

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GAZİANTEP’TE BAZI SÜT ÜRÜNLERİNDE
BOZULMAYA NEDEN OLAN MAYALARDAN
EKSTRASELÜLER LİPAZ ENZİMİ ARANMASI VE
LİPAZ AKTİVİTESİNE SAHİP SUŞLARIN GENOTİPİK
İDENTİFİKASYONU**

BIYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMİH TOKAK

KASIM 2016

KASIM 2016

Yüksek Lisans Biyoloji Bölümü

SEMİH TOKAK

**Gaziantep'te Bazı Süt Ürünlerinde Bozulmaya Neden Olan
Mayalardan Ekstraselüler Lipaz Enzimi Aranması Ve Lipaz
Aktivitesine Sahip Suşların Genotipik İdentifikasyonu**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Semih TOKAK

Kasım 2016

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Gaziantep’te Bazı Süt Ürünlerinde Bozulmaya Neden Olan Mayalardan
Ekstraselüler Lipaz Enzimi Aranması ve Lipaz Aktivitesine Sahip Suşların
Genotipik İdentifikasyonu

Öğrencinin, Adı Soyadı: Semih TOKAK

Tez Savunma Tarihi: 15.11.2016

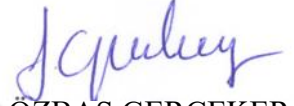
Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Ahmet Necmeddin YAZICI

FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.



Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof. Dr. Ayşen BAYRAM

Doç. Dr. Ayşegül İYİDOĞAN

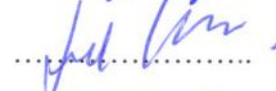
Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin TEKİN

İmzası









© 2016 [Semih TOKAK]

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Semih TOKAK

ABSTRACT

DETECTION OF EXTRACELLULAR LIPASES AND GENOTYPIC IDENTIFICATION FROM YEAST CAUSING TO SPOILAGE OF SOME DAIRY PRODUCTS PRODUCED IN GAZIANTEP

TOKAK, Semih

M.Sc. in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ibrahim Halil KILIC

November 2016, 79 page

Yeasts are usually detected in high numbers in dairy products reflecting a good adaptation to a substrate rich on proteins, lipids, sugars and organic acids. Wide distribution of yeasts is a consequence of proteolytic and lipolytic activity. In this study, our aim is to identify the yeast strains producing potential lipases and offer an alternative source to produce lipases by putting them into industrial microbiology. For this purpose, it was dilute of dairy products (yoghurt, cream, butter, curd cheese, Antep cheese) produced in Gaziantep, Turkey. Due to the isolation of yeasts stemming spoilage from diluted samples, it was plated TGYCA (Tryptone Glucose Yeast Extract Chloramphenicol Agar) medium and incubated during 3-5 days at 30°C. After incubation, in order to obtain the pure culture of yeast isolates having apparent different morphologies (color, shape and size), by taking TGYCA medium it was incubated during 3-5 days at 30°C. In order to detect the lipase enzyme, it was plated 66 isolates into PDA (Potato Dextrose Agar) medium containing tributyrin. Plated strains were incubated during 5-7 days at 30°C. At the end of the incubation, strains seemed clear zone around colonies were regarded as positive strains in terms of lipase production. 20 strain accepted as positive were described at the molecular level. Among the 20 strain, the most frequently occurring yeasts belonged to the species *Kluyveromyces marxianus* (40%), *Candida intermedia* (40%), *Pichia fermentans* (10%), *Yarrowia lipolytica* (5%), *Kluyveromyces lactis* (5%).

Keywords: Spoilage yeasts, extracellular lipase, dairy products

ÖZET

GAZİANTEP’TE BAZI SÜT ÜRÜNLERİNDE BOZULMAYA NEDEN OLAN MAYALARDAN EKSTRASELÜLER LİPAZ ENZİMİ ARANMASI VE LİPAZ AKTİVİTESİNE SAHİP SUŞLARIN GENOTİPİK İDENTİFİKASYONU

TOKAK, Semih
Yüksek lisans tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Danışmanı: Doç.Dr. İbrahim Halil KILIÇ
Kasım 2016, 79 Sayfa

Mayalar genellikle süt ürünlerinde yüksek miktarda bulunurlar; bu da onların protein, lipid, şeker ve organik asitlerce zengin substratlara iyi bir şekilde adapte olabilmeye yeteneklerini gösterir. Mayaların süt ürünlerinde geniş bir dağılıma sahip olmaları proteolitik ve lipolitik aktivitelerinin bir sonucudur. Bu çalışmadaki amacımız potansiyel lipaz üretici maya suşlarını tanımlayıp bu suşları endüstriyel mikrobiyolojinin hizmetine sunarak lipaz üretimine alternatif bir kaynak göstermektir. Bu amaçla Gaziantep ilinde üretilen süt ürünleri (Yoğurt, kaymak, tereyağı, lor peyniri, antep peyniri) nin dilüsyonu yapılmış ve dilüsyonu yapılan örneklerden bozulma etkeni mayaların izolasyonu için TGYCA (Trypton Glikoz Yeast Ekstrakt Kloramfenikol Agar) besiyerine ekim yapılmış 30 °C de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra belirgin farklı morfolojiye (renk, şekil ve boyut) sahip maya izolatlarının saf kültürlerini elde edebilmek için kloramfenikol içeren TGYCA ortamına aseptik koşullarda alınarak 30 °C de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Lipaz enzim taranması için Tributirin içeren PDA (Potato Dextrose Agar) besiyerine 66 izolatın ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan suşlar 5-7 gün 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloni çevresinde şeffaf zon görülen suşlar lipaz üretimi açısından pozitif suş olarak kabul edilmiştir. Pozitif olarak kabul edilen 20 suş moleküler düzeyde tanımlanmıştır. Bu suşlar arasında, en sık karşılaşılan maya türlerinin *Kluyveromyces marxianus* (%40), *Candida intermedia* (%40), *Pichia fermentans* (%10), *Yarrowia lipolytica* (%5), *Kluyveromyces lactis* (%5)’e ait olduğu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Bozulma etkeni mayalar, ekstraselüler lipaz, süt ürünleri



Çok kıymetli aileme.....

TEŞEKKÜR

Tez alıőmamn her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gürdüğüm çalıőmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında emeği geçen tez danıőmanım sayın Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca eğitim sürecim boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Doç. Dr. Hüsniye Tansel YALÇIN hocama sonsuz teőekkürlerimi sunuyorum. Yardımlarından dolayı arkadaşlarım Ebru AKDOĞAN ve Hamide Dilara TÜTER'e ve son olarak hayatımın her anında yanımda olarak beni destekleyen, hayatımın en önemlileri ve en değerlileri aileme ve niőanlıma sonsuz teşekkür ederim.

Semih TOKAK

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ABSTRACT	v
ÖZET	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
RESİMLER LİSTESİ	xiv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. Giriş	1
BÖLÜM 2	6
LİTERATÜR ÖZETİ	6
2.1. Mayaların Taksonomisi	6
2.1.1. Doğal Sınıflandırma Sistemi.....	6
2.1.2. Biyolojik Tür Kavramı.....	7
2.1.3. Moleküler Taksonomi.....	7
2.1.4. Günümüzdeki Sınıflandırılma Sistemi.....	9
2.2. Mayaların Mikrobiyal Ekolojisi	9
2.3. Mayaları Tanımlamada Kullanılan Yöntemler.....	11
2.3.1. Geleneksel Sınıflandırma.....	11
2.3.2. Gıdalarda Bulunan Mayaları Tanımlamada Kullanılan Moleküler Metodlar.....	13
2.3.2.1. Tür Tanımlamak İçin Kullanılan Metodlar	14
2.3.2.1.1. Ribozomal Bölgelerin Analizine Dayalı Metodlar.....	14
2.3.2.1.2. Ribozomal Bölgelerin Sekanslanması.....	14
2.3.2.1.3. Ribozomal Bölgelerin Restriksiyon Analizi.....	15
2.4. Gıdalarda Mayaların Neden Olduğu Bozulmaların Etkileri.....	17
2.4.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Mayaların Neden Olduğu Bozulmaların Etkileri	18
2.5. Enzimler	23
2.5.1. Antik Çağda Kullanılan Enzimler.....	24

