28°C'de inkübe edilmiştir. İki hafta süresince gelişme olup olmadığı besiyeri bulanıklığı izlenerek belirlenmiştir (Lodder 1970; Şahin ve Öztürk 1998; Apan 2007; Albayram 2007).

### **3.3.3. Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişme**

Maya suşlarının yüksek şeker konsantrasyonunda gelişme özelliklerinin belirlenmesinde, Parish ve Carroll (1987) tarafından önerilen yöntem, Iranzo ve ark. (1998) tarafından belirtilen bazı değişikliklerle uygulanmıştır. Denemeler, briks derecesi refraktometre ile 30'a ayarlanmış YPG broth besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Aktif maya kültürlerinden, içerisinde durham tüpü bulunan, steril 10 mL besiyerine 1 öze dolusu inoküle edilerek, 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda durham tüpünün üçte ikisinde gaz oluşturan maya suşlarının gelişmeleri pozitif olarak kabul edilmiştir (Apan 2007; Albayram 2007; Bağder 2008).

### 3.3.4. Farklı pH Değerlerinde Gelişme

Maya suşlarının düşük pH değerlerinde gelişebilme yetenekleri, pH değerleri 3.0 ve 4.0'a ayarlanan YPG broth besiyerinde incelenmiştir. Analizde kontrol olarak, pH değeri 7.1 olarak ölçülen YPG broth besiyeri kullanılmıştır. Çalışma kültürleri 24 saat boyunca 28°C'de aktiveleştirilen pasajdan, 10'ar mL YPG broth (pH 3.0, 4.0 ve 7.1) besiyeri içeren tüplere 1 öze dolusu inoküle edilmiş ve 28°C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda gelişme gösteren tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Apan 2007; Bağder 2008).

### 3.3.5. Orta Derecede Ozmotik Basıncıta Gelişme

Bu test için %10 NaCl ve %5 glukoz içeren Yeast Nitrogen Base besiyeri hazırlanmış, ve tüplere 5'er mL dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonra 24 saatlik genç kültürlerden bir öze dolusu inoküle edilen tüpler 28°C'de 2-3 hafta inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar şu şekilde değerlendirilmiştir; 2. haftaya kadar gelişme görülen kültürler pozitif, 2. haftadan sonra veya zayıf gelişme gösteren kültürler zayıf gelişme ve gelişme olmayan kültürler ise negatif gelişme olarak belirtilmiştir ( Deak ve Beuchat 1996; Gadaga ve ark., 2000; Kurtzman ve Fell 2000; Moreira ve ark., 2001; Apan 2007).

### 3.3.6. Üre Hidrolizi

Üre hidrolizi testi Ürea Broth besiyerinde (Oxoid) gerçekleştirilmiştir. Besiyeri hazırlandıktan sonra 0.22 µm gözenek çaplı filtreyle sterilize edilmiştir.

Aktif kültürlerden bir öze alınarak bu besiyerine inoküle edildilmiş ve 28°C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerdeki besiyeri renginin turuncudan kırmızıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Deak ve Beuchat 1988; Barnett ve ark. 1990; Deak ve Beuchat 1996; Liu ve ark. 1996; Kurtzman ve Fell 2000; Benli ve Çakmakçı 2003; Apan 2007; Albayram 2007).

### **3.3.7. Fermantasyon Hızı**

Mayaların fermantasyon hızları, fermantasyon başlıklı 500 mL'lik kahverengi fermantasyon şişelerinde 200 mL besiyerinde ve 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon besiyeri olarak %20 glukoz (g/mL) içeren YPG (pH 3.5) broth kullanılmıştır. YPG (pH 4.5) besiyerinde 28°C'de 24 saat aktiveleştirilen maya kültürleri besiyerlerine  $10^6$  hücre/mL düzeyinde aşılannmışlardır. Denemelerde kullanılan kahverengi şişelerin fermantasyon başlıklarına yaklaşık 3 mL düzeyinde steril saf su eklenerek, sadece CO<sub>2</sub>'in sistemden çıkışına olanak sağlanmıştır. Fermantasyonun gidişi, CO<sub>2</sub> üretimine bağlı olarak meydana gelen ağırlık azalmasının günlük olarak ölçülmesi ile izlenmiştir. Ağırlık azalması sabitlendiğinde fermantasyonun bittiği kabul edilmiştir (Iranzo ve ark. 1998; Perez-Coello ve ark. 1999; Bağder 2008).

### **3.3.8. Enzim Profillerinin Belirlenmesi**

Maya suşlarının enzim profillerinin belirlenmesi amacıyla API ZYM (BioMérieux, Fransa) test kitleri kullanılmıştır. Bu amaçla; YPG agar besiyerinde, 30°C'de 48 saat geliştirilen maya kültürlerinden saf koloniler alınarak, 5 mL'lik API



süspansiyon sıvısı içerisinde çözündürülmüş ve test sisteminde önerilen 5-6 McFarland bulanıklığına sahip bir süspansiyon hazırlanmıştır. Daha sonra sistem içeriğinde bulunan plastik inkübasyon kutularının göz göz delikli tepsisi üzerine nemli bir atmosfer yaratmak amacıyla, yaklaşık 5 mL damıtık su dağıtılmıştır. Bu inkübasyon kutusunun içerisine API ZYM şeritleri yerleştirilerek, mikropipet ya da pastör pipeti yardımıyla şeritteki her bir kuyucuğa 5-6 Mcfarland'lık bulanıklığa sahip kültür süspansiyonundan 65 µL aşılanmıştır. Aşılama işleminin ardından inkübasyon kutusunun plastik kapağı kapatılarak, 37°C'de 4-4.5 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa bir damla ZYM A ve bir damla ZYM B reaktifleri eklenerek, renk oluşumu için yaklaşık 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra test panelleri güçlü ışık kaynağı altında (~1000 W), kuyucuklara 10 cm mesafede, yaklaşık 10 saniye tutulmuştur. İşlemlerin sonunda maya suşlarının, API-ZYM test kiti içeriğinde yer alan 20 adet enzim aktivitesi yarı kantitatif olarak belirlenmiştir. Maya suşlarının enzim profilleri belirlenirken, oluşan rengin yoğunluğuna göre 0 ile 5 aralığındaki skala kullanılmıştır. Bu değerlendirme sistemine göre; 0 negatif reaksiyon, 5 maksimum yoğunlukta reaksiyon olarak değerlendirilmiş; 3, 4 ve 5 pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Reaksiyon sonuçlarının değerlendirilmesi, Çizelge 5'te belirtilen renk skalası yardımıyla gerçekleştirilmiştir (Anonim 2009).

### 3.3.9. Lipolitik Aktivite

Bu test için %0.01 CaCl<sub>2</sub> ve % 0.5 Tween 80 içeren PCA (Merck) besiyeri hazırlandı. Hazırlanan PCA 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 12.5 mL olacak şekilde petri kutularına dağıtılmıştır. İğne uçlu öze ile 24 saatlik genç

maya izolatlarından besiyerine nokta ekim yapılarak Petri kutuları 28°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerin çevresinde şeffaf zon oluşup oluşmadığına göre lipolitik aktivite vardır ya da yoktur şeklinde değerlendirilmiştir (Tükel ve ark. 2000; Fadda ve ark. 2004; Halkman 2005)

**Çizelge 5.** API-ZYM sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan renk skalası

| No. | Analiz edilen enzim              | Substrat                                   | Sonuç                       |                                           |
|-----|----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
|     |                                  |                                            | Pozitif                     | Negatif                                   |
| 1   | Kontrol                          |                                            | Renksiz ya da örneğin rengi |                                           |
| 2   | Alkalın fosfataz                 | 2-naftil fosfat                            | Mor                         | Renksiz ya da çok soluk sarı <sup>x</sup> |
| 3   | Esteraz ( C 4)                   | 2-naftil bütirat                           | Mor                         |                                           |
| 4   | Esteraz lipaz (C 8)              | 2-naftil kaprilat                          | Mor                         |                                           |
| 5   | Lipaz ( C14)                     | 2-naftil miristat                          | Mor                         |                                           |
| 6   | Lösin arilamidaz                 | L-lösil-2-naftilamid                       | Turuncu                     |                                           |
| 7   | Valin arilamidaz                 | L-valil-2-naftilamid                       | Turuncu                     |                                           |
| 8   | Sistin arilamidaz                | L-sistil-2-naftilamid                      | Turuncu                     |                                           |
| 9   | Tripsin                          | N-benzoil-DL-arjinin-2-naftilamid          | Turuncu                     |                                           |
| 10  | $\alpha$ – kimotripsin           | N- glutaril-fenilalanin-2-naftilamid       | Turuncu                     |                                           |
| 11  | Asit fosfataz                    | 2-naftil fosfat                            | Mor                         |                                           |
| 12  | Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz       | Naftol-AS-BI-fosfat                        | Mavi                        |                                           |
| 13  | $\alpha$ – galaktosidaz          | 6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-galaktopiranozit | Mor                         |                                           |
| 14  | $\beta$ – galaktozidaz           | 2-naftil- $\beta$ D-galaktopiranozit       | Mor                         |                                           |
| 15  | $\beta$ – glukuronidaz           | Naftol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronid         | Mavi                        |                                           |
| 16  | $\alpha$ – glukozidaz            | 2-naftil- $\alpha$ D-glukopiranozit        | Mor                         |                                           |
| 17  | $\beta$ – glukozidaz             | 6-Br-2-naftil- $\beta$ D-glukopiranozit    | Mor                         |                                           |
| 18  | N-asetil- $\beta$ -glukoaminidaz | 1-naftil-N-asetil- $\beta$ D-glukozaminid  | Kahverengi                  |                                           |
| 19  | $\alpha$ – mannozidaz            | 6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-mannopiranozit   | Mor                         |                                           |
| 20  | $\alpha$ – fukozidaz             | 2-naftil- $\alpha$ L-fukopiranozid         | Mor                         |                                           |

<sup>x</sup> Eğer şerit yoğun ışık kaynağına maruz kalmışsa renksiz olur ya da kontrolün rengini alır, eğer şerit yoğun ışık kaynağına maruz kalmamışsa, çok soluk bir renk elde edilir.

### 3.3.10. Proteolitik Aktivite

Mayaların proteolitik aktiviteleri 2 farklı yöntem kullanılarak, 2 farklı besiyerinde araştırılmıştır. Birinci yöntemde maya izolatlarının Skim Milk Agarda (SMA, Merck) proteolitik zon oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Bu amaçla maya izolatları SMA besiyerine sürme yöntemi ile ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış, oluşan koloniler etrafındaki şeffaf zonlar belirlenerek proteolitik zon oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir (Yıldırım 1997; Çakır ve ark. 2000; Halkman 2005). Maya izolatlarının proteolitik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan ikinci yöntemde ise %50 oranında skim milk içeren PCA besiyeri hazırlanmış ve 24 saatlik genç maya izolatlarından iğne uçlu öze ile nokta ekim yapılarak 28°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda gelişen maya kolonilerinin çevresinde şeffaf zon oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Şeffaf zon oluşuyorsa maya izolatlarının proteolitik aktivitesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Fadda ve ark. 2004).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Mayaların Tanımlanması

Bu çalışmada otlu peynir yapımında kullanılan salamura edilmiş sirmo, mendo, heliz, sov (sah) ve çahşır gibi otlardan izole edilen maya örneklerinin tanımlanması biyokimyasal hızlı tanıları RapID Yeast Plus System (Remel Inc., Lenexa, KS, USA) ile moleküler kesin tanıları ise 5,8S ve 18 rRNA ITS dizi analizi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon kaynaklarına göre mayalara verilen kodlar Çizelge 6'da verilmiştir.

#### 4.1.1. Mayaların RapID Yeast Plus System ile Tanımlanması

Maya izolatlarının biyokimyasal tanı sonuçları Çizelge 7'de verilmiştir. Ayrıca *C. krusei* M5.1 izolatının RYP kuyucuklardaki renk değişimleri Şekil 2'de, diğer tüm izolatların görüntüleri ise Ek B'de gösterilmiştir.

RYP sonuçlarına göre test edilen maya izolatlarından 5 tanesi *Candida krusei*, 5 tanesi *Yarrowia lipolytica*, 2 tanesi *Candida zeylanoides*, 2 tanesi *Candida lambica*, 1 tanesi *Candida glabrata*, 1 tanesi *Rhodotorula minuta*, 1 tanesi, *Rhodotorula rubra*, 1 tanesi *Candida kefyr*, 1 tanesi *Blastoschizomyces capitatus* ve 1 tanesi de *Cryptococcus neoformans* var. *uniguttulatus* olarak adlandırılmıştır.

