

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**SÜT ÜRÜNLERİ VE ZEYTİNDE BOZULMAYA NEDEN
OLAN MAYA TÜRLERİNİN “REAL-TIME PCR YÜKSEK
ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ” İLE
TANIMLANMASI**

**Hazırlayan
Mine ERDEM**

**Danışman
Doç. Dr. Zülal Kesmen**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2015
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**SÜT ÜRÜNLERİ VE ZEYTİNDE BOZULMAYA NEDEN
OLAN MAYA TÜRLERİNİN “REAL-TIME PCR YÜKSEK
ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ” İLE
TANIMLANMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Mine ERDEM**

**Danışman
Doç. Dr. Zülal Kesmen**

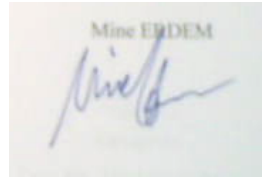
**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından FYL-2014-5221 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

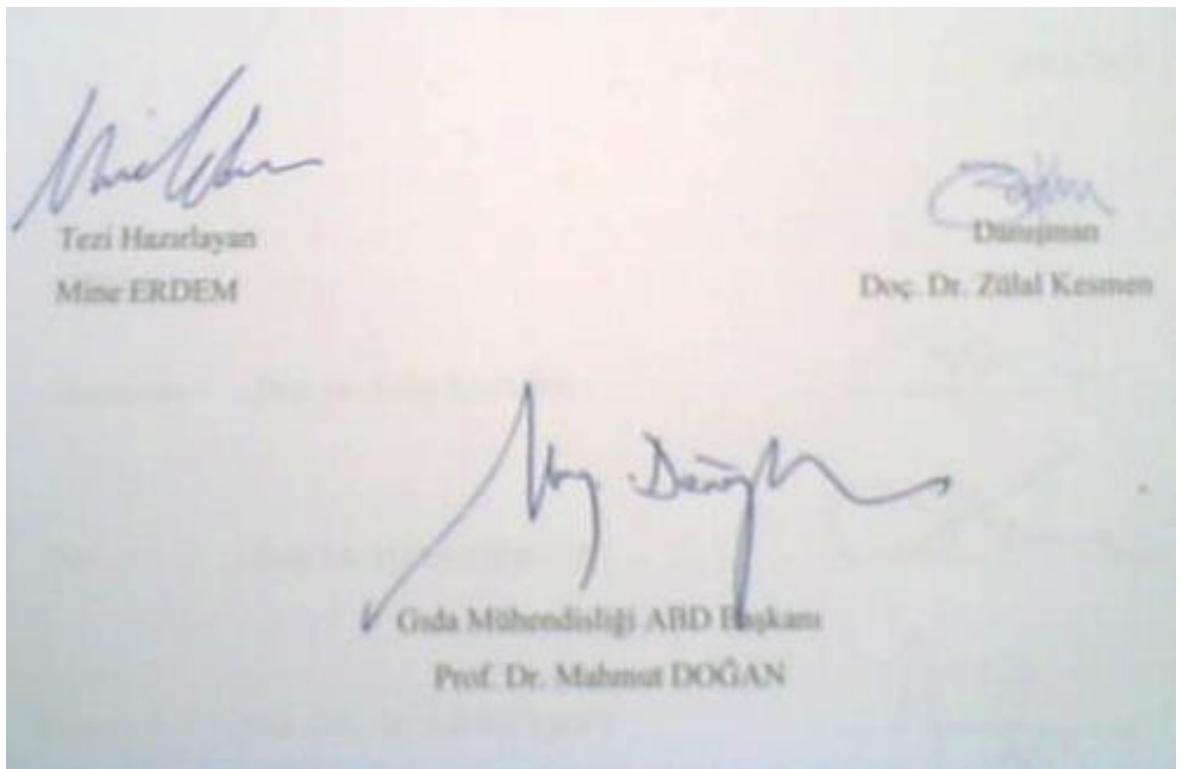
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Mine ERDEM



YÖNERGEYE UYGUNLUK

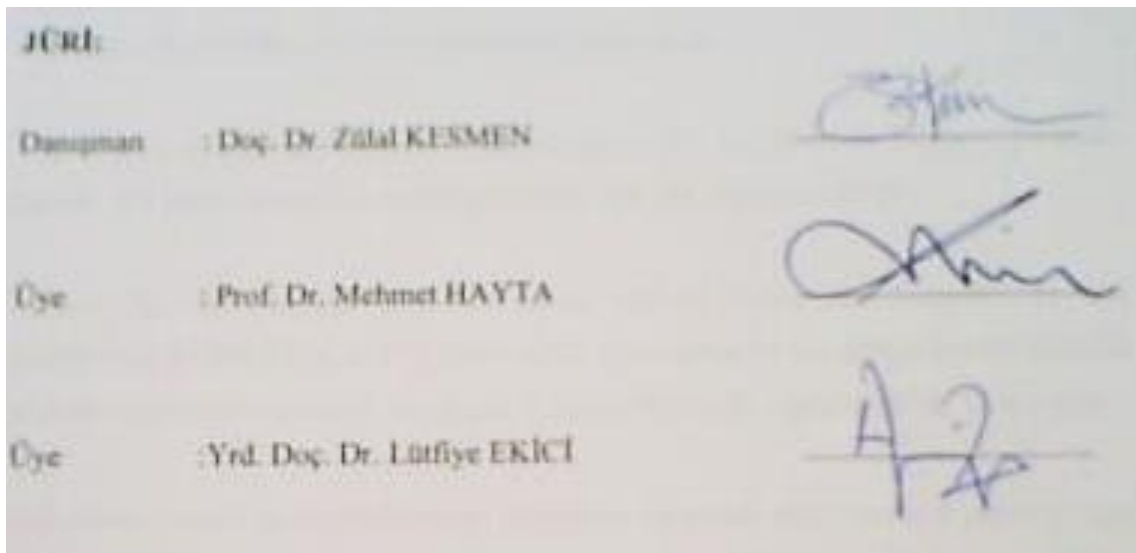
“Süt Ürünleri ve Zeytinde Bozulmaya Neden Olan Maya Türlerinin “Real-Time PCR Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi” İle Tanımlanması” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Doç. Dr. Zülal Kesmen danışmanlığında **Mine ERDEM** tarafından hazırlanan “**Süt Ürünleri ve Zeytinde Bozulmaya Neden Olan Maya Türlerinin “Real-Time PCR Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi” İle Tanımlanması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

.

09/01/ 2015



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 20/01/2015 tarih ve 2015/03-03 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi esnasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, hiçbir yardımı esirgemeyen ve destek olan değerli hocam Doç. Dr. Zülal KESMEN' e çok teşekkür ederim.

Bölümümüzün biyoteknoloji laboratuvarındaki çalışmalarım esnasında huzurlu çalışma ortamlarına beni de kabul eden, ihtiyacım olduğunda yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Uzman Ahmet E. YETİMAN'a ve Öğ. Gör. Ayten GÜLLÜCE'ye, özellikle geç saatlere kadar çalıştığım zamanlarda hem yardımcı hem de destek olan arkadaşım Esra ÖZBEKAR'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Çok değerli arkadaşım Neslihan KAHRAMAN'a bu tez çalışması boyunca yanımda olduğu, her türlü yardımı ve desteği gösterdiği için çok teşekkür ederim.

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile beni destekleyen TÜBİTAK'a ve FYL-2014-5221 kodlu proje ile tez çalışmamı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, sadece bu tez çalışmasını yürütmem esnasında değil hayatım boyunca beni destekleyen, teşvik eden ve hep yanımda olan anneme, babama ve abime, her ablanın sahip olmak isteyebileceği en mükemmel kız kardeş olan Merve'ye ve dualarını esirgemeyen tüm yakınlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Mine ERDEM
Kayseri, Ocak 2015

SÜT ÜRÜNLERİ VE ZEYTİNDE BOZULMAYA NEDEN OLAN MAYA TÜRLERİNİN “REAL-TIME PCR YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ” İLE TANIMLANMASI

Mine ERDEM

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2014
Danışman: Doç. Dr. Zülal KESMEN**

ÖZET

Mayalar, tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalar olup günümüzde endüstriyel öneme sahip birçok ürünün, ekmek, bira ve şarap gibi çeşitli fermente gıdaların üretiminde büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Bununla birlikte birçok maya türü, gıdalarda gelişerek arzu edilmeyen değişikliklere neden olmakta ve sonuçta bu ürünlerin değişik şekillerde bozulmalarına yol açmaktadır. Gıda üretim hattında ve üründe bozulma ya da kalite düşmesine neden olan maya türlerinin hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilerek bozulma etkeni türe özgü, koruyucu tedbirlerin alınması, kaliteli bir üretim için zorunludur. Ancak günümüzde mayaların tanımlanmasında yaygın olarak doğruluğu ve tekrarlanabilirliği oldukça düşük olan fenotipik testlere dayalı tanımlama yöntemleri kullanılmaktadır. Dolayısıyla gün geçtikçe gıda mikrobiyolojisi açısından önemleri daha iyi anlaşılan mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tespiti için genotipik testlere dayalı alternatif tanımlama yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu nedenle bu tez çalışmasında maya türleri arasında değişkenlik gösteren DNA dizilerine ait yüksek çözünürlüklü erime dereceleri (T_m) ve erime eğrilerinin (HRM analizi) analizini sağlayacak real-time PCR'a dayalı bir tanı yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmanın ilk aşamasında, kaymak, yoğurt, peynir ve zeytin gibi çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen mayalar (GTG)5 rep-PCR analizi ile tiplendirildikten sonra ITS bölgesini hedef alan dizi analizi ile tanımlanmıştır. Analiz edilen gıda örneklerinin maya florasında *Kluyveromyces marxianus* ve *Debaryomyces hansenii* türleri baskın olmakla birlikte bunların dışında *Pichia membranifaciens*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida zeylanoides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania servazzii*, *Kluyveromyces lactis*, *Saturnispora* sp., *Kazachstania naganishii*, *Pichia anomala*, *Ustilago hordei*, *Torulaspora delbrueckii*,

Yarrowia. lipolytica, *Clavispora lusitaniae*, *Candida diversa*, *Candida sake* ve *Kazachstania exigua* olmak üzere toplam 20 farklı maya türü tanımlanmıştır.

Tanımlanan 20 maya türüne ait izolatlar 26S rRNA geni üzerinde D1/D2 bölgesini hedef alan universal NL1-LS2 ve U1-U2 primer setleri kullanılarak real-time PCR HRM ve T_m analizine tabi tutulmuşlardır. Analiz edilen maya izolatlarının U1-U2 bölgesine ait ortalama T_m değerleri 81.482–91.332 °C aralığında, NL1-LS2 bölgesine ait T_m değerleri ise 81.116–88.087 °C aralığında tespit edilmiştir. NL1-LS2 bölgesinin T_m analizi sonucunda 12 maya türünün, U1-U2 bölgesinin analizi sonucunda ise 16 maya türünün T_m değerlerinin istatistiki olarak birbirinden önemli derecede farklı olduğu saptanmıştır. T_m analiz sonuçlarına paralel olarak NL1-LS2 bölgesine ait HRM eğrilerinin 16 maya türü, U1-U2 bölgesine ait HRM eğrilerinin ise 20 maya türü için türe spesifik olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, real-time PCR HRM ve T_m analizinin, gıdalarda bozulma yapan mayaların karakterizasyonunda kullanılabilecek hızlı ve kolay uygulanabilen bir yöntem olmasının yanı sıra sadece gıdalarda bozulma yapan maya türlerinin değil birçok mikroorganizma grubunun tanımlanmasında kullanılabilecek potansiyel bir analiz yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bozucu mayalar, Real-Time PCR, HRM analizi, T_m, (GTG)₅-rep-PCR, dizi analizi

IDENTIFICATION OF SPOILAGE YEASTS IN DAIRY PRODUCTS AND OLIVES WITH REAL-TIME PCR HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSES

Mine ERDEM

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M. Sc. Thesis, January 2014

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zülal KESMEN

ABSTRACT

Yeasts are eukaryotic microorganisms with single-celled and nowadays they play important role in producing a variety of products which have industrial importance and a variety of fermented foods such as bread, beer and wine. However, a lot of yeast species leads to undesirable changes like spoilage in foods in different ways. The detection of yeast species, which cause decomposition in food products or reduction in quality, accurately and quickly results in taking species-specific precautions. But current identification systems based on phenotypic tests have poor repeatability, expensive and time-consuming. Therefore, it is necessary to develop alternative identification methods depending on genotypic methods, which give fast and reliable results.

For this reason, in this study we aim to develop a method depends on the real-time PCR analysis, which enables to analyze the high resolution melting temperature (T_m) and melting curves (HRM) of the DNA sequences. For this purpose, after typing via (GTG)₅ rep-PCR analysis, the yeasts isolated from some food products like cream, yoghurt, cheese, and olives were identified by sequencing using ITS region. Although *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii* among yeast species analysed were dominant, 20 different yeast species including, *Pichia membranifaciens*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida zeylanoides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania servazzii*, *Kluyveromyces lactis*, *Saturnispora* sp., *Kazachstania naganishii*, *Pichia anomala*, *Ustilago hordei*, *Torulaspora delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida diversa*, *Candida sake* and *Kazachstania exigua* were also identified.

The isolates belong to yeast species were subject to real-time PCR HRM and T_m analyses using NL1-LS2 and U1-U2 primers targeting of sequence of D1/D2 region of

26S rDNA. The T_m values of the yeast isolates that produced by U1-U2 primer pair were between 81.482–91.332 °C while the T_m values obtained with NL1-LS2 primer pair were between 81.116–88.087 °C. A total 12 yeast species which were analysed based on the NL1-LS2 region and 16 yeast species which were analysed based on U1-U2 region were showed significantly different T_m values. In similar with T_m analysis results, HRM curves of 16 yeast species belong to NL1-LS2 region and HRM curves of 20 species obtained with analysis of U1-U2 region were found as species specific.

As a result it was concluded that the real-time PCR HRM and T_m analyses is a rapid and easy method to be used in the characterization of the spoilage yeasts. It was also a potential analysis that can be used not only to identify the spoilage yeasts but also in the identification of the many of the microorganism groups.

Keywords: Spoilage yeasts, Real-Time PCR, HRM analysis, T_m , (GTG)₅-rep-PCR, sequence analysis

İÇİNDEKİLER

SÜT ÜRÜNLERİ VE ZEYTİNDE BOZULMAYA NEDEN OLAN MAYA TÜRLERİNİN “REAL-TIME PCR YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ” İLE TANIMLANMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
ONAY	: iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Gıdalardaki Bozulma Etkeni Mayalar.....	7
1.2. Maya Tanımlama Yöntemleri.....	13
1.2.1. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Fenotipik Yöntemler	13
1.2.2. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Genotipik Yöntemler.....	14

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL	25
2.1.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Gıda Ürünlerinin ve İzolatların Temini.....	25

2.2. YÖNTEM.....	25
2.2.1. Gıda Örneklerinden Farklı Maya Türlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması	25
2.2.2. Maya İzolatlarının Genotipik Olarak Tanımlanması.....	26
2.2.2.1. Saf Maya İzolatlarından DNA İzolasyonu	26
2.2.2.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması	27
2.2.2.2. Rep-PCR Fingerprint Analizi.....	27
2.2.2.3. Rep-PCR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezinde Yürütülmesi.....	28
2.2.3. Dizi Analizi.....	28
2.2.4. Maya İzolatlarının Real-time PCR Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi	29
2.2.4.1. İstatistik Analizi.....	31

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	32
3.2. Rep-PCR Fingerprint Analizi Sonuçları.....	33
3.3. Dizi Analizi Sonuçları	35
3.4. Real-time PCR Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) ve Tm Analizi.....	36
3.4.1. U1-U2 Primeri ile Yapılan Real-time PCR HRM Analizi	38
3.4.2. NL1-LS2 Primeri ile Yapılan Real-time PCR HRM Analizi	43

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

KAYNAKLAR	61
EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ.....	81

KISALTMALAR

°C	: Santrigrad derece
μM	: Mikromolar
A	: Adenin
bç	: baz çifti
BLAST	: Basic Local Alingment Search Tool
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DGGE	: Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi
dH₂O	: deiyonize su
dk	: dakika
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
g	: gram
G	: Guanin
IGS	: Genler Arası Bölgeler
ITS	: Transkripsiyonu Yapılmayan Bölgeler
kob	: koloni oluşturan birim
L	: Litre
M	: Molar
MgCl₂	: magnezyum klorür
mL	: mililitre
NaCl	: sodyum klorür
ng	: nanogram
NH₄AC	: amonyum asetat
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	: Vurgulu Alan Jel Elektroforezi
pH	: Sudaki hidrojen iyonlarının eksi logaritması
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
rDNA	: Ribozomal deoksiribonükleik asit
REA	: Restriksiyon Endonükleaz Analizi
Rep-PCR	: Tekrar eden palindromik element-polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit

s	: saniye
S	: Sitozin
T	: Timin
TE	: Tris-EDTA
Tm	: Erime sıcaklığı
V	: Volt
µg	: mikrogram
µL	: Mikrolitre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Gıdalarda yaygın olarak bulunan ve bozulmaya sebep olan maya türleri.....	8
Tablo 1.2. Bozulmaya sebep olan mayaların gıdaların kalite parametreleri üzerindeki etkileri.....	12
Tablo 1.3. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türleri ve izole edildikleri ürünler	17
Tablo 2.1. Rep-PCR döngü şartları	28
Tablo 2.2. Dizi analizinde kullanılan primerlerin baz dizilimi.....	29
Tablo 2.3. Dizi analizi için PCR döngü şartları.....	29
Tablo 2.4. HRM analizi için kullanılacak universal PCR primer setleri.....	30
Tablo 2.5. RT-PCR ile T _m /HRM analizi döngü şartları	30
Tablo 3.1. Gıda örneklerinde maya sayım sonuçları	32
Tablo 3.2. Tanımlanan maya izolatlarının örneklere göre dağılımı	35
Tablo 3.3. Real-time PCR HRM analiz sonucunda elde edilen ortalama T _m değerleri.....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	PCR reaksiyonunun temel aşamaları.....	15
Şekil 1.2.	Maya tanısında kullanılan ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri ve universal primerleri	18
Şekil 1.3.	Yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi: amplifikasyon eğrisi, normalizasyon öncesi ve sonrası erime eğrileri, difference plot.....	20
Şekil 3.1.	Maya izolatlarına ait rep – PCR Fingerprint analizi ile elde edilen fingerprintler kullanılarak oluşturulan dendrogram (UPGMA metot)	34
Şekil 3.2.	Dizi analizi ile tanımlanan izolatların örneklere göre % dağılımı.	36
Şekil 3.3.	U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri: A: difference plot eğrisi B: normalize erime eğrisi C:Tm pikleri	38
Şekil 3.4.	<i>Pichia</i> cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.....	39
Şekil 3.5.	<i>Candida</i> cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.	40
Şekil 3.6.	<i>Kazachstania</i> cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.	41
Şekil 3.7.	<i>Kluyveromyces</i> cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.	42
Şekil 3.8.	Tüm izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri: (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.....	43
Şekil 3.9.	<i>Pichia</i> cinsi izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.....	44
Şekil 3.10.	<i>Candida</i> cinsi izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.	45
Şekil 3.11.	<i>Kazachstania</i> cinsi izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.	46
Şekil 3.12.	<i>Kluyveromyces</i> cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri.	47

GİRİŞ

Maya aktivitesinin gıdalardaki etkisi çift yönlü olup, bir taraftan ekmek, bira, şarap ve diğer alkollü içeceklerin üretiminde arzu edilen biyokimyasal dönüşümlere neden olurken, diğer taraftan birçok maya türü bozulma yapan bakterilerin gelişemedikleri ortamlarda (düşük su aktivitesi, yüksek tuz/şeker konsantrasyonu düşük pH) dahi gelişerek arzu edilmeyen değişikliklere neden olmakta ve sonuçta bu ürünlerin değişik şekillerde bozulmalarına yol açmaktadır. Maya kaynaklı bozulmalar gıdayı tüketilemeyecek duruma getirerek ekonomik kayıplara neden olabildiği gibi patojen bakterilerin gelişmesi için uygun bir ortam oluşturarak gıdaları sağlık yönünden de riskli duruma getirebilmektedir [1,2].

Çeşitli şekillerde bulaşarak gıdalarda gelişen mayaların lipolitik, proteolitik ve pektolitik aktiviteleri ile fermantasyonu sonucu oluşan alkol ve CO₂ gibi ürünlerin gıdanın tat, koku ve tekstürünü olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır [3-8]. Bozulmaya neden olan maya türlerinin doğru bir şekilde identifikasyonu, gıda sistemlerindeki fizyolojik ve ekolojik özelliklerine bağlı olarak bozucu potansiyellerinin belirlenmesine katkı sağladığı gibi prosesin teknolojik yönden geliştirilmesine ve ürün kalitesinin artırılmasına da imkan sağlar [9]. Diğer bir ifade ile gıda üretim hattında proses kontrolünün rutin bir parçası olarak, üründe bozulma ya da kalite düşmesine neden olan mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tespiti kaliteli bir üretim için zorunludur.

Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların tanımlanmalarında kullanılan morfojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakteristiklere dayanan fenotipik yöntemlerin zaman alıcı olduğu ve bazen yanlış tanımlamalara yol açtığı göz önüne alındığında, maya tanımlamada daha güncel olan DNA'ya dayalı genotipik yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu yöntemler içerisinde mayaların hem tür hem de suş düzeyinde tanımlanmasında hızlı ve doğru sonuçlar elde edilmesine olanak sağlayan

Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı yöntemlerin daha çok tercih edildiği belirtilmektedir [9].

PCR tekniğinde, tekrarlanan sıcaklık döngüleri kullanılarak doğal hücredeki replikasyon süreci taklit edilir. Böylece in vitro koşullarda hedef bir DNA dizisinin çok sayıda kopyası elde edilmiş olur [10]. Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas dedeksiyon sistemleriyle birleştirilmesi ile “real-time PCR” olarak adlandırılan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Real-time PCR’da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu yöntemlerde PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresans boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır [11,12].

Diğer taraftan son yıllarda üzerinde yoğun çalışmalar yapıldığı yüksek çözünürlüklü erime (High Resolution Melting, HRM) eğrileri ve erime sıcaklık derecelerinin (T_m) analizine dayanan real-time PCR tekniğinin geliştirilmesiyle birlikte ortaya çıkan bir yöntemdir. Bu teknik DNA örneklerinin amplifikasyon sonrası sıcaklık artışıyla birlikte çift zincirli DNA’nın tek zincirli DNA’ya ayrılmasındaki davranışının karakterize edilmesi esasına dayanır [13]. PCR esnasında DNA’nın denatürasyonu süresince floresan boyaaların sinyal şiddetinde meydana gelen değişimler, florometrik cihazlar yardımıyla ölçülerek analiz edilmektedir. Analizin PCR’ın gerçekleştiği tüpte yapılması yani kapalı tüp sistemi olması olası kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Analizler kısa bir sürede gerçekleşmekte, bu sayede birçok tarama yönteminin yerini alabilecek özellikte kolay ve hızlı uygulanabilen bir yöntem olduğu ileri sürülmektedir [14]. Bu yöntem ilk olarak tıpta mutasyon tarama amacıyla kullanılmış olup daha sonra mikroorganizmaların tanımlanmasında da kullanılabilecek potansiyel bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur [15,16].

Sonuç olarak gıda mikrobiyolojisi ve endüstrisindeki önemi giderek daha iyi anlaşılan mayaların tanımlanmasına yönelik mevcut yöntemler yetersiz olup hızlı ve güvenilir sonuçlar veren alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tespiti için, son yıllarda potansiyel bir yöntem olarak öne çıkan real-time PCR HRM ve T_m tekniğine dayalı bir analiz yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Dolayısıyla bu tez çalışmasında;

- Gıda ürünlerinde bozulmaya neden olan maya türlerinin tespiti için real- time PCR HRM ve Tm analizine dayalı bir yöntem geliştirilmesi,
- Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların hızlı ve doğru bir şekilde identifikasyonunun gerçekleştirilebilmesi,
- Maya türlerinin analizinde geleneksel yöntemlerde yaşanan analizci hatalarının minimuma indirilmesi,
- Laboratuvar işlemlerini azaltarak iş gücü kayıplarının önlenmesi amaçlanmıştır.

Böylece;

- Maya kaynaklı gıda bozulmalarının önlenmesine ve buna bağlı olarak üretim kayıpları ve dolayısıyla ekonomik kayıpların azaltılmasına katkı sağlanması,
- Yalnızca bozulma etkeni maya türüne yönelik koruyucu işlem ve katkıların kullanımının yaygınlaştırılması,
- Üründe gereksiz koruyucu katkı maddelerinin kullanımının azaltılarak daha sağlıklı ve güvenli gıda üretimine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

Bir gıdanın tüketilebilirliğini yitirmesi ve yapısal özelliklerinin değişmesi “bozulma” olarak tanımlanmaktadır. Bozulan bir gıdanın yapı, görünüş, renk, tat ve kokusunda çeşitli fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelir. Bu değişimler bir taraftan gıdayı yenilemez hale getirerek ekonomik yönden kayıplara neden olurken diğer yandan da gıdayı sağlık açısından zararlı veya riskli hale getirebilirler [17,18].

Mikroorganizmalar gıda bozulmalarında en önemli etkenlerden biridir. Gıdalara çeşitli şekillerde bulaşan mikroorganizmalar onları kendi gelişmeleri için besin kaynağı olarak kullanırlar. Mikroorganizmalar gıdalara bulaştıktan sonra hızla çoğalır, besin öğelerini tüketir, enzimatik değişimlere yol açar ve yeni bileşikler sentezleyerek ya da mevcut bileşikleri parçalayarak hoşta gitmeyen tat ve aroma oluşumu veya tekstürel değişikliklere neden olurlar [19].

Mikrobiyal bozulma, hasat esnasında, taşıma ve işleme süresince ve son ürün olarak paketlenme evresi de dahil üretim zincirinin herhangi bir evresinden tüketilinceye kadar geçen süre içerisinde meydana gelebilmektedir. Gıdanın bozulması; düşük kaliteli ürün üretimi veya ürünün ziyan olmasına bağlı olarak ekonomik kayıplara, ürünün geri çağırılması ve imha edilmesi ile üretici maliyetlerinin artmasına ve bozulmayı takiben meydana gelebilecek patojen bakteri gelişimi durumunda ise sağlık sorunlarına sebep olmaktadır [19].

Mayalar, tomurcuklanma, bölünme, sporla ve eşeyli olarak çoğalabilen, tek hücreli ökaryotik canlılardır. Bazı maya türleri hem eşeyli (telemorf) hem de eşeysiz (anamorf) üreme özelliği göstermekte bu özelliklerinden dolayı farklı isimler almaktadır. Eşeyli üreme özelliği gösteren mayalar askomisetik ve basidiomisetik olmak üzere iki ana

funga sınıfta, seksüel durumları tam olarak bilinmeyen bazı cins ve türler de deuteromisetik sınıfı içinde gruplandırılmaktadır. Ancak son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesiyle mayalar, yalnızca askomisetik ve basidiomisetik olmak üzere iki grup altında toplanmıştır [9,20,21].

Mayalar, ekmek, bira, şarap ve diğer alkollü içeceklerin birincil fermantasyonunda, peynir, kefir, yoğurt gibi süt ürünlerinin, sucuk, sosis gibi et ürünlerinin, turşu ve zeytinin ise sekonder fermantasyonunda rol almalarının yanı sıra B12, β -karoten gibi vitaminlerin, çeşitli enzimlerin, pigmentlerin, prebiyotiklerin, polisakkaritlerin ve lipidlerin, gıda ve yemler için bazı spesifik bileşenlerin, gliserol gibi alkollerin ve tek hücre proteinin endüstriyel olarak üretiminde kullanılmaktadır [22-27].