2.5.2. İlk Zamanlardaki Enzimoloji	25
2.5.3. Günümüz Enzimolojisi	26
2.6. Lipazlar ve Özellikleri	27
2.6.1. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemi	30
2.6.2. Lipazların Uygulama Alanları	32
2.6.2.1. Deterjan Endüstrisinde Kullanılan Lipazlar	34
2.6.2.2. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Lipazlar	35
2.6.2.3. Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisinde Kullanılan Lipazlar	35
2.6.2.4. Organik Sentezlerde Kullanılan Lipazlar	36
2.6.2.5. Oleokimya Endüstrisinde Kullanılan Lipazlar	36
2.6.2.6. Çevre Yönetiminde Kullanılan Lipazlar	37
2.6.2.7. Çay İşlemede Kullanılan Lipazlar	37
2.6.2.8. Biyosensör Olarak Kullanılan Lipazlar	37
2.6.2.9. Tamı Aracı Olarak Kullanılan Lipazlar	38
2.6.2.10. Kozmetikler ve Parfümlerde Kullanılan Lipazlar	38
2.6.2.11. Tıbbi Uygulamalarda Kullanılan Lipazlar	38
BÖLÜM 3.....	41
MATERYAL VE METOTLAR	41
3.1. Materyal.....	41
3.1.1. Kullanılan Örnekler	41
3.1.2. Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri.....	41
3.1.3. Çözelti, Tampon ve Boyalar	42
3.1.4. Çalışmadan Kullanılan Başlıca Cihazlar	44
3.2. Metod.....	44
3.2.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Mayaların İzolasyonu	44
3.2.2. İzolatların Tribütirin Agarda Ekstrasellüler Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi	45
3.2.3. Lipolitik Aktiviteye Sahip Mayalardan DNA İzolasyonu	45
3.2.4. İzole edilen DNA'ların Saflık Kontrolü	46
3.2.5. DNA'ların ITS PCR İle Amplifikasyonu	46
3.2.6. ITS PCR Ürünlerinin Elektroforezi	47
BÖLÜM 4.....	49
BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1. BULGULAR	49
4.1.1. İzolatların Elde Edilmesi	49
4.1.2. Koloni morfolojisinin incelenmesi	50
4.1.3. İzolatların Tribütirin Agardaki Ekstrasellüler Lipaz Aktivite Tayini	52
4.1.4. DNA İzolasyonu	56

4.1.5. ITS PCR.....	56
4.1.6. DNA Dizi Analizi	56
BÖLÜM 5.....	58
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR	63



TABLolar LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1.1. Süt ve süt ürünlerinde bozulmaya neden olan mikroorganizma tipleri ve mikrobiyal aktiviteleri	5
Tablo 2.1. Lipaz enzimi aktivite tayin yöntemleri	32
Tablo 2.2. Lipazların endüstriyel uygulamaları	33
Tablo 2.3. Lipaz üreten mayalar	40
Tablo 4.1. Mayaların İzole Edildiği Kaynaklara Göre Türlerin Dağılımı.....	49
Tablo 4.2. İzolatların Tribütirin Agarda Büyüme Esnasında Oluşan Lipaz Aktivitesi	55
Tablo 4.3. DNA dizi analizi sonucu tanımlanan izolatlar	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA

Şekil 2.1. Nükleer ribozomal DNA'nın yapısı	14
Şekil 2.2. PCR amplifikasyonu ve ribozomal bölgelerin sekanslanmasına dayalı türlerin tanımlanmasına yönelik metot.....	17
Şekil 2.3. Lipaz aktivitesi	28
Şekil 2.4. Serbest yağ asitlerinin katabolizması	30

RESİMLER LİSTESİ

SAYFA

Resim 4.1. Yoğurttan izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü	50
Resim 4.2. Kaymakdan izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü	50
Resim 4.3. Lor peynirinden izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü	51
Resim 4.4. Tereyeğından izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü	51
Resim 4.5. Gaziantep peynirinden izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü	52
Resim 4.6. %1'lik Tribütirin içeren Potato Dextrose Agar'da kaymak örneklerinin 30 °C'de kolonilerin 5 günlük görünümü.....	52
Resim 4.7. %1'lik Tribütirin içeren Potato Dextrose Agar'da tereyağı örneklerinin 30 °C'de kolonilerin 5 günlük görünümü.....	53
Resim 4.8. %1'lik Tribütirin içeren Potato Dextrose Agar'da yoğurt örneklerinin 30 °C'de kolonilerin 5 günlük görünümü.....	53
Resim 4.9. %1'lik Tribütirin içeren Potato Dextrose Agar'da lor peyniri örneklerinin 30 °C'de kolonilerin 5 günlük görünümü	54
Resim 4.10. Yüksek lipaz aktivitesine sahip örneklerin, PCR sonucunda elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü	56

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Giriş

Mayaların insan toplumuyla ilgili tarihçesi şarap, bira ve ekmeğin kullanımına dayanmaktadır. Bu ürünlerde maya hücrelerinin varlığı 1600'lerin ortasında mikrobiyoloji bilimine katkı sağlayan Antonie Van Leuwenhoek'ün gözlemiyle başlamıştır. Bu bulguların önemi 1850-1900'lere kadar Pasteur ve Hansen'in klasik çalışmalarına kadar değişmeden kalmış, mikrobiyoloji ve biyokimya disiplinlerinin başlangıçlarını müjdelemiştir. 1900'lerin başlarında Guilliermand ve Kluyver'in çalışmalarında mayaların eşsiz organizmalar olduğu gıda ve içecek üretiminde önemli rol oynadığını göstermiştir (Rose ve Harrison 1969; Rose, 1977). 1950'den beri yapılan çalışmalar; gıda ve içeceklerde bulunan mayaların ticari ve sosyal öneme sahip olduğunu göstermiştir(Boekhout ve Robert, 2003).

Mayalar tek hücreli funguslardır. Sınıflandırılmasında hücre, askospor ve koloni karakteristiklerinden faydalanılır. Fizyolojik karakteristik türlerin tanınmasında kullanılır. En iyi bilinen karakteristik özelliklerinden birisi şekeri fermente ederek etanol üretebilme yeteneğidir. Tomurcuklanan mayalar Ascomycetes filumunun Hemiascomycetes sınıfının gerçek funguslarıdır. Gerçek funguslar başlıca ordolardan biri olan Saccharomycetales ordosu içinde yer alır.

Mayalar tek bir hücrenin bölünerek tomurcuklanmasıyla (*Saccharomyces*), doğrudan bölünme (fission, *Schizosaccharomyces*) ya da basit düzensiz filamentler şeklinde gelişirler. Çoğu mayadaki eşeyli çoğalma askus içerisindeki sekiz haploid askospor içerisinde gerçekleşir. Bu askosporlar yandaki hücrelerle kaynaşabilir ve vejetatif bölünmeyle çoğalırlar ya da bazı funguslarda olduğu gibi diğer askosporlarla kaynaşabilirler.

Mayalar fakültatif anaeroblardır, hem oksijenli hem oksijensiz ortamda gelişebilirler. Oksijen varlığında şekerleri CO₂, enerji ve biyokütleye dönüştürürler.

Anaerobik koşullarda mayalar yeterli şekilde gelişemezler, şekerleri gliserol ve CO₂ gibi ara ü rünlere dönüştürürler. Bu yüzden mayalar, çoğalmak ve optimum biyokütle üretimi için havaya gereksinim duyarlar.

Çoğu maya için başlıca karbon ve enerji kaynağı glikozdur. Glikolitik yol iziyle glikozu piruvata, Krebs döngüsüyle anabolitlere ve ATP formunda enerjiye dönüştürürler. Mayalar solunum ve fermantasyonla piruvattan enerji üretebilme yeteneklerine göre sınıflandırılır. Bu işlem çevredeki glikoz ve oksijen konsantrasyonlarıyla düzenlenir. Solunumda piruvat asetil CoA'ya dekarboksile edilir. Sitrik asit döngüsünde CO₂, enerji ve mayanın büyümesini teşvik etmek için tamamen oksidize edilir. Anaerobik koşullarda, maya hücreleri canlılığını sürdürmesi gerek duyduğu enerjiyi üretmek için glikozdan çok az faydalanırlar. Bu işlem fermantasyon olarak adlandırılır, bu işlemede şekerler CO₂ ve etanole tamamen oksidize edilmezler. Maya hücresi yüksek glikoz konsantrasyonuna maruz kaldığında, katabolit represyon meydana gelir, bu sırada genlerin ifadesi ve solunum enzimlerinin sentezi baskılanır ve fermantasyon solunumun önüne geçer. Endüstriyel uygulamalarda, glikoz ve sükroz tarafından katabolit represyonu Crabtree etkisi olarak da bilinir, istenmeyen tat ve ürün oluşum, biyokütle ve maya hücresinin canlılığını kaybetmesi gibi birçok probleme sahip olabilir.

Mayalar çeşitli karbon bileşiklerini metabolize edebilir ancak başlıca; glikoz, sükroz ve maltoz gibi şekerlerden faydalanabilir. Sükroz ekstraselüler invertase enziminin glikoz ve fruktoza hidroliz edilmesiyle metabolize edilir. Maltoz maltoz permeaz ile hücre içine transfer edilir ve maltaz tarafından 2 molekül glikoza hidrolizinden sonra metabolize edilir. Bazı mayalar biyopolimerler, pentozlar, alkoller, polyoller, hidrokarbonlar, yağ asitleri ve organik asitler gibi yaygın olarak kullanılmayan birçok karbon bileşiğinden faydalanabilirler. Bu maddeler gıda ve çevre biyoteknolojisiyle yakından ilişkilidir. Örneğin, laktoz β galaktosidaz enzimiyle mayalar tarafından metabolize edilir. *Kluyveromyces* ve *Candida* cinsi mayalar gıda üretimindeki uygulamalar ile belirli koşullar altında peynir altı suyunda gelişirler. Nişasta, selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi biyopolimerler bazı mayalar tarafından doğrudan ya da mayalar tarafından sentezlenmeyen enzimlerle metabolize edilir. *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis*'in bazı türleri tek enerji ve karbon kaynağı olarak metanolde gelişebilirler.