**Çizelge 6.** İzole edilen mayaların izolasyon kaynakları ve kodları

| İzolat Kodu             | İzolasyon Kaynağı                                   |
|-------------------------|-----------------------------------------------------|
| M5.1<br>M5.2            | Eski sirmo - PAS ilaveli salamura                   |
| M6.1<br>M6.3<br>M6.4    | Mendo - PAS ilaveli salamurada                      |
| M8.1<br>M8.2            | Heliz - PAS ilaveli salamura                        |
| M9.1                    | Sirmo - PAS ilaveli salamura                        |
| M10.1                   | Mendo - Su salamura                                 |
| M11.1<br>M11.2          | Sirmo + Mendo, sulu salamura                        |
| M13.1<br>M13.2          | Mendo + çok az sirmo ve nane - PAS ilaveli salamura |
| M14.1                   | Heliz - sulu salamura                               |
| M15.1<br>M15.2          | Sirmo - PAS ilaveli salamura                        |
| M17.1<br>M17.2<br>M17.3 | Sov (Sah) - PAS ilaveli salamura                    |
| M18.2                   | Sirmo - PAS ilaveli salamura                        |

M (Maya) 5 (İzolasyon kaynağı salamuranın kodu).1 (İzolat numarası)

RYP sistemi özellikle klinik olarak önemli mayaların tanımlanmasında aynı gün içinde güvenilir sonuçlar verdiğinden, klinik laboratuvarlarında rutin kullanım için tavsiye edilmektedir. Bu sistemle sıklıkla görülen maya türlerinin %95 oranında nadir görülen türlerin ise ancak %75-79 oranında doğru olarak tanımlanabildiği bildirilmekle birlikte bazı türlerin ise tanımlanamadığı bildirilmektedir. Bu sistemle çalışan kullanıcıların uygun inokulum bulanıklığını hazırlayamaması ve inkübasyon bitiminde oluşan renk değişikliklerinin değerlendirilmesinde karşılaşılan zorluklar

nedeniyle mayaların tanımlanmasında ek yöntemlerin de kullanılmasını önermektedirler (Kitch ve ark. 1996; Helan ve ark. 1998; Kaçmaz ve ark. 2006).

**Çizelge 7.** Maya izolatlarının RYP sistemi ile tanımlama sonuçları

| Maya<br>Kodu | Tür Adı                   | Tanı<br>Yüzdesi | Maya<br>Kodu | Tür Adı               | Tanı<br>Yüzdesi |
|--------------|---------------------------|-----------------|--------------|-----------------------|-----------------|
| M5.1         | <i>C. krusei</i>          | 96,83           | M11.2        | <i>C. krusei</i>      | 99,9            |
| M5.2         | <i>C. krusei</i>          | 99,83           | M13.1        | <i>C. zeylanoides</i> | 98,46           |
| M6.1         | <i>R. minuta</i>          | 99,01           | M13.2        | <i>Y. lipolytica</i>  | 91,38           |
|              | <i>C. neoformans var.</i> |                 |              |                       |                 |
| M6.3         | <i>Uniguttulatus</i>      | 99,9            | M14.1        | <i>C. zeylanoides</i> | 98,46           |
| M6.4         | <i>C. krusei</i>          | 96,83           | M15.1        | <i>C. glabrata</i>    | 99,65           |
| M8.1         | <i>C. kefir</i>           | 99,9            | M15.2        | <i>Y. lipolytica</i>  | 99,40           |
|              | <i>Blastoschizomyces</i>  |                 |              |                       |                 |
| M8.2         | <i>capitatus</i>          | 89,74           | M17.1        | <i>Y. lipolytica</i>  | 99,40           |
| M9.1         | <i>C. krusei</i>          | 96,83           | M17.2        | <i>C. lambica</i>     | 99,89           |
| M10.1        | <i>Y. lipolytica</i>      | 99,40           | M17.3        | <i>C. lambica</i>     | 99,89           |
| M11.1        | <i>Rhodotorula rubra</i>  | 99,9            | M18.2        | <i>Y. lipolytica</i>  | 98,06           |



**Şekil 2.** *C. crusei* M5.1 izolatının RYP kuyucuklarındaki reaksiyon sonucu

#### 4.1.2. Maya Suşlarından DNA İzolasyonu

Maya suşlarından DNA ekstraksiyonu amacıyla kullanılan iki farklı yöntemden ticari izolasyon kiti (Genomic DNA İzolasyon Kiti, Fermentas) ile yapılan ekstraksiyonda iki izolat hariç maya suşlarının DNA ekstrakte edilememiştir. Bu nedenle DNA izolasyonları Harju ve ark. (2004) mayalar için önermiş olduğu klasik ve hızlı DNA izolasyon protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak maya izolatlarından elde edilen DNA izolatlarının agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3'te görülmektedir.

#### 4.1.3. DNA Dizi Analiz Sonuçları

Maya suşlarının DNA izolatlarına uygulanan PCR ve DNA dizi analizi sonucunda elde edilen baz dizi sıralarının BLAST veri tabanında karşılaştırılmaları ile gerçekleştirilen 5.8S ve 18S rDNA ITS kesin tanı sonuçları ve veri tabanındaki erişim numaraları Çizelge 8’de gösterilmiştir. DNA dizi analiz sonuçlarına göre suşların birbirleri ile olan yakınlıkları gösteren filogenetik dendogramları EK D’de verilmiştir.

**Çizelge 8.** Maya izolatlarının moleküler tanı sonuçları

| İzolat Kodu | 5.8S ve 18S rDNA ITS Tamı Sonucu | Erişim Numarası<br>(Accession Number) |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| M5.1        | <i>Saccharomyces servazzii</i>   | <u>D89895.1</u>                       |
| M5.2        | <i>Saccharomyces servazzii</i>   | <u>AY251628.1</u>                     |
| M6.1        | <i>Debaryomyces hansenii</i>     | <u>AM117816.1</u>                     |
| M6.3        | <i>Debaryomyces castellii</i>    | <u>FM178348.1</u>                     |
| M6.4        | <i>Saccharomyces servazzii</i>   | <u>D89895.1</u>                       |
| M8.1        | <i>Kluyveromyces marxianus</i>   | <u>AY939806.1</u>                     |
| M8.2        | <i>Pichia fermentans</i>         | <u>GQ458040.1</u>                     |
| M9.1        | <i>Saccharomyces servazzii</i>   | <u>AY046153.1</u>                     |
| M10.1       | <i>Pichia membranifaciens</i>    | <u>DQ198951.1</u>                     |
| M11.1       | <i>Pichia membranifaciens</i>    | <u>DQ223427.1</u>                     |
| M11.2       | <i>Saccharomyces servazzii</i>   | <u>D89895.1</u>                       |
| M13.1       | <i>Pichia membranifaciens</i>    | <u>DQ198964.1</u>                     |
| M13.2       | <i>Pichia membranifaciens</i>    | <u>DQ223427.1</u>                     |
| M14.1       | <i>Pichia membranifaciens</i>    | <u>DQ223427.1</u>                     |
| M15.1       | <i>Saccharomyces servazzii</i>   | <u>D89895.1</u>                       |
| M15.2       | <i>Pichia membranifaciens</i>    | <u>EF061127.1</u>                     |
| M17.1       | <i>Pichia membranifaciens</i>    | <u>EF061127.1</u>                     |
| M17.2       | <i>Pichia fermentans</i>         | <u>GQ458040.1</u>                     |
| M17.3       | <i>Kluyveromyces marxianus</i>   | <u>DQ665310.1</u>                     |
| M18.2       | <i>Pichia membranifaciens</i>    | <u>DQ198951.1</u>                     |

Salamura otlardan izole edilen maya örneklerinin DNA dizi analizi ile tür düzeyinde yapılan kesin tanımlama sonuçlarına göre 20 maya izolatından 8 tanesi *Pichia membranifaciens*, 6 tanesi *Saccharomyces servazzii*, 2 tanesi *Pichia fermentans*,

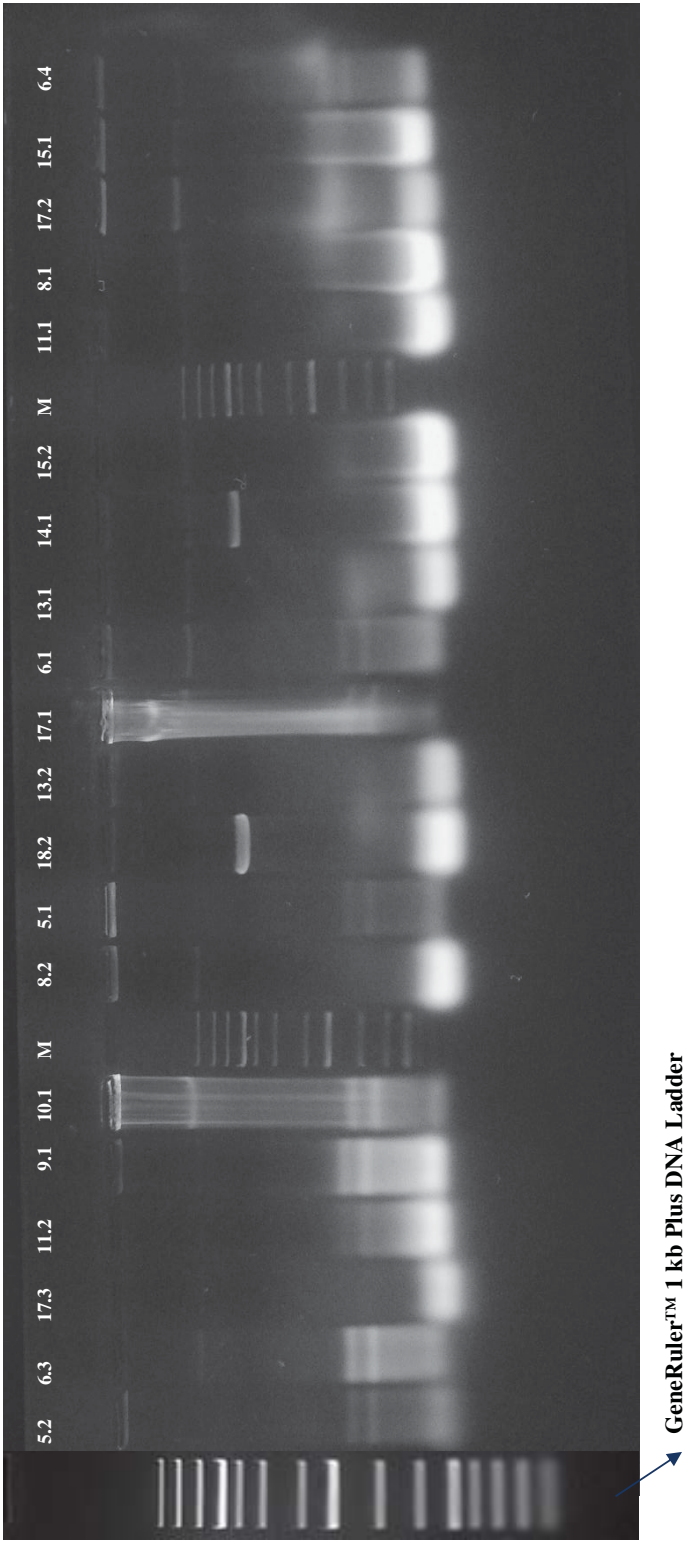


1 tanesi *Debaryomyces hansenii*, 1 tanesi *Debaryomyces castellii* ve 2 tanesi de *Kluyveromyces marxianus* olarak tanımlanmıştır.

Mayalar geleneksel klasik sınıflandırmada morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Ancak bu yöntemler tanıda kullanılan işlemlerin karmaşık oluşu, deneyim gerektirmesi, zahmetli ve zaman alıcı olması nedenlerinden dolayı moleküler yöntemlerin kullanımını daha ön plana çıkarmaktadır. Klasik geleneksel yöntemlere göre hızlı, kolay ve daha güvenilir sonuçlar vermesi ve kesin tanı yapılabilmesi nedeniyle mayaların tanımlanması ve sınıflandırılmasında, moleküler bazlı tekniklerin daha sıklıkla kullanılmasını sağlamıştır (Deak ve Beuchat 1996; de Barros Lopes ve ark. 1998; Vasdinyei ve Deak 2003; Şenses-Ergül ve ark. 2006; Tofalo ve ark. 2009).

Arias ve ark. (2002) portakal suyundaki maya florasında yaptıkları çalışmada mayaların tanımlanmasında çeşitli tanı yöntemlerini karşılaştırdıklarında RYP sistemi kullanılarak yapılan tanıda sırasıyla *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida lambica* olarak tanımlanan maya türlerin moleküler tekniklerle yapılan (5.8S ITS ve 26S) tanılarında *Pichia fermentans* olarak kesin tanıların yapıldığını belirtmişlerdir.