Mayaların çoğu 20-30 °C aralığında optimum gelişme gösterir, fakat her bir türe için minimum ve maksimum sıcaklık sınırı tam olarak belirlenmemiştir. Çok az türün 40-45 °C üzerinde geliştiği bilinmektedir. Fakat *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* gibi bozucu türlerin de içinde bulunduğu birçok tür 2-10 °C aralığında gelişerek soğukta muhafaza edilen gıdaların bozulmasında rol oynamaktadır [5,28-33]. Diğer taraftan başta *Candida*, *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türleri olmak üzere bazı maya türleri ise 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda bile aktivitelerini kaybetmemektedirler [5,34,35]. Sıcaklık, büyüme ya da gelişim hızının yanı sıra etanole tolerans, yüksek tuz ya da şeker varlığında gelişim, çeşitli metabolitlerin üretimi gibi çeşitli fizyolojik ya da biyokimyasal özellikleri de etkiler [4,36,37]. *S. cerevisiae* ısıya en dayanıklı maya türlerinden biri olarak kabul edilmekte, askosporlarının ise tomurcuk oluşturan hücrelerden yaklaşık yüz kat daha dayanıklı olduğu bildirilmektedir [29].

Mayaların düşük su aktivitesine bakterilerden daha dayanıklı olduğu çoğu türün 0.90-0.95 a_w aralığında, bazı türlerin ise, ürüne bağlı olarak 0.65-0.85 a_w aralığında bile gelişim gösterdiği bildirilmektedir [38-40]. Birçok maya türü yüksek tuz ve şeker içerikli gıdaların bozulmasından sorumludurlar. *Debaryomyces hansenii*'nin özellikle tuza karşı oldukça dirençli olduğu, hatta bazı suşlarının %20-24 NaCl varlığında hayatta kalabildiği bildirilmektedir [37,41,42]. *S. cerevisiae* için üst limit %10-12 NaCl olmakla birlikte bu oran suş ya da pH gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Benzer gözlemler *Yarrowia lipolytica*, *Z. bailii* ve *Hanseniaspora uvarum* gibi diğer maya türleri için de rapor edilmiştir [28].

Mayalar, genellikle asitli ortamları tercih etmekte hatta bazı türler 2.0-2.5 gibi düşük pH değerlerinde bile gelişebilmektedir. Optimum gelişim gösterdikleri aralık ise pH 4.5-7.0 olarak bildirilmektedir [5,32].

Diğer taraftan sıcaklık, pH, su aktivitesi ve ürüne eklenen kimyasal koruyucular gibi mayaların büyüme ve gelişmesini etkileyen birçok çevresel faktör birbirlerini etkileyerek kombine bir etkiye bulunduklarından dolayı her biri için kesin sınırların çizilmesi zordur [5,9,36,43]. Örneğin minimum gelişme sıcaklığı, ortamın pH'sına veya tuz ya da şeker konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir [44-47].

Glukoz, fruktoz, sukroz ve maltoz gibi şekerler, mayalar tarafından etanol ve karbondioksit'e dönüştürülerek gaz oluşumuyla birlikte üründe tatlılığın azalmasına ve belirgin bir şekilde alkol tat ve aromasının oluşumuna sebep olur. Mayalar karbonhidrat katabolizmasının ürünü olarak etanolün yanında, yüksek alkoller, organik asitler, gliserol, esterler, aldehytler, ketonlar ve uçucu sülfür bileşenleri de üretirler. Bu bileşenler her ne kadar düşük konsantrasyonlarda üretilseler de ürünün duyu kalitesini önemli derecede etkileyebilirler [48,49].

Mayalarda bulunan peptidazlar, proteazlar, lipazlar, nükleazlar, esterazlar ve dekarboksilazlar gibi aktif enzimler gıda bileşenleriyle etkileşime girerek hücre parçalanmasına ve buna bağlı olarak da gıdalarda kalitenin düşmesine neden olur [50-52]. Proteoliz gıdalarda önemli bir bozulma reaksiyonudur ve amonyaklı, acı tat oluşumuna ve protein kaybına yol açar. Her ne kadar mayaların büyük çoğunluğu hücre dışı proteolitik enzim üretmeseler de bazı *Rhodotorula* ve *Cryptococcus* türleri ve *Y. lipolytica*, *Aureobasidium pullulans* bu enzimi üretme özelliğiyle öne çıkarlar. Ayrıca bazı *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces* ve *Candida* türlerinin de proteaz ürettikleri bildirilmiştir [53-56].

Mayalar organik asitleri hem üretme hem de tüketme özelliğine sahiptirler, böylece ürünün asitliğini ve aroma profilini değiştirirler [57]. Litrede 1-2 gramı aşan konsantrasyonlarda, asetik asit ürün kalitesi üzerinde olumsuz etkiye sahiptir ve *Kloeckera apiculata*, *Wickerhamomyces anomalus*, *C. krusei* ve *D. (Brettanomyces)* gibi bazı türler bu miktarlarda asetik asit üretebilirler [49,57-59]. Birçok maya türü organik asidi metabolize ederek asitliğin azalıp, pH'nın yükselmesine neden olduğu için

bozucu ve patojen bakterilerin gelişimine yol açabilir. Bu özellik *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* gibi laktik asidi metabolize eden türlerin yaygın olarak bulunduğu fermente süt ürünlerinde sorun oluşturmaktadır [60,61].

Mayalar, hidrojen sülfid, kükürt dioksit ve dimetil sülfid gibi bir dizi uçucu sülfür bileşikleri üreterek, ürünün koku ve lezzeti üzerinde olumsuz bir etki oluşturlar [59]. Çeşitli çalışmalarda, *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *P. membranifaciens*, *Dekkera* spp. ve *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türleri gibi basidiomisetik mayaların belirgin miktarlarda sülfür metabolitleri ürettiği bildirilmektedir [62-64].

Çeşitli *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* ve *Yarrowia* cinsi bazı türleri lipolitik özellik göstermekte ve zeytinyağı, et ve süt ürünleri gibi yağ içeriği yüksek gıdalarda gelişerek lipitlerin parçalanmasına neden olmaktadır. Lipitlerin enzimatik yıkımı, üründe serbest yağ asitlerinin oluşumuna ve buna bağlı olarak da ransit ve kötü tat oluşumu ve asitliğin artmasına neden olur. *Y. lipolytica*, *Cr. diffluens*, *C. zeylanoides*, *Cr. albidus* ve *Cr. laurentii* başlıca lipolitik etki gösteren türler olarak kabul edilmektedir [53-56].

1.1. Gıdalardaki Bozulma Etkeni Mayalar

Fermente gıda ve içeceklerde mikrobiyal yükünün yüksek olması ve mikroorganizmaların ürettikleri ürünlerle, son üründe tat ve aroma oluşumuna katkıda bulunmalarından dolayı mikrobiyal bozulma kolaylıkla tanımlanamamaktadır. Hatta etnik ve kültürel farklılıklardan dolayı arzu edilen ya da bozulmaya yol açan mikrobiyal aktiviteleri birbirinden ayırt etmek oldukça güçtür [5]. Gıdalarda bozulmaya neden olan maya türlerinin tam sayısı belli olmasa da sıklıkla belirlenen bozucu maya türleri Tablo 1.1.'de listelenmiştir. Pitt ve Hocking (1985) gıdalardan izole ettiği 30 maya cinsine ait 110 tür üzerinde çalışmış ve bunlardan 10-12 tanesinin İyi Üretim Uygulamaları (GMP) standartlarına göre işlenmiş ve paketlenmiş gıdalarda bozulmaya neden olduğunu belirlemiştir [65]. Tudor ve Board (1993) ise 'ikinci-bölüm' mayaları olarak adlandırılan bir grup mayaların listesini oluşturmuştur. Özellikle zorlu stres koşullarına dayanıklı bozulma etkeni mayalardan oluşan bu grup Pitt ve Hocking (1985) tarafından oluşturulan listenin devamı niteliğindedir [4]. Deak ve Beuchat (1996) gıdalarda sıklıkla bulunan 35 cins ve 109 türü, bozucu özelliklerini göz önünde bulundurmadan

listelemişlerdir [36]. Stratford ve ark.(2000) ise meyve suları ve alkolsüz içeceklerde bulunan en önemli 11 bozucu maya türünü tanımlamıştır [66].

Tablo 1.1. Gıdalarda yaygın olarak bulunan ve bozulmaya sebep olan maya türleri [67]

Pitt ve Hocking (1985)	Tudor ve Board (1993)	Deak ve Beuchat (1996)	Stratford et. al. (2000)
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>C. dattila</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>B. anomalus</i>
<i>C. krusei</i>	<i>C. globosa</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>B. bruxellensis</i>
<i>C. holmii</i>	<i>C. humicola</i>	<i>P. anomala</i>	<i>B. naardenensis</i>
<i>D.hansenii</i>	<i>C. lactis-condensi</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>H. uvarum</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>S. bayanus</i>
<i>Pichia</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>S.cerevisiae</i>
<i>membranifaciens</i>	<i>C. sake</i>	<i>mucilaginoso</i>	<i>Sch. pombe</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>S.exiguus</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		<i>K. marxianus</i>	
<i>Z. bailii</i>	<i>C. zeylanoides</i>	<i>Issatchenkia</i>	<i>T. delbrueckii</i>
<i>Z. bisporus</i>	<i>Cryptococcus spp.</i>	<i>orientalis</i>	<i>Z. bailii</i>
<i>Z. rouxii</i>	<i>P. anomala</i>	<i>Z.bailii</i>	<i>Z. bisporus</i>
	<i>P. subpelliculosa</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>Z. rouxii</i>
	<i>Kluyveromyces</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Z.</i>
	<i>marxianus</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>microellpsoides</i>
	<i>P. burtonii</i>	<i>C. albidus</i>	
	<i>P. fermentans</i>	<i>C. tropicalis</i>	
	<i>Sporobolomyces</i>	<i>S. exiguus</i>	
	<i>roseus</i>		
	<i>Torulaspora</i>	<i>P. fermentans</i>	
	<i>delbrueckii</i>		
	<i>Trichosporon</i>	<i>Trichosporon</i>	
	<i>cutaneum</i>	<i>pullulans</i>	
	<i>Trycosporum</i>	<i>Hansenia</i>	
	<i>pullulans</i>	<i>uvarum</i>	
		<i>C.zeylanoides</i>	

Mayaların 10.000/ml'ye kadar olan hücre konsantrasyonlarının gıda ürünüde kayda değer bir fark yaratmadığı, bozulmanın tespit edilebilmesi için bu değerin 1.10^5 - 1.10^6 /ml ve üzeri gibi yüksek sayılarda olması gerektiği belirtilmektedir [68].

Mayalar, düşük sıcaklık ve pH değerlerinde gelişebilmeleri, fizikokimyasal strese dirençli olmaları ve metabolik aktiviteleri sonucu süt ürünlerinin bozulmasında önemli bir rol oynamaktadır [25]. Laktozu fermente edebilmeleri; proteolitik ve lipolitik aktivite göstermeleri; laktik asidi ve sitrik asidi asilimile edebilmeleri; düşük

sıcaklıklarda ve yüksek tuz içerikli ortamlarda gelişebilmeleri süt ürünlerinde sıklıkla rastlanan mayaların ortak özellikleridir [60]. *K. marxianus*, *K. lactis*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica* ve *S. cerevisiae* türleri bu nitelikleri taşıyan ve süt ürünlerinden sıklıkla izole edilen mayalardır.

Süt, mayaların gelişebilmesi için iyi bir substrat özelliği taşımaktadır. Özellikle bakteriyel rekabetin olmadığı ortamlarda kolaylıkla yüksek konsantrasyonlara (10^8 - 10^9 kob/g) ulaşabilmektedirler [55]. Asitliğin yükselip bakteriyel gelişimi kısıtlamasından dolayı fermente süt ürünleri mayalar tarafından bozulmaya eğilimli ürünlerdir. Yoğurtlar, genellikle kullanılan sütün ya da üretim ortamındaki ekipmanın düşük sanitasyonundan kaynaklanan maya kontaminasyonu sonucu fermentatif bozulmaya uğrayabilirler. Bozulmuş yoğurtlardan izole edilen mayalar içerisinde bazı *Pichia* ve *Candida* türleri ile *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* tespit edilmiştir [69-70].

Moleküler tekniklerin uygulanması, peynirin olgunlaşmasında mikrobiyal ilişkinin tür ve suş seviyesinde takibini sağlamıştır [71]. Peynir çeşidine bağlı olarak, olgunlaşmanın ilk günlerinde *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. lactis* ve *C. zeylanoides* baskın olarak bulunmakta, 5 günden sonra maya popülasyonunda gerileme ve buna bağlı olarak da bakteri popülasyonunda artış görülmektedir [72,73].

Yarı yumuşak ve yumuşak peynirlerde bozulma, kötü tat oluşumu, yumuşama, gaz üretimi, renk değişimi ve ambalajda şişme şeklinde görülmektedir. Bu tür bozulmalardan *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus*, *P. membranifaciens*, *Candida*, *Rhodotorula* ve *Cryptococcus* spp. sıklıkla sorumlu tutulmaktadır [74]. Yumuşak, yarı-yumuşak ve cheddar tarzı peynirlerin olgunlaşma aşamasında *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus* ve *S. cerevisiae* türlerinin yüksek popülasyonlara ulaşarak peynirin olgunlaşmasına olumlu etkileri olduğu belirtilmektedir. Birçok peynirde, mayalar olgunlaşma mikrobiyotasının önemli bir bileşeni olarak kabul edilmekte, ancak faydalı ya da bozulma etkisi arasındaki farkın suşa bağlı olduğu belirtilmektedir [75,76].

Her ne kadar peynirlerin olgunlaşmasında ve duyuşal özelliklerinin gelişiminde mayaların faydalı etkileri olsa da aşırı gelişimleri istenmeyen aroma değişimlerine ve üründe yumuşamaya neden olabilmektedir. Parmesan peynirinin olgunlaşma esnasında ortaya çıkan “erken şişme” gibi sorunlardan mayaların sorumlu olduğu belirtilmektedir

[76]. Modifiye atmosfer ile paketlenmiş yumuşak peynirlerdeki şişme sorunlarının da yine mayalardan kaynaklandığı belirtilmektedir [77]. Kaşar, krem ve süzme peynirlerini sıklıkla kontamine eden maya türleri ise *D. hansenii*, *C. versatilis*, *C. intermedia* ve *P. anomala* olduğu bildirilmiştir [78].

Ambalajlı ve ambalajsız tereyağında gelişen mayaların tanımlandığı bir çalışmada *Candida* türleri (*C. kefyr*, *C. zeylanoides* ve *C. lambica*) baskın olmakla birlikte *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* cinslerine ait türler de tanımlanmıştır. Toplam maya popülasyonları ise, ambalajlı tereyağı örneklerinde ortalama 2.22 log kob/g, ambalajsız tereyağı örneklerinde 5.40 log kob/g olarak belirlenmiştir [79].

Özellikle Akdeniz ülkelerinde önemli bir yeri olan zeytinin fermentasyonu ve işlenmesi sırasında mayaların çift taraflı etkileri bulunmaktadır. Bir yandan üründe laktik asidin parçalanması sonucu kötü tat ve koku oluşumuna, yumuşamaya, CO₂ oluşumuyla ambalajda şişmeye, salamura suyunda bulanıklığa sebep olurken, diğer yandan zeytin üretim prosesinde lipaz, esteraz, β -glukozidaz, katalaz ve ödürücü (killer) faktörlerin üretimi gibi çeşitli biyokimyasal aktiviteleriyle arzu edilen değişikliklere yol açmaktadırlar [80]. Zeytinde *P. membranifaciens*, *P. anomala*, *C. boidinii*, *D. hansenii*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* gibi baskın türlerin yanı sıra 20 veya daha fazla maya türüne rastlandığı bildirilmektedir [81-83].

Mayalar et ve et ürünlerinin bozulmasıyla doğrudan ilişkili değillerdir. Uzun süreli soğukta depolama sonrası üründe gelişen bozucu mayalar, ürünün yapısını bozarak ya da koruyucu bileşenleri inaktive ederek ortamı bakteriler tarafından bozulmaya elverişli duruma getirirler [84,85]. Taze kesilen sığır, kuzu, domuz, kümes hayvanları ve deniz ürünleri etlerinde toplam mikrobiyotanın yaklaşık % 5-10'una karşılık gelen düşük popülasyonlarda bulunan mayalar, etlerin soğukta (5-10°C'de) depolanması esnasında gelişebilirler ancak bakteriler yüksek protein ve su aktivitesi ve nötral pH ortamında mayalardan daha hızlı çoğaldıkları için bu koşullarda bakterilerle rekabet edemezler [5]. *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* ve *Debaryomyces* türleri taze etlerde sıklıkla izole edilen mayalardır. Uzun süreli soğukta depolanan sığır, kuzu ve kümes hayvanları etlerinden izole edilen maya türleri sıklıkla düşük sıcaklıklarda gelişebilme özelliği olan *Cr. laurentii*, *C. zeylandoides* ve *Y. lipolytica*'dır [5]. Bu maya türlerinin kötü tat ve

koku oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı türlerin dondurulmuş kümes hayvanlarının etlerinden de izole edilebilmiştir [86,87].

Mayalar, kıyma etlerde yüksek sayılara (10^3 - 10^7 kob/g) ulaşabilirler ancak bakteriler ile karşılaştırıldığında yine de önemsiz kalırlar [5]. Kurutulmuş ve kür edilmiş et ürünlerinde ortamda bulunan tuz, sodyum nitrit/nitrat, sülfür dioksit ve çeşitli asidulantlar bakteri gelişimini sınırlandırması nedeniyle taze ve fermente sucuk, pastırma, sosis, sığır konservesi, jambon ve diğer şarküteri ürünleri 5 °C’de uzun süreli depolanmaları durumunda mayalar tarafından bozulmaya eğilimli olmaktadır. Tuzlanmış et ürünlerinde *D. hansenii* genellikle baskın tür olmakla birlikte *Rhodotorula*, *Candida* ve *Pichia* türleri de bulunmaktadır. Kürlenmiş jambon ve salam fermentasyonunda bazı maya türlerinin laktik asit bakterileri ile birlikte olumlu etkileri bulunduğu belirtilmektedir. *D. hansenii* ve bir dereceye kadar *Y. lipolytica* bu bağlamda önemli türlerdir [22,88,89].

Mayalar, her ne kadar fırıncılık ürünlerinin fermentasyonundan sorumlu olsalar da bu ürünlerin bozulmalarında da rol almaktadırlar [90,91]. Bu ürünlerin pişirilmesiyle un ve hamur kaynaklı mikroorganizmalar inaktive olmakta bozulmalar genellikle pişirme sonrası meydana gelen kontaminasyonlar sonucunda oluşmaktadır [19]. Mayalar ekmeklerde depolanma sırasında alkolik, meyvemsi ve aseton benzeri istenmeyen tatlar meydana getirebilmekte ve tebeşirimsi, beyaz ya da farklı renkte maya gelişimi gözlenebilmektedir. Bu etkilere sebep olan başlıca maya türlerinin *S. cerevisiae*, *Hyphopichia burtonii* ve *Wickerhamomyces (Pichia) anomalus* olduğu bildirilmiştir [92].

Etanolü tolere edebilmeleri ve düşük pH seviyelerinde gelişim gösterebilmelerinden dolayı mayalar alkollü içeceklerde gelişerek, bozulmalarına sebep olabilmektedirler [93,94]. Biranın bozulmasından genellikle *Saccharomyces* türleri sorumludur. Bira fermentasyonunda rol alan *S. cerevisiae*’nın yabancı suşları birada bulunan dekstrinleri fermente ederek istenmeyen kötü tat oluşumuna neden olmaktadır [95,96]. Mayalar, şarabın fermentasyonunda görev almaları nedeniyle önemlidirler. Şarabın mayalar tarafından bozulması genellikle şişelemeden önceki aşamalarda meydana gelmektedir. Şaraplarda problem oluşturan mayalar; *Z. bailii*, *Dek. (Brettanomyces) bruxellensis* gibi fermentatif türler ve *P. membranifaciens* gibi oksidatif türlerdir [97-99].

Enerji içecekleri, spor ve çeşitli sağlık içecekleri, gazlı ve gazsız alkolsüz içeceklerde genellikle koruyuculara dirençli mayaların bozulmalara neden olduğu belirtilmektedir. *Z. bailii* en çok rastlanan tür olmakla birlikte diğer *Zygosaccharomyces* türlerine de sıklıkla rastlanmaktadır. Bunların yanı sıra *Dekkera (Brettanomyces)* türleri, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *K. exiguus*, *P. membranifaciens*, *P. kudriavzevii* ve *C. davenportii* ve *C. parapsilosis* gibi *Candida* türleri de alkolsüz içeceklerde bozulmalara neden olmaktadır [100,101].

Görüldüğü gibi mayalar gıdalarda özellikle bakterilerin gelişmediği koşullarda gelişerek gıdaların ileri derecede bozulmalarına yol açarak tüketilemeyecek duruma getirebilmektedir. Mayaların gıdaların kalite parametreleri üzerinde oluşturduğu değişiklikler Tablo 1.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 1.2. Bozulmaya sebep olan mayaların gıdaların kalite parametreleri üzerindeki etkileri [1]

Gıda ürünü	Bozulma etkisi							
	Yüzeyde gelişme	Renk değişim	Gaz oluşumu	Bulanıklık	Tortu oluşumu	Film oluşumu	İstenmeyen tat oluşumu	Tekstürel değişimler
Taze sebzeler	+	+					+	+
Salamura sebzeler	+	+	+			+	+	+
Tüketime hazır sebze ve meyveler	+		+				+	
Taze meyveler		+	+				+	+
Meyve suları			+	+	+	+	+	
Mayonez, salata sosları		+	+			+	+	+
Şarap, bira			+	+	+	+	+	
Alkolsüz içecekler			+	+	+		+	
Şekerleme, reçel, jöle	+	+	+	+		+	+	+
Şuruplar, bal, meyve konsantreleri			+	+		+	+	
Tereyağı, krema		+					+	
Peynirler		+	+				+	
Yoğurtlar			+			+	+	
Dilimlenmiş ekmek	+	+					+	
Ekmek hamuru	+	+					+	
Et ürünleri, soslar	+	+	+				+	

1.2. Maya Tanımlama Yöntemleri

1.2.1. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Fenotipik Yöntemler

Mayaların taksonomik sınıflandırılması ve tanımlanmasında birçok kriter kullanılmaktadır. Geleneksel tanımlama yöntemleri, çoğunlukla eşeyli ya da eşeysiz üreme morfolojileri başta olmak üzere, hücre duvarının, septumun ve sporların yapısal özelliklerinin incelenmesine dayanmaktadır [9]. Tanımlama işlemlerinde standart fizyolojik ve biyokimyasal testler öncelikli olarak kullanılmakta, testlerin seçimi maya cins ve türüne göre değişiklik göstermektedir [102-104]. Rutin tanımlama için kullanılan geleneksel testler, karbon kaynaklarının asimilasyonu, farklı azot kaynaklarında gelişebilme, vitamin gereksinimleri, farklı sıcaklık ortamlarında ve yüksek konsantrasyonlu şeker veya tuz ortamında gelişebilme, antibiyotiklere direnç ve üreyi hidroliz edebilmeleri gibi özelliklere dayanmaktadır [105].

Geleneksel tanımlama yöntemlerinde, tür seviyesinde güvenilir bir maya tanımlaması yapabilmek için genellikle 60-90 testin uygulanması gerekmektedir [9]. Hızlı ve basit tekniklerin geliştirilmesiyle geleneksel tanımlama testlerin hacimleri küçültülmüş ve böylece fermantasyon ve asimilasyon testleri küçük miktarlarda substrat kullanılarak serolojik mikrotitre plakalarda analiz edilebilir duruma getirilmiştir [106-108]. Bu çalışmalar, ticari kullanıma hazır test kitlerinin gelişmelerini sağlamış ve bu otomatize edilmiş kit ve sistemler için bilgisayar destekli veri tabanları oluşturularak piyasaya sunulmuştur. API 20C, Uni-Yeast Tec, Abbott Quantum II, VitekATB32, Automicrobic ve benzeri ticari sistemler saf izolatın inoküle edilmesine ve 2-3 gün inkübasyona bırakılmasına dayanmaktadır. Bu sistemlerin birçoğu ilave analizlere ihtiyaç duymakta, bu analizler yapılmadığı durumlarda ise düşük doğruluk seviyelerinde (50–80%) tanımlama yapmaktadırlar [109-111]. Ayrıca bütün bu ticari test kitleri, klinik tanı çalışmalarında önemi olan maya türlerini tanımlamak için tasarlanmış olup bu sistemlerin veritabanları klinik öneme sahip 60 ya da daha az maya türünü kapsamaktadır. Gıda ve içeceklerde bulunan mayaların tanımlanmasında ise, bu testler daha düşük başarı sağlamaktadır.

Verweij et al. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada ticari olarak satılan 7 adet maya tanımlama sisteminin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada 19 türe ait 52 klinik

maya izolatu Vitek, Api ID 32C, Api 20C AUX, Yeast Star, Auxacolor, RapID Yeast Plus ve Api Candida ticari kitleri kullanılarak tanımlanmış ve geleneksel yöntemler referans alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Çalışma sonucunda doğru tespit edilen izolat oranının %59.6 ile %80.8 arasında değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca kitlerin düşük tanımlama oranlarına sahip olduğu ve güvenilirliklerinin de yetersiz olduğu yine aynı çalışma sonuçlarına dayanılarak ifade edilmiştir [112].

1.2.2. Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Genotipik Yöntemler

Gıdalarda istenmeyen değişiklikler oluşturan mayaların tanımlanmalarında kullanılan geleneksel yöntemlerin ve ticari kitlerin, zaman alıcı olduğu ve bazen yanlış tanımlamalara yol açtığı göz önüne alındığında, maya tanımlamada daha güncel olan moleküler yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz hale gelmiştir [9].

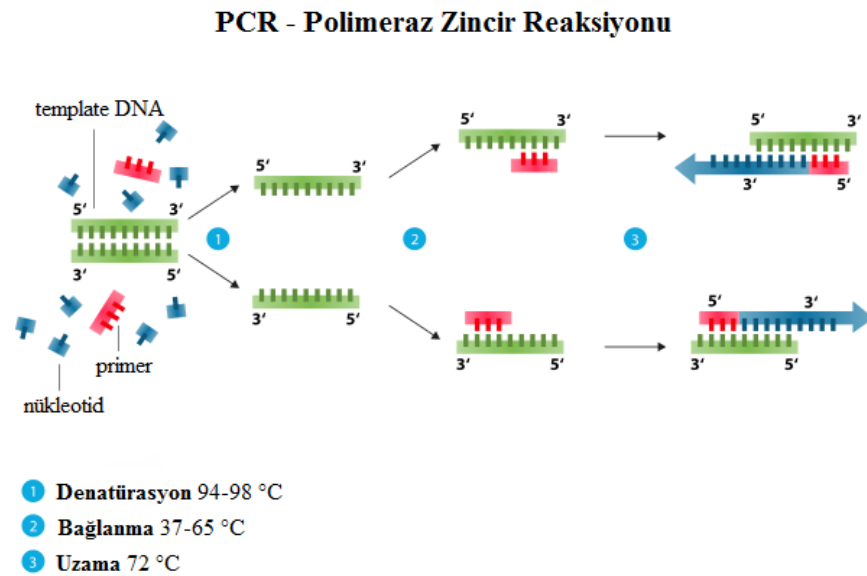
DNA'ya dayalı en eski yöntemlerden biri olan restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm analizinde (RFLP) spesifik DNA bölgelerini tanıyarak DNA'yı bu bölgelerden kesen restriksiyon endonükleazlar kullanılır. Elde edilen fragmentlerin, agaroz jel elektroforezi ile ayrımı sağlanır. Etidyum bromür ile boyanan bantlar ultraviyole ışık altında görüntülenir. Ancak bütün genomun bu yolla analizi oldukça karmaşık sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır [113].