Belirli şekerleri fermente edemeyen mayalar diğer türlerden ilişkili enzimlerin rDNA teknolojisi kullanılarak üstesinden gelebilirler.

Sonuç olarak; azot, fosfor, kükürt, demir, bakır, çinko ve mangan gibi elementler tüm mayalar için gereklidir ve büyüme ortamına eklenir. Çoğu maya amonyum iyonları ve üreyi doğrudan asimile etme yeteneğine sahiptir, ancak birkaç maya türü azot kaynağı olarak nitrati kullanabilmektedir. Fosfor ve sülfür genellikle inorganik fosfat ve sülfat formunda asimile edilir.

Mayalar tereyağı ve krema gibi kültüre edilmiş ürünlerde düşük pH'de gelişebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca bu ürünlerde bulunan diasetili metabolize edebilir (Wang ve Frank, 1981) ve yoğurt benzeri tada neden olurlar. *Geotrichum candidum* ile kontamine olmuş köy peynirlerinde sıklıkla diasetil içeriğinde azalma meydana gelir. *Geotrichum candidum* 4-7 °C' de 15-19 gün muhafaza edilen köy peynirlerinde diasetil konsantrasyonunu %52-56 oranında azaltırlar (Antinone ve Ledford, 1993).

Mayalar gelişimleri için seçici bir çevre olan düşük pH'lı yoğurt ve fermente süt ürünlerinde bozulmanın ana nedenidirler (Fleet, 1990; Rohm vd., 1992). İyi üretim uygulamaları altında üretilen yoğurtlar 10'dan fazla maya hücresi içermemeli ve son kullanım tarihi 5 °C' de 3 ile 4 hafta olmalıdır. Ancak yoğurttaki maya hücre sayısı 100 cfu/g'dan fazla olursa hızlı bir bozulma meydana gelir. Mayalar 10⁵-10⁶ cfu/g kadar geliştiğinde mayamsı, kötü tat oluşumu ve gazlı görünüme sahip ürünlerle karşılaşılır. Giudici ve ark. yoğurtlarda bozulmaya neden olan mayalarda galaktozun rolünü araştırmış ve *Saccharomyces cerevisiae* ve *Hansenula anomala* gibi galaktoz pozitif maya strainlerinin laktik starter kültürlerin laktozu hidroliz ettiği galaktozu fermente ettiği sonucuna varmışlardır. Düşük pH ve çoğu peynirin besin profili bozulmaya neden olan mayaların gelişimi için uygun bir ortam sağlamaktadır. Nemli yüzeyler, laktik asit, peptid ve aminoasit içeriği sıklıkla gelişimi hızlandırmaktadır. Birçok maya peynirlerde alkol ve CO₂ üretir ve mayamsı tat oluşumuna neden olmaktadır (Horwood, Stark, & Hull, 1987). Vakum altında ve modifiye atmosferik ortamda paketlenen peynirler mayaların ürettiği yüksek miktarda CO₂ paketlerde şişmeye neden olmaktadır (Vivier vd., 1994).

Proteaz, fosfolipaz ve lipaz gibi mikrobiyal enzimler süt ürünlerinin bozulmasına indirekt etki ederler, bu enzimler enzim üreten mikroorganizmalar tarafından

parçalansa bile gıda da değişmeden aktif kalabilmektedir. Ekstaselüler proteazlar süt ürünlerinin kalitesini çok farklı şekilde etkileşeler de büyük oranda acı peptidler üretirler. Sıcaklığa dayanıklı proteazlar UHT sütlerin bozulmasına neden olmaktadır (Shah, 1994; Sørhaug ve Stepaniak, 1991). Ayrıca fosfolipazlarda sıcaklığa dayanıklıdır. Örneğin çiğ sütteki fosfolipaz üretimi sütün doğal lipazlarının yağ asitlerine dönüşmesi nedeniyle acı tat oluşumu meydana getirmektedir (Fox vd., 1976). Sıcaklığa dayanıklı lipazlar UHT sütte ekşi tat gelişimiyle ilişkilendirilmektedir. UHT süt, yağ, bazı peynirler ve süt tozu gibi ürünler kalıntı lipazlardan bile etkilemektedir. Kısa zincirli yağ asitlerinin serbest kalması ekşi tat ve koku oluşumu meydana getirirken uzun zincirli yağ asitlerinin serbest kalması sabunsu tat meydana getirmektedir. Doymamış yağ asitlerinin aldehit ve ketonlara oksidasyonu okside bir tat oluşumu meydana getirmektedir (Deeth & Fitz-Gerald, 1983). Süttten krema ayırımı yapıldığında kremadaki lipaz krema yerine yağsız süte karışabilmektedir (Downey, 1980; Stead, 1986). Enzim substrat ilişkisinin artması ve bazı yağ damlacıklarının membranlarından ayrılmasıyla lipaz aktivitesinin ve yağ damlacıklarının konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır. Tereyağı üretiminde, süttten krema ayırma esnasında lipolizis aşırı köpüklenmeye neden olmaktadır (Deeth & Fitz-Gerald, 1983), bu yüzden çalkalama zamanı arttırılmalıdır. Tereyağının ekşimesine çiğ sütteki lipaz aktivitesi ya da son ürün tereyağındaki sıcaklığa dayanıklı mikrobiyal lipazlar neden olmaktadır. Ekşi kremadaki kısa zincirli yağ asitleri suda çözünebilmekte ve yağlı sütte kısmen kaybolmakta ya da üretim esnasında suyla yıkanmaktadır (Stead, 1986). Tereyağındaki mikrobiyal lipazlar dondurularak saklandığında bile yağları hidrolize edebilmektedir (Nashif & Nelson, 1953). Düşük pH lipaz aktivitesini sınırlamaktadır ancak bazı peynirlerde olgunlaşma ilerledikçe nötr pH'ya doğru yükselir ve onları lipolize duyarlı hale getirmektedir (Dumont vd., 1977).

Gıda maddesi	Bozulmaya neden mikroorganizmalar mikrobiyal aktivite
Çiğ Süt	Farklı mikroorganizma çeşitleri
Pastörize Süt	Psikotroflar, spor oluşturanlar, mikrobiyal enzimatik degradasyon
Konsantre Süt	Spor oluşturan bakteriler, osmofilik fungus
Süt tozu	Mikrobiyal enzimatik degradasyon
Tereyağı	Psikotroflar, koliformlar, maya, laktik asit bakterileri
Ayran,krema	Psikotroflar, koliformlar, maya, laktik asit bakterileri
Yoğurt, yoğurt temelli içecekler	Mayalar
Diğer fermente süt ürünleri	Fungus, koliformlar
Krem peynir, işlenmiş diğer peynirler	Fungus, spor oluşturan bakteriler
Kaşar peyniri	Psikotroflar, koliformlar, maya, laktik asit bakterileri
Olgunlaştırılmış Peynir	Fungus, laktik asit bakterileri, spor oluşturan bakteriler, mikrobiyal enzimatik degradasyon

Tablo 1.1. Süt ve süt ürünlerinde bozulmaya neden olan mikroorganizma tipleri ve mikrobiyal aktiviteleri (Ledenbach, L.H. ve Marshall, R.T.)

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mayaların Taksonomisi

Maya taksonomisi identifikasyonu, isimlendirilmesi ve evrimsel çerçevede yerleştirilmesini kapsamaktadır. Tarihsel olarak, askomisetler Hemiaskomisetler ve Öaskomisetler olarak isimlendirilen iki taksonomik sınıfta incelenmektedir. Hemiaskomisetler fruiting body (askokarp) yapısıyla çevrili olmayan askuslarla karakterize edilmektedir.

2.1.1. Doğal Sınıflandırma Sistemi

Doğal sınıflandırma sistemi evrimsel temellidir, sistematik açıdan tercih edilen metodlardan birisidir. Bu sistem tür kavramına atıfta bulunmakta ve evrimsel süreçte gerçekleşen olayların sırasını ve filogenisini de göstermektedir. Bu sistem yeni türleri ve daha fazla askal safha geçirmeyen askomiset türlerini de kapsamaktadır. Tür kavramı farklı türlerin sahip olduğu ve tanımlanmasını sağlayan farklı fenotipik özelliklerle tanımlanmaktadır (Van der Walt, 2000). Birçok uzman tarafından bu yaklaşımın yetersiz olduğu vurgulanmıştır (Kurtzman vd., 1983; Kurtzman ve Phaff, 1987; Van der Walt, 1987, 2000). Bu metot grup içerisindeki değişkenliğe, yakınlığa, benzerliğe ya da evrime paralel olarak bazı özelliklerle tanımlanmaktadır (Price vd., 1978; Fuson vd.,1980; Kurtzman, 1984).