Bizim yaptığımız araştırma sonuçlarına baktığımızda; M8.2 ve M.17.2 kodlu maya izolatlarının RYP sistemiyle yapılan tanımlama sonuçlarına göre sırasıyla *Blastoschizomyces capitatus* ve *Candida lambica* olarak tanıları yapılmış olup moleküler tanı (5.8S ve 18S rDNA ITS) sonuçlarına göre bu suşların her ikisinin de *Pichia fermentans* olduğu görülmüştür. *Candida. Lambica* türünün *Pichia fermentans* türünün anamorf formu olduğu bilinmektedir. M8.1 kodlu maya izolatu ise RYP sistemi ile *Candida kefir* olarak tanımlanmış olup moleküler tanı sonuçlarında ise *Kluyveromyces marxianus* türü olduğu görülmüştür. *Candida kefir* türünün *Kluyveromyces marxianus* türünün anamorf morfu olduğu bilinmektedir.

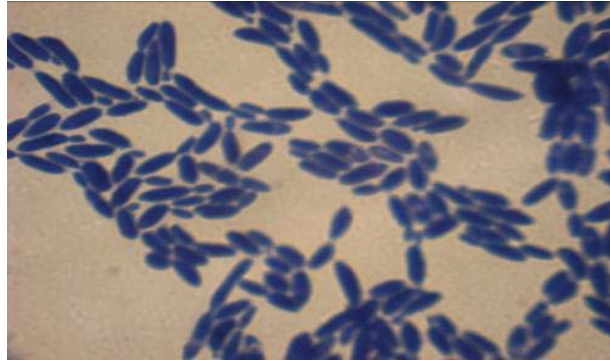


M: Marker; Yukardan aşağıya toplam 15 bant. Büyüklükleri sırasıyla: 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200 ve 75 b.

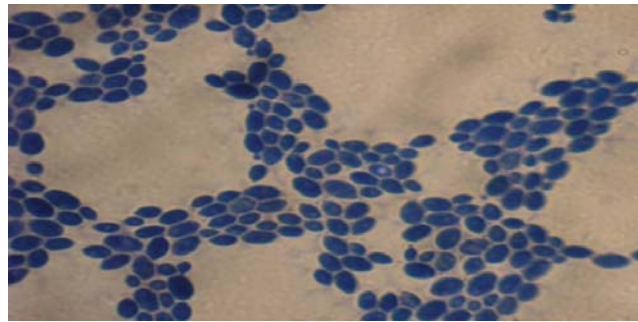
**Şekil 3.** Maya suslarından izole edilen DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü

#### 4.2. Mayaların Mikroskopik Morfolojileri

Maya izolatlarının mikroskopik morfolojik görüntüleri EK E’de verilmiştir. Buna göre örneğin *S. servazzii* M9.1 türü oval, kısa ve eni boyundan biraz küçük veya daha yakın olarak görüldüğü halde, *D. hansenii* M6.1 türünün görünüşünün küre şekilde olduğu tespit edilmiştir. *Debaryomyces castellii* M6.3 türünün morfolojik yapısının oval köşeli olduğu ve hücrelerin toplu halde oldukları görülmüştür. Benzer olarak *Kluyveromyces marxianus* M8.1 suşunun da elips şeklinde olduğu görülmüştür. *Pichia fermentans* suşlarının morfolojik görüntüleri ince, uzun, mekik şeklinde olduğu ancak *Pichia membranifaciens* suşlarının ise ince, kısa ve mekik şeklinde olduğu belirlenmiştir.



(a)



(b)

**Şekil 4.** *P. membranifaciens* M13.1 (a) ve *S. servazzii* M9.1 (b) izolatlarının mikroskopik görüntüsü

### 4.3. Mayaların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 4.3.1. Yüksek Sıcaklıkta Gelişme

Moleküler tanısı yapılan maya izolatlarının 37 ve 42°C'deki gelişme durumları incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 9'da verilmiştir. Tanısı yapılan maya suşlarının yüksek sıcaklıklardaki gelişme durumları incelendiğinde *S. servazii* ve *P. fermentans* suşlarının 37°C'de gelişme gösterdikleri ancak 42°C'de gelişemedikleri tespit edilmiştir. Yapılan testler sonucunda *P. membranifaciens*, *D. hansenii* ve *D. castellii* suşlarının 37°C ve 42°C'de gelişme göstermedikleri; ancak, *K. marxianus*'un ise hem 37°C'de hem de 42°C'de rahatlıkla gelişebildiği tespit edilmiştir.

Cosentino ve ark. (2001) Sardinya peynirlerinde yaptıkları araştırmada peynirde bulunan maya florasını tanımlamışlar ve tanımlanan mayaların biyokimyasal ve teknolojik özelliklerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda *K. marxianus* türünün yüksek sıcaklıklarda gelişme gösterdiği; *P. fermentans* türünün 37°C'de gelişme gösterirken 40°C'de gelişemediği; *D. hansenii* türünün yüksek sıcaklıklarda fazla gelişemediğini belirlemişlerdir. Bu araştırma sonucunda elde ettiğimiz bulguların Cosentino ve ark. (2001) tarafından elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Kockova-Kratachvilova ve Slavikova (1978) *Debaryomyces* cinslerinin sınıflandırılması üzerine yaptıkları çalışmalarında *D. castellii* türünün 42°C'de gelişemediğini belirtmişlerdir. Yaptığımız araştırmada da *D. castellii*'nin yüksek sıcaklıklarda gelişemediği görülmüştür. Bu sonuçların da bizim elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

**Çizelge 9.** Moleküler tanısı yapılan maya suşlarının bazı teknolojik özellikleri

| Maya Türleri                         | Yüksek Sıcaklıkta Gelişme |      |       |   |      |   |        |   |             |   |     |   | Testi |   |     |   |  |  | Farklı pH'da Gelişme |  |  |  |  |  | % 10 NaCl % 5 Glukoz | Üre Hidrolizi | Proteolitik Aktivite | Lipolitik Aktivite |
|--------------------------------------|---------------------------|------|-------|---|------|---|--------|---|-------------|---|-----|---|-------|---|-----|---|--|--|----------------------|--|--|--|--|--|----------------------|---------------|----------------------|--------------------|
|                                      | Gelişme                   |      | % 7.5 |   | % 10 |   | % 12.5 |   | % 50 Glukoz |   | 3.0 |   | 4.0   |   | 7.1 |   |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
|                                      | 37°C                      | 42°C |       |   |      |   |        |   |             |   |     |   |       |   |     |   |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M5.1  | +                         | -    | +     | + | +    | + | +      | - | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M5.2  | +                         | -    | +     | + | +    | + | +      | - | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> M6.1    | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | -           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Debaryomyces castellii</i> M6.3   | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M6.4  | +                         | -    | +     | + | +    | + | +      | - | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> M8.1  | +                         | +    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia fermentans</i> M8.2        | +                         | +    | -     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M9.1  | +                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M10.1  | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M11.1  | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M11.2 | +                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M13.1  | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M13.2  | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M14.1  | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M15.1 | +                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M15.2  | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M17.1  | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia fermentans</i> M17.2       | +                         | -    | -     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> M17.3 | +                         | +    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M18.2  | -                         | -    | +     | + | +    | + | +      | + | +           | + | +   | + | +     | + | +   | + |  |  |                      |  |  |  |  |  |                      |               |                      |                    |

+: Gelişme var, +<sub>w</sub>: Zayıf gelişme, -: Gelişme yok

Yaptığımız araştırmada *S. servazzii* türünün 37°C’de gelişme gösterirken 42°C’de gelişemediği tespit edilmiştir. Benzer olarak Capriotti (1967) Finlandiya’da topraktan izole ederek tanımladığı *S. servazzii* türünün de 37°C’de gelişirken 42°C’de gelişemediğini belirtmiştir.

#### 4.3.2. Tuza Dayanıklılık Testi

Salamura otlardan izole edilerek tanımlanan mayaların %7.5, %10 ve %12.5 tuz içeren besiyerindeki gelişme özelliklerinin incelenmesinden elde edilen sonuçlar Çizelge 9’da verilmiştir. Buna göre kesin tanısı yapılan mayalardan *Debaryomyces hansenii* ve *Debaryomyces castellii* türlerinin %7.5, %10 ve %12.5 tuz içeren besiyerlerinde geliştiği görülmüştür. *Saccharomyces servazzii* ile *Kluyveromyces marxianus*’un %7.5 ve %10 tuz içeren besiyerlerinde gelişme gösterirken %12.5 tuz içeren besiyerinde gelişemediği tespit edilmiştir. *Pichia fermentans* ise %7.5, %10 ve %12.5 tuz içeren besiyerlerinde gelişemediği görülmüştür. Tuza dayanıklılık test sonuçlarına göre *P. membranifaciens* M13.1, M13.2 ve M14.1 suşlarının %12.5 tuz içeren besiyerlerinde gelişebildikleri tespit edilmiştir.

Kockova-Kratavilova ve Slavikova (1978) *Debaryomyces* cinslerinin sınıflandırılması üzerine yaptıkları çalışmalarda *Debaryomyces hansenii* ve *Debaryomyces castelli* türlerinin yüksek tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde geliştiğini belirtmişlerdir. Albayram (2007) turşu ve zeytinde gelişen mayaların izolasyonu ve tanımlaması çalışmasında *Debaryomyces hansenii* türünün %7.5, %10 ve %12.5 tuz içeren besiyerlerinde geliştiğini belirtmiştir. Şahin ve Öztürk (1998) salamura reynirler üzerine yaptıkları çalışmada *Debaryomyces hansenii* türünün %12.5 tuz içeren ortamda oldukça kuvvetli geliştiğini bildirmişlerdir.

Tornadijo ve ark. (1998) Armada peynirinde yaptıkları çalışmada *K. marxianus* türlerinin %10 tuz içeren besiyerlerinde geliştiğini ancak %15 tuz içeren besiyerlerinde gelişemediğini belirtmişlerdir.

Cosentino ve ark. (2001) Sardinya peynirlerinde yaptıkları çalışmada *Pichia fermentans* türlerinin %10 tuz içeren besiyerlerinde gelişemediğini belirtmişlerdir.

#### 4.3.3. Farklı pH Değerlerinde Gelişme

Maya türlerinin pH 3.0 ve 4.0'a ayarlanmış besiyerlerindeki gelişme özelliklerinin incelenmesinde pH'sı 7.1 olan standart besiyeri kontrol olarak kullanılmıştır. Maya izolatlarının farklı pH değerlerindeki gelişme sonuçları Çizelge 9'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde *Pichia fermentans*, *Pichia membranifaciens* ve *Kluyveromyces marxianus* türlerinin pH 3.0'da gelişebildiği ancak diğer türlerin pH 3.0'da gelişemediği tespit edilmiştir.

#### 4.3.4. Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişme

Maya izolatlarının yüksek şeker konsantrasyonlarındaki gelişme durumları farklı substratların endüstriyel üretimlerde besiyeri olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu nedenle kesin tanısı yapılan mayaların Brix derecesi 30'a ayarlanmış (%50 glukoz içeren) YPG broth besiyerinde gösterdikleri gelişme durumları incelenerek belirlenmiş ve sıvı besiyerinde bulunan Durham tüpü içerisinde, 2/3 oranında gaz üreten suşlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 9'da gösterilmiştir.

Çizelge 9’da verilen değerler incelendiğinde *Saccharomyces servazzii*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Pichia fermentans* türlerinin yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebildikleri ancak *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces castellii* ve *Pichia membranifaciens* türlerinin ise yüksek şeker konsantrasyonunda gelişemedikleri tespit edilmiştir.

*Saccharomyces servazzii* türlerinin %50 glukoz içeren besiyerlerinde zayıf bir gelişme gösterdikleri daha önceki araştırmalarda da gösterilmiştir (Anonim 2010). Albayram (2007) yaptığı araştırmada *P. fermentans* türünü turşu ve zeytinden izole ederek tanımlamış bu mayanın %50 D-glukoz içeren besiyerinde geliştiğini belirtmiştir. Apan (2007) Beyaz peynir yüzeyinde gelişen mayaları tanımlamak üzere yaptığı çalışmada *K. marxianus* türünü de tanımlamış olup bu türün %50 D-glukoz içeren besiyerinde geliştiğini tespit etmiştir.

#### 4.3.5. Orta Derecede Ozmotik Basıncıta Gelişme

Maya türlerinin %10 NaCl ve %5 glukoz içeren Yeast Nitrogen Base besiyerindeki gelişme testlerinden elde edilen veriler Çizelge 9’da gösterilmiştir.

Araştırma bulgularına baktığımızda *S. servazzii*, *D. hansenii*, *D. castellii* ve *K. marxianus* türlerinin bu ortamda gelişebildikleri tespit edilmiştir. *P. fermentans* ve *P. membranifaciens* türlerinin ise bu ortamda gelişme gösteremedikleri gözlemlenmiştir.

Albayram (2007) Turşu ve zeytinde gelişen mayaların izolasyonu ve tanımlanması için yaptığı araştırmada *P. fermentans* türünün %10 NaCl ve %5 D-glukoz içeren besiyerinde gelişemediğini bildirmiştir. Campbell (1971) çeşitli maya



cinslerinin sınıflandırılması çalışmalarında *P. fermentans* ve *P. membranifaciens* türlerinin ozmotik dirence dayanıklı olmadıklarını belirtmektedir.