Vurgulu alan jel elektroforezi (PFGE - Pulsed-field gel electrophoresis), uygulanan elektrik alanının sürekli her iki yönde değiştirilerek ve farklı boyuttaki DNA moleküllerinin jel üzerindeki göç farklılıklarına dayanarak ayrılmasını sağlayan elektroforetik bir tekniktir. Başlangıçta, yöntem mayalar ve diğer ökaryotik organizmaların kromozom sayısını ve boyutunu incelemek için geliştirilmiş, ancak zamanla etkili bir sınıflandırma metodu haline gelmiştir [113-115].

PCR'ın keşfi, DNA'ya dayalı yeni tanımlama ve tiplendirme yöntemlerinin de gelişmesine yol açmıştır. Mayaların hem tür, hem de suş düzeyinde tanımlanmasında, özellikle PCR'a dayalı yöntemlerin, daha hızlı ve doğru sonuçlar elde edilmesine olanak sağladığı için son yıllarda daha çok tercih edildiği görülmektedir [9].

PCR, belirli bir DNA dizisinin üstel olarak amplifikasyonunu sağlayan bir yöntemdir. PCR tekniğinde, tekrarlanan sıcaklık döngüleri kullanılarak hedef bir DNA dizisinin

çok sayıda kopyası, in vitro koşullarda elde edilir [116]. Bir sıcaklık döngüsü 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, 94-98°C gibi yüksek sıcaklık uygulamasıyla DNA sarmalındaki çift zincirin ayrılması (denatürasyon) gerçekleşir. İdeal bir denatürasyon sıcaklığının belirlenmesi, yüksek sıcaklık uygulamasıyla DNA polimeraz enziminin aktivitesinin düşmesine ya da sıcaklığın optimum seviyeden düşük olması denatürasyonun tam gerçekleşmemesine dolayısıyla da verimde düşmelere neden olabileceği için önemlidir. İkinci aşamada sıcaklık düşürülerek, tek zincire ayrılan kalıp DNA'ya oligonükleotidlerin bağlanması (annealing) sağlanır. Yaklaşık 20-30 baz uzunluğundaki primerler zincirin iki ucundaki tamamlayıcı bölgeye bağlanır. Bağlanma sıcaklığı primerlere bağlı olmakla birlikte genellikle 37-65 °C aralığındadır. Üçüncü aşamada ise DNA polimeraz enzimi aktivitesi ile DNA'nın çift zincirinin tamamlandığı uzama (extension) gerçekleşir. Zincirin tamamlanması için uygulanan sıcaklık genellikle kullanılan Taq polimeraz enziminin optimum aktivite gösterdiği 72 °C olmakla birlikte 70-75°C arasında değişmektedir [117-119]. PCR reaksiyonunun temel aşamaları Şekil 1.1'de verilmiştir. Standart bir PCR reaksiyonu ortalama 30-35 döngüden meydana gelmektedir. Her bir sıcaklık döngüsü sonrasında kalıp DNA iki katına çıkar ve reaksiyon boyunca ürün miktarı üssel olarak artış gösterir.



Şekil 1.1. PCR reaksiyonunun temel aşamaları

PCR döngülerinin gerçekleşmesi için reaksiyon ortamında kalıp DNA'ya ek olarak, çoğaltılmak istenen hedef bölgenin uçlarını tamamlayıcı özellikteki oligonükleotidler

(primerler), dNTP'ler (deoksiribonükleozidtrifosfat), reaksiyon ortamının optimum iyon konsantrasyonu ve pH dengesini sağlayan $MgCl_2$ içeren PCR tamponu ve DNA polimeraz enziminin bulunması gerekmektedir. PCR tekniklerinin uygulanmaya başlamasıyla birlikte farklı DNA polimeraz enzimleri kullanılmış ancak denatürasyon sıcaklıklarında kullanılan enzimlerini aktivitelerini kaybetmeleri PCR reaksiyonlarının veriminde azalmalara neden olmuştur. Ancak termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan elde edilen Taq polimeraz enziminin yüksek sıcaklığa dayanıklı olması PCR reaksiyonunun etkinliğini arttırmaktadır [117]. Polimeraz enziminin aktivite gösterebilmesi için kalıp zincire primerlerin bağlanması gerekmektedir. Ortamdaki dNTP'leri kullanarak yeni fosfodiester bağları oluşumunu gerçekleştiren enzim yeni DNA zincirinin sentezini sağlamaktadır [120].

Reaksiyon sonucunda ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edilir. Jele yüklenen DNA'ların molekül büyüklüklerine göre ayrımı sağlandıktan sonra oluşan bantlar ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilir [117].

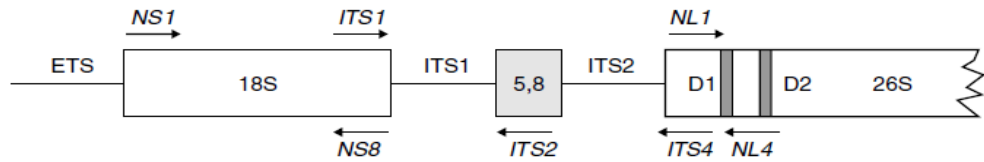
PCR fingerprint metotları günümüzde en yaygın kullanılan tiplendirme yöntemlerinden biri olmuştur [113,121] (Tablo 1.3.). Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD - random amplified polymorphic DNA) analizi, bazı maya türlerinin identifikasyonunda başarılı olarak uygulanmış PCR'a dayalı fingerprint yöntemlerinden biridir. Analiz edilecek türlerin DNA dizisi hakkında bir ön bilgiye ihtiyaç duyulmaksızın rastgele dizayn edilmiş yaklaşık 10 bazlık kısa primerler kullanılarak mikroorganizmaların türe spesifik fingerprintlerini elde etmek mümkündür. Uygun PCR şartlarında bu primerler bazı DNA bölgelerini amplifiye ederek farklı boyutlarda fragmentler oluştururlar. Oluşan bu fragmentler elektroforez jelinde farklı hızlarda yürüyerek türe spesifik fingerprintler meydana getirirler [121].

PCR ribotiplendirme tekniğinde ise türlerin tanımlanmasında en sık kullanılan yöntem PCR ürünlerinin restriksiyon analizidir (PCR-RFLP). Çeşitli primerler ile rRNA genlerinin ya da genler arası bölgelerin (ITS, ETS, NTS) tamamı ya da bir kısmı amplifiye edilebilmektedir. Çeşitli restriksiyon enzimlerinin kullanımı ile rDNA'nın değişken veya stabil bölgeleri amplifiye edilerek çeşitli taksonomik seviyelerdeki organizmaların farklılıklarını gözlemlemek mümkündür [9,122].

Tablo 1.3. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türleri ve izole edildikleri ürünler

Metot	Maya türleri	Gıda/İçecek	Kaynak
RFLP	<i>S. cerevisiae</i>	Şarap, ekmek, bira	[123]
	<i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces spp.</i>	Şarap	[124]
	<i>K. marxianus</i> , <i>K. lactis</i>	Peynir	[125]
	<i>C. zeylanoides</i> , <i>D. hansenii</i>	Peynir	[126]
PFGE	<i>S. cerevisiae</i>	Mısır hamuru	[127]
	<i>S. cerevisiae</i>	Bira	[128]
	<i>Y. lipolytica</i> , <i>C. zeylanoides</i>	Kümes hayvanları	[129]
	<i>Brettanomyces</i> , <i>Dekkera</i>	Şarap	[130]
RAPD	<i>Hanseniaspora spp.</i>	Meyve suyu, şıra	[131]
	<i>Dekkera spp.</i>	Şarap	[130,132]
	<i>S. cerevisiae</i>	Şarap	[133]
	Çeşitli maya türleri	Süt ürünleri	[134]
PCR-RFLP	ITS1-5.8S-ITS2	<i>Non-Saccharomyces</i>	Portakal suyu
		<i>C. humilis</i>	Ekşi hamur
		<i>S. cerevisiae</i> , <i>Candida</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Pichia</i> ve <i>Trichosporon spp.</i>	Fermente kakao çekirdeği
	D1/D2 26S	<i>D. bruxellensis</i> , <i>D. anomala</i>	Şarap
		<i>Hanseniaspora sp.</i>	Şarap, meyve suyu
Real-time PCR		<i>D. bruxellensis</i>	Şarap
		<i>Candida</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> ve <i>Zygosaccharomyces spp</i>	Yoğurt, süt, peynir, meyve suyu
		<i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>R. glutinis</i> ve <i>S. cerevisiae</i>	Meyve suyu

PCR ürünlerinin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde ortaya çıkan türe spesifik uzunluklardaki fragmentlerin tespit edilmesine dayanan PCR-RFLP sayesinde dizi analizi olmaksızın PCR ürünlerinin analizi mümkündür ve bu yöntemin direk dizi analizi imkanı olmayan araştırmacılar için oldukça avantajlı olduğu bildirilmiştir. Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların PCR-RFLP analizinde genellikle 5.8S-ITS bölgesi kullanılmaktadır. 5.8S rRNA geni, 18S ve 26S rRNA genlerine göre daha fazla türler arası farklılık taşır [143,144]. Esteve-Zarzoso et al. (1999) mayaların 5.8S rRNA geni ve ITS bölgesinin restriksiyon analizi ile tanımlanması için hızlı ve basit bir yöntem geliştirerek, 25 farklı cinse ait 132 maya türünün tanımlanmasına yönelik bir veri tabanı oluşturmuşlardır [144]. (Şekil 1.2.)



Şekil 1.2. Maya tanısında kullanılan ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri ve universal primerleri [9]

REP-PCR (Repetitive Element Palindromic-PCR) ya da interrepeat PCR ise PCR'a dayalı diğer bir fingerprint yöntemidir. Hedef fragmentlerin tekrar eden DNA dizilerine özel oligonükleotid primerler ile amplifikasyonuna dayanmaktadır. Mayaların tanımlanması ve sınıflandırılması için en çok kullanılan primerler (GTC)₅, (GAC)₅, (GACA)₄, faj M13 DNA'sı ve sadece M13 sekansı (GAGGGTGGCGGTTCT)'dir [1].

PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas deteksiyon sistemleriyle birleştirilmesi ile "real-time PCR" olarak adlandırılan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek son derece az bir kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir [10].

Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle klasik PCR tekniğinde ihtiyaç duyulan agaroz jel elektroforezi ve DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR'da reaksiyon boyunca her amplifikasyon döngüsünde oluşan ürün miktarı ile paralel olarak artış gösteren floresans sinyaller her bir örnek için ölçülerek sayısal değerlere çevrilmektedir. PCR ürünlerinin tespitinde kullanılan prensibe bağlı olarak farklı real-time PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresans boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır [11,12].

Real-time PCR sonuçları "eşik değeri" (Ct- threshold cycle) yani floresan ışımının detektör tarafından ölçülebildiği döngü sayısı olarak ifade edilir. Ct değeri başlangıçtaki hedef kopya sayısı ile ters orantılıdır [145]. Reaksiyonun ilk döngülerinde sinyal zayıf ve arka plandan ayırt edilemez durumdadır. Ürün miktarı arttıkça sinyal de katlanarak artar. Sonrasında sinyal doyuma ulaşır ve duraklamaya geçer [146].

Real Time PCR’da amplifikasyonun takibi, sadece çift zincirli DNA’ya bağlanarak floresans ışıma yapan spesifik olmayan boyalar veya sadece hedef bölgeye bağlandığında ışıma yapan bir reporter ile işaretlenmiş diziye özgü DNA problemleri kullanılarak yapılır. Etidyum bromür, YO-PRO-I, SYBR green I gibi diziye özgün olmayan boyalar herhangi bir çift zincirli DNA’ya bağlandığında ve uygun dalga boyunda kuvvetli floresan ışıma yaparlar. Reaksiyon boyunca artan amplikon miktarıyla floresan ışıma şiddeti de artış gösterir. Bununla birlikte, bu tip boyalar kullanıldığında sıklıkla meydana gelen primer dimerler, güvenilirliği düşük ya da hatalı sonuçlara neden olmaktadır. Ancak bu tip floresanların kullanımında erime eğrisi analizi yapılarak ve uygun bir yazılım ile bu sorunun büyük oranda çözüleceği belirtilmektedir [117,147].

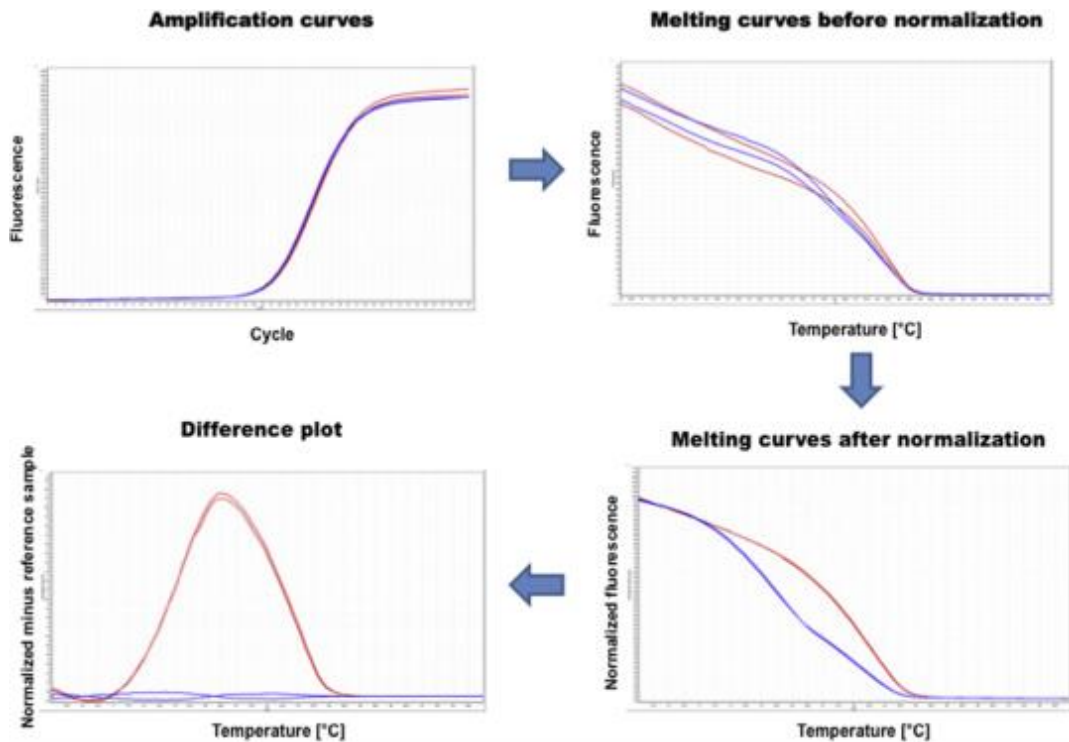
Floresan problemler, hidrolize ve hibridize problemler olmak üzere iki tip prob kullanılmaktadır. Bunlardan hibridize problemler iki primer arasındaki belirli bir bölgeyi tamamlayıcı olan ve bu bölgeye bağlandıklarında ışıma yapan oligonükleotidlerdir. Hidrolize problemler ise, bir raportör ve bir de baskılayıcı uçtan oluşan oligonükleotidlerdir. Bu amaçla TaqMan, Molecular Beacon, Scorpion ve Eclipse gibi farklı prob tipleri geliştirilmiştir. Reaksiyon esnasında primerler ve prob hedef DNA üzerindeki kendilerine özgü bölgelere bağlanırlar ve DNA polimeraz amplifikasyon işlemini başlatır. Enzim proba ulaştığında 5’-3’ ekzonükleaz aktivitesi ile probu degrade eder. Baskılayıcı uçtan ayrılan raportör ışıma yapmaya başlar [145,148].

HRM analizi, çift zincirli DNA’nın erime davranışına dayanarak PCR ürünlerinin analizini yapan bir yöntemdir. Real-time PCR reaksiyonlarının devamı niteliğinde olması ve reaksiyonun gerçekleştiği tüp içerisinde analizin yapılabilmesi yani kapalı tüp sistemi olması analizin en önemli avantajlarından biridir [149,150]. HRM analizi, gıdaların üretiminde kullanılan yakın ilişkili bitkisel türlerin ve çeşitlerin ayrılmasında, patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında, genetik modifiye organizmaların ve gıda alerjenlerinin tespitinde kullanılabilen önemli bir analiz yöntemidir [151].

DNA’nın %50’sinin tek zincirli duruma geldiği sıcaklığa ‘erime sıcaklığı’ (T_m derecesi) adı verilmektedir. T_m derecesi DNA parçasının uzunluğuna ve içerdiği guanin-sitozin (GC) miktarına bağlıdır. Üçlü hidrojen bağı bulunan GC baz çifti, sadece iki hidrojen bağı içeren adenin-timin (AT) baz çiftine göre daha stabildir. Yüksek GC içeriği bulunan DNA dizileri düşük GC baz çifti içeren DNA dizilerine göre daha

yüksek T_m derecesine sahiptir [151]. Farklı DNA fragmentlerinin GC veya AT içeriği farklı olduğu için gözlemlenen erime karakteristiği de farklı olacaktır [152].

Amplikonun erimesi, son PCR döngüsünden sonra sıcaklığın (örneği her 2 sn. de $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ olacak şekilde) yavaş yavaş artırılmasıyla gerçekleştirilir. Erime sürecinin sonrasında artan sıcaklığa (T) karşı azalan floresan yoğunluğunun (F) çizilmesiyle erime eğrisi elde edilir. Ancak her ne kadar PCR şartları optimize edilip aynı miktarlarda kalıp DNA kullanılsa da floresan miktarında farklılıklar meydana gelebilmektedir. Bu farklılıklar, erime öncesi ve sonrası mutlak floresan seviyelerinin hesaplanması ile normalize (normalization) edilir. Analiz edilen örneklerin erime eğrilerindeki küçük farklılıkların daha da belirginleştirilmesi amacıyla, referans alınan bir örneğin erime eğrisinden analiz edilen örneğin erime eğrisinin çıkarılmasıyla elde edilen spesifik grafik (difference plot) kullanılır [153]. (Şekil 1.3.)



Şekil 1.3. Yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi: amplifikasyon eğrisi, normalizasyon öncesi ve sonrası erime eğrileri, difference plot (fark eğrisi/noktası)[151]

HRM analizinin etkinliği, amplikonun saflığına kullanılan floresan boyaya ve analizin gerçekleştirildiği cihazın kapasitesine bağlıdır [152]. HRM uygulamaları için ısıl stabilitesi

ve hassasiyeti yüksek real-time PCR deteksiyon sistemine ve HRM ile uyumlu bir yazılıma ihtiyaç vardır. Real-time PCR ekipmanları ile erime davranışının ayrıntılı bir şekilde analizinin yapılması için, çok küçük sıcaklık artışlarını ($0.01-0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$) uygulayabilen hassas bir sıcaklık kontrolü ve ileri bir florometrik optik sistem ve gelişmiş veri toplama ünitesi ile donatılmış olması gerekir [151]. Gelişmiş real-time PCR cihazlarının yeni nesil floresan boyalar ile kombinasyonu nükleik asit dizilerindeki küçük varyasyonların bile tanımlanmasına imkan vermektedir [154].

Çift zincirli DNA'nın tek zincire ayrılırken sergilediği floresan şiddetindeki karakteristik değişimi analiz etmemizi sağlayan floresan boyalar HRM analizinde oldukça önemlidir. Bu amaçla kullanılan etidyum bromür, propidyum iyodit gibi boyalar birinci nesil boyaları temsil etmekte, SYBR Green gibi boyalarda ikinci nesil boyalar olarak kabul edilmektedir. Amplikonun doğru bir şekilde analizinin yapılması ürünün boya ile doygunluğuna bağlıdır. Doygunluğun sağlanabilmesi ise yüksek konsantrasyonlarda boya kullanımı ile mümkün olmaktadır. Ancak SYBR Green gibi ikinci nesil boyalar yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında PCR reaksiyonlarını inhibe edebilmektedirler. Bu boyaların düşük konsantrasyonlarda kullanımında ise, DNA zincirinde doygunluk tam olarak sağlanamadığı için denatürasyon sırasında açılan zincirden ayrılan boyalar, DNA'nın denatüre olmayan bölgelerine bağlanmakta, ölçülen floresan şiddetinde azalma beklenirken sinyal sabit kalmaktadır. Yani hatalı ya da düşük hassasiyette ölçüm gerçekleşmektedir [155,156].

Üçüncü nesil boyalar olarak kabul edilen LC Green, Eva Green, SYTO9, ResoLight gibi yüksek doygunluktaki boyaların kullanımıyla PCR ürünün tamamının işaretlenmesi mümkün olmakta, böylece bütün erime bölgeleri tespit edilebilmektedir [153]. SYBR Green'in aksine yüksek doygunluktaki boyalar DNA polimerazı inhibe etmedikleri için yüksek konsantrasyonlarda da kullanılabilirler [157].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, HRM analizinin klinik araştırma ve teşhislerin yanı sıra gıda analizlerinde de etkili bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Tüketicilerin hileli ürünlere karşı korunması ve haksız rekabetin önlenmesi amacıyla gıdaların üretiminde kullanılan hammadde ve bileşenlerin tespiti ve ürününün etiketinde bulunan bilgilerin kontrolü amacıyla HRM tekniğinin kullanılabileceği gösterilmiştir [151].

Sakaridis et. al. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada manda yoğurdu ve manda tereyağı gibi dokuz adet ticari manda sütü ürününde inek sütünün tespitine yönelik HRM analiz metodu kullanılmıştır. Mitokondriyal genom üzerinde mandaya spesifik 12S rDNA bölgesi ile sığıra spesifik D-loop bölgesini hedefleyen primer çiftleri kullanılarak dubleks PCR analizi ile gerçekleştirilmiştir. HRM analizinin, manda sütü ürünlerinde inek sütünün rutin kontrolü için hızlı ve doğru bir teknik olduğu kanıtlanmıştır [158].

Süt ürünlerinin üretiminde kullanılan hayvan sütünün orjinini belirlemek amacıyla yapılan bir başka çalışmada ise Yunan PDO Feta peynirindeki sığır, koyun ve keçi sütlerinin tespiti için HRM yöntemi kullanılmıştır. Analiz edilen ticari Feta peyniri örneklerinde koyun ve keçi sütü oranlarının tespitinin yanı sıra Feta peyniri yapında kullanımına izin verilmeyen sığır sütünün % 0.1 seviyesine kadar tespiti yapılabilmektedir [159].

Mackay et al. (2008) asma çeşitlerinin kimliğini doğrulamak için HRM analizine dayalı bir metod geliştirmiştir. Asma çeşitleri arasındaki farklılıklarının belirlenmesi için uygun mikrosatellitler (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD24, VVMD27, VVMD32, VVMD26, ZAG62 ve ZAG79) kullanılmış ve bütün mikrosatellitlerin bir arada ve tek seferde analiz edilmesini mümkün kılan bir real-time PCR protokolü geliştirilmiştir. Böylece asma çeşitlerinin tanımlanmasını 3 saat gibi kısa bir sürede içerisinde gerçekleştirilebilen HRM yönteminin oldukça hızlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir [160].

Real-time PCR HRM teknolojisine dayalı genetik mutasyon uygulamaları tıpta yoğun olarak kullanılmasına rağmen bir mikroorganizma tanımlama yöntemi olarak potansiyeli henüz yeni yeni anlaşılmakta bu nedenle konuyla ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, sığır mastitis patojenlerinin tanımlanmasına yönelik olarak mastitise sebep olan 12 patojen bakteri türü ve 14 koagülaz-negatif stafilokok türü real-time PCR-HRM analizine tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda bakteri türlerinin ayrımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve HRM analizinin mastitisli patojenlerin belirlenmesinde hızlı, ucuz, yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip başarılı bir araç olduğu vurgulanmıştır [161].

Sirke ve sirke anasının bakteri profilinin incelendiği bir çalışmada ITS bölgesini hedef alan Tm ve HRM analizi uygulanmış ve sonuçta tanımlanan 14 asetik asit bakteri türden yalnızca ikisinin, Tm sonuçlarının birbirinden farklı olmadığı diğer bütün türlerin türe spesifik Tm değerleri ve HRM eğrileri verdiği tespit edilmiştir [162]. Diğer taraftan Kesmen ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada sucuktan izole edilen katalaz pozitif kokların gruplandırılması ve identifikasyonu amacıyla real-time PCR HRM analizi kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır [163].

Mandviwala et al. (2010) tarafından klinik vakalarda hastaların kan ya da dokularında bulunabilen ve hayati tehlikelere yol açabilecek, fungal enfeksiyonların erken teşhis ve tanımlanması amacıyla yapılan bir çalışmada *Candida* cinsine spesifik primerlerin kullanıldığı bir real-time PCR HRM yöntemi geliştirilmiştir [164]. Gago, et al. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ise klinik mikrobiyoloji açısından önemli bir maya cinsinin (*Cryptococcus*) farklı türleri (*Cr. neoformans*-*Cr. gattii*) sadece bir primer kullanılarak HRM analizine tabi tutulmuş ve başarılı sonuç alınmıştır [165].

Cheng et al. (2006), klinik önemi olan 25 bakterinin tanımlaması için 16S rRNA gen bölgesini hedef alan real-time PCR HRM analizi gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada tanımlanan bakteri türlerinin büyük çoğunluğunun gıda kaynaklı patojenler olduğu bildirilmiştir [166].

Listeria türleri ile kontamine edilmiş çeşitli gıda örneklerinden *Listeria* türlerinin tanımlanması için HRM analizi kullanılmıştır. *Listeria* türlerinin tanımlanmasında konvansiyonel metotlara göre daha başarılı verdiği bildirilen HRM yöntemi ile 28 gıda örneğindeki *Listeria* türlerinin tanımlanması doğru bir şekilde gerçekleştirilmiş sadece 2 örnekte başarısız olunmuştur [167].