Birçok bağımsız laboratuvarında yürütülen çalışmalar anamorfiklerin askus üretmemelerine rağmen sahip olduğu bazı özellikler sayesinde onların askomisetlere yerleştirilmesinin uygun olduğunun kararlaştırılmasıyla askogenlerle anamorfik türler arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (Barns vd., 1991; Hendriks vd., 1991, 1992; Cai vd., 1996; Suzuki vd., 1999). Anamorfik türlerin askospor oluşumundan sorumlu genlerin yokluğu ya da mevcut genlerin ifade edilmemesi ya da sessiz olması nedeniyle askus üretme yeteneğine sahip olmadığına inanılmaktadır. Anamorflar askomisetlerin yarısını oluşturmakta ve oldukça geniş bir dağılım göstermektedir. Bu askospor tipleri tamamen eşeysiz olmasına rağmen çevresel anlamda başarılı olduklarını göstermektedir.

2.1.2. Biyolojik Tür Kavramı

Modern biyologlar dört farklı bakış açısı ile ifade edilen tür kavramına varmışlardır. Bunlar çoğalma birimi, ekolojik birim, genetik birim ve son olarak evrimsel birimdir. Bu filogenetik tür kavramının girişi tür kavramının genişletilmesini sağlamıştır. Bu kavram; fenotipik, genetik ya da ekolojik kriterler haricinde ribozomal nükleotid sekansının yorumlanmasına odaklanmıştır. Biyolojik tür kavramı ve filogenetik tür kavramı çok az yaygındır. Biyolojik tür kavramı tip-temelli türler ve fenotipik farklılaştırmaya bağlı olduğu için pratik sistematik çok kolay uygulanmamaktadır. Tanım gereği eşeysiz maya türleri biyoloji tür kavramının dışında tutulmuştur. Barnett ve ark. (2000) identifikasyon amacıyla sadece fenotipik özelliklere dayanarak yaklaşık 93 özellik listelemişlerdir.

Yukarıda ifade edilen sorunları aşmak için maya taksonomistleri prokaryotik sistemlerde yaygın şekilde kullanılan nükleer genom analizini değerlendirmektedir. Fenotipik özelliklere olan güvenin azalmasıyla nükleer genomun baz kompozisyonu atasal soyları yansıttığına inanmaktadır (Van der Walt, 2000).

2.1.3. Moleküler Taksonomi

DNA çalışmalarına girişle taksonlar arasındaki evrimsel uzaklıkların tahmini daha kolay olmuştur. Farklı taksonomik seviyeler farklı metodlarla çözülmektedir. H. Phaff laboratuvarında homojen nükleer DNA'nın ilk kez kullanıldığı düşünülen guanin+sitozin ortalama molar yüzdesinin doğru tahminini de içeren nükleer genomun iki özelliği türlerin belirlenmesinde yararlı olduğu düşünülmektedir (Meyer & Phaff, 1969; Fuson vd., 1980; 1987). Fakat ortalama % G+C oranı baz sekanslarındaki farklılıkları yansıtmamaktadır. Farklı türler az ya da çok benzer % G+C değerlerine sahip olduğu için bu özellik genellikle göz önünde bulundurulmaz. Sınırların üstesinden gelmek için nDNA homoloji kavramı göz önünde bulundurulmaktadır, bu sayede yakın ilişkili türler denatüre edilir ve nDNA'nın tek zincirli fragmentleri ile ilişkilendirilerek yakın ilişkili türlerin nasıl oluştuğu belirlenmektedir (Van der Walt, 2000). Bu metod modern algı tarafından yorucu ve ilkel olduğu düşünülmesine rağmen halen kapsamlı bir şekilde kullanılmakta ve tercih edilmektedir (Daniel ve Meyer, 2003). Bu metodun ilk bulguları ümit vermiş ve aynı türün göstergesi olarak değerlerin % 70-100 arasında olduğunu göstermiştir. Strainlerin sayıları azaldığında yakın ilişkili değerler % 40-65 arasında azalmıştır. Bu yüzden bu metod kullanılarak tanımlandığında strainlerin ilişkilendirilmesi zor olmuştur. Moleküler taksonomistler

nDNA'nın maya sistematigi üzerine etkili olduğunu kabul etmişlerdir, ancak nDNA tür seviyesindeki ilişkileri aydınlatamamıştır (Kurtzman, 1998; Vaughan-Martini, 2003). Dolayısıyla nDNA ile ilgili veriler *Pichia* ve *Hansenula* genusunun birleştirilmesinde görüldüğü gibi türlerin ayırımında yararlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir (Kurtzman, 1984). Birleştiricilik ilişkili türler karşılaştırılmasına dayalı olarak genusların birleştirilmesinde kuralların gözardı ettiği için hatalı olduğu düşünülmektedir (Van der Walt, 2000).

Tür kavramının gelişmesiyle de, filogenetik türlerin tanımlanmasında fenotipik, eşeyssel ya da ekolojik kriterlerin yardımına gerek duyulmamaktadır. Bu ribozomal genomdaki seçilmiş bilgisel elementlerin nükleotid sekans analizine dayanmaktadır (Kurtzman & Robnett, 1994; 1995). Ribozomal baz sekansı veri kaynağına daha kolay erişim sağlayarak benzer türlerin analizine imkan sağlamakta ve bu sayede filogenilere dayalı anlam ya da bir varsayım çıkarmaya yardımcı olmaktadır (Van der Walt, 2000; Daniel & Meyer, 2003).

Önerilen kavramların kısıtlamaları nedeniyle ribozomal genlerin baz sekans analizlerine dayalı ribozomal markerları içeren genomik verilerin incelenmesine olanak sağlamıştır. Genomik veriler kararlı ve yüksek derecede korunmuş olmaları nedeniyle oldukça kullanışlıdır. Blanz ve Unseld son birkaç yılda mayalar ve diğer funguslar için sınıflandırma sistemi filogenetik sekansların moleküler analiziyle büyük bir değişim yaşamıştır. Bu çalışmaların yüksek yüzdesi rRNA gen sekanslarına odaklanmış ancak diğer moleküllerin karşılaştırılması da benzer sonuçlar vermiştir (Petersen & Kurtzman, 1991; Kurtzman, 1994).

Başlangıçta yapılan çalışmalar 18S ve 26S rRNA ile sınırlı olmuştur. Alınan ilk sonuçlar ilişkili türler arasındaki akrabalığı doğrulamış ancak 18S ve 26S alt birimlerinin hiçbir bölgesine eşit olarak kullanışlı olmadığı gözlemlenmiştir (Hendriks vd., 1991, 1992; Cai vd., 1996). Bölgeler belirli taksonların birinde başarısız olsa da diğerlerinde başarılı olduğu bulunmuştur. rRNA baz sekanslarında belirtilen sınırlamalar rRNA'nın bir bölümüyle rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA'nın gözönünde bulundurulmasına neden olmuştur (Vaughan-Martini & Kurtzman, 1985). Fakat mikologlar domain dağılımını belirleyerek tür ve cins kavramında ortaya çıkan gücü gidermeye çalışmışlardır (Van der Walt, 2000).

Kurtzman ve Robnett bilinen tüm askomisetik maya üzerine kapsamlı bir çalışma yürütmüştür. 500 tür ile temsil edilen 760 straini kapsayan bu çalışma 26S alt biriminin D1/D2 domaininin 600 bazının sekans analizine dayanmaktadır. Ayrıca Öaskomisetleri temsil eden 9 strain araştırmanın kapsamını genişletmiştir. Çalışma askomisetik mayaların farklı atalardan geldiğini doğrulamıştır. Fakat elde edilen bilgi Saacharomycetales ve Euascomycetes arasındaki düşünülen bağlantıyı doğrulamamıştır. Çalışma tüm askomiset mayalarının sınıflandırılmasında ya da 5.8S alt birimlerinin ITS1 ve ITS2 bölgeleriyle birlikte β tubulin ve histon genlerini içeren diğer bölgeler üzerine yapılan alternatif bir çalışmada yeterli bilgi sağlamadığını göstermiştir. Metodun sınırlamaları çoğu cinsin filogenetik olarak sınıflandırılmadan önce daha fazla genin sekanslanması sonucuna varılmasına neden olmuştur (Kurtzman ve Robnett, 1998; Fell vd., 2000; Yang vd., 2001; Herzberg vd., 2002).

2.1.4. Günümüzdeki Sınıflandırılma Sistemi

Askomiset mayalarının sınıflandırılması, biyolojik tür kavramına dayanmaktadır ve başlıca Archiascomycetes, Euascomycetes ve Hemiascomycetes olmak üzere üç sınıftan oluşmaktadır. Askomiset mayalarının çoğu Schizosaccharomycetales (basitçe ikiye bölünen mayalar) ve Saccharomycetales ordosunda, Archiascomycetes ve Hemiascomycetes sınıflarında yer almaktadır. Hemiascomycetes mayaların üzerine yapılan çalışmalar, onların 9 aile, 51 cins, 432 türden meydana geldiğini göstermiştir. Bu aileler 18S, 26S rRNA sekansı verilerine ve fenotipik özelliklerine dayanarak ayrılmıştır.