Breuer ve Harms (2006) *D. hansenii* türünün % 10NaCl ve %5 glukoz içeren ortamda geliştiği ozmotik basınca karşı dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir.

Kockova-Kratchvilova ve Slavikova (1978) *Debaryomyces* cinslerinin sınıflandırılması üzerine yaptıkları çalışmalarda *Debaryomyces hansenii* ve *Debaryomyces castelli* türlerinin %10 NaCl ve %5 glukoz içeren ortamda geliştiğini bildirmektedirler.

Kurtzman ve Fell (2000) *K. marxianus* türünün %10 NaCl ve %5 glukoz içeren ortamda geliştiğini belirtmişlerdir. Aynı maya türünün sonuçları dikkate alındığında elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

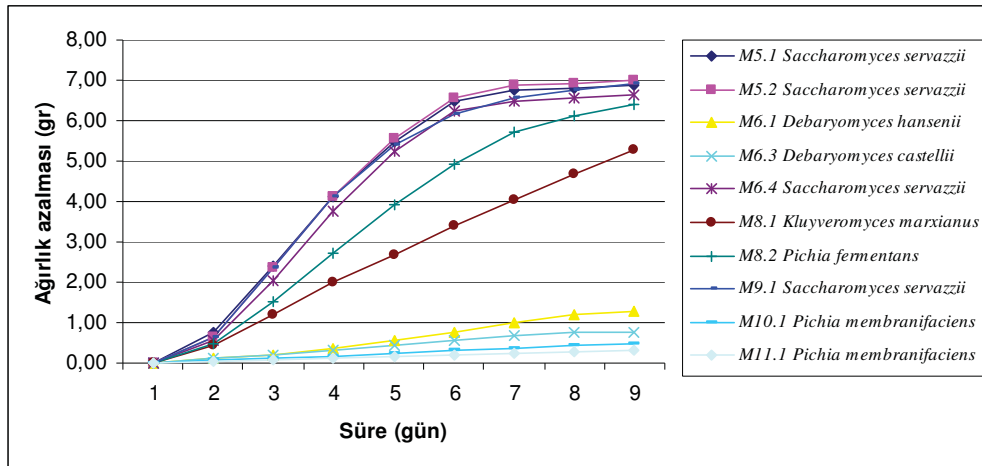
#### 4.3.6. Üre Hidrolizi

Maya izolatlarının Üre Broth (Oxoid) besiyerindeki aktivite durumları incelendiğinde gelişme gösteren maya türleri besiyeri rengini portakal kırmızısından kırmızıya döndürmüştür. Çizelge 9'da maya türlerinin üre hidroliz sonuçları görülmektedir. Araştırma bulguları incelendiğinde maya izolatlarından yalnızca *P. membranifaciens* suşlarının üreyi zayıf bir reaksiyonla hidrolize ettiği ancak diğer tüm maya izolatlarının üre hidroliz sonuçları negatif olarak değerlendirilmiştir.

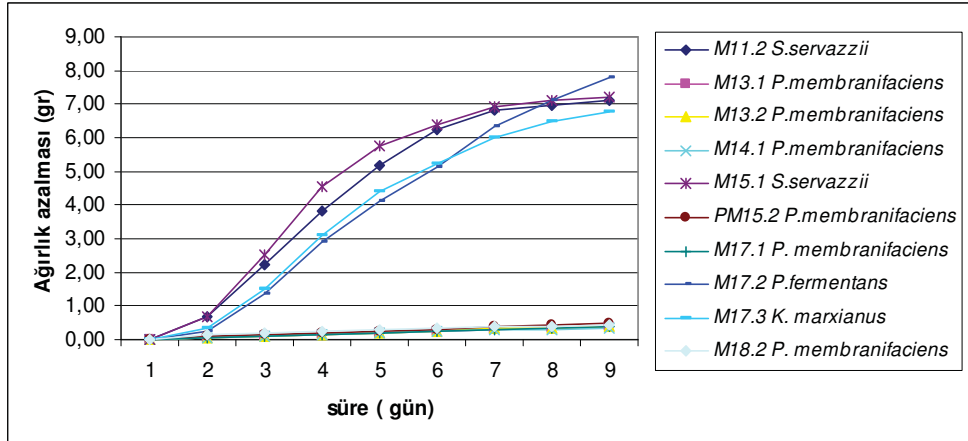
#### 4.3.7. Fermantasyon Hızı

Deneme kapsamında 20 adet maya örneği ile yapılan fermantasyon denemelerinde 9 gün boyunca fermantasyon şişelerinin ağırlıkları günlük olarak

ölçülmüştür. Fermantasyon gidişi, fermantasyon süresince CO<sub>2</sub> üretimine bağlı olarak meydana gelen ağırlık azalmaları üzerinden izlenmiştir. İncelenen mayalara ait fermantasyonlardaki günlük ağırlık azalmaları, Şekil 5 ve Şekil 6'da gösterilmiş olup, bu grafiklere ait veriler EK C'de sunulmuştur.



Şekil 5. Maya türlerinin fermantasyon hızı test sonuçları



Şekil 6. Maya türlerinin fermantasyon hızı test sonuçları

Şekil 5, Şekil 6 ve EK C'de görülen veriler incelendiğinde 9 günlük fermantasyon süresi sonundaki toplam ağırlık azalmalarına göre *Saccharomyces servazzii* türlerinin 6.63-7.21 g; *Pichia fermentans* türlerinin 6.42-7.79 g aralığında olduğu; *Kluyveromyces marxianus* türünün toplam ağırlık azalmasının 5.27 g,

*Debaryomyces hansenii* türünün toplam ağırlık azalmasının 1.29 g, *Debaryomyces castellii* türünün 0.76 g ve son olarakta *Pichia membranifaciens* türlerinin ise 0.32-0.50 g aralığında toplam ağırlık azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Buna göre *Saccharomyces servazzii* ve *Pichia fermentans* türlerinin fermantasyon hızlarının yüksek, *Pichia membranifaciens* ve *Debaryomyces* spp. türlerinin ise düşük olduğu belirlenmiştir. Mayaların fermantasyon hızları endüstriyel üretimlerde substratın ürüne dönüşüm hızı açısından önem taşımaktadır.

#### 4.3.8. Enzim Profillerinin Belirlenmesi

Yaptığımız araştırmada incelenen maya izolatlarının enzim profilleri API-ZYM test sistemi (bioMerieux, Fransa) ile belirlenmiştir. Kültürlerin enzim profillerinin belirlenmesi amacıyla test sisteminde anlatılan yöntem takip edilmiştir. Uygulanan işlem sonucunda enzim aktiviteleri yarı kantitatif olarak belirlenmeye çalışılmış ve elde edilen veriler EK E’de verilen şekillerde gösterilmiştir. Maya izolatlarının enzim profillerine ilişkin test sonuçları Çizelge 10’da gösterilmektedir.

Mayalar tarafından ürün fermantasyonlarında üretilen enzimlerin ürünlerin aromalarında belirleyici rol oynayarak olumlu etki yarattıkları gibi bazı mayalar tarafından üretilen enzimlerin ürünlere olumsuz yönde etki yaptıkları belirtilmektedir. Proteaz, ksilozidaz ve glukozidazlar gibi mayalar tarafından üretilen bazı enzimlerin, aroma oluşumunda etkili oldukları belirtilmektedir (Fiore 2003).

Esteraz enzimlerinin fermantasyon işlemi sonrasında oluşan ve ikincil aromanın oluşumundan sorumlu olan aroma bileşiklerinin üretiminde rol aldıkları belirtilmektedir (Nikolau ve ark. 2006). Bizim yaptığımız araştırmada Çizelge

10'daki test sonuçlarına baktığımızda tüm örneklerin esteraz ve esteraz lipaz aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Maya hücrelerinin lipaz aktivitesinin, hücre içi ve hücre dışında aktif olduğu belirtilmektedir. Mayaların lipaz aktivitelerinin özellikle şaraplarda şıradaki yağ asitlerini ve sterollerini açığa çıkardıkları bilinmektedir. Açığa çıkan bu bileşenlerinde yüksek alkol derişimleri gibi olumsuz koşullarda maya gelişimini destekledikleri bildirilmektedir. Açığa çıkan yağ asitleri ve sterollerin aktif aroma bileşenleri olan etil ester türevlerinin öncülleri oldukları da belirtilmektedir (Delfini ve Formica 2001). Bu çalışmada moleküler tanısı yapılan 20 maya izolatının lipaz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu Maya izolatlarının API-ZYM test sistemi ile yarı kantitatif olarak belirlenen lipaz aktivitelerinin, karşılaştırılan renk skalasına göre 0-1-2 oldukları görülmüş olup bu değerlerin test sistemine göre negatif olduğu anlaşılmaktadır.

Arilamidaz enzimlerinin peptid, amid veya arilamidlerin N terminal uçlarındaki aminoasitleri açığa çıkarma özelliğine sahip oldukları bilinmektedir. Enzim aktivitesi sonucu oluşan düşük molekül ağırlıklı peptidlerin ve özellikle aminoasitlerin maya için besinsel önem taşımalarının yanısıra aroma bileşiklerinin sentezinde de öncül rol üstlendikleri belirtilmektedir (Özbaş ve ark. 2008).

Yaptığımız çalışmada maya izolatlarının hepsinin lösin, valin ve sistin arilamidaz enzim aktivitelerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu izolatların enzim aktivite değerlerinin 3-5 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Alkali fosfataz enziminin üzüm suyu ve şarapta bulunan tanenler ile birleşerek presipite olma özelliğine sahip olduğu belirtilmekte ve bu enzimin özelliğinden tanen miktarının belirlenmesinde yararlanıldığı belirtilmektedir (Adams ve Harbertson 1999). Bu enzim aktivitesine sahip mayaların starter kültür olarak

kullanıldıkları şaraplarda buruk tatlar üzerine etkili olabilecekleri düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada maya izolatlarından sadece *Saccharomyces servazzii* de alkali fosfataz enzim aktivitesine sahip olmadığı görülmüş olup *Debaryomyces castellii*, *Debaryomyces hansenii* ve *Pichia membranifaciens* türlerinde ise alkali fosfataz enzimi aktivitesinin karşılaştırılan renk skalalarına göre kuvvetli oldukları tespit edilmiştir. *Saccharomyces servazzii* türlerinde ise enzim aktivitesinin zayıf olduğu görülmüştür.

Asit fosfataz enzimin ise; bir vitamin olan tiaminin hücre içine alınmasında görev yaptığı ifade edilmektedir. Tiaminin maya hücresi içine alınmasında, etanol metabolizması üzerinde etkili bir faktör olduğu bildirilmektedir (Thomson ve ark. 2005). Bizim yaptığımız çalışmada incelenen 20 maya izolatından 19 tanesinin asit fosfataz enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. *Pichia fermentans*, *Pichia membranifaciens*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* ve *Debaryomyces castellii* türlerinin kuvvetli asit fosfataz enzimine sahip oldukları görülmüştür.

Glukozidaz enzimlerinin, glukozidik olarak bağlı monoterpenlerin hidrolizlerinden sorumlu oldukları bildirilmektedir. Bu enzimlerin şaraplarda aromatik karakterlerin geliştirilmesinde rol oynadıkları belirtilmiştir (Nikolau ve ark. 2006). Maya izolatlarından sadece 4 tanesinin  $\alpha$ -glukozidaz enzimi üretebildiği belirlenmiştir. Bu türlerin dört tür *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces servazzii* ve *Pichia membranifaciens* olduğu görülmüştür. Bu çalışmamızda  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine sahip sadece 2 türün olduğu bunlarında *Kluyveromyces marxianus* ve *Pichia membranifaciens* olduğu tespit edilmiştir. *Kluyveromyces marxianus* türünün kuvvetli  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