Sonuç olarak gıdalarda bozulmaya neden olan maya türlerinin tespitinde yaygın olarak fenotipik özelliklere dayalı testler kullanılmakta ve düşük doğruluk oranında sonuçlar elde edilebilmektedir. Dolayısıyla gıda mikrobiyolojisi ve endüstrisindeki önemi giderek daha iyi anlaşılan mayaların tanımlanmasına yönelik genotipik yöntemlere dayalı hızlı ve güvenilir sonuçlar veren alternatif yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında real-time PCR HRM ve Tm analizine dayalı bir yöntem geliştirilerek çok sayıda bozucu maya türünün kısa bir

sürede yüksek doğruluk oranı ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Real-time PCR HRM ve T_m analizi mikrobiyolojik tanıda önemi gün geçtikçe daha iyi anlaşılan potansiyel bir yöntemdir. Henüz literatürde mayaların tanımlanmasında HRM ve T_m analizine dayalı bir yöntem bulunmamakta dolayısıyla tamamlanan tez çalışması bu yöntemin mayalardaki ilk uygulaması olması bakımından önem taşımaktadır.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Gıda Ürünlerinin ve İzolatların Temini

Bu çalışmada bazı gıda ürünlerinde bozulma etkeni maya türlerinin real-time PCR HRM analizi ile tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla; Kayseri'deki semt pazarlarından temin edilen beyaz peynir (P), yoğurt (Y), kaymak (K) ve zeytin (Z) olmak üzere 4 çeşit gıda ürününün her birinden 4 adet (A, B, C ve D) olmak üzere toplamda 16 örnek kullanılmıştır. Örneklemede ambalajsız olarak satılan, rengi, kokusu ve görünüşü itibari ile mikrobiyal olarak bozulmuş olduğu tahmin edilen ürünlerin seçimine dikkat edilmiştir. Soğuk zincir ile laboratuvara taşınan bu ürünlerden toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $>10^6$ kob/g olan örnekler çalışmada kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Gıda Örneklerinden Farklı Maya Türlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Gıda örneklerinden 10 g tartılarak 90 mL Maximum Recovery Dilüent (Merck/Almanya) ile süspanse edilmiş ve steril koşullarda parçalanıp, homojenize edildikten (Retsch mm-400 /Almanya) sonra 10^{-1} den 10^{-6} ya kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan mayaların izolasyonu ve sayımı için Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (Merck/Almanya) besiyerine ekim yapılmıştır. Her bir dilüsyondan yayma plak yöntemi ile DRBC agar bulunan petrilere 0.1 mL ekim yapılmıştır ve 25 ± 2 °C'de 3–5 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon sonunda DRBC agar üzerinde gelişen ve sayılabilir yoğunlukta koloni içeren petrilere sayım yapılmış ve morfolojik görünüşleri birbirinden farklı koloniler belirlenmiştir. Seçilen

atipik kolonilerden DRBC agar içeren petrilere 3 faz çizilerek saflaştırma yapılmıştır. Bu işleme saf koloniler elde edilinceye kadar 2 – 3 defa tekrar edilmiştir. Saflaştırma işlemi sırasında seçilen koloniler kodlanmıştır. Bu kodlamada ilk olarak örnek adının ilk harfi, ikinci olarak örnek kodu, üçüncü olarak dilüsyon numarası ve dördüncü olarak da o dilüsyondan seçilen maya kolonilerinin sayısı verilmiştir. Saflaştırılan maya kolonileri, içerisinde steril cam boncukların bulunan ve % 20 oranında gliserol içeren Malt Extract Broth tüplerine aktararak -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. Maya İzolatlarının Genotipik Olarak Tanımlanması

2.2.2.1. Saf Maya İzolatlarından DNA İzolasyonu

- 2 mL’lik tüplere DRBC Agar üzerinde gelişen maya kültürlerinden 1–3 öze dolusu maya toplanıp 400 µL Lysis Buffer bulunan tüplere aktarılmıştır.
- Tüpler 5–10 saniye vorteklenmiş ve 95 °C’de 15 dakika ısıtıcı blok (Thermo Cell-HB–202, Bioer /Çin) içerisinde inkübasyona bırakılmıştır.
- 56 °C’ye soğutulan tüplerin üzerine 20 µL proteinaz K eklenip vortekslenerek (IKA MS 3 Basic/ Almanya) 56 °C’de 2 saat inkübe edilmiştir.
- Inkübasyondan sonra tüplere 150 µL %10’luk CTAB, 150 µL 5 M’lık NaCl eklenmiş ve 65 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Oda sıcaklığına gelen tüplere 500 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenerek 20 dakika çalkalanmıştır.
- 20000xg hızda 15 dakika santrifüj (Hettich 22R Zentrifugen/Almanya) edilen tüplerdeki süpernatant temiz bir tüpe aktarılmış ve üzerlerine 250 µL CTAB eklenip 65 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Soğutulan tüplere 500 µL kloroform: izoamilalkol (24:1) ilave edilip 200 rpm’de 15 dakika çalkalanmıştır.
- 20000xg hızda 15 dakika santrifüj yapılmış, üst faz yeni bir tüpe aktarıldıktan ve üzerine 550 µl izopropanol (2-propanol), 20 µL NH₄AC eklendikten sonra -20 °C’de en az 2 saat bekletilmiştir.
- Tüpler 20000xg hızda 20 dakika santrifüjlenip, üst fazın tamamı dökülmüştür. Pelletin üzerine 500 µL %70’lik soğuk etanol eklenip, çalkalayıcıda 10 dakika çalkalanmıştır.

- 20000xg hızda 10 dakika santrifüjlenip, son olarak üst faz dökülmüş ve tüpler oda sıcaklığında 2–3 saat kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruyan tüplere 100 μ L TE Buffer (10 mm Tris-1mmEDTA) eklenip, 15–30 dakika bekletildikten sonra nanodrop spektrometre (ACT Gene UVS-99/ Amerika) kullanılarak DNA konsantrasyonu ölçülmüştür.

2.2.2.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

- **%10'luk CTAB-0,7 M NaCl Çözeltisinin Hazırlanışı:** 100 mL'lik çözelti için 10 g CTAB (hexadecyltrimethylammoniumbromide) ve 4.09 g NaCl tartılarak 4.09 g NaCl 70 mL suda çözündürülmüştür. Daha sonra %10'luk CTAB eklenerek hacim saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda (Hirayama/HV 50 L/ Japonya) 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.
- **% 70'lik Etanolün Hazırlanışı:** 200 mL için; 140 mL absolute (saf) alkole 60 mL steril distile su eklenerek -20 °C'de muhafaza edilir.
- **Lysis Buffer Hazırlanışı;** 250 mL için; 50 mM EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit), 150 mM NaCl, 50 mM Tris ve %5 Triton X100 karıştırılarak hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.
- **5 M NaCl Hazırlanışı;** 150 mL için; 29.22 g NaCl tartılıp suda çözülür ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir.
- **TE Buffer Çözeltisinin Hazırlanışı;** 200 mL TE buffer için; 0.24 g Tris-HCl ve 0.074 g EDTA 150 mL suda çözülüp hacim 200 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 8'e ayarlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

2.2.2.2. Rep-PCR Fingerprint Analizi

Genom üzerinde tekrarlayan dizilerin PCR ile amplifikasyonuna dayanan (rep-PCR) fingerprint yöntemi, yakın ilişkili türlerin veya tür içerisindeki farklı suşların başarılı bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır. Çalışma kapsamında tüm izolatların (GTG)₅ rep-PCR yöntemi ile fingerprint analizi yapılmıştır. Bu amaçla 15 μ L ticari PCR master mix, 200 ng her bir saf kültürden izole edilen template DNA ve 0.6 μ M (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTGGTG GTG-3') primerinden oluşan reaksiyon karışımının toplam hacmi

distile su ile 30 μ L'ye tamamlanmıştır. Termal döngü cihazında (Techne, TC-5000, ABD) gerçekleştirilen reaksiyonun döngü şartları Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Rep-PCR döngü şartları

İşlem basamağı	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	50 s	35
Yapışma	50	1 dk	
Uzama	72	2 dk	
Final uzama	72	6 dk	1

2.2.2.3. Rep-PCR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

0.5 μ g/mL etidyum bromür içeren % 1.5'lik agaroz jele, elde edilen PCR ürünleri yüklendikten sonra 1 x TAE tamponunda, 50 V'da 5 saat yürütülmüş ve oluşan bant profilleri görüntülenmiştir (Gel-Doc XR, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif. ABD).

50 X TAE Buffer Hazırlanışı

242 g 2 M Tris base 57,1 mL 1 M asetik asit, 100 mL 0.5 M EDTA ultra saf su ile karıştırılarak hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve pH 8'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilen karışım oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X TAE yürütme tamponunun hazırlanışı

20 mL 50 X TAE tamponuna 980 mL dH₂O ilave edilerek toplam hacim 1000 mL tamamlanmıştır.

2.2.3. Dizi Analizi

Rep-PCR reaksiyonlarında elde edilen tüm izolatlara ait fingerprintler Bionumerics 7.5 programı yardımıyla analiz edilerek gruplandırılmış ve her grubu temsil eden bir izolat seçilerek dizi analizi yapılmıştır. Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen maya türlerinin dizi analizi ile tanımlanması amacıyla yaklaşık 600 bç büyüklüğündeki ITS (internal

transcribed spacer) bölgesi hedef alınmıştır. Dizi analizinde kullanılan primerler Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Dizi analizinde kullanılan primerlerin baz dizilimi.

Oligonükleotid	Dizi (5'–3')	Amplikon Uzunluğu
ITS1 (İleri primer)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600 bp
ITS4 (Geri primer)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Bu amaçla hedef bölgenin amplifikasyonu için 25µL ticari PCR master mix (NEB), 20µM ileri primer, 20µM geri primer ve 2µL kalıp DNA kullanılmış, reaksiyon hacmi saf su ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. PCR döngü şartları Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Dizi analizi için PCR döngü şartları

İşlem basamağı	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	10 dk	1
Denatürasyon	94	40 s	35
Yapışma	59.5	1 dk	
Uzama	72	35 s	
Final uzama	72	10 dk	1

PCR işlemi sonucu elde edilen amplikonlar sekans analizine tabi tutulmadan önce %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek kontrolleri edildikten sonra dizi analizi için Medsantek (İstanbul) laboratuvarına gönderilmiştir. Sonuçlar BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.2.4. Maya İzolatlarının Real-time PCR Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi

Real-time PCR HRM analizi için maya türleri arasında en fazla, aynı türün bireyleri arasında ise en az değişkenlik gösteren DNA bölgeleri kullanılmıştır. Fungal identifikasyonlarda genellikle ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri kullanılmaktadır.

Literatürde maya tanısında kullanılmak üzere dizayn edilmiş ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgelerini hedef alan bazı universal primer setleri mevcut olup bunlardan 2 farklı DNA bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan universal PCR primer setleri Tablo 2.4.'de verilmiştir.

Tablo 2.4. HRM analizi için kullanılacak universal PCR primer setleri

Oligonükleotid	Dizi (5'-3')	Amplikon Uzunluğu
NL1(İleri primer)	5'-GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	250 bç
LS2(Geri primer)	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'	
U1 (İleri primer)	5'-GTGAAATTGTTGAAAGGGAA-3'	260 bç
U2(Geri primer)	5'-GACTCCTTGGTCCGTGTT-3'	

Real-time PCR-HRM analizi için amplifikasyonlar toplam 10 µL hacim içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu karışım, 5µL Fast Start Essential DNA Green Master miks (RocheAppliedScience, Almanya), 0.05 µL ileri ve 0.05 µL geri primer, 100 ng kalıp DNA ve 4.15 µL dH₂O içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR döngü şartları ve T_m/HRM analizi, Tablo 2.5.'deki gibi optimize edilerek LightCyclerNano (RocheAppliedScience, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.5. RT-PCR ile T_m/HRM analizi döngü şartları

İşlem basamağı	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	10 dk	1
Denatürasyon	95	45 s	30
Yapışma	52	30 s	
Uzama	72	45 s	
Final uzama	72	10 dk	1
Erime Sıcaklığı Analizi			
Bekleme	40	5 dk	1
Yüksek Çözünürlüklü Erime	60	20 s	1
	95	20 s	

Toplam 30 döngü tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin sıcaklığı 60°C'den 95°C'ye 0.03°C/s hızla artırılırken floresans akümüasyonu ölçülerek erime eğrileri elde edilmiştir. Her bir PCR ürünü için erime sıcaklığı (T_m) değerleri, sıcaklıktaki değişime karşı floresan miktarındaki değişimin birinci dereceden negatif türevi alınarak real-time PCR cihazının yazılımından otomatik olarak hesaplanmıştır. Sıcaklığa karşı elde edilen erime eğrisi dataları yine cihazın yazılımı ile normalize edilerek HRM profilleri oluşturulmuştur.

2.2.4.1. İstatistik Analizi

Real-time PCR T_m ve HRM analizleri 3 tekerrür olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen T_m değerlerinin Varyans analizi (ANOVA, $\alpha=0.05$) ile önemliliği sorgulanmış ve örneklerin ortalama T_m değerleri arasında önemli fark olup olmadığı fisher LSD testi ile XLStat 2013 istatistiksel veri analiz programı kullanılarak belirlenmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Bu çalışmada analizi gerçekleştirilen bozulmuş gıda örneklerinden seri dilüsyonlar hazırlanarak Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar besiyerine ekim yapılmış ve inkübasyon süresi sonunda gelişen maya kolonileri sayılmıştır. Sayım sonuçlarına ait ortalama değerler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

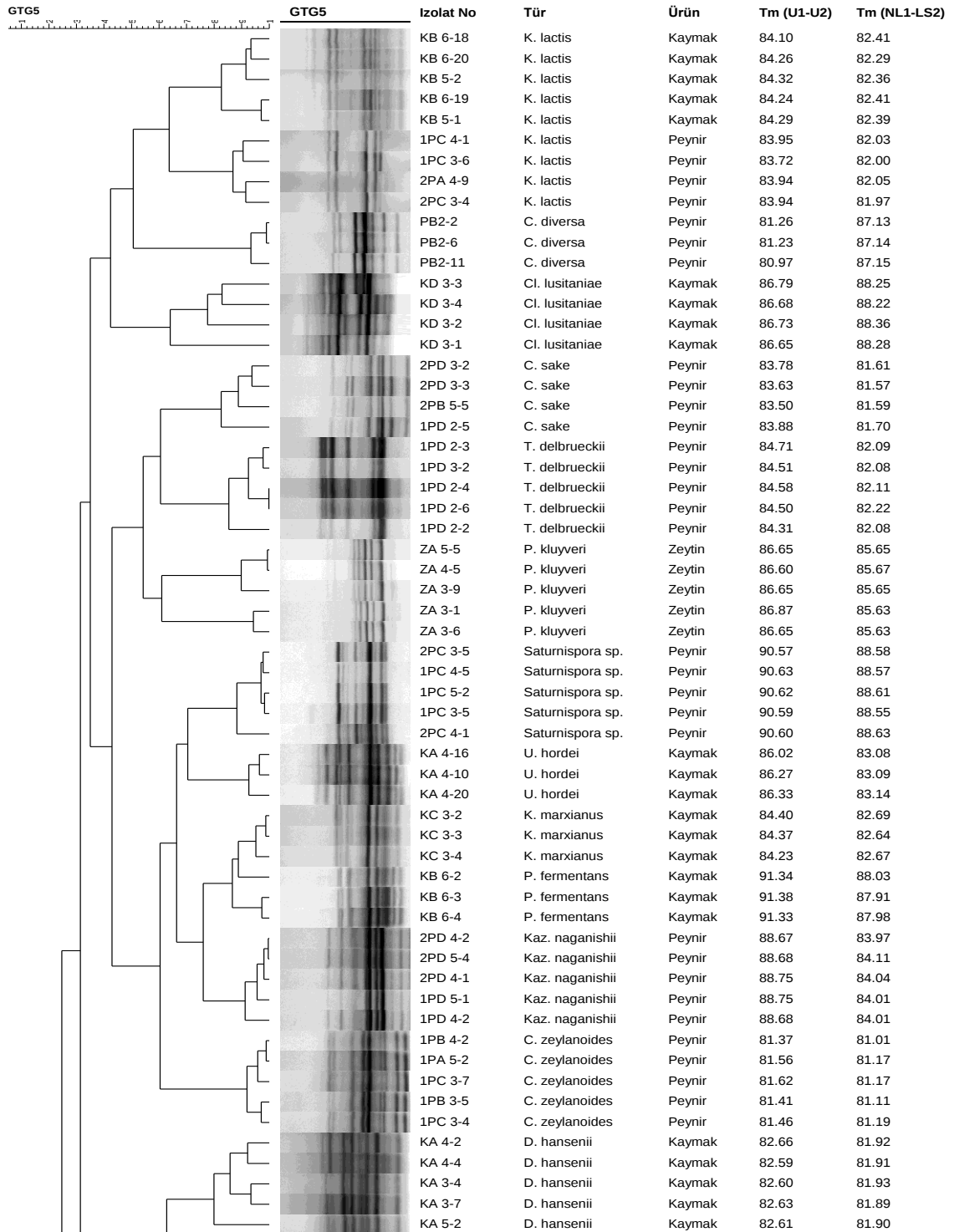
Tablo 3.1. Gıda örneklerinde maya sayım sonuçları

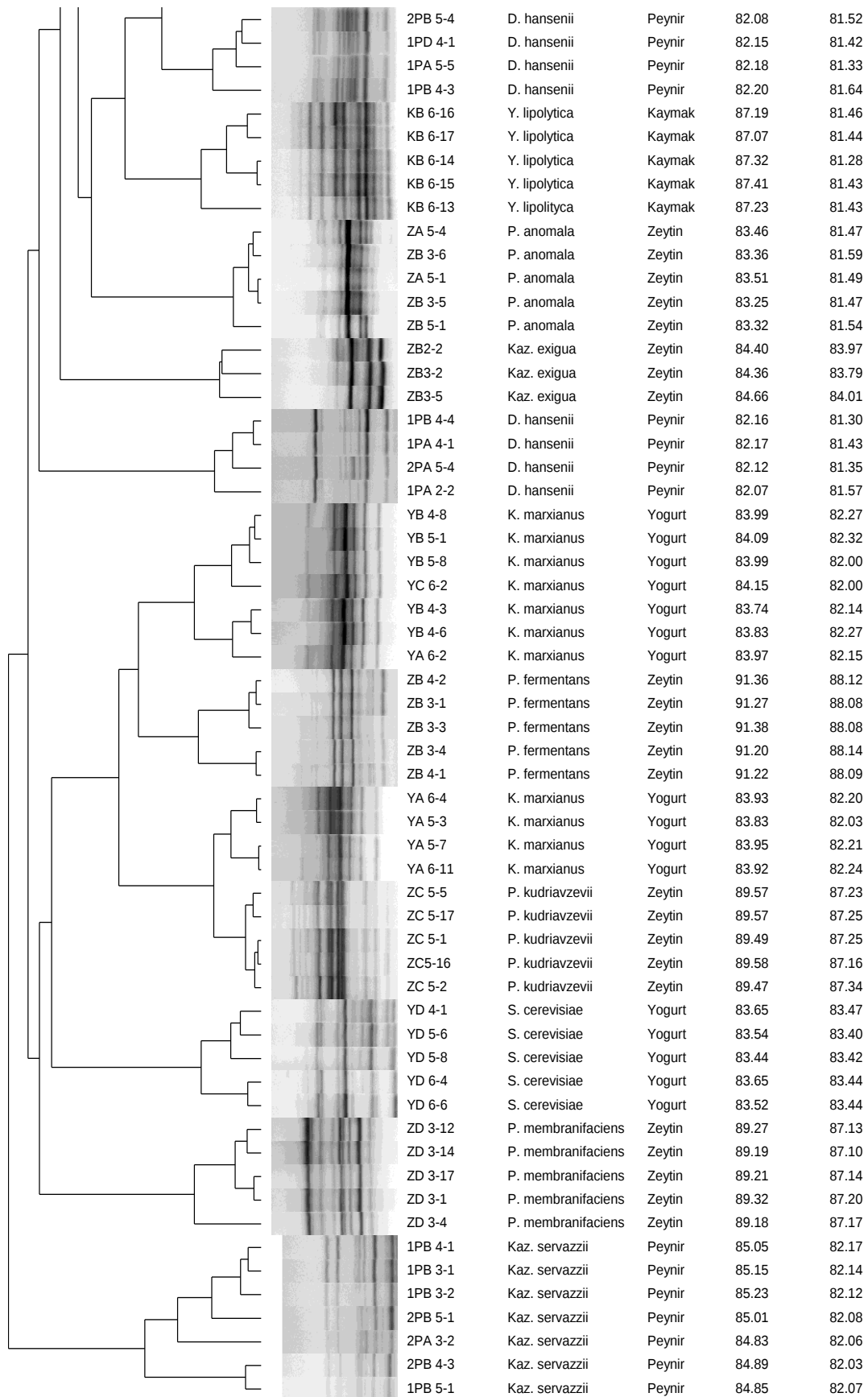
Örnek Adı	Örnek Kodu	Koloni sayısı (kob/g)	Koloni sayısı (Log kob/g)
Peynir (P)	PA	$3,10 \times 10^6$	6,491362
	PB	$1,20 \times 10^6$	6,079181
	PC	$1,40 \times 10^6$	6,146128
	PD	$2,95 \times 10^5$	5,469822
Kaymak (K)	KA	$2,32 \times 10^6$	6,365488
	KB	$1,51 \times 10^7$	9,177536
	KC	$1,46 \times 10^6$	7,164353
	KD	$6,55 \times 10^7$	7,816241
Yoğurt (Y)	YA	$3,95 \times 10^7$	7,596597
	YB	$1,10 \times 10^7$	7,041393
	YC	$3,30 \times 10^7$	7,518514
	YD	$1,80 \times 10^7$	7,255273
Zeytin (Z)	ZA	$1,70 \times 10^6$	6,230449
	ZB	$2,60 \times 10^6$	6,414973
	ZC	$1,11 \times 10^7$	7,043362
	ZD	$1,85 \times 10^6$	6,267172

A:1. Örnek, B: 2. Örnek, C: 3.Örnek, D: 4. Örnek

3.2. Rep-PCR Fingerprint Analizi Sonuçları

(GTG)5 primeri ile gerçekleştirilen rep-PCR Fingerprint analizi ile toplamda 338 izolat analiz edilmiştir. Maya izolatlarına ait elde edilen fingerprintler, BioNumerics 7.5 yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve türler arasında tespit edilen filogenetik ilişki Şekil 3.1.'de verilmiştir.





Şekil 3.1. Maya izolatlarına ait rep – PCR Fingerprint analizi ile elde edilen fingerprintler kullanılarak oluşturulan dendrogram (UPGMA metot)

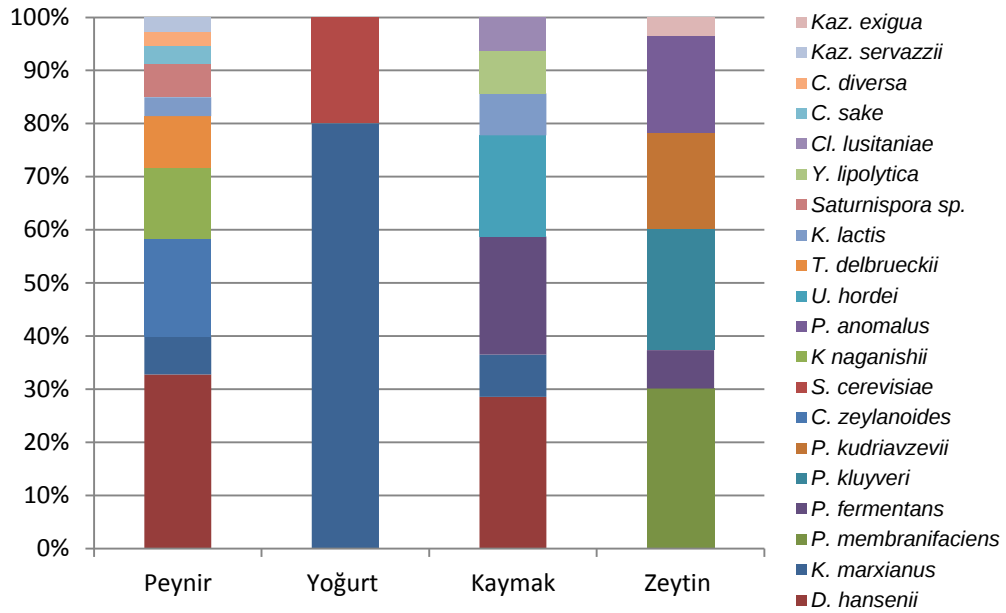
3.3. Dizi Analizi Sonuçları

Rep-PCR analizine göre gruplandırılan maya izolatlarından her grubu temsil eden bir ya da iki izolat seçilmiş ve seçilen izolatların tanımlanması amacıyla yaklaşık 600 bp büyüklüğündeki ITS bölgesi hedef alınarak dizi analizi yapılmıştır. Tanımlanan maya izolatlarının örneklerle göre dağılımı Tablo 3.2.'de ve türlerin örneklerle göre yüzde dağılımı ise Şekil 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Tanımlanan maya izolatlarının örneklerle göre dağılımı

Türler		Peynir	Yoğurt	Kaymak	Zeytin	Toplam
Teleomorf	Anamorf [168]					
<i>K. marxianus</i>	<i>C.kefyr</i>	-	64	5	-	69
<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	37	-	18	-	55
<i>P.membranifaciens</i>	<i>C. valida</i>	-	-	-	25	25
<i>P. fermentans</i>	<i>C.lambica</i>	-	-	14	6	20
<i>P. kluyveri</i>	-	-	-	-	19	19
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. krusei</i>	-	-	-	15	15
<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. krissii</i>	21	-	-	-	21
<i>S. cerevisiae</i>	<i>C.robusta</i>	-	16	-	-	16
<i>Kaz. naganishii</i>	<i>S. naganishii</i>	15	-	-	-	15
<i>P. anomala</i>	<i>C.beverwijkiae</i>	-	-	-	15	15
<i>U. hordei</i>	-	-	-	12	-	12
<i>T. delbrueckii</i>	<i>C. colliculosa</i>	11	-	-	-	11
<i>Kaz. servazzii</i>	<i>S. servazzii</i>	10	-	-	-	10
<i>K. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	4	-	5	-	9
<i>Saturnispora sp.</i>	-	7	-	-	-	7
<i>Y. lipolytica</i>	<i>C. lipolytica</i>	-	-	5	-	5
<i>Cl. lusitaniae</i>	-	-	-	4	-	4
<i>C. sake</i>	-	4	-	-	-	4
<i>C. diversa</i>	-	3	-	-	-	3
<i>Kaz. exigua</i>	<i>C. holmii</i>	-	-	-	3	3
Toplam		113	80	64	83	338

K: Kluyveromyces, D: Debaryomyces, P: Pichia, C: Candida, S: Saccharomyces, Kaz: Kazachstania, U: Ustilago, T: Torulaspora, Y: Yarrowia, Cl: Clavispora, -:tespit edilmedi



Şekil 3.2. Dizi analizi ile tanımlanan izolatların örneklere göre % dağılımı.

Çalışma kapsamında bozulmuş gıda örneklerinden izole edilerek tanımlanan toplamda 338 izolatın %27.81'inin *Pichia* cinsi mayalara, %23.08'inin *Kluyveromyces* cinsi mayalara, %8.28'inin *Candida* cinsi mayalara ve %8.28'inin *Kazachstania* cinsi mayalara ait olduğu belirlenmiştir. Bunların yanı sıra toplam izolatın %16.27'sinin *D. hansenii*, %4.73'ünün *S. cerevisiae*, %3.55'inin *U. hordei*, %3.25'inin *T. delbrueckii*, %2.07'sinin *Saturnispora sp.*, %1.47'sinin *Y. lipolytica* ve %1.18'inin *Cl. lusitaniae* türlerine ait olduğu saptanmıştır. *Pichia* cinsi mayaların %26.60'ını *P. membranifaciens*, %21.28'ini *P. fermentans*, %20.21'ini *P. kluyveri*, %15.96'sını *P. kudriavzevii* ve %15.96'sını ise *P. anomala* türlerinin oluşturduğu, *Kluyveromyces* cinsi mayaların %88.46'sını *K. marxianus* ve %11.54'ünü ise *K. lactis* türlerinin oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *Candida* cinsi mayaların %60'ını *C. zeylanoides*, %28.57'sini *C. diversa* ve %11.43'ünü *C. sake* türlerinin oluşturduğu, *Kazachstania* cinsi mayaların ise %53.57'sini *Kaz. naganishii*, %35.71'ini *Kaz. servazzii* ve %10.71'ini de *Kaz. exigua* türlerinin oluşturduğu tespit edilmiştir.