2.2. Mayaların Mikrobiyal Ekolojisi

Mayalar doğadaki aktiviteleri nedeniyle insanlar için ekonomik bir öneme sahiptir. Çevre ekolojisinde mayaların potansiyel rolü; kirlilik ajanı, biyoremediasyon ya da biyolojik pestisit kontrolü olduğu gibi iyi şekilde tanımlanmış bazı endüstriyel proseslerin merkezi yapıtaşları da olabilir (Brakhage & Turner, 1995; Pöggeler, 2001). Mayalar biyosfer boyunca rastgele dağılım göstermezler, habitatları tarafından tanımlanan tür komünitelerini oluştururlar. Habitat maya hücrelerinin biraraya geldiği ve türlerin parçası olan nişlerinin bulunduğu belirli yerdir. Niş maya hücresinin var olması için gerekli olan tüm fiziksel, kimyasal ya da biyotik faktörleri içerir. Mayaların yaşam alanı genellikle işgal ettikleri habitatların büyüklüğüyle sınırlanır. Mineral, besin, organik karbon kaynağı ve enerji habitatlar ile habitatlarda var olan maya

türlerine bağı olarak farklılık gösterir (Phaff & Starmer, 1980; Phaff, 1986; Lachance & Starmer, 1998).

Tek hücreli mayalar doğası gereği derin sıvı substratlarda ya da nemli hatta katı yüzeylerde yaygın bir şekilde bulunur. Bu yüzden mayalar şeker ve aminoasit gibi suda çözünebilir besinlerin bol miktarda bulunduğu nemli çevrelerde gelişimlerini sürdürürler. Bu özellik mayaların neden yaprak ve meyve yüzeylerinde, bitki köklerinde ve çeşitli gıdalarda bulunduğunu da açıklamaktadır. Birkaç hifli fungus türü nişasta ve selüloz gibi polimerleri degrades ederek kullanabilirler. Mayalar farklı sucul ve karasal kaynaklarda ve atmosferdeki sınırlı alanlarda bulunurlar. Mayalar aynı zamanda bağırsakta simbiyotik rol oynadığı için bazı hayvanlar ile sıkı ilişki içerisinde (Lachance ve Starmer, 1998).

Çeşitli besinlerin toprağa ulaşması topraktaki maya florasını belirlerken, bazı mayalar toprağın kalıcı sakinleridir. Bu türler *Cryptococcus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomycestetrasporus*, *Rhodotorula* türleri, *Schizoblastosporion starkeyi-henricci* ve *Sporobolomyces* türlerini içermektedir, bu türlerin hepsi sürekli olarak topraktan izole edilmiştir (Spencer & Spencer, 1997; Lachance & Starmer, 1998).

Çeşitli su kaynaklarındaki maya türlerinin dağılımı farklılık gösterir, sayıları kirlenmemiş su da birkaç hücre/ml den atıksudaki sayıları ise bir milyon hücre/ml ye kadar oldukça büyük farklılık göstermektedir. Atık suda mayaların sayısı kirlilik derecesiyle orantılı olarak artmaktadır (Hagler & Ahearn, 1987; Lachance & Starmer, 1998). Kırmızı mayalar gibi bazı mayalar kirliliğin belirteci olarak gösterilmektedir. Hagler'in grubu tarafından bildirilen yengeçlerdeki *K. aestuarii* bolluğu mayaların neden denizde dağılışı gösterdiğini açıklamaktadır. Tatlı su mayaları muhtemelen diğer ekosistemlerden gelerek denizlerde bulunabilirler, diğer su kaynaklarının içerisine akmaktadır. *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* ve *Sporobolomyces* gibi türler bu ortamlarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Hagler & Ahearn, 1987).

Mayalar karasal ekosistemlerde diğer mayalar ile kompleks bir ilişkiye katılmak için bulunabilmektedirler. Bu etkileşimler mikrop-mikrop etkileşimleri, kommensalizm, sinerjizm, mutualizm, rekabet, kommensalizm, avcılık ve parazitizmdir (Phaff & Starmer, 1987; Atlas ve Bartha 1993; Lachance & Starmer, 1998). Bu etkileşimin en

önemli sonuçları ise özel türlerin ya da strainlerin gelişimini teşvik etmek ya da inhibe etmektir (Fleet, 2003).

Kaktüs-maya-Drosophila sistemleri belirli kaktüs türleriyle beslenen böcekleri içeren yüksek spesifik bir faktör olarak dağılımı göstermek için örnek (Starmer vd., 1991) olarak kullanılmıştır (Dobzhansky vd., 1956; Starmer vd., 1976; Lachance, 2003). Belirli habitatlarda bulunan mayalar gıdaların zenginleştirilmesi ve detoksifikasyon gibi yararlı özelliklere sahip olmalı ve yeni bir çevreye maya komünitesinin dağılımını sağlamak için vektör olarak kullanılmalıdır. Üstelik belirli nişe sahip mayaların uyumu habitatda bulunan diğer türlere de etkili olmaktadır (Lachance & Starmer, 1998).

Maya habitatları sıklıkla basit organik karbonlarla, bazen çok yüksek nemli, asidik, nadiren alkalın ortamlardır. Habitatlardaki bu çeşitlilik mayaların büyüme koşullarının ne kadar geniş olduğunu da göstermektedir.

Bu özellikler bize maya hücrelerinin dağılımını tahmin etmemize de olanak sağlamaktadır. Fakat yeni habitatlardan izole edilen maya türleri çevre tarafından uygulanan seçici baskı sayesinde oluşmaktadır. Belirli bir çevrede bulunan maya türlerinin gözlemlenen benzerlik ve farklılıkları onların evrimsel sürecini izlemede önemli rol oynamaktadır.

Bu yüzden maya hücrelerinin ekolojisi, fiziksel çevrenin maya hücrelerinin üzerine etkisini ve maya hücrelerinin diğer mikroorganizmalarla etkileşimini kapsadığına inanılmaktadır (Spencer & Spencer, 1997). Yeni habitatlar tesadüfen keşfedilse de, diğer bulgular önceki bilgilerimizden etkilenmektedir. Fakat, çalışmalarda maya hücrelerinin yeri belirlenir belirlenmez tüm komüniteyi değerlendirmek için habitatlar tanımlanmalıdır (Lachance & Starmer, 1998).

2.3. Mayaları Tanımlamada Kullanılan Yöntemler

Bir kültürü saf olarak tanımlamak oldukça önemlidir. Klasik taksonomik yöntemler ekolojik orjin, morfoloji, fizyoloji, biyokimyasal ve eşeyssel özellikleri içeren fenotipik özellikleri analiz etmekte, bu analizi tamamen saf kültürde yürütmektedir (Kreger-van Rij, 1984; Van der Walt ve Yarrow, 1984; Yarrow, 1998; Barnett vd., 2000).

2.3.1. Geleneksel Sınıflandırma

Mayaların tanımlanması için test ve kriterler koloninin yapısı, şekli, rengini içeren kültür özelliklerini kapsamaktadır. Koloni yapısı mukoid, akıcı, tereyağımsı, kolayca

dağılan ya da membranımsı olabilir. Mukoid gelişimin sonucu olarak ekstraselüler polisakkarit üretimi gözlenebilmektedir. Belirli cinslere özgü sarı, turuncu, kırmızı gibi ayırt edici renklere rastlanmaktadır. Bu cinsler *Phaffia*, *Rhodosporidium* ve *Sporidiobolus*'dur. Mayaların çoğu beyazımsıdan, kreme devetüyüne kadar farklı renkler üretmektedir (Yarrow, 1998).

Bu özellikleri vejetatif hücrelerin şeklini ve boyutunu içeren eşeysiz yapıların gözlenmesi takip etmektedir. Daha sonra konidia oluşum şekli araştırılmaktadır. Bu sayede strainin identifikasyonuna yardım edecek bilgi sağlanmaktadır. Hücrenin boyutunda herhangi bir değişiklik olmaksızın hücre yüzeyindeki bir noktada küçük bir çıkıntı oluşumuyla tomurcuklanma başlamaktadır. Hücre boyutundaki artış ana hücreden ayrılarak yeni oluşan tomurcukta görülmektedir. Holoblastik tomurcuklanma ana hücre duvarının tam bir çıkıntı yapması sonucu oluşmakta dar bir bölgeden ayrılmakta ve burada daha sonra tomurcuklanma meydana getirmeyen iz bırakmaktadır (Yarrow, 1998).

Tomurcuk oluşum bölgesi ve pozisyonu sınıflandırmayı kolaylaştırmaktadır. Tomurcuklanma hücrenin tek bir kutbunda ortaya çıkan tek kutuplu ya da Apiculate mayaların özelliği olan hücrenin her iki kutbunda da gözlenebilmektedir (Yarrow, 1998). Füzyon, hücrenin uzun ekseni boyunca hücre duvarından içeriye doğru hücreyi ikiye bölen septum gelişimini içeren vejetatif hücreninin çoğalma şeklidir. Yeni oluşan füzyon hücreleri arthrokonidia (arthrosporlar) olarak isimlendirilir. Bu hücrelerde uzamakta ve süreç yeniden başlamaktadır. Bir hücreden oluşan füzyon hücreleri *Schizosaccharomyces*'e özgü bir özellik olan enine çok sayıda iz ya da halka oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Yarrow, 1998).