**Çizelge 10.** Maya türlerinin API-ZYM test sistemi ile belirlenen enzim profilleri

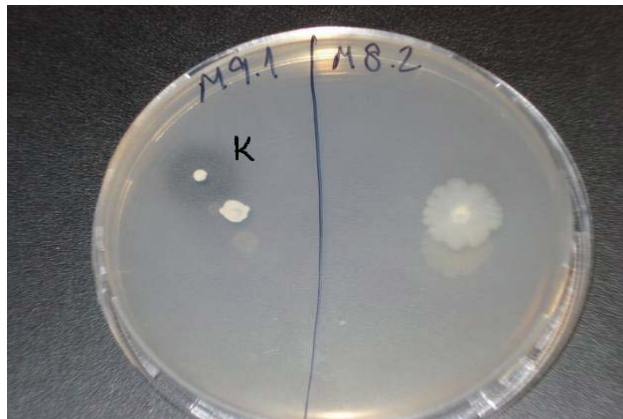
| Maya İzolatları                  | M5.1                          | M5.2                          | M6.1                        | M6.3                          | M6.4                          | M8.1                           | M8.2                     | M9.1                          | M10.1                         | M11.1                         | M11.2                         | M13.1                         | M13.2                         | M14.1                         | M15.1                         | M15.2                         | M17.1                         | M17.2                    | M17.3                          | M18.2                         |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Analiz Edilen Enzim              | <i>Saccharomyces servazii</i> | <i>Saccharomyces servazii</i> | <i>Debaryomyces hanseni</i> | <i>Debaryomyces castellii</i> | <i>Saccharomyces servazii</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | <i>Pichia fermentans</i> | <i>Saccharomyces servazii</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>Saccharomyces servazii</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>Saccharomyces servazii</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>Pichia fermentans</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> |
| Kontrol                          | 0                             | 0                             | 0                           | 0                             | 0                             | 0                              | 0                        | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| Alkalın fosfataz                 | 2                             | 1                             | 4                           | 5                             | 1                             | 5                              | 1                        | 1                             | 4                             | 4                             | 1                             | 4                             | 2                             | 1                             | 0                             | 3                             | 3                             | 2                        | 1                              | 5                             |
| Esteraz (C4)                     | 5                             | 5                             | 5                           | 4                             | 5                             | 4                              | 4                        | 4                             | 5                             | 4                             | 5                             | 5                             | 4                             | 4                             | 5                             | 5                             | 5                             | 4                        | 4                              | 4                             |
| Esteraz Lipaz (C8)               | 4                             | 4                             | 3                           | 3                             | 3                             | 3                              | 3                        | 3                             | 3                             | 3                             | 3                             | 3                             | 3                             | 3                             | 4                             | 3                             | 3                             | 3                        | 3                              | 2                             |
| Lipaz (C14)                      | 1                             | 1                             | 0                           | 1                             | 1                             | 1                              | 0                        | 1                             | 0                             | 1                             | 1                             | 1                             | 1                             | 0                             | 0                             | 2                             | 1                             | 0                        | 0                              | 1                             |
| Lösin arilamidaz                 | 5                             | 5                             | 5                           | 5                             | 5                             | 5                              | 5                        | 5                             | 5                             | 5                             | 5                             | 5                             | 5                             | 5                             | 5                             | 5                             | 4                             | 5                        | 5                              | 5                             |
| Valin arilamidaz                 | 3                             | 3                             | 2                           | 3                             | 3                             | 4                              | 4                        | 3                             | 4                             | 4                             | 3                             | 4                             | 3                             | 4                             | 4                             | 4                             | 5                             | 4                        | 5                              | 4                             |
| Sistin arilamidaz                | 3                             | 3                             | 3                           | 2                             | 3                             | 3                              | 3                        | 3                             | 4                             | 4                             | 3                             | 3                             | 3                             | 4                             | 4                             | 4                             | 5                             | 4                        | 5                              | 4                             |
| Tripsin                          | 1                             | 1                             | 0                           | 0                             | 1                             | 1                              | 0                        | 1                             | 0                             | 1                             | 1                             | 1                             | 1                             | 0                             | 0                             | 0                             | 1                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| $\alpha$ -kimotripsin            | 1                             | 1                             | 0                           | 0                             | 1                             | 1                              | 0                        | 1                             | 0                             | 1                             | 1                             | 1                             | 1                             | 0                             | 0                             | 0                             | 1                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| Asit fosfataz                    | 0                             | 2                             | 4                           | 5                             | 1                             | 5                              | 5                        | 1                             | 5                             | 5                             | 2                             | 5                             | 5                             | 5                             | 2                             | 5                             | 5                             | 5                        | 5                              | 5                             |
| Naftol-AS-BI-fosfhidrolaz        | 3                             | 3                             | 2                           | 2                             | 3                             | 4                              | 5                        | 3                             | 5                             | 5                             | 3                             | 5                             | 5                             | 5                             | 2                             | 5                             | 5                             | 5                        | 5                              | 5                             |
| $\alpha$ -galaktozidaz           | 0                             | 0                             | 0                           | 0                             | 2                             | 1                              | 0                        | 2                             | 0                             | 1                             | 0                             | 1                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 1                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| $\beta$ -galaktozidaz            | 0                             | 0                             | 4                           | 4                             | 1                             | 5                              | 0                        | 1                             | 0                             | 1                             | 0                             | 1                             | 1                             | 0                             | 0                             | 0                             | 1                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| $\beta$ -glukuronidaz            | 0                             | 0                             | 0                           | 0                             | 0                             | 0                              | 0                        | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| $\alpha$ -glukozidaz             | 0                             | 0                             | 1                           | 0                             | 0                             | 1                              | 0                        | 0                             | 0                             | 0                             | 1                             | 0                             | 1                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| $\beta$ -glukozidaz              | 0                             | 0                             | 0                           | 0                             | 0                             | 4                              | 0                        | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 1                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| N-asetil- $\beta$ -glukoaminidaz | 0                             | 0                             | 0                           | 0                             | 0                             | 0                              | 0                        | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| $\alpha$ -mannozidaz             | 1                             | 0                             | 0                           | 0                             | 1                             | 1                              | 0                        | 0                             | 0                             | 1                             | 1                             | 0                             | 1                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                        | 0                              | 0                             |
| $\alpha$ -fukozidaz              | 0                             | 1                             | 0                           | 0                             | 0                             | 1                              | 0                        | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 1                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                             | 0                        | 0                              | 0                             |

#### 4.3.9. Lipolitik Aktivite

Lipolitik aktivite denemelerinden alınan sonuçlara göre çalışılan mayaların izolatlarının lipolitik aktiviteleri  $\text{CaCl}_2$  ve Tween 80 içeren PCA besiyerlerinde incelenmiş ancak test edilen maya suşlarından hiçbirisinin lipolitik aktivite göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 9).

#### 4.3.10. Proteolitik Aktivite

Proteolitik aktivite denemelerinde 2 farklı besiyeri kullanılarak suşların proteolitik aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre maya izolatlarından hiçbirisinde proteolitik aktiviteye rastlanmamıştır (Çizelge 9). Mayaların proteolitik aktivitelerinin Petride gerçekleştirilen testler ile belirlenmesinin oldukça zor olduğu başka araştırmacılar tarafından da vurgulanmaktadır (Iranzo ve ark. 1998; Özbaş ve ark. 2008). Şekil 7’de Skim Milk Agarda gerçekleştirilen iki suşa ait proteolitik aktivite sonucu kontrol suş (K) ile birlikte aynı Petri kutusunda gösterilmiştir.



**Şekil 7.** M9.1 ve M8.2 suşlarının kontrole (K) kıyasla proteolitik aktivitesi

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, otlu peynir üretiminde kullanılan salamura otlardan izole edilen yerel maya suşlarının izolasyonu, morfolojik ve biyokimyasal tanıları ve 5.8S ve 18S rRNA ITS bölgesinin dizi analizi yöntemi ile moleküler tanıları yapıldıktan sonra bazı teknolojik özellikleri belirlenmiştir.

Yapılan tanı testleri sonuçlarına göre, izole edilen yerel maya türlerinin *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces servazzii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Debaryomyces hansenii* ve *Debaryomyces castellii* olduğu belirlenmiştir.

Salamura otlardan izole edilerek tanımlanan maya türlerinin teknolojik özelliklerinin belirlendiği deneylerde ilk olarak maya izolatlarının farklı sıcaklıklarda, farklı pH değerlerinde, yüksek şeker derişimine sahip ortamda, %7.5 %10 ve %12.5 tuz içeren ortamda ve orta derecede ozmotik basınçta gelişme özellikleri ile birlikte enzim profilleri belirlenmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre destek starter olarak kullanım olanakları bakımından tuza ve şekere tolerans göstermeleri, düşük pH'da gelişme ve kuvvetli proteolitik aktivite içermeyen maya türlerinin fermente gıda ürünlerinde destek starter kültür olarak kullanım potansiyellerinin bulunduğu düşünülmektedir.

Araştırma bulgularına göre; *K. marxianus* türünün 37- 42°C'de gelişebildiği tespit edilmiş; *S. servazzii* ve *P. fermentans* türlerinin ise sadece 37°C'de geliştiği; diğer maya türlerinin ise bu sıcaklıklarda gelişemediği görülmüştür.



*D. hansenii* ve *D. castellii* türünün ve bazı *P. membranifaciens* türlerinin %12.5 NaCl içeren ortamlarda geliştiği görülmüştür. Orta derecede ozmotik basınçta gelişen maya türlerinin ise *S. servazzii*, *D. hansenii* ve *D. castellii* olduğu görülmüştür.

Yüksek şeker konsantrasyonunda gelişen maya türleri ise *S. servazzii*, *K. marxianus* ve *P. fermentans* oldukları tespit edilmiştir.

Yaptığımız araştırmada *S. servazzii*, *P. fermentans* ve *K. marxianus* türlerinin fermantasyon hızlarının incelen diğer maya türlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Yerel maya suşlarının enzim profilleri açısından değerlendirilmesinde; incelenen maya türlerinin tamamının esteraz, esteraz lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz sistin arilamidaz, asit fosfataz ve naftol-AS-BI-fosfohidrolaz enzim aktivitelerine sahip olduğu görülmüştür. *D. hansenii*, *D. castellii* ve *K. marxianus* türlerinin kuvvetli  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesine sahip olduğu ayrıca *K. marxianus* türünün kuvvetli  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

İncelenen maya türlerinden hiçbirinde proteolitik ve lipolitik aktivite saptanmamıştır.

*P. membranifaciens* türünün yüksek şeker derişiminde, yüksek sıcaklıklarda ve orta derecede ozmotik basınçta gelişemediği tespit edilmiştir. *P. fermentans* türünün de farklı tuz derişimleri içeren besiyerinde gelişemediği ve orta derecede ozmotik basınca dayanıklılığının olmadığı belirlenmiştir.

Maya türlerinin, teknolojik özellikleri ve enzim profilleri bakımından incelendiğinde tuza ve şekere tolerans göstermeleri düşük pH değerlerinde gelişmesi ve kuvvetli lipolitik aktivite göstermemeleri onların starter kültür olarak kullanım

potansiyellerini belirler. Yaptığımız araştırmada özellikle *K. marxianus*, *D. hansenii* ve *S. servazzii* türlerinin ürün fermentasyonlarında karakteristik tat ve aroma için önemli olacağı düşünölmekte, fermente olarak üretilen gıdalarda starter kültür olarak kullanım olanakları bulunduğu birçok literatür kaynağında da ifade edilmektedir. Özellikle *S. servazzii* türü son yıllarda tanımlanan bir maya olup bu maya türü ile ilgili çalışmaların fazla olmadığı görölmektedir. Bu maya türlerinin starter kültür olarak kullanımı bakımından teknolojik açıdanda da üretilecek ürün denemelerinde araştırılmasının uygun olacağı düşünölmektedir.

## KAYNAKLAR

Abbas, C.A. 2006. Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. In: Querol, A. and Fleet, G.H. (eds.). *Yeasts in Food and Beverages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp: 285-334.

Adams, D.O. and Harbertson, J.F. 1999. Evolution of skin and seed tannins in Pinot Noir berries during ripening: Application of a simple assay to a difficult problem, Rave99, 2nd Joint Burgundy-California-Oregon Winemaking Symposium. pp: 26-29

Albayram, C. 2007. Turşu ve zeytinde gelişen mayaların izolasyonu ve identifikasyonu. Master Tezi. Gıda Mühendisliği Bölümü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, s. 88.

Alpaslan, D. 2009. Van yöresinde doğal olarak yetişen bazı bitkilerin geleneksel tüketim şekilleri. 2. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 27-29 Mayıs 2009.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. L. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-3402.

Álvarez-Martín, P., Flóres, A.B., López-Díaz, T.M. and Mayo, B. 2007. Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*, 17: 961-967.

Anonim, 2004. [www.kho.edu.tr/yayinlar/cizgi/agustos2002/van](http://www.kho.edu.tr/yayinlar/cizgi/agustos2002/van). (Erişim 10 Haziran 2010)

Anonim, 2006. Gıda Teknolojisi, Genel Mikrobiyoloji, MEGEP, MEB, Ankara.

Anonim, 2009. API ZYM Test Combination Kit, Ref 252000, bioMérieux, France.

Anonim, 2010. [www.mycobank.org/yeast/S. servazzii](http://www.mycobank.org/yeast/S. servazzii).

Apan, M. 2007. Beyaz peynir yüzeyinde gelişen mayaların izolasyonu ve identifikasyonu. Master Tezi. Gıda Mühendisliği Bölümü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, s. 73.

Arias, C.R., Burns, J.K., Friedrich, L.M., Goodrich, R.M. and Parish, M.E. 2002. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1955-1961.

Arroyo-Lopez, F.N., Durán-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A. and Garrido-Fernández, A. 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23: 791-796.

Ateş, G. 1999. Starter kültürlü tulum peynirlerinin olgunlaşmaları sırasında duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerinde meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar (Doktora Tezi). Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Fırat Üniversitesi, Elazığ, s. 120.

Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar, *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara, s. 55-56.