3.4. Real-time PCR Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) ve Tm Analizi

U1-U2 ve NL1-LS2 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen Real-time PCR HRM analizi sonucunda elde edilen Tm değerleri istatistiksel olarak analiz edilmiştir ve izolat

grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Tm analiz sonucunda elde edilen veriler Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Real-time PCR HRM analiz sonucunda elde edilen ortalama Tm değerleri

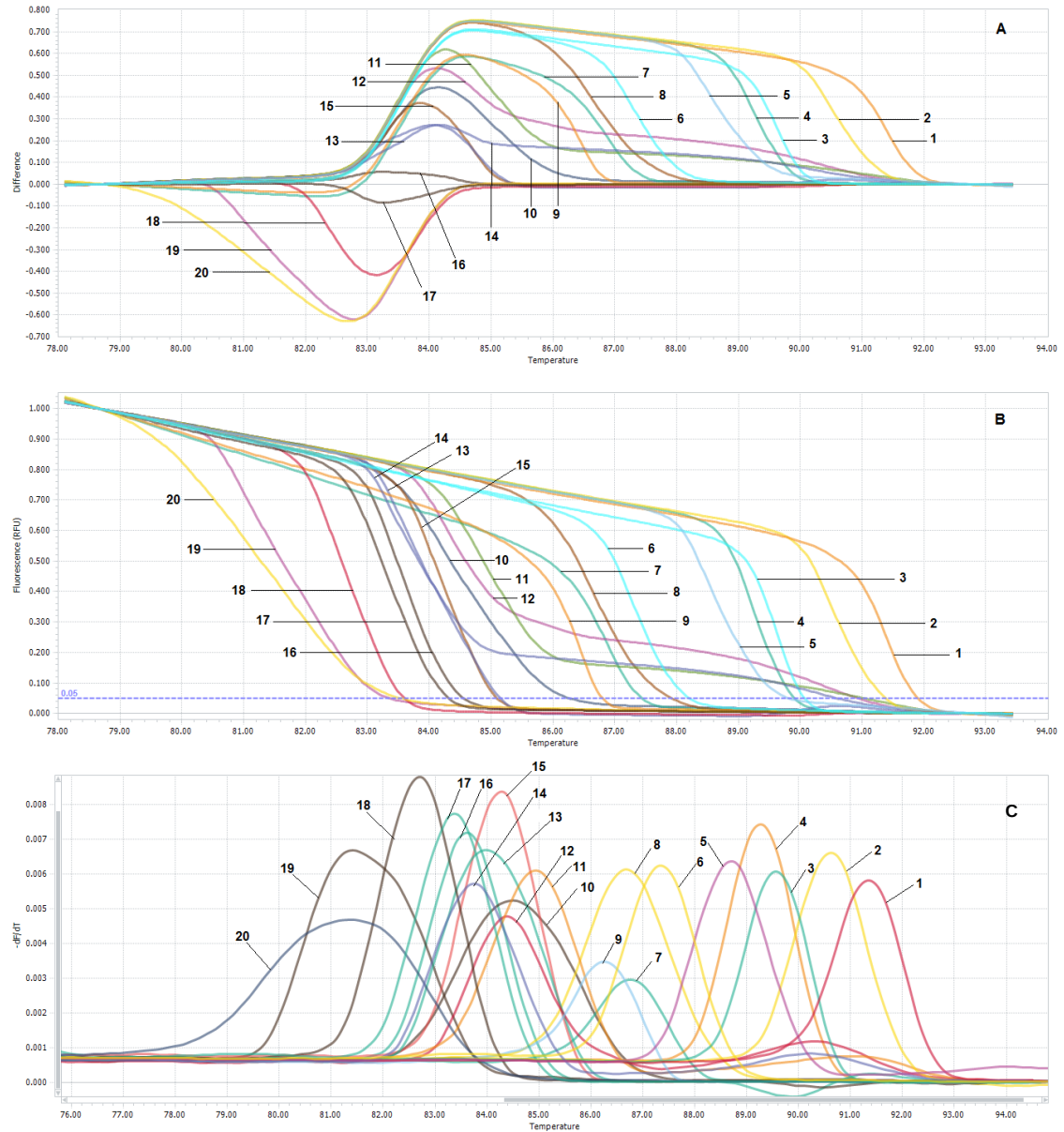
Türler	Grupların Tm değerlerinin ortalaması	
	U1-U2 Primeri	NL1-LS2 Primeri
<i>K. marxianus</i> ¹	83,922 ±0,025 ^m	82,181 ±0,024 ^m
<i>K. marxianus</i> ²	84,304 ±0,040 ^l	82,658 ±0,039 ^m
<i>D. hansenii</i> ²	82,559 ±0,044 ^q	81,895 ±0,043 ^o
<i>D. hansenii</i> ³	82,144 ±0,028 ^r	81,415 ±0,027 ^{qr}
<i>P. membranifaciens</i>	89,222 ±0,040 ^d	87,130 ±0,039 ^f
<i>P. fermentans</i> ²	91,321 ±0,050 ^a	87,953 ±0,048 ^d
<i>P. fermentans</i> ⁴	91,273 ±0,040 ^a	88,085±0,039 ^c
<i>P. kluyveri</i>	86,670 ±0,040 ^g	85,632 ±0,039 ^g
<i>P. kudriavzevii</i>	89,523 ±0,040 ^c	87,236 ±0,039 ^e
<i>C. zeylanoides</i>	81,472 ±0,040 ^s	81,114 ±0,039 ^s
<i>S. cerevisiae</i>	83,549 ±0,040 ^o	83,418 ±0,039 ^l
<i>Kaz. naganishii</i>	88,695 ±0,040 ^e	84,012 ±0,039 ^h
<i>P. anomala</i>	83,366 ±0,040 ^p	81,498 ±0,039 ^q
<i>U. hordei</i>	86,289 ±0,050 ^h	83,083 ±0,048 ^j
<i>T. delbrueckii</i>	84,510 ±0,040 ^k	82,043 ±0,039 ⁿ
<i>Kaz. servazii</i>	85,021 ±0,050 ^j	82,093±0,048 ⁿ
<i>K. lactis</i> ³	83,935 ±0,044 ^m	81,996±0,043 ^{no}
<i>K. lactis</i> ²	84,228 ±0,040 ^l	82,356 ±0,039 ^l
<i>Saturnispora sp.</i>	90,590±0,040 ^b	88,571±0,039 ^a
<i>C. diversa</i>	81,122 ±0,050 ^t	87,118 ±0,048 ^f
<i>Y. lipolytica</i>	87,232 ±0,040 ^f	81,390±0,039 ^r
<i>Cl. lusitaniae</i>	86,691 ±0,044 ^g	88,260±0,043 ^b
<i>C. sake</i>	83,675 ±0,044 ⁿ	81,600 ±0,043 ^p
<i>Kaz. exigua</i>	84,444 ±0,050 ^k	83,906 ±0,048 ^h

İzole edildikleri örnek 1: Yoğurt, 2: Kaymak, 3: Peynir, 4: Zeytin

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

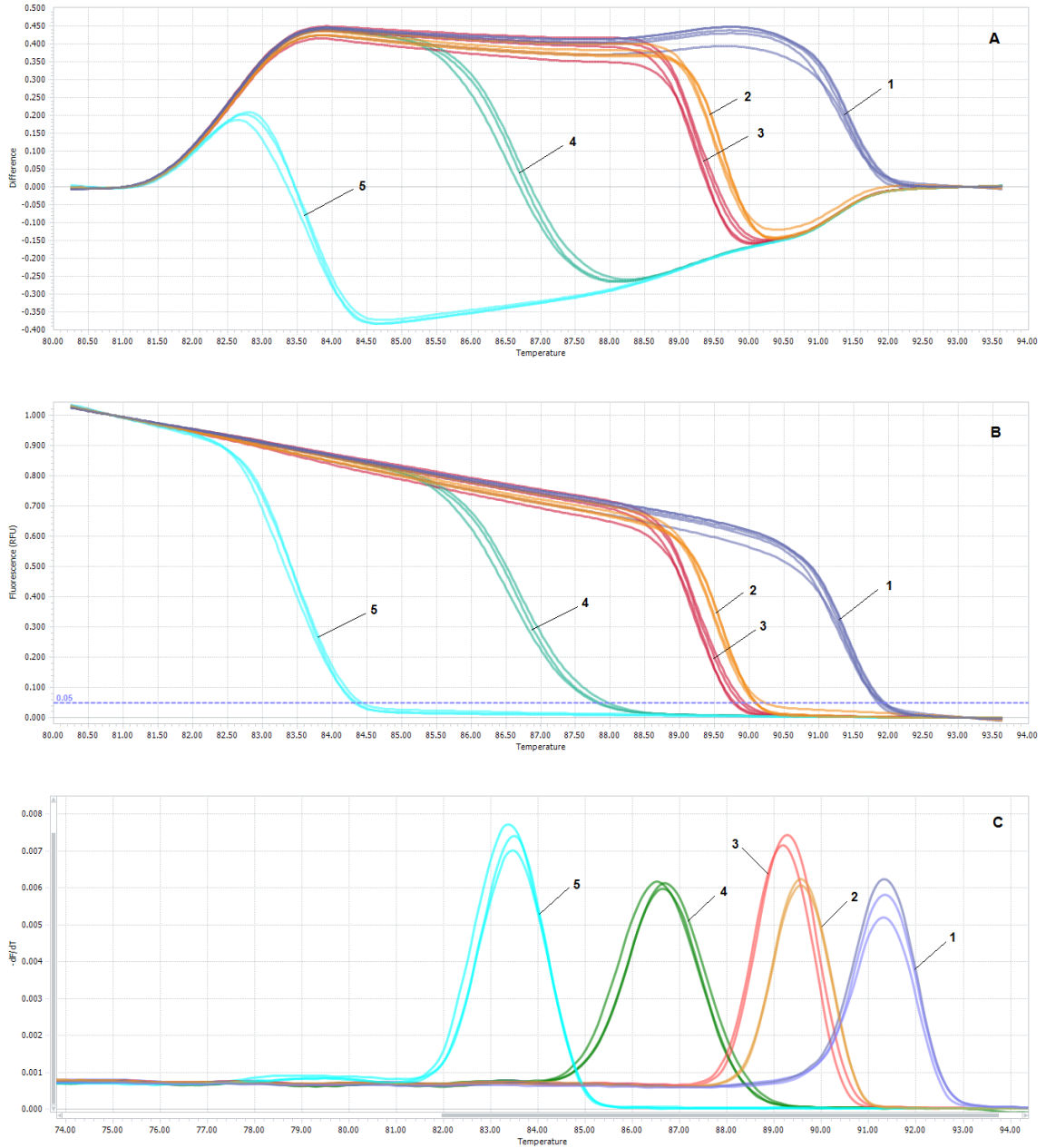
3.4.1. U1-U2 Primeri ile Yapılan Real-time PCR HRM Analizi

U1-U2 primeri ile yapılan HRM analizi sonucunda çalışma kapsamında tanımlanan tüm türlerin türe spesifik HRM eğrileri verdiği tespit edilmiştir. Bu primerler de elde edilen HRM profilleri Şekil 3.3.'de verilmiştir.



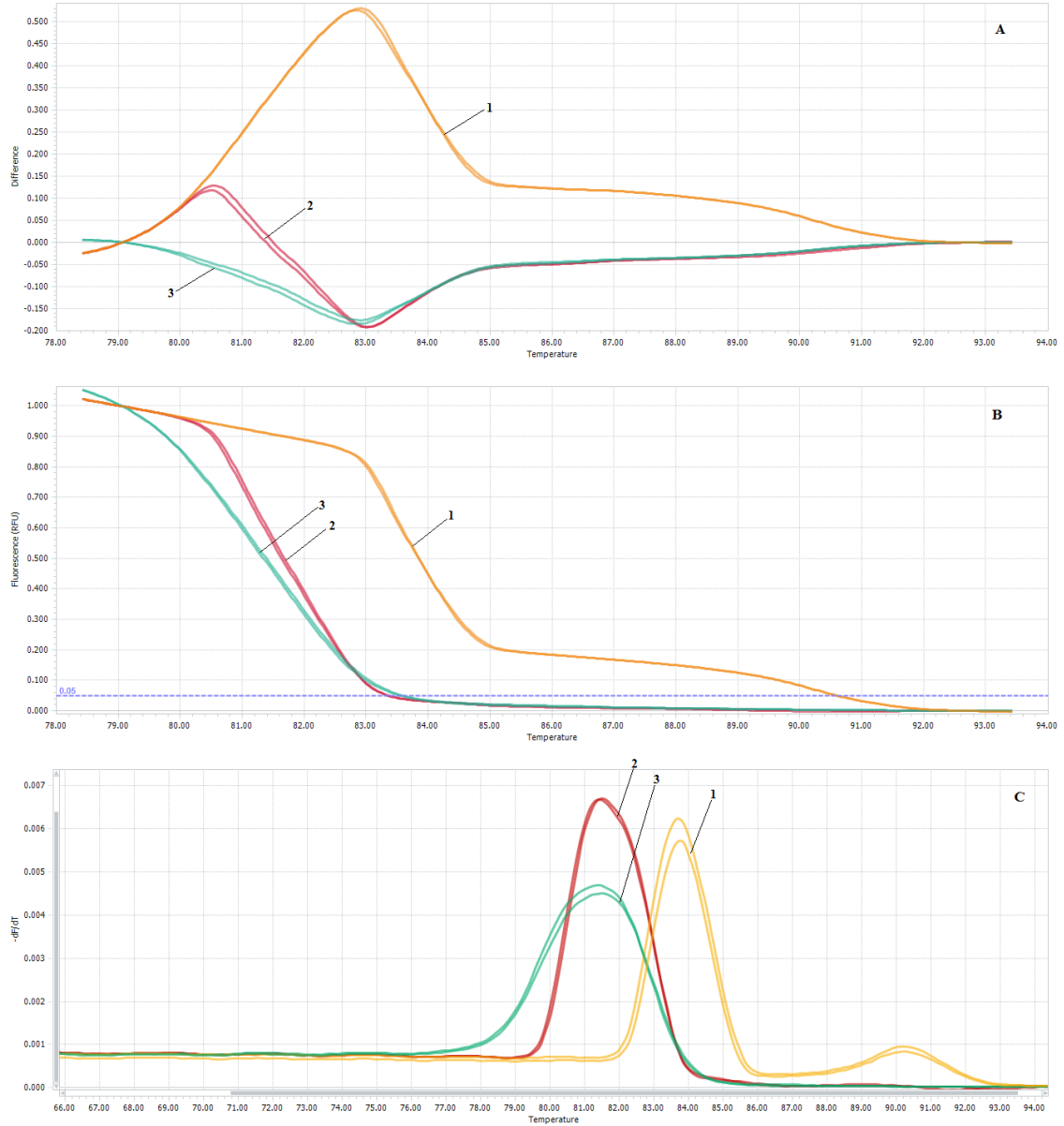
Şekil 3.3. U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri: A: difference plot eğrisi B: normalize erime eğrisi C: Tm pikleri, 1: *P. fermentans*, 2: *Saturnispora* sp., 3: *P. kudriavzevii*, 4: *P. membranifaciens*, 5: *Kaz. naganishii*, 6: *Y. lipolytica*, 7: *Cl. lusitaniae*, 8: *P. kluyveri*, 9: *U. hordei*, 10: *T. delbrueckii*, 11: *Kaz. servazzii*, 12: *Kaz. exigua*, 13: *K. marxianus*, 14: *C. sake*, 15: *K. lactis*, 16: *S. cerevisiae*, 17: *P. anomalus*, 18: *D. hansenii*, 19: *C. zeylanoides*, 20: *C. diversa*

Çalışma kapsamında tanımlanan *Pichia* cinsi mayaların tamamının türe spesifik HRM eğrileri oluşturduğu tespit edilmiştir. *Pichia* cinsi mayaların Tm değerleri istatistiksel olarak kıyaslandığında izolat grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Şekil 3.4.'de *Pichia* cinsine ait türlerin izolatların HRM eğrileri ve Tm pikleri verilmiştir.



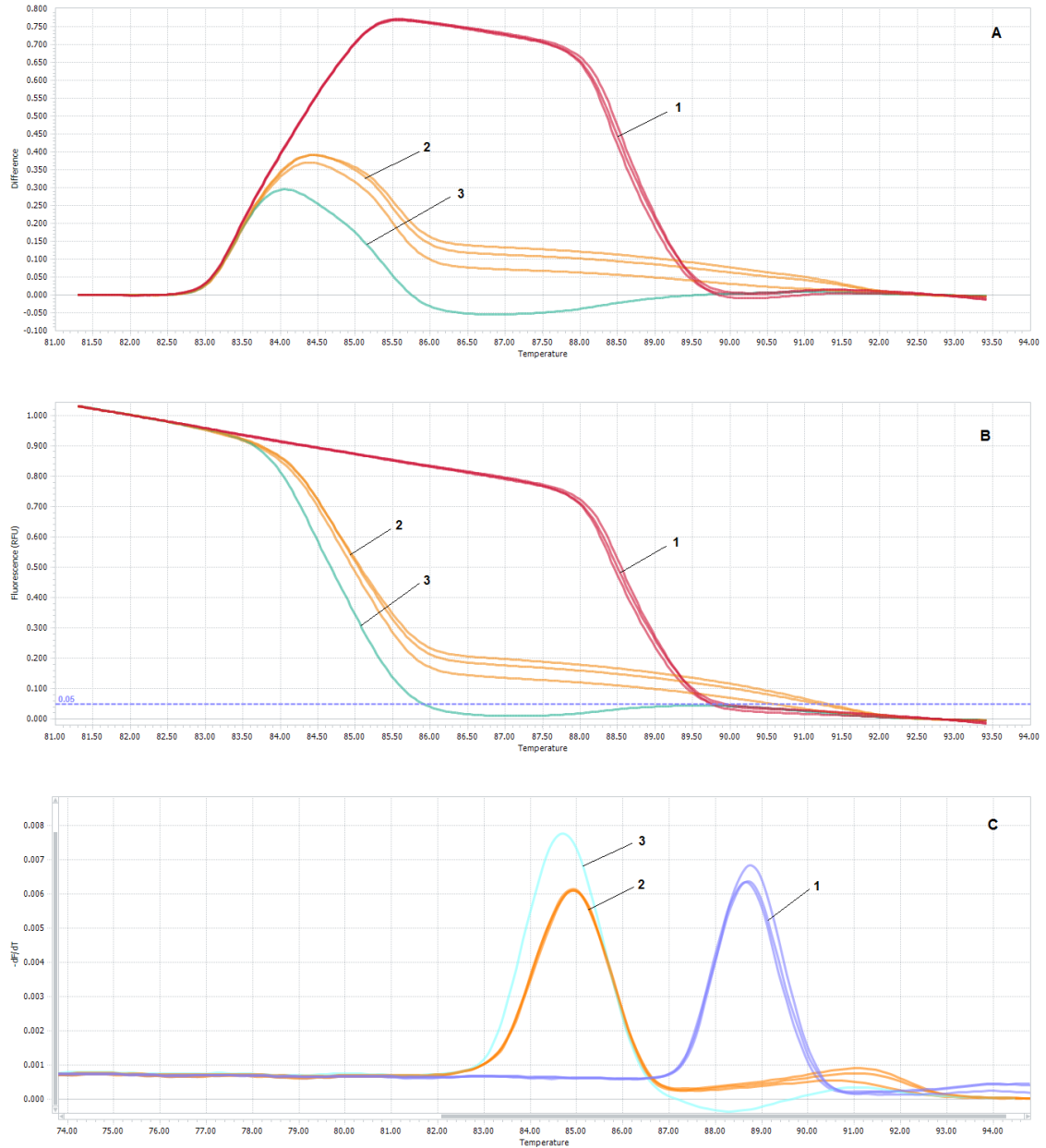
Şekil 3.4. *Pichia* cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri 1: *P. fermentans*, 2: *P. kudriavzevii*, 3: *P. membranifaciens*, 4: *P. kluyveri*, 5: *P. anomala*

Tamamı peynirler örneklerinden izole edilen *Candida* cinsi mayalardan *C. sake*, *C. diversa* ve *C. zeylanoides* türleri tanımlanmış ve bu türlerin tamamının türe spesifik HRM profilleri oluşturduğu tespit edilmiştir. Tm değerleri incelendiğinde *Candida* cinsine ait izolat grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. *Candida* cinsine ait izolatların HRM eğrileri ve Tm pikleri Şekil 3.5.'de verilmiştir.



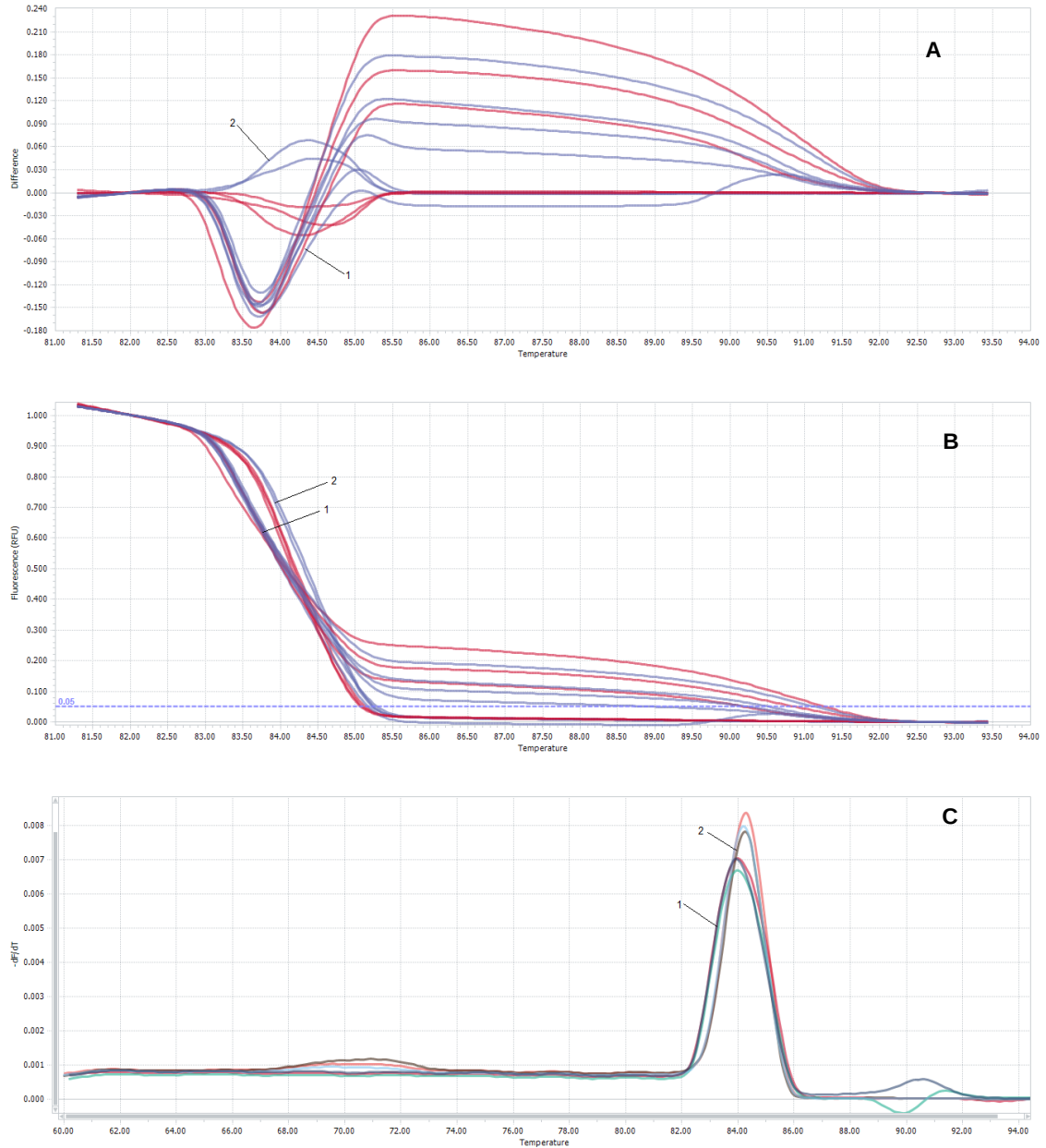
Şekil 3.5. *Candida* cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri, 1: *C. sake*, 2: *C. zeylanoides*, 3: *C. diversa*

Çalışma kapsamında tanımlanan türlerin %8.28'ini oluşturan *Kazachstania* cinsine ait türlerin U1-U2 primerleri ile spesifik HRM eğrileri verdiği tespit edilmiştir. Tm değerleri kıyaslandığında bu cinsin türleri arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. *Kazachstania* cinsine ait izolatların HRM eğrileri ve Tm pikleri Şekil 3.6.'da verilmiştir.



Şekil 3.6. *Kazachstania* cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri 1: *Kaz. naganishii*, 2: *Kaz. servazzii*, 3: *Kaz. exigua*

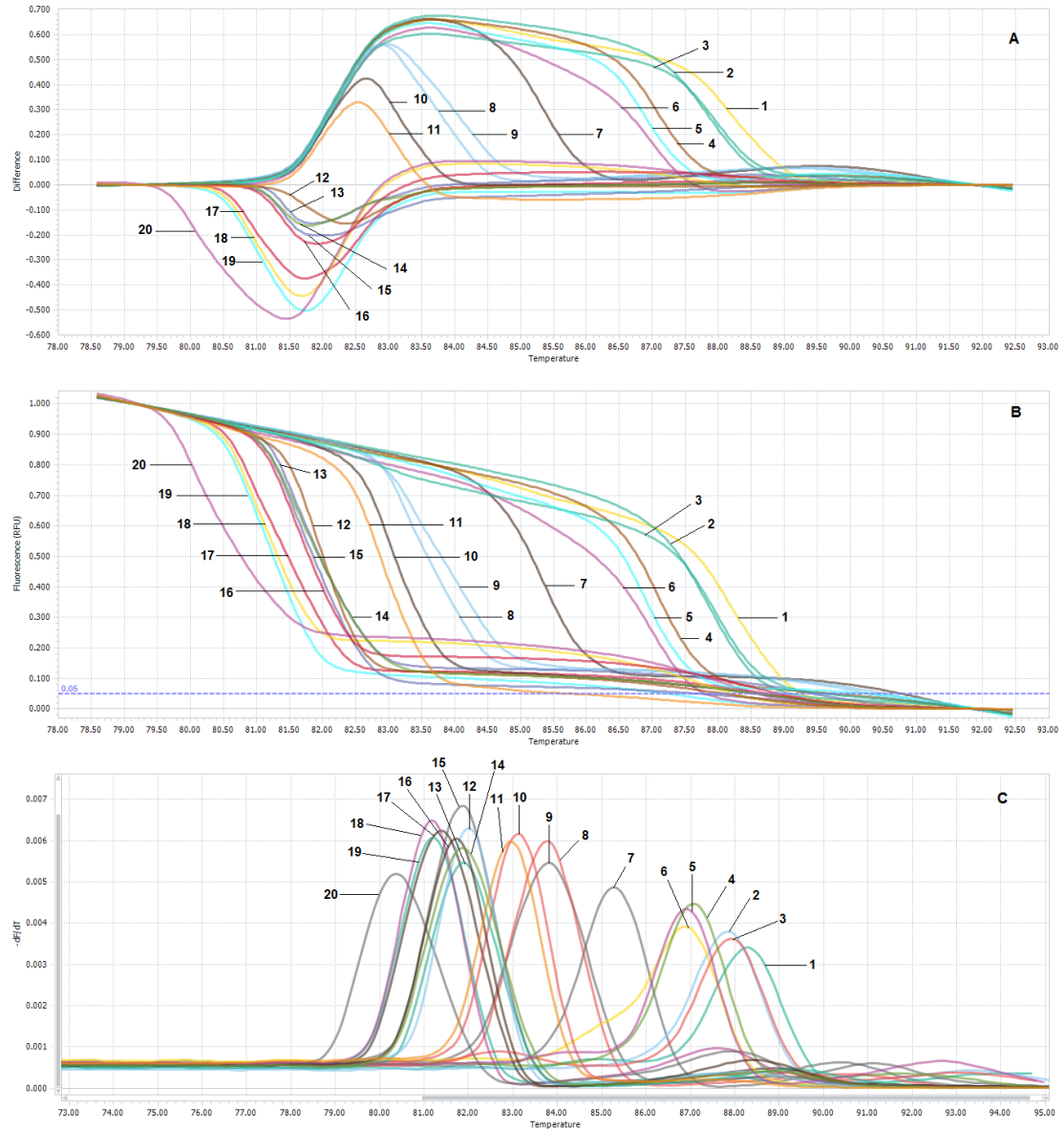
Kluyveromyces cinsine ait *K. marxianus* ve *K. lactis* türleri tanımlanmıştır. Bu türlerin HRM eğrilerinde türe spesifik karakterizasyon göstermediği, ayrıca T_m değerleri birbirleri ile kıyaslandığında izolat grupları arasında önemli farklılıklar olmadığı gözlemlenmiştir. *Kluyveromyces* cinsine ait izolatların HRM eğrileri ve T_m pikleri Şekil 3.7.'da verilmiştir.