Vejetatif hücreler tanımlama için kullanılan farklı şekillere sahiptirler. Sözü edilen şekiller ise; küresel, küremsi, elipsoid, oval, silindirik, ince uzun, hilal şeklinde ve üçgen biçiminde olabilmektedir. Şekil çoğalma şeklini yansıtmakta ve bazı durumlarda cins ve türe özgü olmaktadır. *Hanseniaspora* ve *Wickerhamia* apikulat mayalarının limon şekilli hücreleri, *Malassezia*'nın şekilli hücreleri, *Trigonopsis*'in üçgen şekilli hücreleri, *Metschnikowia lunata* ve *Candida pellata*'nın hilal şeklinde hücreleri bu şekillere örnek olarak verilmektedir (Yarrow, 1998).

Eşeyli yapılar, askosporlar ya da basidiosporların boyutu, şekli, düzenlenmesi, hücre duvar içeriği araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Askus oluşumu bir türü tanımlayabilmektedir. *Lipomyces*'lerde kese benzeri uzantılar görülürken, *Metschnikowia*'da uzun ve çomak şeklindedir. Eşeyli yapılarda mevcut olan askus, şekil, boyut, içerik ve renk değişiklik göstermektedir. Genellikle 8'den fazla spor olması *Lipomyces*'lere özgüdür. Askosporların bilinen birçok şekli bulunmaktadır. Askosporlar, küresel, silindirik, elipsoid, hilal ve şapka şekilli, kurşun, iğne, şırınga şekilli olabilmektedir (Yarrow, 1998).

Hücre ve hifde oluşan endosporlarında dahil olduğu diğer spor çeşitlerini tanımlamaya yardımcı olmaktadır. Bunlar seçici olarak boyanmamaktadır. Fakat eski kültürlerde YM agarda gözlenebilmektedir. Eşeyli endosporlar *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Oosporidium* ve *Trichosporon*'da gözlenirken diğer cinslerde çok yaygın gözlenmemektedir. Klamidosporlar kalın duvarlı lipidlerce zengin eşeyli sporlardır. Klamidosporlar eşeyli tipleri *Sporidiales* ve *Ustilaginales* teliosporlarında ayırtedilmektedir. Klamidosporlar *Candida albicans* ve *Metschnikowia* türlerine özgüdür. *Candida albicans* tarafından oluşturulan çimlenme borusu testi tıbbi laboratuvarlarda teşhisi için kullanılan güvenilir ve hızlı bir testtir (Van der Walt ve Yarrow, 1984; Yarrow, 1998).

2.3.2. Gıdalarda Bulunan Mayaları Tanımlamada Kullanılan Moleküler Metodlar

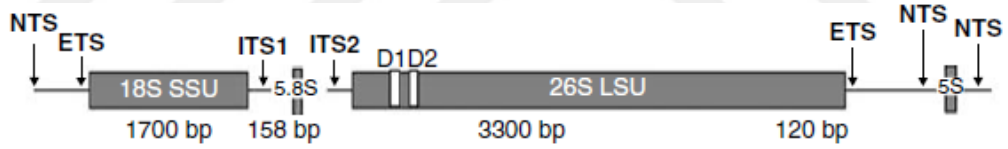
Farklı maya ve strainleri tanımlamayı amaçlayan çalışmalar organizmaların morfolojik ve fizyolojik özelliklerini temel almaktadır (Kreger-van Rij, 1984; Barnett vd., 1990). Bu özellikler gelişme koşullarına göre değişiklik gösterebilmektedir (Scheda ve Yarrow 1966, 1968; Yamamoto vd., 1991), bazen türler tek bir gen tarafından kontrol edilen tek bir fizyolojik özellikle de belirlenmektedir. Son zamanlarda tam protein analizi, izoenzim şekilleri, gaz kromatografisi kullanılarak yağ asidi analizine dayalı analizlerle mayaların ayrımını sağlayan metodlar geliştirilmiştir (Cottrell vd., 1986; Tredoux vd., 1987; Moreira da Silva vd., 1994). Fakat bu teknikler birçok durumda mayaların fizyolojik hallerine bağlı olduğu için bu tekniklerin sürdürülmesi hala tartışılmakta olan bir konudur (Golden vd., 1994). Bunun aksine kullanılan moleküler biyoloji teknikleri hücrenin fizyolojik durumundan bağımsız genom analizini sağladığı için alternatif metodlar olarak görülmektedir. Moleküler biyolojinin sunmuş olduğu araçlar kullanılarak birçok teknik geliştirilmiştir.

Geliştirilen bu tekniklerin çoğu mayaları tür seviyesinde karakterize etmek ve tanımlamak için oldukça yararlıdır.

2.3.2.1. Tür Tanımlamak İçin Kullanılan Metotlar

2.3.2.1.1. Ribozomal Bölgelerin Analizine Dayalı Metotlar

Genomda 100 ve 200 kez tekrar eden ribozomal genler (5.8S, 18S and 26S) transkripsiyon birimleriyle birlikte gruplandırılmaktadır. Her bir transkripsiyon biriminde iç transkribe edilmiş bölgeler (ITS) ve dış transkribe edilmiş bölgeler (ETS) mevcuttur ve bu bölgeler transkribe edilebilirler ancak değişmezler. Yani, kodlanan birimler NTS olarak da isimlendirilen intergenik spacerla ayrılmaktadır. 5S geni daha önceden tanımlanmış transkripsiyon birimi içermediği ancak mayalarda benzer tekrarlayan üniteler sahip olduğu bulunmuştur. 5,8S, 18S, 26S ribozomal genlerinin yanısıra ITS ve NTS korunmuş sekanslara ve türler arasında ortak evrime sahip olması, türler arasındaki tekrarlayan transkripsiyon birimlerinin farklı türlere ait birimlerden daha fazla benzerliğe sahip olması, eşit olmayan crossing-over ya da genetik değişim gibi mekanizmalar sayesinde, filogenetik ilişkileri belirlemek ve tanımlamak için oldukça güçlü araçlar olduğu bilinmektedir (Li 1997, Kurtzman ve Robnett, 1998).



Şekil 2.1. Nükleer ribozomal DNA'nın yapısı (Fernandez-Espinar, M.T. vd., 2006)

2.3.2.1.2. Ribozomal Bölgelerin Sekanslanması

Bu metodların herbiri bu bölgelerde bulunan nükleotid sekanslarının belirlenmesine ve karşılaştırılmasına dayanmaktadır. En yaygın kullanılan iki bölge 18S (James vd., 1997) ve 26S (Kurtzman ve Robnett, 1998) genlerinin 5' ucuna yerleşmiş olan D1 ve D2 domainleridir. Veri tabanlarında bu sekansların özellikle de 26S geninin D1/D2 gen bölgesinin bulunması, sekansların homoloji yüzdesi %99 ve üzerinde olduğunda bilinmeyen maya türlerinin belirlenmesinde bu tekniği oldukça kullanışlı hale getirmiştir (Kurtzman ve Robnett, 1998). Veritabanı karşılaştırması WU-BLAST2 programı kullanılarak <http://www.ebi.ac.uk/Blas2/index.html> internet adresinde gerçekleştirilmektedir.

Bunun yanısıra DNA PCR tekniklerinin gelişimi, ilişkili bölgelerin doğrudan sekanslama yapılmasına olanak sağlamış ve modern otomatik sekans teknolojisiyle birlikte bu teknolojinin kullanımını nispeten hızlandırmıştır. PCR ürünleri deoksiniükleotidlerin fazlasını ve primerleri ortadan kaldırmak için ticari kitler kullanılarak saflaştırılmakta, bu fazlalıkların sekans reaksiyonlarına girmesi engellenmektedir. Otomatik sekanslama sistemlerinde, herbir bazı (A, G, C ve T) tanımlamak için 4 floresan boya kullanılmaktadır. PCR amplifikasyonu vasıtasıyla benzer primerler kullanılarak boyalar dahil edilmektedir. İşaretli DNA fragmentleri herbir boyanın üretmiş olduğu farklı ışınlar kapillerde aynı anda boyutlarına göre ayrılarak işaretlenmektedir. Üretilen sinyaller daha sonra bir yazılım vasıtasıyla herbiri bir nükleotide karşılık gelecek şekilde renk piklerine dönüştürülmektedir. Sekanslayıcının modeline göre değişmekle birlikte, sekanslama oldukça hızlı olmakta ve yaklaşık 600 nükleotid 2 ya da 3 saat içerisinde okunabilmektedir.