Bağder, S. 2008. Türkiye’de değişik şarap bölgelerinden izole edilmiş şarap mayalarının teknolojik özellikleri (Yüksek Lisans Tezi). Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara Üniversitesi, Ankara, s. 97.

Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. 1990. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 1002.

Baytop, T. 1984. Türkiyede Bitkiler ile Tedavi. *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, No:40.

Benli, M. ve Çakmakçı, L. 2003. Elmalarda hasat sonrası hastalıkların kontrolünde kullanılan mayaların tanımlanması ve sınıflandırılması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(1): 30-37.

Besançon, X., Smet, C., Chabalier, C., Rivemale, M. J., Reverbel, P., Ratomahenina, R. and Galzy, P. 1992. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1): 9-18.

Botes, A., Todorov, S.D., von Mollendorff, J.W., Botha, A. and Dicks, M.T. 2007. Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. *Process Biochemistry*, pp: 267-270.

Breuer, U. and Harms, H. 2006. *Debaryomyces hansenii*-an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Wiley interscience*, 23: 415-437.

Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F. and Montel, M. C. 2005. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 87(7): 102-111.

Campbell, I. 1971. Numerical taxonomy of various genera of yeasts. *Journal of General Microbiology*, 67: 223-231.

Capriotti, A. 1967. *Saccharomyces servazzii* sp. A new yeast from Finland soil. *Annali di Microbiologia ed Enzimology*, 17: 79-84.

Coppola, S., Parente, E., Dumontet, S. and La Peccerella, A. 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Dairy Science and Technology*, 68(3): 295-310.

Corbo, M. R., Lanciotti, R., Albenzio, M. and Sinigaglia, M. 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milk and dairy products of apulia region. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2): 147-152.

Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Mulargia, A. F. and Palmas, F. 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2): 53-80.

Coşkun H. 2005. Otlı Peynir. *Gıda Teknolojisi Dernegi Yayınları*, No: 31.

Coşkun, H. and Tunçtürk, Y. 2000. The effect of *Allium* sp. on the extension of lipolysis and proteolysis in Van Herby cheese during maturation. *Food/Nahrung*, 44(1): 52-55.

Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G. ve Çakır, İ. 2008. *Mikrobiyoloji*, Bizim Büro Basımevi, Ankara. s. 227.

Çakır, İ., Doğan, H.B. ve Tükel, Ç. 2000. Proteolitik Mikroorganizmalar. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. 2. baskı. Sim Matbaacılık, Ankara, s. 477-480.

Dağdemir, E. 2006. Salamura Beyaz Peynirden İzole Edilen laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Seçilen Bazı İzolatların Kültür Olarak Kullanılabilme İmkanları (Doktora Tezi). Gıda Mühendisliği Bölümü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, s. 190.

De Barros Lopes M., Soden A., Martens A.L., Henschke P.A. and Langridge P. 1998. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 279-286.

Deak, T. and Beuchat, L.R. 1988. Evaluation of simplified and commercial systems for identification of foodborne yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 7: 135-145.

Deak, T. and Beuchat, L.R. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, CRC Pres, USA, p. 210.

Delfini, C. and Formica, J.V. 2001. *Wine Microbiology: Science and Technology*, Marcel Dekker, Inc. New York. p. 490.

Durlu Özkaya, F., Karabıçak, N., Kayalı, R. ve Esen, B. 2005. Inhibition of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses by *Lactobacillus* spp. *International Journal of Dairy Technology*, 58:111-114.

El-Sharoud, W.M., Belloch, C. and Querol, A. 2009. Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *Journal of Food Science*, 74(7): 341-346.

Ergül, Ş.Ş., Agoston, R., Belak, A. and Deak, T. 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology*, 108:120-124.

Ergün, Ö., Bostan, K. ve Sağun, E. 1992. Van otlu peynirlerinde mikrobiyolojik kalite ve küf florası. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 3(1-2): 53-59.

Esen, E. 2008. Farklı Gıda Maddelerinde maya kontaminasyonu üzerine bir çalışma (Yüksek Lisans Tezi). Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, s. 80.

Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburul F. and Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329-337.

Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M. and Cosentino, S. 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 51-59.

Fernandez- Espinar M.T., Esteve-Zarzoso B., Querol A. and Barrio E. 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 87-97.

Ferreira, A.D. and Viljoen, B.C. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 131-140.

Fiore, C. 2003. Enzymatic activities in various yeast species and strains of wine origin. Book of Abstracts 23rd International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest.

Gadaga, T. H., Mutukumira, A. N. and Narvhus, J. A. 2000. Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. *International Dairy Journal*, 10: 459-466.

Garrido, M., Inigo, B. and Barcenilla, J. 1991. Microbiological and physiological study of Aracena cheese yeast microflora. *Chimie Microbiologie Technologie*, 13(112): 4-6.

Guillamon, J.M., Sabaté J., Barrio E., Cano J. and Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169: 387-392.

Güneri, İ. 1993. Reçellerde Osmofilik Mayaların İzolasyonu, Sayımı ve İdentifikasyonu ile Degisik Parametrelerin (Su Aktivitesi, Ph, Sıcaklık) Büyümeye Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, s. 91.

Halkman, A. K. 2005. *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara. s. 358.

Harju, S., Fedosyuk, H. and Peterson, K.R. 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC Biotechnology*, 4:8.

Hayaloğlu, A.A. and Fox, F.F. 2008. Cheeses of Turkey: 3. varieties containing herbs or spices. *Dairy Science Technology*, 88: 245-256.

Heelan, J.S., Sotomayor, E., Coon, K. and D'Arezzo, J.B. 1998. Comparison of the Rapid Yeast Plus panel with the API 20C yeast system for identification of clinically significant isolates of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(5):1443-5.

Heras-Vazquez, F.J.L., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J.M. and Rodriguez-Vico, F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*, 3: 3-9.

Hierro, N., González, Á., Mas, A. and Guillamón, J.M. 2004. New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 792-801.

Iranzo, J.F.U., Pérez, A.I.B. and Cañas, P.M.I. 1998. Study of oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiology*, 15: 399-406.

Jakopsen, M. and Narvhus, J. 1996. Yeasts and Their Possible Beneficial and Negative Effects on The Quality of Dairy Products. *International Dairy Journal*, 6: 755-768.

Kaçmaz, B., Sipahi, A.B. ve Aksoy, A. 2006. *Candida* türlerinin tanımlanmasında API ID 32 C ve RYP sistemlerinin karşılaştırılması. *Aknem Dergisi*, 20(4): 214-216.

Kitch, T.T., Jacobs, M.R., McGinnis, M.R. and Applebaum, P.C. 1996. Ability of Rapid Yeast Plus System to identify 304 clinically significant yeast within 5 hours. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5):1069-71.



Kesenkaş, H. ve Akbulut, N. 2006. Mayaların peynir üretiminde destek starter kültür olarak kullanımı. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(2): 165-174.

Kockova-Kratavilova, A. and Slavikova, E. 1978. Numerical Taxonomy of the yeast genus *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij. *Journal of General Microbiology*, 104: 257-268.

Kosikowski, F.V. 1978. *Cheese and Fermented Milk Foods*. F.V. Kosikowski and Ass., P.O. Box 139, Brooktondale, New York. p. 711.

Köşker, Ö. ve Çakmakçı, M.L. 1985. *Genel Mikrobiyoloji*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ofset Basım Ders Notları 15: 138.

Kreger-van Rij, N.J.W. 1987. *The Yeasts: Biology of Yeasts*. Ed: Rose, A.H. ve Harrison, J. S. Academic Pres, London. pp: 5-61.

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 2000. *The Yeast: A Taxonomic Study*. Third impression, Elsevier Science B.V, The Netherlands. p. 1055.

Liu, C.-H., Hsu, W.-H., Lee, F.-L. and Liao, C.-C. 1996. The isolation and identification of microbes from a fermented tea Beverage, Haipao, and their interactions during Haipao. *Fermentation Food Microbiology*, 13: 407-415.

Lodder, J. 1970. *The Yeasts*, North – Holland Publishing Company, Amsterdam, London. p. 1385.

Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F. and Prillinger, H. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23: 341-350.

McNeil, B. and Harvey, L.M. 2008. *Fermentation: An Art from the Past, a Skill for the Future*. Ed: McNeil B., and Harvey, L.M. Practical Fermentation Technology, John Wiley & Sons Ltd. West Sussex PO19 8SQ, England. pp: 1-3.

Moreira, S. R., Schwanl, R. F., de Carvalho, E. P. and Wheals, A. E. 2001. Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 117-122.

Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E. and Tzanetakis, N. 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 23: 205-211.

Özbaş, Z. Y., Ergül, Ş.Ş. ve Kahraman, S. 2008. Nevşehir yöresi Emir ve Kalecik Karası üzümlerine özgü yabani maya floralarının belirlenmesi ve izole edilen endojen suşların bazı teknolojik özelliklerinin araştırılması. Proje Sonuç Raporu TÜBİTAK Proje No: TOVAG 104 O 459. s. 210.

Özer, B., Atasoy, F. and Akın, S. 2002. Some properties of Urfa cheese (a traditional white-brined Turkish cheese) produced from bovine and ovine milks. *International Journal of Dairy Technology*, 55: 94-99.

Parish, M.E. and Carroll, D.E. 1987. Fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* isolates from *Vitis rotundifolia* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1): 45-48.

Pereira Dias, S., Potes, M. E., Marinho, A., Malfeito Ferreira, M. and Loureiro, V. 2000. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 60(1): 55-63.

Pérez-Coello, M.S., Briones-Perez, A.I., Ubeda-Iranzo, J.F. and Martin-Alvarez, P.J. 1999. Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiology*, 16: 563-573.

Petersen, K. M., Westall, S. and Jespersen, L. 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish rurfacedripened cheeses. *Journal of Dairy Science*, 85: 478-486.

Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*, Cambridge: University Press. p. 540.

Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A. and Tzanetakis, A. 2001. Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 125-133.

Reps, A. 1993. Bacterial Surface-Ripened Cheeses. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Ed: Fox P.I., Chapman and Hall, Ireland. 2:173-172.

Romano, P., Ricciardi, A., Salzano, G., and Suzzi, G. 2001. Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *International Journal of Food Microbiology*. 69(2): 45-51.

Romano, P., Capece, A. and Jespersen, L. 2006. Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. Ed: Querol, A. and Fleet, G.H. *Yeasts in Food and Beverages*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp: 13-53.

Sahin, İ. ve Öztürk, N. 1998. Salamura beyaz peynirlerde bozulmaya neden olan mayaların tanımlanması. TÜBİTAK Proje no: TOKTAG-1582. s. 47.

Savova, I. and Nikolova, M. 2002. Isolation and taxonomy study of yeast strains form Bulgaria dairy products. *Journal of Culture Collections*, 3: 59-65.

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

Smith, M.B., Dunklee, D., Vu, H. and Woods, G.L. 1999. Comparative Performance of the RapID Yeast Plus System and the API 20C AUX Clinical Yeast System. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2697-2698.

Stratford, M. 2006. Food and Beverage Spoilage Yeasts. Ed: Querol, A. and Fleet, G.H. *Yeasts in Food and Beverages*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp: 335-379.

Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yeşilada, E., Fukui, H., Goto, K. and Ikeshiro, Y. 1994. Traditional medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolia, Van and Bitlis Provinces. *International Journal of Pharmaceutics*, 32:3-12.

Tang, Y. W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith D. H., Dodge, D. and Persing, D. H. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12): 3674-3679.

Tarakçı, Z., Durmaz, H. ve Sağun, E. 2005. Siyabonun (*Ferula* sp.) Otlı peynirin olgunlaşması üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilgileri Dergisi*, 15(1): 53-56.

Temiz, A. 2000. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara. s. 291.

Thomson, J.M., Gaucher, E.A., Burgan, M.F., de Kee, D.W., Li, T., Aris, J.P. and Benner, S.A. 2005. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature Genetics*, 37(6): 630-633.

Tilbury, R.H., Davis, J.G., French, E.K., Imrie, K., Campbell-Lent, K. and Orbell, C. 1974. Taxonomy of yeasts in yogurts and other dairy products. *In Fourth International Symposium on Yeasts*, Viyana. pp: 265-266.

Tofalo, R., Chavez-Lopez, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G.E., Torriani, S., Paparella, A. and Suzzi, G. 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3): 179-187.

Tornadijo, M.E., Fresno, J. M., Sarmiento, R. M. and Carballo, J. 1998. Study of the yeast during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk. *Dairy Science and Technology*, 78: 64-659.

Tunail, N. 1999. Biology of the *Enterococcus* spp. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Eds: R. K. Robinson, C.A. Batt, P. D Patel, Academic Press, London. pp: 1365-1373.

Tunail, N. 2009. *Mikrobiyoloji*. Pelin Ofset. Ankara, s. 448.

Tunçtürk, Y. 2004. Peynirde Hızlı Olgunlaştırma Çalışmalarına Yeni Yaklaşımlar, 8. Gıda Kongresi, Uludağ Üniversitesi, Bursa.