Şekil 3.7. *Kluyveromyces* cinsi izolatların U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) T_m pikleri, 1: *K. marxianus*, 2: *K. lactis*

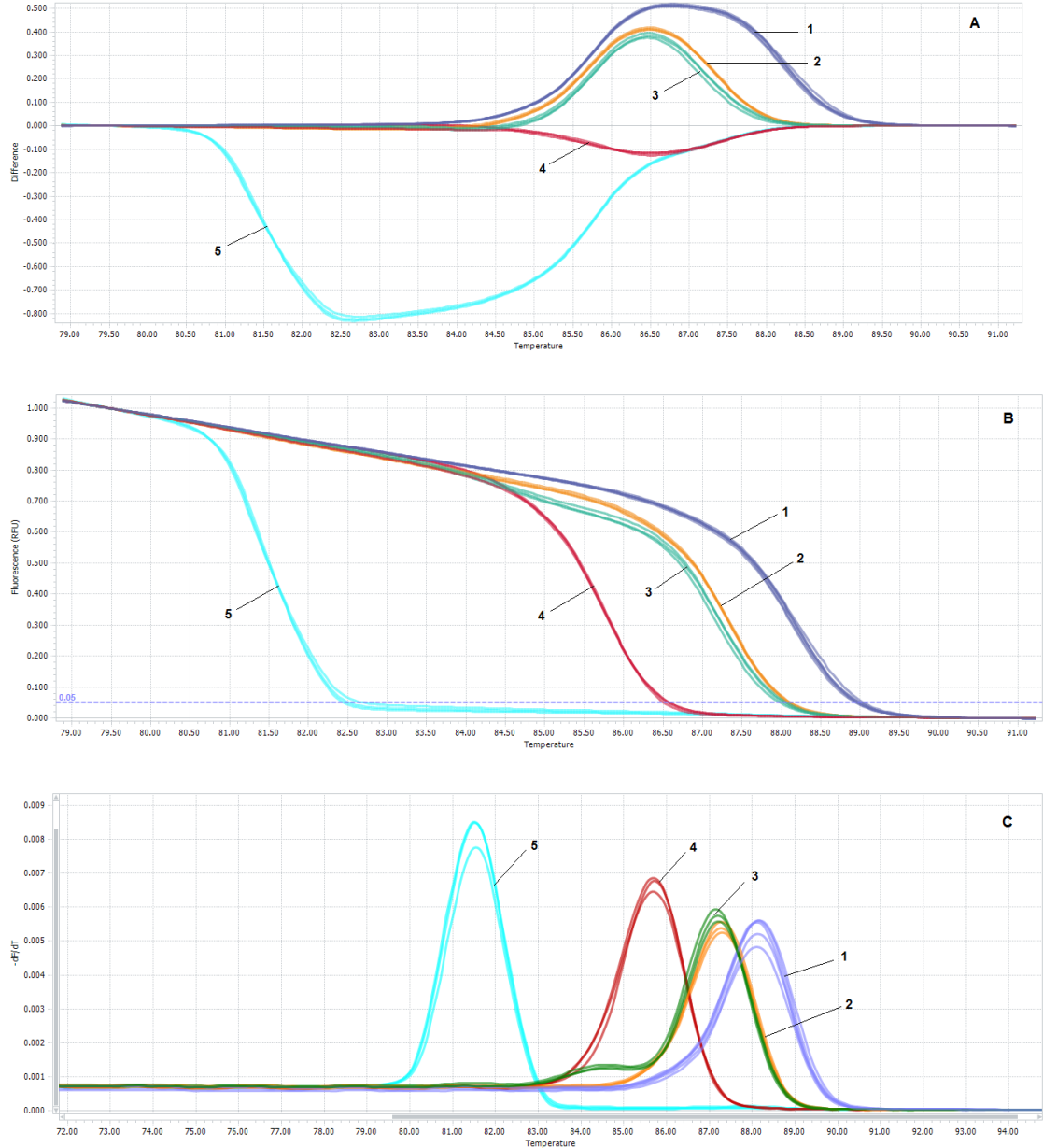
3.4.2. NL1-LS2 Primeri ile Yapılan Real-time PCR HRM Analizi

NL1-LS2 primeri ile gerçekleştirilen Real-time PCR HRM analizi sonucunda tanımlanan tüm türlere ait elde edilen HRM profilleri Şekil 3.8.'de verilmiştir.



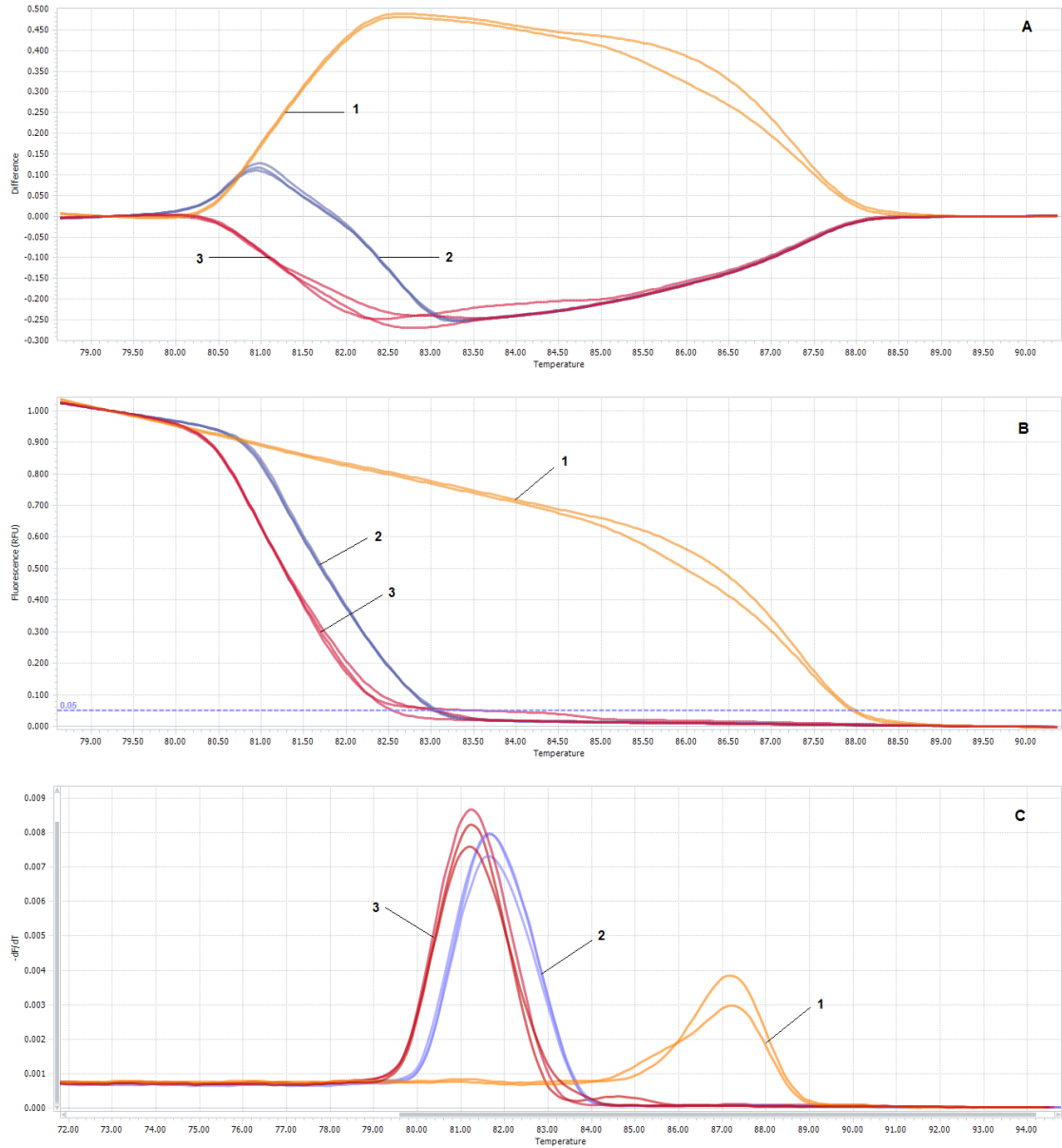
Şekil 3.8. Tüm izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri: (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri, 1: *Saturnispora sp.*, 2: *P. fermentans*, 3: *Cl. lusitaniae*, 4: *P. kudriavzevii*, 5: *P. membranifaciens*, 6: *C. diversa* 7: *P. kluyveri*, 8: *Kaz. naganishii*, 9: *Kaz. exigua* 10: *S. cerevisiae*, 11: *U. hordei*, 12: *K. lactis*, 13: *K. marxianus*, 14: *Kaz. servazzii*, 15: *T. delbrueckii*, 16: *D. hansenii*, 17: *C. sake*, 18: *P. anomala* 19: *Y. lipolytica*, 20: *C. zeylanoides*

Çalışma kapsamında tanımlanan mayaların %27.81'ini oluşturan *Pichia* cinsi mayaların NL1-LS2 primeri ile gerçekleştirilen HRM reaksiyonları sonucunda türe spesifik HRM eğrileri oluşturduğu tespit edilmiştir. *Pichia* cinsi mayaların Tm değerleri karşılaştırıldığında izolat grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Şekil 3.9.'da *Pichia* cinsine ait türlerin HRM eğrileri ve Tm pikleri verilmiştir.



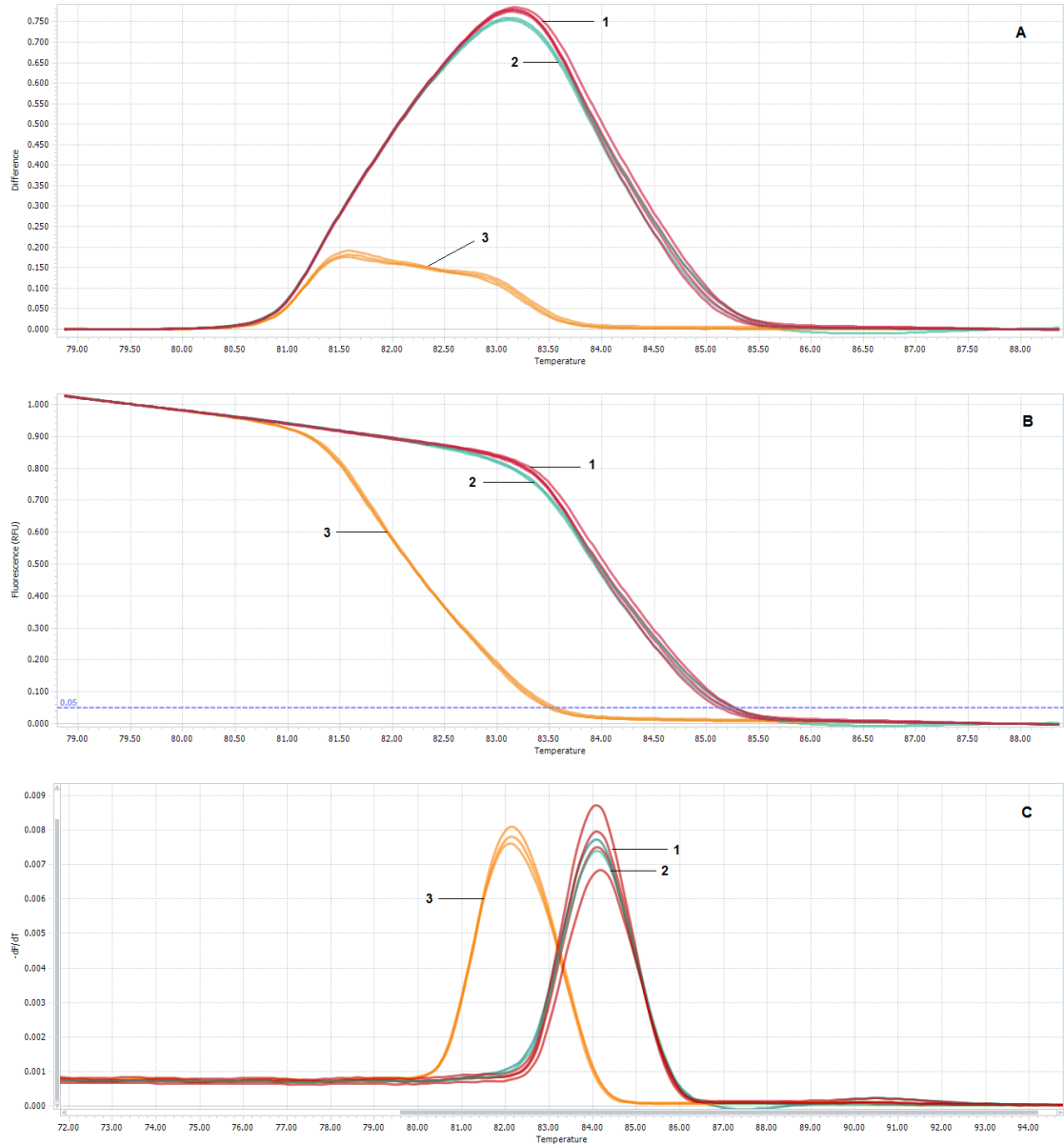
Şekil 3.9. *Pichia* cinsi izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri, 1: *P. fermentans*, 2: *P. kudriavzevii*, 3: *P. membranifaciens*, 4: *P. kluyveri*, 5: *P. anomala*

Candida cinsi mayaların çalışma kapsamında tanımlanan izolatların %8.28'ini oluşturduğu, bu cinse ait türlerin tamamının türe spesifik HRM eğrileri verdiği tespit edilmiştir. Tm değerleri incelendiğinde *C. sake*, *C. diversa* ve *C. zeylanoides* izolat grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Bu cinse ait izolatların HRM eğrileri ve Tm pikleri Şekil 3.10.'da verilmiştir.



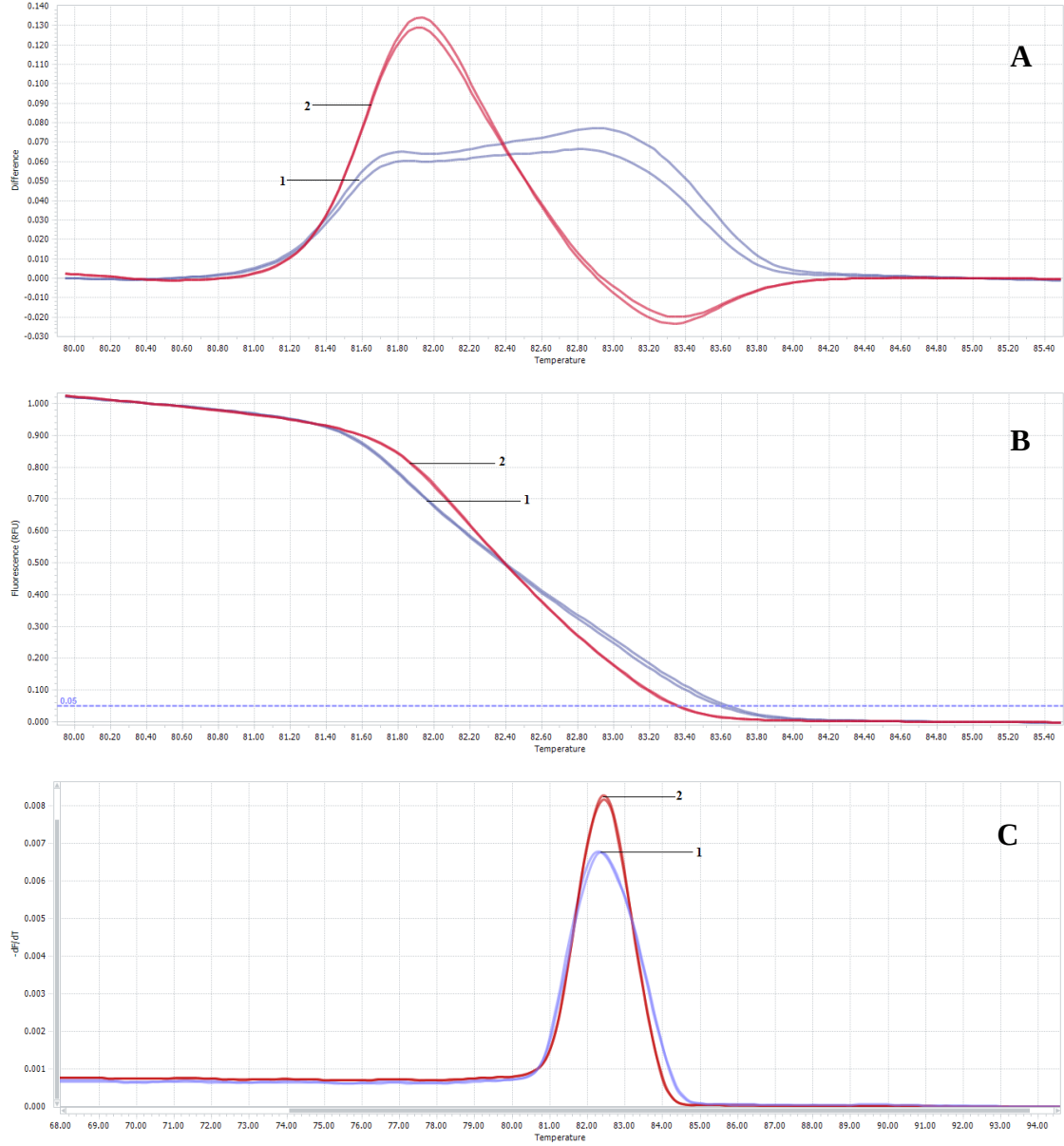
Şekil 3.10. *Candida* cinsi izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri, 1: *C. diversa*, 2: *C. sake*, 3: *C. zeylanoides*

Çalışma kapsamında tanımlanan *Kazachstania* cinsine ait *Kaz. naganishii*, *Kaz. exigua*, *Kaz. servazzii* izolatlarının türe spesifik HRM profilleri oluşturduğu tespit edilmiştir. Tm değerleri analiz edildiğinde ise türler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. *Kazachstania* cinsine ait türlerin HRM eğrileri ve Tm pikleri Şekil 3.11.'de verilmiştir.



Şekil 3.11. *Kazachstania* cinsi izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri, 1: *Kaz. naganishii*, 2: *Kaz. exigua*, 3: *Kaz. servazzii*

Çalışma kapsamında tanımlanan türlerin %23.08'inin *Kluyveromyces* cinsi mayalardan oluştuğu belirlenmiştir. Bu cinse ait mayaların NL1-LS2 primeri ile yapılan real-time PCR HRM reaksiyonları sonucunda türe spesifik eğriler verdiği tespit edilmiştir.



Şekil 3.12. *Kluyveromyces* cinsi izolatların NL1-LS2 primeri ile elde edilen HRM eğrileri (A) difference plot eğrisi, (B) normalize erime eğrisi (C) Tm pikleri, 1: *K. marxianus*, 2: *K. lactis*

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada gıda ürünlerinde bozulma sebep olan mayaların tanımlanması amacıyla real-time PCR Tm ve HRM analizine dayalı yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla, bozulmuş gıda ürünlerinden (kaymak, peynir, yoğurt, zeytin) izole edilerek saflaştırılan mayalardan DNA izolasyonu sonrasında (GTG)5 primeri ile rep-PCR fingerprint analizi yapılmış ve oluşan fingerprintlere göre maya türleri gruplandırılmıştır. Daha sonra her grubu temsil eden izolatlar seçilerek ITS bölgesine göre dizi analizi yapılmış ve dizi analizi sonuçları gen bankası verileri ile karşılaştırılarak maya izolatları tanımlanmıştır. Diğer taraftan analiz edilen örneklerden saflaştırılan toplam 338 izolatın U1-U2 ve NL1-LS2 bölgelerine ait amplifikasyon ürünlerinin Tm değerleri belirlenmiş ve HRM analizi yapılarak erime eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen Tm değerleri istatistiksel olarak analiz edilerek yöntemin etkinliği değerlendirilmiştir.

Analiz edilen gıda örneklerinden saflaştırılan izolatları tanımlamak için yapılan dizi analizi sonucunda toplamda 20 maya türü belirlenmiştir. Tanımlanan maya türleri, *K. marxianus*, *D. hansenii*, *P. membranifaciens*, *P. fermentans*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *C. zeylanoides*, *S. cerevisiae*, *Kaz. naganishii*, *P. anomalus*, *U. hordei*, *T. delbrueckii*, *K. lactis*, *Saturnispora sp.*, *Y. lipolytica*, *C. diversa*, *Cl. lusitaniae*, *C. sake*, *Kaz. servazzii*, *Kaz. exigua* olarak belirlenmiştir. Çalışma kapsamında tanımlanan toplam 338 izolatın %27.64'ünün *Pichia* cinsi, %25.29'unun *Kluyveromyces* cinsi, %8.23'ünün *Candida* cinsi ve %6.18'inin *Kazachstania* cinsi mayalara ait olduğu belirlenmiştir.

Kaymak ve yoğurttan saflaştırılan toplam 69 izolat *K. marxianus* olarak tanımlanmıştır. (GTG)5 primeri ile oluşturulan dendogram incelendiğinde her iki üründen izole edilen

K. marxianus suşlarının ayrı ayrı fingerprintler oluşturduğu dolayısıyla farklı clusterlar şeklinde ayrıldığı tespit edilmiştir. U1-U2 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin ortalama Tm değerleri analiz edildiğinde, kaymaktan ve yoğurttan izole edilen suşların istatistiki olarak *K. lactis* suşlarından farklı bulunmadığı ancak tanımlanan diğer tüm türlerden ve birbirlerinden önemli derecede farklı olduğu tespit edilmiştir. NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri ise, kaymaktan izole edilen suşlarda *Kaz. servazzii* izolatlarından istatistiksel olarak farklı bulunmazken, yoğurttan izole edilen suşlardan ve diğer tüm türlerden önemli derecede farklı bulunmuştur. Bu çalışmada analiz edilen toplam izolat sayısının %23.1'ni oluşturan *K. marxianus* suşlarının tamamı süt ürünlerinde tespit edilmiştir. Laktozu fermente edebilen, termotolerant, proteolitik ve pektinolitik aktiviteye sahip bir tür olan *K. marxianus*'un (anamorfu *C. kefir*) süt ürünlerinin ve bazı bitkisel ürünlerin bozulmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [19].

Peynir ve kaymak olmak üzere iki ayrı üründen izole edilen toplam 55 izolat *D. hansenii* olarak tanımlanmıştır. Peynirden izole edilen *D. hansenii* suşları iki ayrı cluster oluşturduğu halde bu iki gruba ait izolatların her iki primer ile elde edilen ortalama Tm değerleri arasındaki fark, önemli bulunmamış ve HRM eğrilerinin benzer olduğu görülmüştür. Kaymak izolatları ise, her iki grup peynir izolatından farklı bir cluster oluşturmuş ve bu farklılık HRM eğrilerinde ve istatistiki olarak da Tm değerlerinde kendini göstermiştir. Peynir ve kaymak izolatlarının hem U1-U2 hem de NL1-LS2 primeri ile elde edilen PCR ürünlerine ait ortalama Tm değerleri, tanımlanan diğer türlerden önemli derecede farklı bulunmuştur. Diğer taraftan peynirden izole edilen suşların NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değeri istatistiksel olarak *Y. lipolytica* ve *P. anomala* türlerinden, kaymaktan izole edilen suşların ortalama Tm değeri ise *K. lactis* suşlarından istatistiki olarak farklı olmadığı, ancak diğer tüm türlerle arasındaki farklılığın önemli olduğu tespit edilmiştir.

Bir hemiascomisetes maya olan *D. hansenii* peynirlerde olgunlaşmanın ilk aşamasında özellikle yüksek tuz konsantrasyonu, düşük pH ve başlıca karbon kaynağı olarak laktatın bulunmasına bağlı olarak iyi bir gelişim gösterip yüzeyde biyofilm oluşumu ve aroma bozukluklarına sebep olmaktadır. Pek çok peynir çeşidinde dominant maya türü olarak bulunan *D. hansenii*'nin gelişimi yüksek tuz konsantrasyonu ile ilgili olup peynir dışında et ürünleri, salamura sebzeler ve diğer süt ürünlerinden de sıklıkla izole

edilebilmektedir. Diğer taraftan peynirde aroma oluşumu üzerine yoğunlaşmış bazı çalışmalar, *D. hansenii*'nin aldehit ve alkoller gibi aroma bileşenlerini oluşturarak karakteristik peynir aromasının şekillenmesine katkı sağladığını göstermiştir [19,169-173].

Toplam izolat yüzdesinin 7.35'ini oluşturan *P.membranifaciens* türlerinin tamamı zeytinden izole edilmiştir. Rep-PCR ürünlerinin fingerprint analizi sonucunda bu türün tek bir cluster oluşturduğu tespit edilmiştir. *P.membranifaciens* türünün HRM profilleri incelendiğinde her iki primerle de türe spesifik erime özelliği sergilediği gözlemlenmiştir. U1-U2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerinin (89.232°C) istatistiksel analiz sonucunda diğer tüm türlerden önemli derecede farklı olduğu belirlenmiştir. NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değeri (87.132°C) ise, istatistiki analiz sonucunda diğer türlerden önemli düzeyde ayrılırken *C. diversa* türü ile aradaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Kaymak ve zeytinden izole edilen toplamda 20 *P. fermentans* suşunun iki farklı cluster şeklinde ayrıldığı tespit edilmiştir. U1-U2 primeri ile elde edilen Tm değerleri zeytinden izole edilen suşlarda ortalama 91.283°C olarak bulunurken kaymaktan izole edilen suşlarda ortalama 91.332 °C olarak bulunmuş, bu iki değer istatistiksel olarak analiz edildiğinde diğer türlerle aradaki farklılık önemli bulunurken kendi içerisinde önemsiz bulunmuştur. NL1-LS2 primeri ile elde edilen Tm değeri kaymaktan izole edilen suşlarda ortalama 87.959°C, zeytinden izole edilen suşlarda ortalama 88.087°C bulunmuştur. Kaymaktan izole edilen *P. fermentans* suşlarının Tm değerleri, hem zeytinden izole edilen suşlardan hem de çalışma kapsamında tanımlanan diğer türlerden istatistiksel olarak önemli derecede farklı olduğu tespit edilmiştir.

Zeytinden izole edilen ve toplam izolat sayısının %5.59'unu oluşturan *P. kluyveri* türünün tek bir fingerprint oluşturduğu tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen real-time PCR HRM ve Tm analizlerinde kullanılan her iki primer çifti ile elde edilen sonuçlara göre *P. kluyveri* izolatlarının türe spesifik karakterizasyon sergilediği tespit edilmiştir. U1-U2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerlerinin *Cl. lusitaniae* izolatları ile aradaki farklılığın önemli olmadığı tespit edilmiştir.