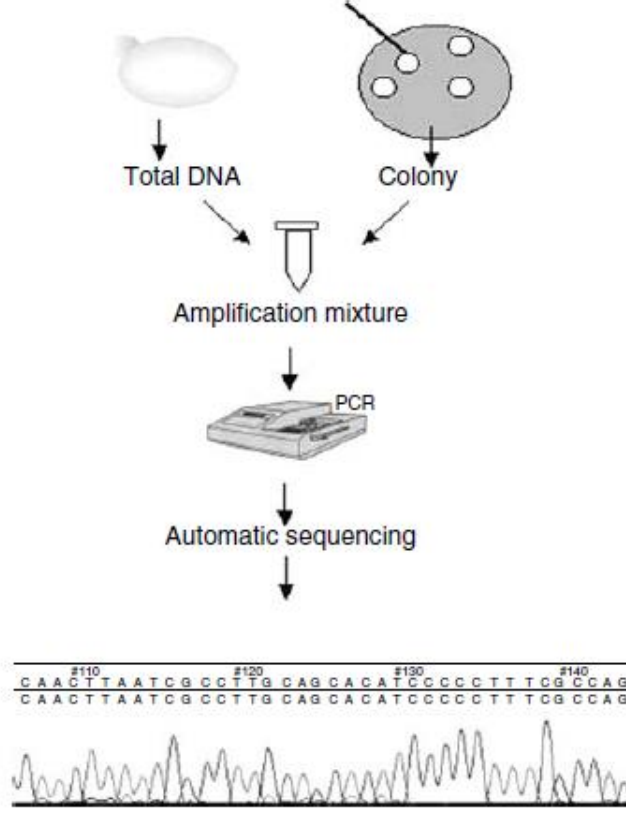
2.3.2.1.3. Ribozomal Bölgelerin Restriksiyon Analizi

Endüstriyel uygulamalarla birlikte, amplifiye edilmiş fragmentlerin sonradan restriksiyonu ve ribozomal DNA bölgeleri PCR amplifikasyonuna dayalı metodlara paralel olarak diğer basit identifikasyonlarını da geliştirmiştir. Amplifikasyon reaksiyonlarında DNA'nın kalıp olarak kullanılması kullanışlı olmasına rağmen, çok az miktarda izole edilen kolonilerle yapılan birçok çalışmada da kalıp olarak kullanılmıştır. Bu yaklaşımla büyük bir zaman kazanılmakta ve reaksiyon karışımında DNA'yı elde etmek için amplifikasyon protokolünde sadece 95 °C'lik 15 dakikalık ön adıma ihtiyaç duyulmaktadır. Amplifikasyon ürünleri %1,4'lük agaroz jelde yürütülmektedir. Farklı boyuttaki amplifikasyon ürünleri farklı türlerde aynı olabilir, fakat amplifiye edilen fragmentler aynı boyutta olduğunda türler her zaman aynı olmayabilir, türleri tamamen tanımlayabilmek için son çare olarak bu fragmentlerin kesilmesi gerekmektedir. PCR ürünlerinin sindirilmesi önceki saflaştırma adımına gerek duymaksızın doğrudan yürütülmekte ve üretilen fragmentler %3'lük agaroz jelde elektroforez yapılarak ayrılmakta ve fragmentelerin boyutları uygun markerlar kullanılarak belirlenmektedir. Dlačny vd. (1999) bu metodu başlıca yiyecek, şarap, bira ve alkolsüz içeceklerle ilişkili 128 türün ITS 1 genler arası bölgesi 18S ribozomal genlerini ns1 primerleri (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') ve ITS 2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3') ve sindirim enzimleri AluI, HaeIII, MspI and

RsaI'yi kullanarak çoğaltmak için kullanmıştır. Bu metod daha sonra Redzepovic vd. (2002) tarafından kullanılmıştır.

5.8S ve bitişik genler arası bölgeler ITS1 ve ITS2, White vd. tarafından tanımlanan çoğaltılmış ITS1 ve ITS4 primerleri kullanımını içeren diğer ribozomal bölgeler tür seviyesinde ayırım için oldukça kullanışlıdır. Guillamón vd. (1998) bu tekniği şarap mayalarının hızlı bir şekilde tanımlaması için kullanmış ve daha sonra bu tekniği yiyecek ve içeceklerle ilişkili 191 mayanın tanımlanması ile genişletmiştir (Esteve-Zarzoso vd. 1999; Fernández-Espinar vd. 2000; de Llanos vd. 2004). Çoğaltılan fragmentler ve bu türlerin HaeIII, HinfI, CfoI ve DdeI enzimleriyle restriksiyon profilleri <http://yeast-id.com>. internet adresinde mevcuttur. Bu tekniğin yararı referans strainler çalışılarak ispatlanmış (Ramos vd., 1998; Fernández-Espinar vd., 2000; Cadez vd., 2002; Esteve-Zarzoso vd., 2003; Naumova vd., 2003) ve farklı yiyecek ve içeceklerdeki türlerin teşhisi için birçok yazar tarafından kullanılmıştır.

Diğer ribozomal bölgelerin restriksiyon analizi maya türlerini özellikle de kompleks *Saccharomyces* “sensu stricto” e ait olan türleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu NTS (Baleiras Couto vd., 1996; Nguyen ve Gaillardin, 1997; Pulvirenti vd., 2000; Nguyen vd., 2000a, b; Caruso vd., 2002; Romero vd. 2005), NTS (Capece vd., 2003) ya da ITS (Vasdinyei ve Deak, 2003) bölgeleriyle komşu 18S geni, 18S geni (Tornai-Lehoczki ve Dlačny, 2000) ve 26S geninin farklı domainleri ile isimlendirilmiş ribozomal bölgeler için geçerlidir. Fakat aslında maya türlerinin tanımlanması için kullanılan bu bölgelerin yaygın olmaması bir veritabanının mevcut olmadığı anlamına gelmektedir.



Şekil 2.2. PCR amplifikasyonu ve ribozomal bölgelerin sekanslanmasına dayalı türlerin tanımlanmasına yönelik metod (Fernandez-Espinar, M.T. vd., 2006)

2.4. Gıdalarda Mayaların Neden Olduğu Bozulmaların Etkileri

Taze meyve ve sebzeler besin öğeleri açısından zengin, yüksek nem içeriğine sahip canlı dokuları barındırmaktadır. Meyvelerin pH değerleri (pH 3-5) sebzelerden daha düşüktür. Dolayısıyla meyveler, maya ve küflerin gelişimi için daha uygun ekolojik bir ortam sağlamaktadır. Sebzelerde öncelikle bakterilerin gelişimi bozulmaya neden olmaktadır. Mayalar çoğu meyve ve sebzenin doğal mikroflorasında bulunmaktadır. Türlerin gıdalardaki dağılımı ürünün çeşidine, çevresel koşullara, hasat koşulları ve depolama koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Meyvelerdeki bozulma mayaların fermantasyonu sonucu oluşmaktadır (Deak, 2008).

Alkollü içecekler çok çeşitlidir. Mayalar şarap, bira gibi içeceklerin üretiminde önemli bir role sahiptir. Mayaların fermantasyonuyla oluşan metabolitler son üründe lezzet ve aroma oluşumuna etki ettiği için, bu gıdalarda bulunan maya türlerinin faydalı ve bozulmaya sebep olup olmadığını ayırt etmek zordur. Şarap üretiminin farklı aşamalarına göre maya içeriği araştırılmıştır. Tarlada olgunlaşan üzümün maya içeriği, şıranın fermantasyonu sırasında, şarap üretim tesisinde, şişelenmiş şarapta gelişen

maya populasyonlarının değişimleri incelenmiştir. Üretimde kullanılan üzümün hijyen kalitesi, bozulmada güçlü bir etkidir. Genellikle *Z. bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii* suşları en zararlı, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. stellata* ise ikinci derecede zararlı türlerdendir (Deak ve Beuchat, 1996; Loureira ve Malfeito Ferreira, 2003).

2.4.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Mayaların Neden Olduğu Bozulmaların Etkileri

Bugün, gıda ve içecek endüstrisinde kullanılan mayaların etkileri *Saccharomyces cerevisiae*'nin yapmış olduğu ekmek, bira ve şarap fermantasyonunun ötesine geçmiştir. Mayalar ticari ürünlerin büyük çoğunluğunun fermantasyonuna katkı sağlamaktadır. Bu ürünlerdeki birçok maya türü bakteri ve filamentli funguslarla uyumlu bir şekilde faaliyet göstermektedir. Bazı mayalar güçlü antifungal aktivite göstermekte, bu da onların gıda bozulmasının biyolojik kontrolünde yeni ajan olarak kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Bazı mayaların probiyotik aktiviteye sahip olması mayaların önemli özelliklerinden bir diğeridir. Bu özellik mayaların endüstride kullanılabilirliğini büyük ölçüde artırmaktadır. Mayalar bu yararlı özelliklerinin yanısıra gıdalarda olumsuz etkilere de neden olabilmektedir. Birçok ticari üründe bozulmaya neden olarak, birçok gıda ve içecek sektöründe büyük ekonomik kayıplara yol açtığı bilinmektedir.

Bilimsel ya da bilimsel olmayan bilgiye sahip çoğu kişi mayaların ekmek, bira, şarap ve alkollü içecek üretiminde yaygın bir şekilde kullanılması nedeniyle mayaların yararlı organizmalar olduğunu düşündürmektedir. Ancak çok az kişi ekmek, bira, şarap ve damıtmada kullanılan mayaların birbirinden farklı olduğunu bilmekte, onlar hakkında daha fazla bilgiye ise *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, ya da *S. pastorianus*, taksonomik sınıflandırmayı bilerek ulaşacaklardır (Vaughan-Martini ve Martini, 1998; Kurtzman, 2003) .