Tükel, Ç., Çakır, İ. ve Doğan, H.B. 2000. Lipolitik Mikroorganizmalar. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Genişletilmiş 2. baskı, Sim Matbaacılık, Ankara. s. 473-475.

Tzanetakis, N., Litoponeon-Tzanetaki, E. and Manolkidis, K. 1987. Microbiology of kopanisti, a traditional Greek cheese. *Food Microbiology*, 4: 251-256.

Valdes-Stauber, N., Scherer, S. and Seiler, H. 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 34: 115-129.

Vasdinyei, R. and Deak, T. 2003. Characterization of yeasts isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 123-130.

Viljoen, B.C. 2006. Yeast ecological interactions: Yeast–yeast, yeast–bacteria, yeast–fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. Ed: Querol, A. and Fleet, G.H. *Yeasts in Food and Beverages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp: 83-110.

Westall, S. and Filtenborg, O. 1998. Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology*, 15(5): 215-222 .

Welthagen, J. J. and Viljoen, B.C. 1999. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiology*, 16: 63-73.

Yaygın, H. 1988. Gıda ve süt endüstrisinde yararlanılan mikroorganizmalar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(2): 363-373.

Yaygın , H. ve Toklu, G.Ş. 2000. Süt ürünleri üretiminde starter kltürler. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Tekirdağ.

Yıldırım, İ. 1997. Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları ve bu mikroorganizmaların proteinaz enzim aktiviteleri (Yüksek Lisans Tezi). Biyoloji Bölümü, Gazi Üniversitesi, Ankara, s. 161.

## EK A. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

### PDA (Potato Dextrose Agar)

| Bileşim           | g/L |
|-------------------|-----|
| Patates infüzyonu | 4   |
| Glukoz            | 20  |
| Agar              | 15  |

Besiyeri bileşenleri damıtık su içinde ısıtılarak çözündürüldükten sonra 121°C’de otoklavda 15 dakika sterilize edilir.

### YPG (Yeast Extract Peptone Glucose) Agar

| Bileşim    | g/L |
|------------|-----|
| Maya Özütü | 10  |
| Pepton     | 10  |
| Glukoz     | 20  |
| Agar       | 15  |

Agar dışındaki besiyeri bileşenleri damıtık su içerisinde çözündürüldükten sonra pH değeri 1 N HCl ile 5.5’e ayarlanmış ve daha sonra agar ilave edilerek otoklavda, 121°C’de 15 dakika sterilize edilir.

**YPG (Yeast Extract Peptone Glucose) Broth**

| Bileşim    | g/L |
|------------|-----|
| Maya Özütü | 10  |
| Pepton     | 20  |
| Glukoz     | 20  |

Besiyeri bileşenleri damıtık su içerisinde çözündürüldükten sonra, pH değeri 1 N HCl ile 4.5'e ayarlanmış ve tüplere dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

**%10 NaCl ve %5 Glukoz Yeast Nitrogen Base Ortamı**

| Bileşim    | g/L |
|------------|-----|
| NaCl       | 100 |
| Glukoz     | 50  |
| Tryptone   | 5   |
| Maya özütü | 5   |
| Agar       | 20  |

Besiyeri bileşenleri damıtık su içinde çözündürüldükten sonra tüplere 5'er mL dağıtıldıktan sonra otoklavda 110°C'de 10 dakika sterilize edilir.

**Rapid Ürea Broth**

| Bileşim                         | g/L   |
|---------------------------------|-------|
| Maya Özütü                      | 0.1   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.091 |
| NaHPO <sub>4</sub>              | 0.95  |
| Üre                             | 20    |
| %1 Fenol Kırmızısı              | 1 mL  |

Besiyeri hazırlandıktan sonra pH 6.9'a ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

**Fermantasyon Besiyeri ( %20 glukoz içeren YPG Broth)**

| Bileşim  | g/L |
|----------|-----|
| Maya Özü | 10  |
| Pepton   | 20  |
| Glukoz   | 220 |

Besiyeri bileşenleri damıtık su içerisinde çözündürüldükten sonra pH değeri 1 N HCl ile 3.5'e ayarlanmış ve fermantasyon şişelerine aktararak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

**% 0.01 CaCl<sub>2</sub> ve %0.5 Tween 80 İçeren Plate Count Agar**

| Bileşim           | g/L  |
|-------------------|------|
| Pepton            | 5    |
| Maya Özü          | 2.5  |
| Glukoz            | 1    |
| Agar              | 14   |
| CaCl <sub>2</sub> | 0.1  |
| Tween 80          | 5 mL |

Besiyeri bileşimi çözündürüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.



### **Skim Milk Agar**

#### Solüsyon A

|                |        |
|----------------|--------|
| Nutrient Broth | 2.6 g  |
| Agar           | 3.2 g  |
| Distile su     | 180 mL |

pH 6.5 ayarlanarak 121°C’de 15 dakika sterilize edilir.

#### Solüsyon B

%10’luk Skim milk besiyeri için

|            |       |
|------------|-------|
| Skim milk  | 2 g   |
| Distile su | 20 mL |

1.5 atm basınçta 8 dakika otoklavlama yolu ile steril edilir. Her iki besiyeri karıştırılarak plaklara dökülerek hazırlanmıştır.

### **%50 Skim Milk PCA (Plate Count Agar)**

| Bileşim    | g/L  |
|------------|------|
| Pepton     | 5    |
| Maya Özütü | 2.5  |
| Glukoz     | 1    |
| Agar       | 10.5 |
| Skim Milk  | 500  |

Besiyeri bileşenleri çözündürüldükten sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilir.

**0.5 M EDTA'nın Hazırlanması**

29.2 g EDTA 160 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür, hacim 200 mL'ye tamamlanır. pH'nın 8.0 olması için NaOH peleti ilave edilir. Otoklavda sterilize edilir.

**1 M Tris Hazırlanması**

121.1 g Tris base 700 mL distile suda çözündürülür. pH'nın 8.0 olması için HCl ilave edilir ve hacim 1 L tamamlanır. Otoklavda sterilize edilir.

**TE Tampon Çözeltilisi**

TE tampon çözeltisi 0.5 M EDTA ve 1 M Tris 'den hazırlanır.

**1.2 M NaCl Hazırlama**

70.1 g NaCl 950 mL suda çözündürüldükten sonra hacim 1 L tamamlanır.

**100 mM NaCl Hazırlama**

5.844 g NaCl 950 mL suda çözündürüldükten sonra hacim 1 L tamamlanır.

**10 mM Tris-HCl Hazırlama**

315.12 mg madde tartılarak 200 mL distile suda çözündürülür.

**%1 SDS Hazırlama**

5 g SDS 450 mL distile suya eklenir. İyice çözülmesi için 68 °C'deki su banyosunda bekletilir. Sonra hacim 500 mL'ye tamamlanır. 1 N HCl eklenerek pH:7.2'ye ayarlanır.

**TBE Tamponu (Tris-Borik asit-EDTA): Stok Solüsyonu (10X, pH:8.0)**

121.10 g Tris base 61.83 g Borik asit ve 5.84 g EDTA (susuz) Distile su ile hacim 1 L'ye tamamlanır. pH:8.0'e ayarlanarak, buzdolabında saklanır.

**1 mM EDTA Hazırlanması**

29.2 mg EDTA 100 mL Distile su içinde hazırlanır.

**Etidyum bromür (5 mg/mL stok)**

Etidyum bromür'ün 50 mg'ının 10 mL distile suda, manyetik çalkalayıcı üzerinde birkaç saat karıştırılarak çözünmesi ile hazırlanır. Renkli şişeye konur ve şişenin etrafı alüminyum kâğıt ile kapatılarak oda sıcaklığında saklanır. Hazırlanan bu çözeltiden her 100 mL agaroz 10 µL eklenir. Etidyum bromürün buharlaşmasını engellemek için agaroz iyice çözüldükten sonra, sıcaklığı 60°C'ye gelince etidyum bromür eklenir.

**Agaroz jel hazırlanışı (%1'lik)**

2 g agaroz 200 ml 1X TBE tamponu içerisinde iyice eritilir. Jelin sıcaklığı 60°C'ye gelince etidyum bromür çözeltisinden 20 µL eklenir. İyice karıştırıldıktan sonra jel kalıbına dökülür.

## EK B. Maya İzolatlarının RYP (Remel) Panellerinde Oluşturduğu Renk Değişimi



Şekil 8. *S. servazzii* M5.1



Şekil 9. *S. servazzii* M5.2



Şekil 10. *D. hansenii* M6.1



Şekil 11. *D. castellii* M6.3



Şekil 12. *S. servazzii* M6.4



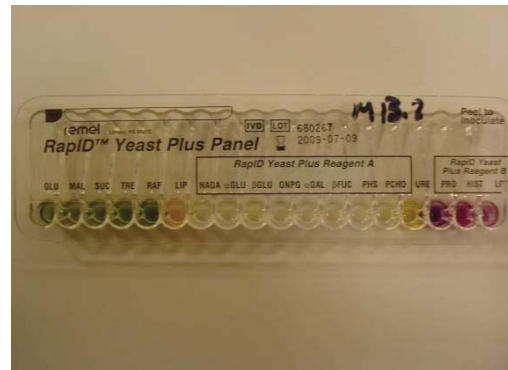
Şekil 13. *K. marxianus* M8.1

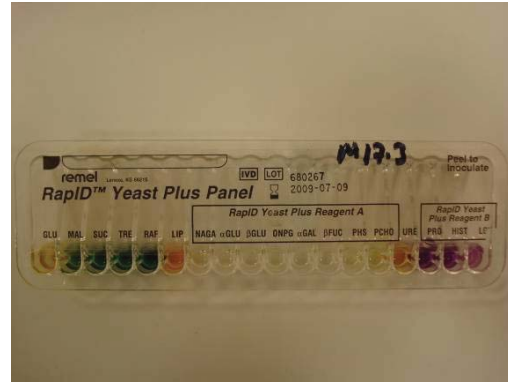


Şekil 14. *P. fermentans* M8.2



Şekil 15. *S. servazzii* M9.1

Şekil 16. *P. membranifaciens* M10.1Şekil 17. *P. membranifaciens* M11.1Şekil 18. *P. membranifaciens* M13.1Şekil 19. *P. membranifaciens* M13.2Şekil 20. *P. membranifaciens* M14.1Şekil 21. *S. servazzii* M15.1Şekil 22. *P. membranifaciens* M15.2Şekil 23. *P. membranifaciens* M17.1

Şekil 24. *P. fermentans* M17.2Şekil 25. *K. marxianus* M17.3Şekil 26. *P. membranifaciens* M18.2

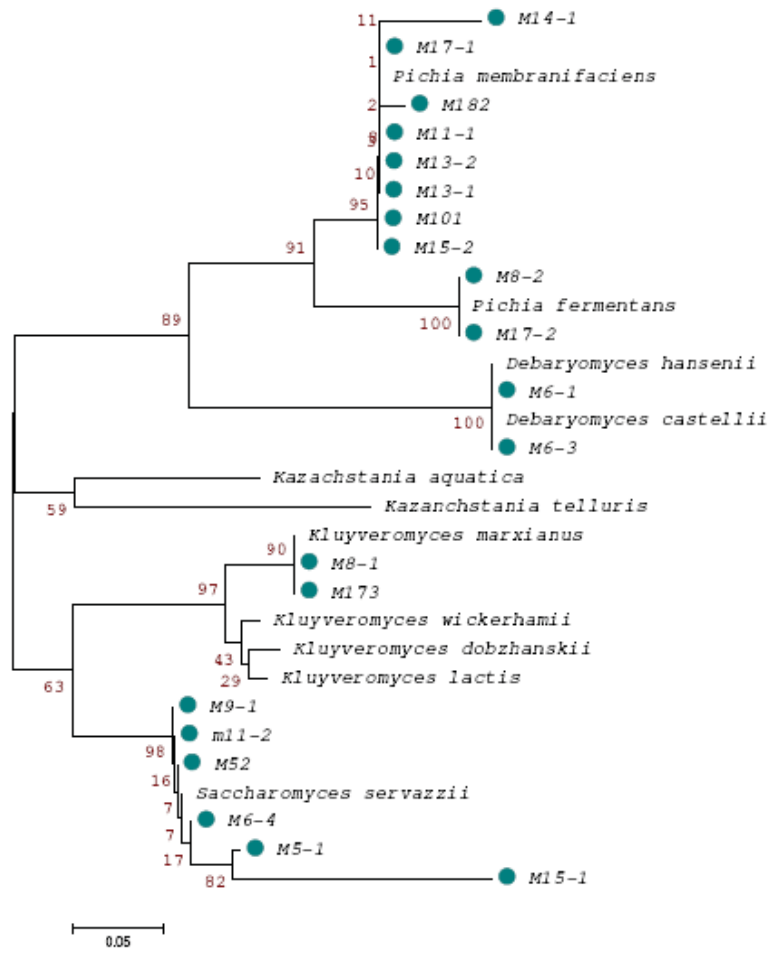
Şekil 27. Panellerin Toplu Götüntüsü

EK C. Maya örnekleriyle gerçekleştirilen fermantasyonlar süresince izlenen ağırlık azalmalarına ilişkin veriler (gr)