Tamamı zeytinden izole edilen toplam 15 *P. kudriavzevii* izolatlarının türe spesifik bir fingerprint oluşturduğu belirlenmiştir. Bu türe ait izolatların her iki primer çifti ile elde edilen PCR ürünlerinin, HRM profilleri incelendiğinde türe spesifik karakterizasyon sergiledikleri tespit edilmiştir. *P. kudriavzevii* izolatlarının U1-U2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değeri 89.533°C, NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değeri ise 87.238 °C olarak bulunurken, gerçekleştirilen istatistik analizi sonuçlarına göre hem U1-U2 primeri ile hem de NL1-LS2 primeri ile elde edilen Tm değerleri diğer türler ile kıyaslandığında aradaki farklılığın önemli olduğu gözlemlenmiştir.

Peynirden izole edilen 21 izolatın *C. zeylanoides* türüne ait olduğu belirlenmiştir. (GTG)5 primeri ile oluşturulan dendogram incelendiğinde bu türün tek bir cluster oluşturduğu tespit edilmiştir. HRM analizlerinde *C. zeylanoides* izolatının türe spesifik karakterizasyon sergilediği ve Tm değerlerinin de diğer türlerden önemli derecede farklı olduğu gözlemlenmiştir.

Tamamı yoğurt örneklerinden izole edilen ve toplam izolat sayısının %4.71'ini oluşturan *S. cerevisiae* türünün (GTG)5 primeri ile oluşturulan dendogram incelendiğinde tek bir cluster oluşturduğu gözlemlenmiştir. U1-U2 primerleri ile elde edilen ortalama Tm değeri 83.559 °C, NL1-LS2 primerleri ile elde edilen ortalama Tm değeri ise 83.420 °C olarak belirlenmiştir. Tm değerleri, çalışma kapsamında tanımlanan diğer türler ile kıyaslandığında arada ki farklılık önemli bulunmuştur. Ayrıca *S. cerevisiae* izolatlarının hem U1-U2 hem de NL1-LS2 primerleri ile elde edilen HRM eğrilerinin de türe spesifik olduğu tespit edilmiştir.

Peynirden izole edilen ve toplam izolat yüzdesinin 4.11'ini oluşturan *Kaz. naganishii* izolatlarının gerçekleştirilen fingerprint analizinde tek bir cluster oluşturduğu tespit edilmiştir. *Kaz. naganishii* izolatlarının U1-U2 primerine ait ortalama Tm değeri 88.705°C, NL1-LS2 primerine ait ortalama Tm değeri ise, 84.014 °C olarak belirlenmiş olup her iki primer ile elde edilen HRM profillerinin türe spesifik olduğu gözlemlenmiştir. U1-U2 primer çiftinde elde edilen Tm değerleri diğer türler ile kıyaslandığında aradaki farklılığın önemli olduğu tespit edilmiştir. NL1-LS2 primerlerine ait Tm değerlerinde ise yalnızca *Kaz. exigua* türü ile arasındaki farklılık istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Tamamı zeytin örneklerinden izole edilen ve toplam izolat yüzdesinin %4.41'ini oluşturan *P.anomala/Wickerhamomyces anomalus* türünün türe spesifik bir cluster oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında her iki primer çifti ile yapılan HRM analizi sonucunda ise bu türün türe spesifik HRM eğrileri verdiği tespit edilmiştir. U1-U2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerinin 83.376 °C, NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerinin ise 81.500 °C olduğu belirlenmiş ve her iki primer çifti ile elde edilen erime sıcaklıklarının da diğer türlerden istatistiksel olarak ayrıldığı tespit edilmiştir.

Kaymaktan izole edilen *U. hordei* türleri toplam izolat yüzdesinin 3.53'ünü oluşturmaktadır. (GTG)5 rep-PCR ürünlerinin cluster analizi sonucunda türe spesifik fingerprint oluşturduğu gözlenen *U. hordei* izolatlarının real-time PCR HRM ve Tm analizlerinde de türe spesifik karakterizasyon göstermiştir.

Tamamı peynirden izole edilen ve toplam izolat yüzdesinin 3.24'ünü oluşturan *T. delbrueckii* izolatlarının gerçekleştirilen cluster analizinde tek bir fingerprint oluşturduğu belirlenmiştir. Ortalama Tm değerleri U1-U2 primeri ile 84.520 °C iken NL1-LS2 primeri ile 82.045 °C olarak bulunmuştur. U1-U2 primeri ile elde edilen HRM eğrilerinin türe spesifik olduğu gözlenen *T. delbrueckii* izolatlarının istatistiki analizinde *Kaz. exigua* ile arasındaki farklılık önemsiz bulunurken diğer türler ile aradaki farklılık önemli bulunmuştur. NL1-LS2 primerine ait istatistiki analiz sonucunda ise, *T. delbrueckii* izolatlarının *K. marxianus*, *Kaz. servazzii* ve peynirden izole edilen *K. lactis* türleri ile aradaki farklılık önemli bulunmazken diğer türler ile aradaki farklılık önemli bulunmuştur.

Peynirden izole edilen *Kaz. servazzii* izolatlarının gerçekleştirilen cluster analizinde tek bir fingerprint verdiği belirlenmiştir. U1-U2 primerleri ile yapılan HRM ve Tm analizinde *Kaz. servazzii* izolatlarının türe spesifik bir özellik sergilediği ve elde edilen ortalama Tm değerinin çalışma kapsamında analiz edilen diğer türlerle kıyaslandığında arasındaki farklılığın önemli olduğu gözlemlenmiştir. NL1-LS2 primeri ile elde edilen, HRM eğrileri incelendiğinde ve Tm değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde *Kaz. servazzii* izolatının *T. delbrueckii* suşlarından ayrılmadığı tespit edilmiştir.

Peynir ve kaymak örneklerinden izole edilen *K. lactis* toplam izolat yüzdesinin 2.65'ini oluşturmaktadır. (GTG)5 primeri sonucunda elde edilen fingerprintler ile yapılan cluster analizinde *K. lactis* izolatlarının tek bir cluster oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ancak U1-U2 ve NL1-LS2 primerleri ile elde edilen Tm ortalamaları bakımından kaymaktan izole edilen *K. lactis* suşların ile peynirden izole edilen *K. lactis* suşlarından istatistiki olarak farklı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte U1-U2 primeri ile gerçekleştirilen analizde peynirden izole edilen *K. lactis* suşlarının ortalama Tm değerinin (83.946 °C) diğer türler ile arasındaki farkı önemli bulunurken, yoğurttan izole edilen *K. marxianus* suşlarından istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Kaymaktan izole edilen *K. lactis* suşlarının ise, ortalama Tm değerinin (84.238°C) diğer türlerle arasındaki fark önemli bulunurken kaymaktan izole edilen *K. marxianus* arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur. NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değeri peynirde 82.002 °C, kaymakta 82.358 °C olarak belirlenmiştir. Kaymaktan izole edilen *K. lactis* suşları diğer türlerden önemli derecede farklı bulunurken, peynirden izole edilen *K. lactis* suşları *T. delbruecki*, *Kaz. servazzii* ve kaymaktan izole edilen *D. hansenii* türlerinden istatistiksel olarak ayırlamamıştır.

Tamamı peynir örneklerinden izole edilen ve toplam izolat yüzdesinin 2.06'sını oluşturan *Saturnispora* cinsi için gen bakasından tür seviyesinde bit tanımlama yapılamamıştır. (GTG)5-rep-PCR analizi sonucunda elde edilen fingerprintlerin tek bir cluster oluşturduğu ve HRM ve Tm analizlerinde de spesifik karakterizasyon sergilediği gözlemlenmiştir. *Saturnispora sp.*'in U1-U2 ve NL1-LS2 primeri ile elde edilen Tm değerlerinin tanımlanan diğer türlerle arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur.

Tamamı peynirden izole edilen 3 *C. diversa* izolatının (GTG)5 fingerprintleri ile oluşturulan dendogram incelendiğinde tek bir grup oluşturduğu belirlenmiştir. HRM profilleri incelendiğinde bu türün türe spesifik erime eğrileri oluşturduğu tespit edilmiştir. *C. diversa* izolatlarının U1-U2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değeri 81.134 °C, NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değeri ise 87.124 °C olarak bulunmuştur. U1-U2 primer çifti ile elde edilen Tm değeri, diğer türler ile kıyaslandığında arada ki farklılık önemli bulunurken NL1-LS2 primer çifti ile elde edilen ortalama Tm değerinin *P. membranifaciens* dışındaki diğer tüm türlerle arasındaki fark önemli bulunmuştur.

Kaymaktan izole edilen *Y. lipolytica* izolatlarının fingerprint analizi sonucunda tek bir cluster verdiği, her iki primer çifti ile elde edilen HRM profillerinin ise türe spesifik olduğu gözlemlenmiştir. U1-U2 primerleri ile elde edilen ortalama Tm değeri 87.242°C, NL1-LS2 primerleri ile elde edilen ortalama Tm değeri ise 81.392°C olarak bulunmuştur. Tm değerleri istatistiksel olarak analiz edildiğinde, *Y. lipolytica* izolatlarının Tm değerlerinin diğer türler ile arasındaki farklılık U1-U2 primeri ile önemli bulunurken, NL1-LS2 primeri ile yapılan kıyaslamada peynirden izole edilen *D. hansenii* suşu ile aradaki farklılık önemsiz, diğer türler ile önemli bulunmuştur.

Kaymaktan izole edilen *Cl. lusitaniae* türü toplam izolat yüzdesinin 1.18'ini oluşturmuştur. *Cl. lusitaniae* izolatlarına ait (GTG)5 primeri ile elde edilen fingerprintin ve HRM eğrisinin türe spesifik olduğu gözlemlenmiştir. Ortalama Tm değerleri U1-U2 primeri için 86.703°C, NL1-LS2 primeri için 88.266 °C olarak belirlenmiştir. NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerinin istatistiki analizinde diğer türler ile aradaki farklılık önemli bulunurken, U1-U2 primeri ile gerçekleştirilen Tm analizinde *P. kluyveri* türü ile aradaki farklılık önemsiz bulunmuştur.

Peynir örneklerinden izole edilen *C. sake* izolatlarının tek bir clusterda toplandığı gözlemlenmiştir. Bu izolatların ortalama Tm değerleri U1-U2 primeri için 83.686 °C, NL1-LS2 primeri için 81.606 °C olarak tespit edilmiştir. *C. sake* 'nin her iki primer ile gerçekleştirilen Tm ve HRM analizleri sonucunda diğer türler ile kıyaslandığında türe spesifik karakterizasyon sergilediği tespit edilmiştir.

Zeytin örneğinden izole edilen ve toplam izolat sayısının %0.88'ini oluşturan *Kaz. exigua* suşları gerçekleştirilen cluster analizinde tek bir fingerprint vermiştir. Her iki primer çiftiyle oluşturulan HRM profillerinde *Kaz. exigua* izolatlarının türe spesifik karakterizasyon sergilediği gözlemlenmiştir. U1-U2 primeri ile gerçekleştirilen Tm analizi sonucunda, elde edilen ortalama değerinin (84.455 °C) *T. delbruecki* dışındaki diğer türlerin Tm değerleri ile arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerinin (83.912 °C) ise *Kaz. naganishii* dışında çalışma kapsamında tanımlanan diğer türler ile arasındaki farklılık önemli bulunmuştur.

Bu çalışmada toplam maya-küf sayısı 10^5 - 10^7 kob/g arasında değişen bozulmuş olduğu kabul edilen gıda örnekleri kullanılmıştır. İzolat kodları, örnek türü ve dilüsyon

seviyesini belirtecek şekilde seçildiği için tanımlanan maya türlerinin hangi örnekte hangi seviyeye kadar gelişebildiğini takip etmek mümkün olmuştur. Tanımlanan maya türleri içerisinde; *P. fermentans*, *Y. lipolytica* ve *K. lactis* türlerinin kaymak örneklerinde, *K. marxianus* ve *S. cerevisiae*'nin yoğurt örneklerinde, *P. kluyveri*, *P. membranifaciens* ve *P. anamola*'nın ise zeytin örneklerinde 10^7 kob/g seviyesine kadar gelişme gösterdiği gözlenmiştir. Analiz edilen peynir örneklerinde toplam maya sayısı 10^5 - 10^6 kob/g seviyelerinde bulunmuştur. Peynir örneklerine ait izolatların %32.74'nü oluşturan *D. hansenii*'nin bu üründeki en baskın maya türü olduğu ve bunu toplam izolatların %18.58'ni oluşturan *C. zeylanoides*'in takip ettiği belirlenmiştir. Peynirden izole edilen diğer maya türleri içerisinde, *K. marxianus*, *Kaz. servazzii*, *Kaz. naganishii* ve *C. sake* 'nin de 10^6 kob/g, *T. delbrueckii* ve *K. lactis*'in ise 10^5 kob/g seviyesine kadar gelişebildiği gözlenmiştir.

Piyasadan toplanan peynir örneklerinde maya-küf sayısının 10^6 kob/g'a kadar yükseldiğini gösteren çalışma sonuçları mevcut olup toplam aerob mezofil canlı bakteri sayısının da 1.0×10^8 kob/g'ın üzerinde bulunduğu bu peynirlerin hijyenik kalitesinin kabul edilebilir limitlerin altında olduğu bildirilmiştir [174,175,176]

Peynirlerin maya populasyonunu tanımlamak üzere yapılan çalışmalarda benzer maya türlerinin öne çıktığı gözlenmiş olmakta bu floranın oluşumu üzerinde başlıca; mayaların düşük su aktivitesi, pH ve sıcaklıkta gelişebilmeleri ve yüksek tuz konsantrasyonlarına toleranslı olmaları gibi faktörlerin önemli derecede etkili olduğu bildirilmiştir [60].

Öztürk-Yalçın (2007) tarafından yapılan bir çalışmada beyaz peynirden izole edilen maya türleri fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Çalışma kapsamında analiz edilen 92 maya izolatu içerisinde en baskın türler *D. hansenii* (%32,6), *K. marxianus* (%18,5) ve *Y. lipolytica* (%17,4) olarak tanımlanmıştır. Bu türlerin yanı sıra *Pichia*, *Torulaspora*, *Candida*, *Williopsis*, *Galactomyces* cinslerine ait mayalar ise daha düşük seviyelerde izole edilmiştir. Çalışma kapsamında uygulanan fenotipik yöntemlerin yanlış tanımlamalara neden olduğu PCR'a dayalı geotipik tanımlama yönteminin ise güvenilir sonuçlar verdiği belirtilmiştir [177].

İtalya'nın Puglia bölgesinden temin edilen farklı süt ürünleri ve peynirlerden izole edilen mayaların tanımlanması ve karakterize edilmesi için gerçekleştirilen bir

çalışmada ise 105 maya izolatu tanımlanmıştır. Süt ürünlerinden izole edilen 36 maya türden baskın olanlar; *Trichosporon cutaneum*, *C. catenulata*, *Y. lipolytica*, *C. zeylanoides* ve *C. sake* olarak belirlenmiştir [178].

İzmir’de inek, koyun ve keçi sütünden üretilen çeşitli süt ürünlerinden mayaların izole edilip tanımlandığı bir çalışmada salamura, tulum ve kaşar peynirlerinden fenotipik metotlarla 10 farklı cinse ait toplam 17 tür tanımlanmıştır. Bu türler içerisinde; *D. hansenii* örneklerin %25’inden ve yüksek konsantrasyonlarda (10^5 - 10^9 kob/g) izole edilmiş, *K. lactis*, *S. cerevisiae*, *P. anomala* ve *Y. lipolytica* ise *D. hansenii*’den sonra baskın olan diğer maya türler olarak tanımlanmıştır [179].

Durlu-Özkaya ve ark. (2005) tarafından fenotipik yöntemler kullanılarak yapılan bir çalışmada analiz edilen peynir örnekleri içerisinde baskın olarak *S. cerevisiae* türü tanımlanırken izole edilen diğer maya türlerinin *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. ciferrii*, *C. glabrata* ve *Rhodotorula rubra* olduğu bildirilmiştir [180].

Analiz edilen kaymak örneklerinde toplam maya sayısı 10^6 - 10^7 kob/g aralığında bulunmuştur. Bu örnek grubunda sırasıyla *D. hansenii* (%28.57) ve *P. fermentans* (%22.22) baskın olarak bulunurken, *U. hordei*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *Y. lipolytica*, *Cl. lusitaniae* ise tanımlanan diğer maya türleri olmuştur.

Literatürde kaymaktaki maya popülasyonunu belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmaya rastlanmamış olmakla tereyağında bu amaçla yapılmış çalışmalar olduğu gözlenmiştir. Örneğin Sağdıç ve ark. (2009) tarafından tereyağında bozulmaya neden olan mayaların izole edilmesi ve tanımlanması amacıyla yapılan bir çalışmada, 10 tereyağı örneğinde baskın olarak belirlenen *Candida kefir*, *C. lambica*, *C. sake*, *C. zeylanoides* ve *S. cerevisiae*’nin yanı sıra *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *S. cerevisiae* ve *Zygosaccharomyces* sp. türleri de izole edilmiştir [181].

Bu çalışmada analiz edilen yoğurt örneklerindeki toplam maya sayısının 10^7 kob/g seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Yoğurt örneklerinde *K. marxianus* toplam izolatin %80’ini oluştururken kalanlar da *S. cerevisiae* olarak tanımlanmışlardır. Caggia et al. (2001) tarafından şişmiş ambalajlı, aromalı ve normal yoğurtlardan mayaların izole edilerek, tanımlandığı bir çalışmada analiz edilen 87 izolatta bulunan türlerin çoğu *P. anomala* kalanlar ise *S. cerevisiae* olarak belirlenmiştir. Çalışmada bozulmuş yoğurt

örneklerinin hepsinde maya sayısı yüksek düzeylerde (10^7 kob/g) bulunduğu bildirilmiştir [69].

Farklı süt ürünlerinden izole edilen 513 maya izolatının tanımlanması için morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklere dayanan fenotipik ve RAPD-PCR ve 26S rRNA'nın D1/D2 bölgesinin sekansına dayalı genotipik metotların kullanıldığı bir çalışmada en çok izole edilen maya türleri *D. hansenii*, *Geo. candidum*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica* ve *C. zeylanoides* olarak belirlenmiştir. Fenotipik ve genotipik yöntemler ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, klasik yöntemlere dayalı tanımlamada incelenen izolatların sadece %54 oranında genotipik karakterizasyon ile uyumlu olduğu ortaya koyulmuştur. Bu çalışma sonuçlarına göre süt ürünlerindeki mayaların tanımlanmasında moleküler yöntemlerle tanımlamanın, geleneksel biyokimyasal ve fizyolojik testlerin aksine güvenilir bir yaklaşım olduğu belirtilmiştir [182].

Çalışma kapsamında analiz edilen zeytin örneklerinde toplam maya sayısı 10^6 - 10^7 kob/g seviyelerinde bulunmuştur. Bu örneklerde bulunan maya türleri içerisinde toplam izolat sayısının %30.12'sini oluşturan *P. membranifaciens* baskın tür olmakla birlikte, *Pichia* cinsine ait diğer maya türleri; *P. kluyveri*, *P. anomala*, *P. kudriavzevii* ve *P. fermentans* de tanımlanmıştır.

Zeytinin mikrobiyal popülasyonu üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda salamura edilmiş siyah zeytinden izole edilen maya türleri; *W. anomalus*, *C. boidinii*, *D. etchellsii*, *M. pulcherrima*, *D. hansenii*, *A. pullulans*, *P. membranifaciens*, *C. olivae*, salamura edilmiş yeşil zeytinden izole edilen türler ise, *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *C. diddensiae*, *I. orientalis*, *P. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *P. guilliermondii*, *P. kluyveri* olarak bildirilmiştir [80].

Hurtado et al. (2008, 2009) İspanya'da sofralık zeytinlerden *C. boidinii*, *C. sorsoba*, *C. diddensiae*, *C. membranifaciens*, *K. lactis*, *P. membranifaciens*, *W. anomalus*, *P. kluyveri* ve *Rhodotorula glutinis* türlerini izole etmiştir [183,184]. Silva et al. (2011) ise Portekiz'de salamura zeytinin fermantasyonu sırasında gelişen maya popülasyonunu belirlemek için gerçekleştirdikleri çalışmada baskın olarak *P. membranifaciens*, *P. fermentans*, *S. cerevisiae* ve *C. oleophila* türlerini tanımlamışlardır [185].

Bautista-Gallego et al. (2011) İspanya’da üretilen sofralık yeşil zeytinlerinden izole ettikleri 199 izolatu PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle tanımlamışlardır. Çeşitli zeytin tiplerinden izole edilerek tanımlanan maya türleri içerisinde *C. diddensiae*, *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *C. tropicalis*, *P. galeiformis*, *W. anomalus*, *D. etchellsii*, *C. tropicalis*, *P. galeiformis* ve *K. lactis*’in bulunduğu bildirilmiştir [186].

Meyve suyu ve konsantreleri, badem ezmesi, tuzlanmış ve kurutulmuş etler, zeytin, peynir, şarap, çeşitli içecekler ve soslar gibi çeşitli gıda ürünlerindeki maya popülasyonunu belirlenmesi amacıyla hem fenotipik hem de PCR’a dayalı moleküler yöntemlerin kullanıldığı bir çalışmada, üretim zincirindeki kontaminasyonun erken safhalarda teşhisi için PCR’a dayalı tekniklerin etkin bir araç olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında analiz edilen 450 maya izolatu içerisinde en baskın türler, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *Z. bisporus*, *P. membranifaciens*, *P. kudriavzevii*, *P. fermentans*, *Y. lipolytica* ve *C. pelliculosa* olarak belirlenmiştir [187].

Arias et al. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada portakal suyundan izole edilen 99 maya suşu tanımlamak amacıyla genotipik ve fenotipik yöntemleri karşılaştırmıştır. Bu amaçla 26S rRNA gen bölgesinin dizi analizi, (5.8S-ITS) bölgesinin restriksiyon fragment analizi, klasik yöntemler, RapID Yeast Plus sistem ve API 20C AUX test kitleri olmak üzere beş farklı yöntemle tanımlama yapılmıştır. Tanımlama da en iyi yöntemin 26S rRNA gen bölgesinin dizi analizi olduğu, bunu 5.8S-ITS bölgesinin analizi ve klasik yöntemlerin takip ettiği ve ticari tanımlama kitlerinin ise izolatların sadece % 13’lük kısmını doğru olarak tanımladığını belirtilmiştir [188].

Çalışma kapsamında real-time PCR HRM analizi ile 26S rRNA geninin D1/D2 bölgesinde yer alan U1-U2 ve NL1-LS2 primerleri kullanılmıştır. Bu bölgenin nükleotid dizilerinin heterojenitesi yüksek olup tür seviyesinde bir tanımlamayı mümkün kılmaktadır. Kurtzman ve Robnett (1998) bilinen tüm askomisetik mayalar için D1/D2 bölgesinin sekansını çıkartarak hızlı bir tanımlama için evrensel bir veritabanı oluşturmuşlardır. Böylece bilinmeyen bir türün bu veri bankasındaki bilinen bir türle sekans benzerliği %99 ve üzeri olduğunda bu türün tanımlanabilmesi mümkün olabilmektedir [189].

Sonuç olarak;

- Bu çalışma kapsamında gıdalarda gelişen ve yüksek sayılara ulaşarak bozulmalara neden olan maya türlerinin tanımlanması amacıyla real-time PCR'a dayalı yeni bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. PCR ürünlerinin Tm değerleri ve erime eğrilerinin karşılaştırılmasına dayanan Tm ve HRM analiz yöntemleri, bugüne kadar bazı bakteri türlerinin tanımlanmasında kullanılmış olmakla birlikte mayalarda henüz kullanımına rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma Tm ve HRM analizinin mayaların tanımlanmasında kullandığı ilk çalışmadır.
- Fenotipik yöntemlerin yetersizliği, tekrarlanabilirliğinin düşük olması, zaman alıcı olması ve bazen yanlış tanımlamalara yol açtığı göz önüne alındığında genotipik yöntemlere dayalı bu tekniğin bir mikroorganizma tanılama yöntemi olarak kullanılabilecek hızlı, kolay uygulanabilen bir yöntem olmasının yanı sıra sadece gıdalarda bozulma yapan mayaların değil birçok mikroorganizma grubunun tanımlanmasında da kullanılabilecek potansiyel bir analiz yöntemi olduğu tespit edilmiştir.
- Bu çalışmada Tm ve HRM analizi için değişkenliği yüksek 26S rRNA gen bölgesi üzerinde NL1-LS2 ve U1-U2 bölgeleri hedef alınmıştır. Sonuçta U1-U2 bölgesinin analizi ile çalışma kapsamında toplam tanımlanan 20 maya türünden yalnızca 4 Tm sonuçlarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olmadığı diğer taraftan bütün izolatların türe spesifik HRM eğrileri verdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan NL1-LS2 bölgesinin analizi ile ise 12 maya türünün Tm değerlerinin istatistiki analiz sonuçlarına göre birbirinden farklı olduğu, 16 maya türünün spesifik HRM eğrileri oluşturduğu tespit edilmiştir.
- Bu çalışmada iki farklı primer çifti kullanılarak elde edilen iki farklı DNA bölgesinin Tm ve HRM analizi yapılmıştır. Değişkenliği yüksek daha farklı DNA fragmentleri analiz edilerek ayırım gücünün ve yöntemin etkinliğinin artırılacağı sonucuna varılmıştır.
- Real-time PCR HRM ve Tm analizlerinin gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların karakterizasyonunda başarılı olarak kullanılabilecek alternatif bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Henüz potansiyeli yeni yeni fark edilen bu yöntem yüksek

heterojeniteye sahip birçok DNA fragmentinin eş zamanlı ve kısa sürede analizine imkan sağladığı için yalnızca maya türleri için değil diğer mikroorganizma türlerinin karakterizasyonunda da başarılı bir şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir.

- Real-time PCR HRM analizi yapılırken, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar almak için, reaksiyonlarda kullanılan DNA'ların saflığının ve kalitesinin yüksek olmasının yanında hazırlanan reaksiyon karışımının da standardize edilmesi oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Loureiro, V., Querol, A., 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. **Trends in Food Science & Technology**, **10**, 356-365.
2. Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S., 2011. Geleneksel gıdalarda bulunan bozulma etkeni mayalar. **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi**, **9**, 18-21.
3. Deak, T., 1991. Foodborne yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, **36**, 179–278.
4. Tudor, E., Board, R., 1993. Food spoilage yeasts, pp. 435–516. *In*: (Eds: A. Rose, J. Harrison), *The Yeasts*, 2nd ed. Yeast Technology, vol. 5. Academic Press, London.
5. Fleet, G.H. 1992. Spoilage yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, **12**, 1–44.
6. Querol, A., Fleet, G., 2006. Yeasts in Food and Beverages. Springer, Berlin, Germany. 335-379 pp.
7. Moon, N.J., 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, **55**, 453.
8. Thomas, D.S., Davenport, R., 1985. *Zygosaccharomyces bailii*: A profile of characteristics and spoilage activities. **Food Microbiology**, **2**, 157-169.
9. Deák, D., 2008. Handbook Of Food Spoilage Yeasts, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton - New York, pp:221-245.
10. Ma, H., Shieh, K.J., Chen, G., Qiao, Xt., Chuang, M.Y., 2006. Application of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), **The Journal of American Science**, **2**, 1–15.
11. Kubista, M., Andrade M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., 2006. The real-time polymerase chain reaction, **Molecular Aspects of Medicine**, **27**, 95-125.
12. Dorak, M.T., 2006. Real-time PCR, School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne, pp: 39 – 62.

13. Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of dna melting curves during the polymerase chain reaction, **Analytical Biochemistry**, **245**, 154-160.
14. Montgomery, J., Wittwer, J.T., Palais, R., Zhou, R., 2007. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis, **Nature Protocols**, **2**, 59-66.
15. Porcellato, D., Grønnevik, H., Rudi, K., Narvhus, J., Skeie, SB., 2012. Rapid lactic acid bacteria identification in dairy products by high-resolution melt analysis of DGGE bands. **Letters in Applied Microbiology**, **54**, 344–51.
16. Corbett Life Science, Eylül 2006. High resolution melt assay design and analysis, Corbett Research, Avustralya
17. Bautista, D. A., 2014. Problems Caused by Bacteria, pp. 465-470. *In: Encyclopedia of Food Microbiology* (Eds: A. C. Batt, M. L. Tortorello), Academic Press, UK.
18. Aksan, E., 2010. Gıdaların Mikrobiyal Bozulması, sf. 82-123. *In: Gıda Mikrobiyolojisi* (Eds: O. Erkman), Efil Yayınevi, Ankara
19. Fleet, G. H., 1992. Yeast Spoilage of Foods and Beverages, pp. 53-64. *In: The Yeasts: A Taxonomic Study* (Eds: C. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout). Elsevier, Landon.
20. Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G., Çakır, İ., 2008. Mikrobiyoloji. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:36, Bizim Büro Basımevi, Ankara.
21. Erkmen, O., Bozoğlu, F., 2008. Food Mikrobiyology I. İlke yayınevi, Ankara.
22. Romano, P., Capece, A., Jespersen, L., 2006. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts, pp. 13–53. *In: Yeasts in Food and Beverages*, (Eds: A. Querol and G.H. Fleet). Springer-Verlag, Berlin.
23. Phaff, H.J., Miller, M.W., Mrak, E.M., 1966. The Live of Yeasts, Harward University Press, Cambridge, 186 p.
24. Deak, T., 1995. Methods for the rapid dedection and identification of yeast in food, **Trends in Food Science Technology**, **6**, 287- 292.

25. Jakobsen, M., Norvhus, J., 1996. Yeast and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products, **International Dairy Journal**, **6**, 755-768.
26. Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J.M., 2004. New PCR based methods for yeast identification, **Journal of Applied Microbiology**, **97**, 792-801.
27. Gürsoy, O., Kınık, Ö., 2002. Probiyotik bir maya: *Saccharomyces boulardii*. **Gıda Teknolojisi**, **6**, 58-63.
28. Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J., 1999. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. **Food Control**, **10**, 27–34.
29. Fleet, G.H., 2006. *Saccharomyces* and related genera. pp. 306–335. *In: Food Spoilage Microorganisms* (Eds: C. de W. Blackburn). Woodhead Publishing, Cambridge.
30. Guerzoni, M.E., Lancotti, R., Marchetti, R., 1993. Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. **International Journal of Food Microbiology**, **17**, 329–341.
31. Kurtzman, C.P., and S.A. James. 2006. *Zygosaccharomyces* and related genera, pp. 289–305. *In: Food Spoilage Microorganisms* (Eds: C. de W. Blackburn), Woodhead Publishing, Cambridge
32. Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M.T., Querol A., 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. **International Journal of Food Microbiology**, **114**, 234–242.
33. Steels, H., James, S.A., Roberts, I.N., Stratford, M., 1999. *Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature. **Journal of Applied Microbiology**, **87**, 520–527.
34. Davenport, R.R., 1980. Cold-tolerant yeasts and yeast-like organisms, pp. 215–230. *In: Biology and Activities of Yeasts* (Eds: F.A. Skinner, S.M. Passmore and R.R. Davenport). Academic Press, London.

35. Walker, H.W., 1977. Spoilage of food by yeasts. **Food Technology**, **65**, 57–61.
36. Deák, T., Beuchat, L.R., 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Raton, pp. 210.
37. Papouskova, K., H., Sychrova, 2007. The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. **International Journal of Food Microbiology**, **118**, 1–7.
38. Lages, F., Silva-Gracia M., Lucas, C., 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, **145**, 2577–2585.
39. Tokuoka, K., 1993. Sugar and salt-tolerant yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, **74**, 101–110.
40. van Eck, J.H., Prior B.A., Brandt, E.V., 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. **Journal of General Microbiology**, **139**, 1047–1054.
41. Breuer, U., Harms, H., 2006. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, **23**, 415–437.
42. Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren A., Gunde-Cimerman N., 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, **244**, 229–234.
43. Deák, T., 2006. Environmental factors influencing yeasts. pp. 155–174. In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (Eds: C. A. Rosa and G. Peter). Springer-Verlag, Berlin.
44. Battey, A.S., Duffy, S., Schaffner, D.W., 2002. Modelling yeast spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, **68**, 1901–1906.
45. Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J., 2000. Synergistic effect of sodium chloride, temperature and pH on growth of a cocktail of spoilage yeasts: a research note. **Food Microbiology**, **17**, 47–52.

46. Evans, D.G., Everis, L.K., Betts, G.P., 2004. Use of survival analysis and classification and regression trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeasts as affected by alcohol, pH, sucrose, sorbate and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, **92**, 55–67.
47. Praphailong, W., Fleet, G.H., 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. **Food Microbiology**, **14**, 459–468.
48. Heard, G.M., 1999. Novel yeasts in winemaking – looking to the future. **Food Australia**, **51**, 347–352.
49. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. **International Journal of Food Microbiology**, **86**, 169–180.
50. Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., 2006. Yeast autolysis in sparkling wine – a review. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, **12**, 119–217.
51. Hernawan, T., Fleet, G.H., 1995. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. **Journal of Industrial Microbiology**, **14**, 440–450.
52. Zhao, J., Fleet, G.H., 2005. Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **32**, 415–423.
53. Buzzini, P., Martini, A., 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, **93**, 1020–1025.
54. Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., Todd, B.E.N., 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, **3**, 2–8.
55. Roostita, R., Fleet, G.H., 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. **International Journal of Food Microbiology**, **31**, 205–219.

56. Strauss, M.C.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Resemburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, **91**, 182–190.
57. Radler, F., 1993. Yeasts – metabolism of organic acids, pp. 165–182. *In: Wine Microbiology and Biotechnology*, (Ed: G.H. Fleet). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland,
58. Du Toit, M., and I.S. Pretorius. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – a review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, **21**, 74–96.
59. Sweigers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, **11**, 139–173.
60. Fleet, G.H., 1990. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, **68**, 199–211.
61. Roostita, R., Fleet, G.H., 1999. Growth of yeasts isolated from cheeses on organic acids in the presence of sodium chloride. **Food Technology and Biotechnology**, **37**, 73–79.
62. Buzzini, P., Romano, S., Turchetti, B., Vaughan, A., Pagnoni, U.M., Davoli, P., 2005. Production of volatile organic sulfur compounds (VOSCs) by basidiomycetous yeasts. **FEMS Yeast Research**, **5**, 379–385.
63. Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leao, C., 2002. Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. **Journal of Food Protection**, **65**, 1033–1037.
64. Spiropoulos, A.J., Tanaka, J., Flerianos, I., Bisson, L., 2000. Characterization of hydrogen sulfide in commercial and natural wine isolate of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, **51**, 233–248.
65. Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press, Sydney, Australia 413 pp.
66. Stratford, M., Hofman, P.D., Cole, M.B., 2000. Fruit juices, fruit drinks and soft drinks, pp. 836–869. *In: The Microbiological Safety and Quality of Food*.

Aspen(Eds: B.M. Lund, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould), Gaithersburg, MD, USA.

67. Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, **86**, 23– 50.
68. Ingram, M., 1949. Fermentation in concentrated orange juice. **Food Manufacture**, **24**, 77–81
69. Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A., Giudici, P., 2001. Identification of *Pichia anomala* isolated from yogurt by RFLP of the ITS region. **International Journal of Food Microbiology**, **71**, 71–73.
70. Vasdinyei, R., Deák, T., 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. **International Journal of Food Microbiology**, **86**, 123–130.
71. Petersen, K. M., Møller, P. L., Jespersen, L., 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, **69**, 11–24.
72. Valdés-Stauber, N., Scherer, S., Seiler, H., 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, **34**, 115–119.
73. Petersen, K. M., Westall, S., Jespersen, L., 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surface-ripened cheeses. **Journal of Dairy Science**, **85**, 478-486.
74. Carreira, A.L., Paloma, V. Louriero. 1998. Pigment producing yeasts involved in the brown, surface discoloration of ewe's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, **41**, 223–230.
75. Addis, E., Fleet, G.H., Cox, J.M., Kolak, D., Leung, T., 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, **69**, 1–2.

76. Romano, P., Grazia, L., Suzzi, G., Giudici, P., 1989. The yeasts in cheese-making. **Yeast** 5 (Special Issue) pp. 151–155.
77. Westall, S., Filtenborg, O., 1998. Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. **Food Microbiology**, **15**, 243–249.
78. Tilbury, R. H., Davis, J. G., French, S., Imrie, F. K. E., Campbell-Lent, K., Orbell, C., 1974. Taxonomy of yeasts in yoghurts and other dairy products, pp. 265–266. *In: Proceed. 4th Int. Symp. Yeasts, part I.* (eds: Klaushofer, H. and Sleytr, V. B.) Hochschule für Bodenkultur, Vienna.
79. Sagdic, O., Ozturk, I., Bayram, O., Kesmen, Z., Yilmaz, M. T., 2010. Characterization of butter spoiling yeasts and their inhibition by some spices. **Journal of Food Science**, **75**, 597-603.
80. Arroyo-López, F.N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., Garrido-Fernández, A., 2012. Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms?. **International Journal of Food Microbiology**, **160**, 42–49.
81. Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., Spencer-Martins, I., 1992. Characterization of the yeast population in olive brines. **Letters in Applied Microbiology**, **14**, 279–283.
82. Kotzekidu, P., 1997. Identification of yeasts from black olives in rapid ystem microtitre plates. **Food Microbiology**, **14**, 609–616.
83. Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D., 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, **108**, 130–135.
84. Dillon, V. M., 1998. Yeasts and moulds associated with meat and meat products. pp. 85–117. *In: The Microbiology of Meat and Poultry* (eds: Davies, A. and Board, R.). Blackie Acad. Profess., London.
85. Dillon, V. M., Board, R. G., 1991. Yeasts associated with red meats. **Journal of Applied Bacteriology**, **71**, 93–108.

86. Hinton, A., Cason J.A., Ingram, K.D., 2002. Enumeration and identification of yeasts associated with commercial poultry processing and spoilage of refrigerated broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, **65**, 993–998.
87. Ismail, S.A., Deák, T., El-Rahman, H.A., Yassien, M.A., Beuchat, L.R., 2000. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. **International Journal of Food Microbiology**, **62**, 113–121.
88. Andrade, M.J., Rodriguez, M., Sanchez, B., Aranda, E., Cordoba, J.J., 2006. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, **107**, 48–58.
89. Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., 2006. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. **FEMS Yeast Research**, **6**, 692–701.
90. Bonjean, B., Guillaume, L.D., 2003. Yeasts in bread and baking products, pp. 289–307. *In: Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects*, (Eds T. Boekhout and V. Robert). B. Behr's Verlag, Hamburg.
91. Legan, J.D., Voysey, P.A., 1991. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. **Journal of Applied Bacteriology**, **70**, 361–371.
92. Magan, N., Aldred, D., 2006. Managing microbial spoilage in cereal and baking products, pp. 195–212. *In: Food Spoilage Microorganisms*, (Eds: C. de W. Blackburn). Woodhead Publishing, Cambridge.
93. Fleet, G.H., 1998. The microbiology of alcoholic beverages, pp. 217–262. *In: The Microbiology of Fermented Foods*, (Eds: B.J. Wood). 2nd edn. Vol. 1. Blackie Academic and Professional, London.
94. Thomas, D.S., 1993. Yeasts as Spoilage Organisms in Beverages, pp. 517–561 *In: The Yeasts*, Vol. 5, 2nd edition (Eds: Rose, A.H. and Harrison, J.S.), Academic Press.
95. Dufour, J.P., Verstrepen, K., Derdelinckx, G., 2003. Brewing yeasts, pp. 347–388. *In: Yeasts in Food*, (Eds: T. Boekhout and V. Robert). Beneficial and Detrimental Aspects. Behr's Verlag, Hamburg.

96. Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, **33**, 139–155.
97. Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W., de Baros-Lopes, M.A., 2007. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. **FEMS Yeast Research**, **7**, 471–481.
98. Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2006. *Dekkera/Brettanomyces* spp., pp. 354–400. In Food Spoilage Microorganisms, (eds: C. de W. Blackburn). Woodhead Publishing, Cambridge.
99. Silva, P., Cardoso, H., Geros, H., 2004. Studies on the wine spoilage of *Brettanomyces/ Dekkera* spp., **American Journal of Enology and Viticulture**, **55**, 65–71.
100. James, S.A., Stratford, M., 2003. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*, pp. 171–187. In: Yeasts in Food (Eds: T. Boekhout and V. Robert), Beneficial and Detrimental Aspects. Behr's Verlag, Hamburg.
101. Stratford, M., James, S.A., 2003. Non-alcoholic beverages and yeasts, pp. 309–345. In: Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects, (Eds T. Boekhout and V. Robert). Behr's Verlag, Hamburg.
102. Van Dijken, J. P., Van Den Bosch, J. J., Hermans, L., de Miranda, R., Scheffers, W. A., 1986. Alcoholic fermentation by “non-fermentative” yeasts. **Yeast**, **2**, 123–127.
103. Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.) 1984. The Yeast, a Taxonomic Study, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.
104. Kurtzman, C. P., Fell, J.W., 1998. The Yeasts: A Taxonomic Study, 4th ed. Elsevier, Amsterdam.
105. Yarrow, D., 1998. Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts' in The Yeasts. A Taxonomic Study, 4th edition (Eds: C.P. Kurtzman, J.W. Fell), Elsevier
106. Lin, C. C. S., Fung, D. Y. C., 1987. Comparative biochemical reactions and identification of food yeast by the conventional methods, Fung's minimethod,

- Minitex, and the Automicrobic System. **Critical Reviews in Biotechnology**, 7, 1–16.
107. Seiler, H., Busse, M., 1988. Identifizierung von Hefen mit Mikrotiterplatten. **Forum Mikrobiology**, 11, 505–509.
108. Heard, G. M., Fleet, G. H., 1990. A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. **Journal of Applied Bacteriology**, 68, 447–451.
109. Land, G. A., McGinnis, M. R., Salkin, I. F., 1991. Evaluation of commercial kits and systems for the rapid identification and biotyping of yeasts, pp. 353–366. *In: Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology* (Eds. A. Vaheri, R. C. Tilton, A. Balows). Springer Verlag, Berlin.
110. Stager, C. E., Davies, J. R., 1992. Automated systems for identification of microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, 5, 302–327.
111. Paugham, A., Benchetrit, M., Fiarce, A., Tourte-Schaefer, C., Dupouy-Camet, J., 1999. Comparison of four commercialized biochemical systems for clinical yeast identification by colour-producing reactions. **Medical Mycology**, 37, 11–17.
112. Verweij, P.E., Breuker, I. M., Rijs, A.J.M.M., Meis, J.F.G.M., 1999. Comparative Study Of Seven Commercial Yeast Identification Systems. **Journal of Clinical Pathology**, 52, 271–273.
113. Deak, T., 1995. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. **Trends in Food Science & Technology**, 6, 287–292.
114. Boekhout, T., Renting, M., Scheffers, W.A., Bosboom, R., 1993. Antonie van Leeuwenhoek, **Journal of Microbiology**, 63, 157–163.
115. Vaughan-Martini, A., Martini, A., Cardinali, G., 1993. Antonie van Leeuwenhoek **Journal of Microbiology**, 63, 145–156.
116. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Schaf, S. J., Higuchi, R., Hoprn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239, 487–491.
117. Aran, N., 2010. Gıda Biyoteknolojisi. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 494 s.

- 118.Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres.
- 119.Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., 2006. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, **27**, 95-125.
- 120.Temizkan G., Arda N., 1999. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Biyogem yayınları Nobel tıp kitabevleri, İstanbul, s. 56-57.
- 121.Power, E. G. M., 1996. RAPD typing in microbiology—a technical review. **Journal of Hospital Infection**, **34**, 247–265.
- 122.White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Eds: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. I. Sninsky, T. J. White). Academic Press, San Diego, CA.
- 123.López, V., Querol, A., Ramón, D., Fernández-Espinar, M. T., 2001. A simplified procedure to analyse mtDNA from industrial yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, **68**, 75–81.
- 124.Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C., Cocolin, L., 2000. Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). **International Journal of Food Microbiology**, **58**, 117–121.
- 125.Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M. T., Caruso, M., Andrighetto, C., Gardini, F., 2000. Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water-buffalo Mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, **88**, 117–123.
- 126.Romano, A., Casaregola, S., Torre, P., Gaillardin, C., 1996. Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. **Systematic and Applied Microbiology**, **19**, 255–264.
- 127.Hayford, A. E., Jespersen, L., 1999. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation,

- chromosome polymorphism, PCR and MAL genotyping. **Journal of Applied Microbiology**, **86**, 284–294.
- 128.Tornai-Lehocski, J., Dlauchy, D., 2000. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. **International Journal of Food Microbiology**, **62**, 37–45.
- 129.Deák, T., Chen, J., Beuchat, L. R., 2000. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**, 4340–4344.
- 130.Mitrakul, C. M., Henick-Kling, T., Egli, C. M., 1999. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. **Food Microbiology**, **16**, 3–14.
- 131.Cadez N., Raspor P., de Cock A.W., Boekhout T., Smith M.T., 2002. Molecular identification and genetic diversity with in species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. **FEMS Yeast Research**, **1**, 279–280
- 132.Quesada, M. P., Cenis, J. L., 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR in the characterization of wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, **46**, 204–208.
- 133.Martorell, P., Fernández-Espinar M.T., Querol A., 2005. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. **International Journal of Food Microbiology**, **101**, 293–302.
- 134.Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., Lombardi, A., 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. **Letters in Applied Microbiology**, **30**, 5–9.
- 135.Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., Parish, M. E., 2002. Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. **Applied and Environmental Microbiology**, **98**, 1955–1961.

- 136.Gullo, M., Romano, A. D., Pulvirenti, A., Giudici, P., 2003. *Candida humilis*—dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. **International Journal of Food Microbiology**, **80**, 55–59.
- 137.Jespersen, L., Nielsen, D. S., Honholt, S., Jakobsen, M., 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, **5**, 441–453.
- 138.Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., Comi, G., 2004. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. **Applied and Environmental Microbiology**, **70**, 1347–1355.
- 139.Phister, T.G., Rawsthorne, H., Joseph, C.M., Mills, D.A., 2007. Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Hanseniaspora* species from wine and juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, **58**, 229–233.
- 140.Phister, T.G., Mills, D.A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. **Applied and Environmental Microbiology**, **69**, 7430–7434.
- 141.Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., Torriani, S., 2003. Development of reverse transcription (RT)- PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. **Applied and Environmental Microbiology**, **69**, 4116–4122
- 142.Casey, G.D., Dobson, A.D., 2004. Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice – a preliminary study. **International Journal of Food Microbiology**, **91**, 327–335.
- 143.Cai, J., Roberts, I.N., Collins, M.D., 1996. Phylogenetic relationship among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **4**, 542– 549.
- 144.Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal

- transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **49**, 329–337.
- 145.Linares, D.M., del Rio, B., Redruello, B., Fernandez, M., Martin, M.C., Ladero, V., Alvarez, M.A., 2014. The use of qPCR-based methods to identify and quantify food spoilage microorganisms, pp 313-334. *In: Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques* (eds: Ioannis S. Boziaris), CRC Press, Boca Raton.
- 146.Kubista, M., Stahlberg, A., Bar, T., 2001. Light-up probe based real-time Q-PCR, pp. 53–58. *In: Genomics and Proteomics Technologies* (Eds: R. Raghavachari, W. Tan). Proceedings of SPIE, 4264.
- 147.Martínez, N., Martín, M.C., Herrero, A., Fernández, M., Álvarez M.A., Ladero, V., 2011. qPCR as a powerful tool for microbiol food spoilage quantification: Significance for food quality. **Trends Food Science and Technology**, **22**, 367–376.
- 148.Logan, J., Edwards K., Saunders, N., 2009. Real-Time PCR: Current Technology and Applications (1st ed.). Caister Academic Press. Norfolk, UK.
- 149.Kuzpınar, A., 2007. High resolution melting curve (HRM) analiz yönteminin delesyon tipi mutasyonların saptanmasında kullanımı. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans, Ankara, 51s.
- 150.Mustapha, A., P., Singh, 2014. Recent developments in molecular-based food-borne pathogen detection In: *Microbial Food Safety and Preservation Techniques*. (Eds: V. Ravishankar Rai, Jamuna A. Bai), CRC Press, pp.143-157.
- 151.Druml, B., Cichna-Markl, M., 2014. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. **Food Chemistry**, **158**, 245–254.
- 152.Sümer, H., 2008. Nokta Mutasyonlarının Saptanmasında Yüksek Çözünürlüklü Erime Tekniğinin Verim ve Hassasiyetinin Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans, Ankara, 71 s.

153. Reed, G. H., Kent, J. O., Wittwer, C. T., 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, **8**, 597–608.
154. Garritano S., et al., 2009. Determining the effectiveness of high resolution melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. **BMC Genetics**, **10**, 5.
155. Cosa, G., Focsaneanu, K.-S., McLean, J. R. N., McNamee, J. P., Scaiano, J. C., 2001. Photophysical properties of fluorescent DNAdyes bound to Single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. **Photochemistry and Photobiology**, **73**, 585–599.
156. White, H., Potts, G., 2006. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of RotorGene 6000 (Corbett Life Science), HR1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). (Rapor No: NGRLW_HRM_1.0). United Kingdom, National Genetics Reference Laboratory (Wessex).
157. Vossen, R.H.A.M., Aten, E., Roos, A., Den Dunnen, J.T., 2009. High-resolution melting analysis (HRMA) – More than just sequence variant screening. **Human Mutation**, **30**, 860–866.
158. Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., Tsiftaris, A., 2013. High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in pure water buffalo mozzarella and other buffalo dairy products. **International Dairy Journal**, **28**, 32–35.
159. Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A., Madesis, P., Tsiftaris, A., 2013. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. **Food Chemistry**, **141**, 835–840
160. Mackay, J. F., Wright, C. D., Bonfiglioli, R. G., 2008. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: Application to the verification of grapevine and olive cultivars. **Plant Methods**, **4**, 8.

161. Ajitkumar, P., Barkema, H. W., De Buck, J., 2012. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16s rdna sequences. **Veterinary Microbiology**, **155**, 332–340.
162. Yetimhan A.E., 2012. Sirke Mikroflorasındaki Asetik Asit bakterilerinin Moleküler Teknikler ile Tanımlanması. Erü Fen Bilimleri Enstitüsü.Yüksek Lisans Tezi. s. 78.
163. Kesmen, Z., Yarımçam, B., Aslan, H., Özbekar, E., Yetim, H., 2014. Application of different molecular techniques for characterization of catalase-positive cocci isolated from sucuk. **Journal of Food Science**, **79**, Nr. 2.
164. Mandviwala, T., Shinde, R., Kalra, A., Sobel, J. D., Akins, R. A., 2010. High-throughput identification and quantification of candida species using high resolution derivative melt analysis of panfungal amplicons. **Journal of Molecular Diagnostics**, **12**, 91-101.
165. Gago, S., Zaragoza, I.C., Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., Buitrago, K.J., 2011. High-resolution melting analysis for identification of the *cryptococcus neoformans-cryptococcus gattii* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, **49**, 3663-3666
166. Cheng, J.-C., C.-L. Huang, C.-C. Lin et al. 2006. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR. **Clinical Chemistry**, **52**, 1997–2004.
167. Jin, D., Luo, Y., Zhang, Z., Fang, W., Ye, J., Wu, F., et al. 2012. Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis. **FEMS Microbiology Letters**, **330**, 72–80.
168. National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
169. Reys, A., 1993. Bacterial surface-ripened cheeses, pp. 137–172, *In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, (eds: P. F. Fox). Chapman and Hall, London, UK.
170. Martin, N., C. Berger, C. Le Du, and H. E. Spinnler. 2001. Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. **Journal of Dairy Science**, **84**, 2125–2135.

- 171.Arfi, K., Spinnler, H. E., Tache, R., Bonnarme, P., 2002. Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **58**, 503–510.
- 172.Arfi, K., Leclercq-Perlat, M. N., Spinnler, H. E., Bonnarme, P., 2005. Importance of curd-neutralising yeasts on the aromatic potential of *Brevibacterium linens* during cheese ripening. **International Dairy Journal**, **15**, 883–891.
- 173.Leclercq-Perlat, M. N., Corrieu, G., Spinnler, H. E., 2004. Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Dairy Science**, **87**, 1545–1550.
- 174.Sert, S., Kıvanç, M., 1984. Erzurum piyasasında taze olarak tüketime sunulan beyaz peynirlerin kaliteleri üzerinde bir araştırma, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayını, **Ziraat Dergisi** **15**, 3/4, 79-89.
- 175.Dığrak, M., Yılmaz, Ö., Çelik, S., Özçelik, S., 1996. Elazığ'da satışa sunulan taze beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesi ve yağ asitleri analizi, **Turkish Journal of Biology**, 221-230.
- 176.Uğur, A., 2001. Muğla halk pazarında satışa sunulan ev yapımı peynirlerin mikrobiyolojik özellikleri. **Ekoloji Çevre Dergisi**, **10**: 40, 3-8.
- 177.Öztürk-Yalçın, H.T., 2007. Beyaz Peynirlerde Bozulmaya Neden Olan *Yarrowia lipolytica* ve *Debaryomyces hansenii*'nin Fenotipik ve Genotipik İdentifikasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir, 207 s.
- 178.Corbo, M. R., Lanciotti, R., Albenzio, M. Sinigaglia, M., 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. **International Journal of Food Microbiology**, **69**, 147–152.
- 179.Kavas, G., Kinik, O., Uysal, H., Kılıç, S., Celikel, N., Akbulut, N., 2006. Characterisation of Yeasts Isolated from Artisanal Turkish Dairy Products. **International Journal of Dairy Sciences**, **1**, 44-50.

- 180.Durlu-Özkaya, F., Karabıçak, N., Kayalı, R., Esen, B., 2005. Inhibition of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses by *Lactobacillus* spp., **International Journal of Dairy Technology**, **58**, 111-114.
- 181.Sagdic, O., Ozturk, I., Bayram, O., Yetim, H., 2009. The identification and isolation of yeasts from spoilage butter in Turkey. **Scientific Works of the University of Food Technologies – Plovdiv**, **56**, 638-642.
- 182.Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H., 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, **23**, 341–350.
- 183.Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of Aberquina table olives. **Food Research International**, **41**, 738–744.
- 184.Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N., 2009. Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives. **Food Microbiology**, **26**, 827–833.
- 185.Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C.M., Peres, C., Xavier-Malcata, F., 2011. Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behaviour. **LWT-Food Science and Technology**, **44**, 1349–1354.
- 186.Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N., 2011. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. **International Journal of Food Microbiology**, **147**, 89–96.
- 187.Loureiro, V., 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. **Food Research International**, **33**, 247-256.
- 188.Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., 2002. Parish, M. E., Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. **Applied And Environmental Microbiology**, **68**, **4**, 1955–1961.

189. Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, 73, 331–371.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mine ERDEM

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 13 Şubat 1989, Kayseri

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: 05374458225

email: e.minerdem@hotmail.com

Adres: Sivas cad., Yıldırım Beyazıt mah., Özlem sit. 224/16, 38030, Melikgazi, Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü	-
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü	2012
Lise	Kayseri Lisesi	2007

YABANCI DİL

İngilizce