| Maya Türleri                         | 0. Gün | 1. Gün | 2. Gün | 3.Gün | 4.Gün | 5.Gün | 6.Gün | 7.Gün | 8.Gün |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M5.1  | 0,00   | 0,76   | 2,41   | 4,11  | 5,48  | 6,46  | 6,74  | 6,82  | 6,88  |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M5.2  | 0,00   | 0,63   | 2,37   | 4,10  | 5,55  | 6,57  | 6,88  | 6,93  | 7,00  |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> M6.1    | 0,00   | 0,13   | 0,20   | 0,38  | 0,57  | 0,78  | 1,01  | 1,19  | 1,29  |
| <i>Debaryomyces castellii</i> M6.3   | 0,00   | 0,14   | 0,19   | 0,34  | 0,45  | 0,56  | 0,68  | 0,75  | 0,76  |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M6.4  | 0,00   | 0,55   | 2,04   | 3,75  | 5,23  | 6,22  | 6,48  | 6,58  | 6,63  |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> M8.1  | 0,00   | 0,45   | 1,21   | 1,99  | 2,69  | 3,39  | 4,05  | 4,68  | 5,27  |
| <i>Pichia fermentans</i> M8.2        | 0,00   | 0,47   | 1,52   | 2,73  | 3,93  | 4,93  | 5,72  | 6,12  | 6,42  |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M9.1  | 0,00   | 0,64   | 2,36   | 4,13  | 5,39  | 6,16  | 6,56  | 6,77  | 6,91  |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M10.1  | 0,00   | 0,08   | 0,13   | 0,18  | 0,25  | 0,31  | 0,38  | 0,43  | 0,47  |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M11.1  | 0,00   | 0,06   | 0,09   | 0,12  | 0,17  | 0,20  | 0,25  | 0,29  | 0,32  |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M11.2 | 0,00   | 0,66   | 2,22   | 3,82  | 5,17  | 6,26  | 6,83  | 6,95  | 7,09  |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M13.1  | 0,00   | 0,06   | 0,11   | 0,15  | 0,21  | 0,25  | 0,31  | 0,34  | 0,41  |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M13.2  | 0,00   | 0,07   | 0,11   | 0,15  | 0,21  | 0,26  | 0,32  | 0,36  | 0,41  |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M14.1  | 0,00   | 0,07   | 0,10   | 0,14  | 0,19  | 0,23  | 0,28  | 0,31  | 0,36  |
| <i>Saccharomyces servazzii</i> M15.1 | 0,00   | 0,69   | 2,51   | 4,53  | 5,76  | 6,40  | 6,90  | 7,09  | 7,21  |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M15.2  | 0,00   | 0,11   | 0,14   | 0,18  | 0,24  | 0,29  | 0,37  | 0,43  | 0,50  |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M17.1  | 0,00   | 0,06   | 0,08   | 0,14  | 0,19  | 0,22  | 0,29  | 0,34  | 0,39  |
| <i>Pichia fermentans</i> M17.2       | 0,00   | 0,24   | 1,36   | 2,88  | 4,09  | 5,14  | 6,36  | 7,12  | 7,79  |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> M17.3 | 0,00   | 0,36   | 1,51   | 3,11  | 4,38  | 5,24  | 6,00  | 6,46  | 6,76  |
| <i>Pichia membranifaciens</i> M18.2  | 0,00   | 0,15   | 0,19   | 0,22  | 0,27  | 0,32  | 0,37  | 0,41  | 0,42  |



# EK D. Maya Suşlarının Filogenetik Analiz Sonucu Oluşturulan Dendogramları



### EK E. Maya İzolatlarının Enzim Profillerinde Gözlenen Renk Reaksiyonları



(a)



(b)



(c)



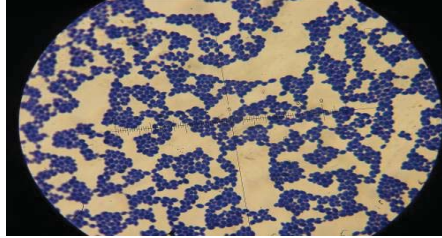
(d)



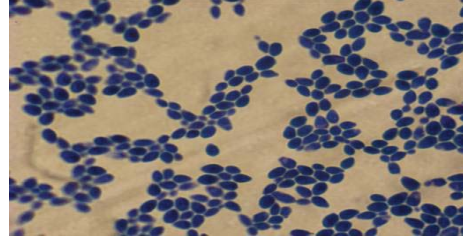
(e)

Şekil 28. Maya izolatlarının API-ZYM'deki renk reaksiyonlarının görüntüleri

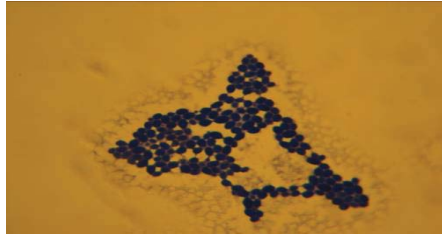
# EK F. Maya Kùltürlerinin Mikroskobik Görüntüleri



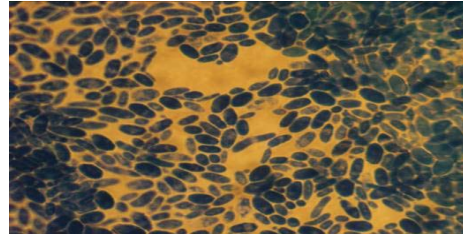
*S. servazzii* M5.1



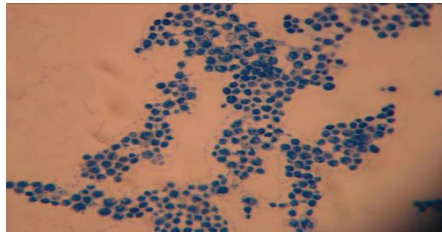
*K. marxianus* M8.1



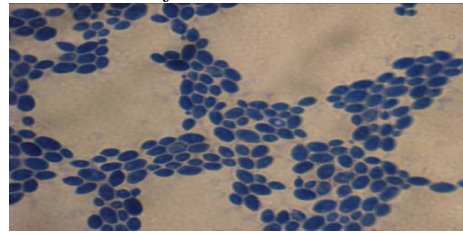
*S. servazzii* M5.2



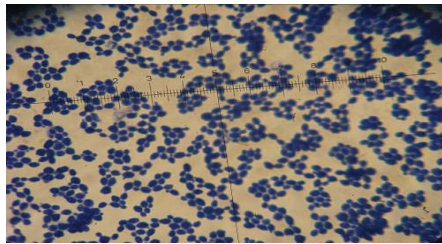
*P. fermentans* M8.2



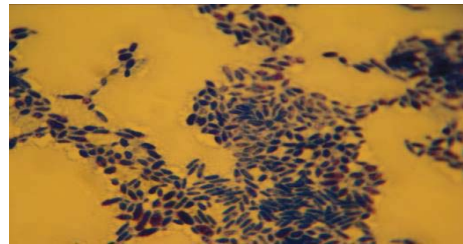
*D. hansenii* M6.1



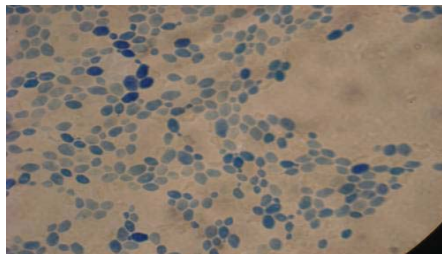
*S. servazzii* M9.1



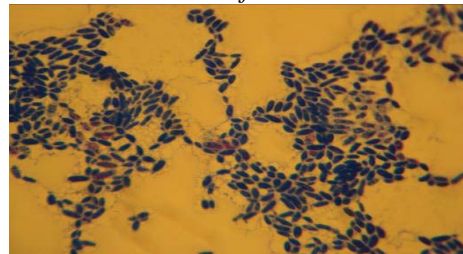
*D. castellii* M6.3



*P. membranifaciens* M10.1



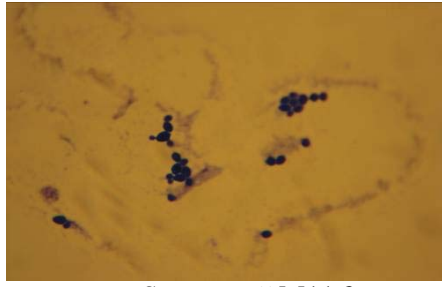
*S. servazzii* M6.4



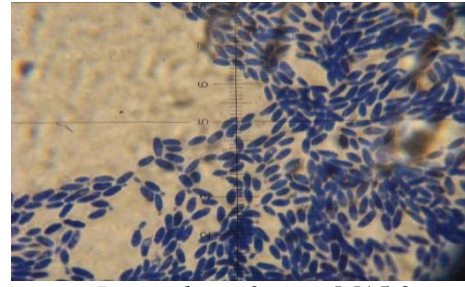
*P. membranifaciens* M11.1

**Şekil 29.** Maya türlerinin mikroskobik görüntüsü  
(YPG Agar, 28 °C'de 3 gün, x100)





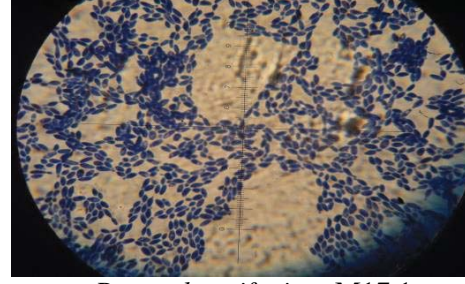
*S. servazzii* M11.2



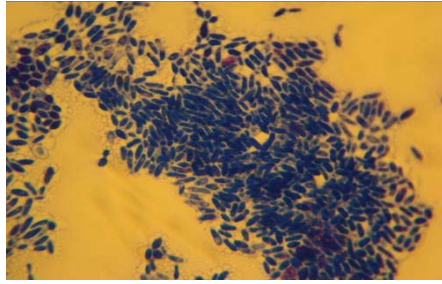
*P. membranifaciens* M15.2



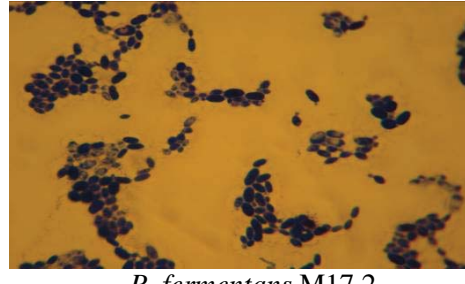
*P. membranifaciens* M13.1



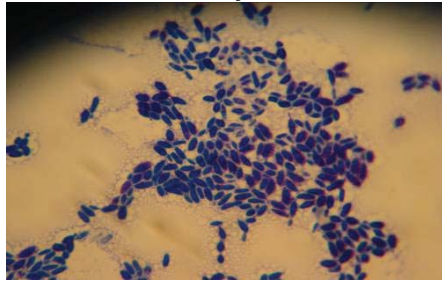
*P. membranifaciens* M17.1



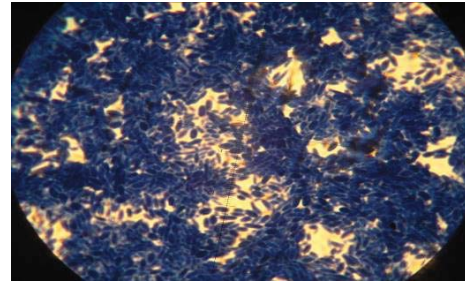
*P. membranifaciens* M13.2



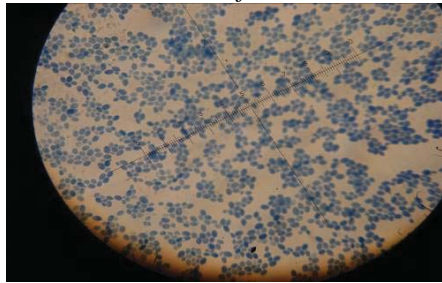
*P. fermentans* M17.2



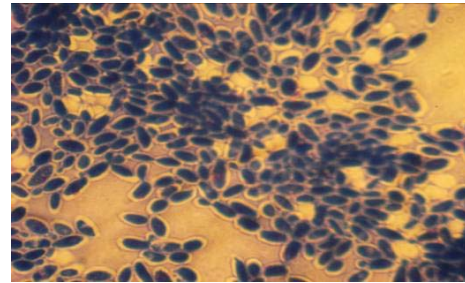
*P. membranifaciens* M14.1



*K. marxianus* M17.3



*S. servazzii* M15.1



*P. membranifaciens* M18.2

**Şekil 30.** Maya türlerinin mikroskopik görüntüsü  
(YPG Agar, 28 °C'de 3 gün, x100)