Fakat *Saccharomyces*'in yiyecek ve içeceklerin fermantasyonuna yapmış olduğu olumlu katkıdan daha fazlasını yapan türlerin olduğu bilinmektedir. *S. cerevisiae* ve *S. bayanus*'e ek olarak *Hanseniaspora*, (*Kloeckera*), *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* ve *Issatchenkia*'nin çeşitli türleri elma ve üzümün fermantasyonundan elde edilen şaraplar pozitif katkı sağlamaktadır (Fleet, 1998, 2003a; Pretorius, 2000). *S. pastorianus* ve *S. cerevisiae*'nin yanısıra *Dekkera* (*Brettanomyces*) türleri bazı bira çeşitlerinin üretiminde oldukça önemlidir. Abbas ve

arkadaşları antioksidan, aroma, tat, renk ve vitaminlerin mayalar tarafından üretildiğini belirtmiştir.

Süt ürünleri mikrobiyolojik açıdan genellikle laktik asit bakterilerinin olduğu düşünülse de, peynirin olgunlaşması sırasında, kefir ve kıymız gibi fermente süt ürünlerinin tat ve yapı oluşumunda mayaların önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Fleet, 1990; Frohlich-Wyder, 2003). Süt ürünlerinde en çok bulunan türler *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* ve *S. cerevisiae*'dir ancak *Galactomyces geotrichum*, *Candida zeylanoides* ve çeşitli *Pichia* türleri de oldukça önemlidir.

Laktik asit bakterileri, *Micrococcus*, *Stapylococcus*'a ek olarak mayalar da et sucuklarının fermantasyonunda ve jambonun olgunlaşmasında da önemli rol oynamaktadır. *D. hansenii* ve diğer *Debaryomyces* türleri, *Y. lipolytica*, ve çeşitli *Candida* türleri de et ürünlerinin tat ve renk oluşumuna katkı sağlamaktadır (Lucke, 1998; Samelis ve Sofos, 2003).

S. cerevisiae'den başka diğer mayalar çeşitli tahıl ürünlerininfermantasyonunda yer almakta ve aktiviteleriyle de tahıl ürünlerinin tadına ve özelliğine etki etmektedir. En fazla katkı sağlayanlar, *S. exiguus*, *C. humicola*, *C. milleri*, *Torulaspora delbrueckii*, çeşitli *Pichia* ve diğer *Candida* türleridir(Jenson 1998; Meroth vd., 2003; Hammes vd., 2005). Kahve ve kakao (çikolata) çekirdeklerinde *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* ve *Saccharomyces* türlerinin gelişimi ve çeşitli aktiviteleriyle bu ürünlerin işlenmesi sırasında doğal birfermantasyon meydana getirirler. Aslında bu maya türleri çekirdeğin degradasyonuna yardım etmekte ve çikolatanın karakterisik tadının üretimine katkı sağlamaktadır (Schwan and Wheals, 2004). *Zygosaccharomyces rouxii*, *C. versatilis* ve *C. etchellsii* soya sosunun fermantasyonunda rol oynayanönemli osmotolerant türlerdir.

Mayalar gıdaların işlenmesinde güvenilir içerik ve katkı maddesi kaynağı olarak düşünüldüğü için tüketicilerde olumlu bir izlenime sahiptir. Yüksek B vitamini, protein, peptid, aminoasit, iz mineral içerikleri sayesinde ekmek ve bira mayaları beslenme ve gıda katkı maddesi olarak yıllardır kullanılmaktadır. Mayalar aynı zamanda insan tüketimi için alternatif protein kaynağı olarak düşünülmektedir (Peppler, 1970; Harrison, 1993). Stem ve arkadaşlarına göre tüketmiş olduğumuz

birçok ürün mayalar tarafından üretilmekte ve endüstriyel maya üretiminin yaklaşık % 15-20'si bu amaçla kullanılmaktadır. Abbas ve arkadaşları ise antioksidan, aroma, tat, renk ve vitaminlerin mayalar tarafından üretildiğini belirtmiştir.

Maya ekstraktları, maya otolizatları ve kuru mayalardan temellenen tatlandırıcılar mayalardan elde edilen en önemli ürünlerdir. Bu ürünler gıda endüstrisinde hoş, lezzetli, fındıksı, peynirsi, etsi ve tavuksu tat kaynağı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bazı maya ekstraktları glutamik asit ve nükleotid içerikleriyle güçlü tatlandırıcı işlevine sahiptir. Bu ise ürünün tadını artırmada önemlidir (Stam vd., 1998). Ekmek ve bira mayaları bu ürünlerin önemli kaynakları iken, bu mayaların çeşitliliği ve fonksiyonları *C. utilis* (*Pichia jadinii*) ve *K. marxianus* gibi mayaların kullanılmasıyla genişlemiştir (Lukondeh vd., 2003). Mayalar vanilya (*S. cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*), citronellol, linalool ve geraniol (*K. marxianus*) ve γ ve δ -dekalaktonaz (*Sporidiobolus sulmonicolor*, *Y. lipolytica*) gibi yüksek değerli aroma ve tatların potansiyel kaynakları olarak düşünülmektedirler (Hagedorn ve Kaphammer, 1994; Vandamme ve Soetaert, 2002).

Maya hücre duvarı $\beta(1\rightarrow3)$ ve $\beta(1\rightarrow6)$ glukan ve mannopteinden oluşmuştur ve hücre kuru ağırlığının yaklaşık %20-30'unu oluşturur (Fleet 1991; Nguyen vd., 1998). β glukanlar jelleştirici, katılaştırıcı ve yağ tutucu özelliğe sahiptir ve gıda işlemede uygulama çeşitliliği sağlamaktadır. Ayrıca antikanser (Bohn and Be Miller, 1995), immünmodulator (Sandula vd., 1999) ve kolesterol düşürücü aktivitelere (Bell vd., 1999) sahip olduğu bildirilmiştir. Mayalar mikotoksinleri de absorbe etmekte ve şarap gibi içeceklerden toksinlerin uzaklaştırılmasına olanak sağlamaktadır (Yiannikouris vd., 2004; Bejaoui vd., 2004).

Astaksantin ve diğer karotenoid pigmentler (Lyons vd., 1993; Johnson ve Schroeder, 1995) ve çeşitli vitaminler (Reilly, 1991; Saueret vd., 2004) mayalardan üretilmektedir.

Düşük pH, düşük sıcaklık, düşük su aktivitesi, yüksek tuz konsantrasyonları ve belirli enzimatik aktiviteleri mayaları sadece süt ürünlerinde değil aynı zamanda diğer ürünlerde de arzu edilen organizmalar yapmıştır. Birçok karakteristik özellikleri nedeniyle mayalar süt ürünlerinde bozulmaya da neden olabilmektedir. En yaygın kusurları arasında gaz üretimi, paket şişmesi, mayamsı ve diğer istenmeyen tat

oluşumu, renk bozukluğu ve yapı değişimidir (Jakobsen ve Narvhus, 1996). Aşağıdaki örneklerde bazı gelişme özellikleri nedeniyle fermente süt ürünlerinde bozulmaya neden olan organizmalar olarak mayaların potansiyel rolü gösterilmektedir. *D. hansenii*, *G. candidum*, *K. marxianus*, *P. membranifaciens*, *Y. lipolytica* gibi 6-10 °C' de iyi gelişirler (Engel vd., 1987). *S. exiguus*, *I. orientalis*, *C. guilliermondii* (= *P. guilliermondii*), *C. parapsilosis*, *Debaryomyces* spp., *P. anomala*, ve *S. cerevisiae* gibi bozulmaya neden olan birkaç maya türü farklı sıcaklıklar (8 ve 22 °C), pH (2,5-6) ve NaCl konsantrasyonları (0,4-8 %w/v) gelişebilme yetenekleri test edilmiştir. Test edilen türlerin çoğu düşük sıcaklıklarda (optimum sıcaklık ve NaCl konsantrasyonu), pH (optimum sıcaklık ve NaCl konsantrasyonu) ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (optimum sıcaklık ve pH) gelişebilmektedir. Ancak NaCl ve pH arasında sinerjistik bir etki meydana gelmektedir. Bu durum NaCl konsantrasyonu düştüğünde mayanın gelişiminin yavaşlayacağı anlamına gelmektedir (Betts vd., 1999). *Debaryomyces hansenii* pH, tuz ve sıcaklığa en toleranslı tür olarak düşünülmektedir. Süt ürünlerinin bozulmasında türlerin potansiyel rolü diğer fizyolojik özellikleriyle laktozun fermantasyonu ve asimilasyonu (*K. lactis* and *K. marxianus*), laktik asidin asimilasyonu, *D. hansenii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*) ve kazeininin hidrolizi (*D. hansenii*, *K. marxianus*) anlaşılmaktadır (Suriyarachchi ve Fleet, 1981).

Çiğ ve pastörize sütte mayalar genellikle düşük sayıda bulunmaktadırlar (Herbir ml de 10³ hücre). Fakat antibiyotik kalıntıları nedeniyle bakteriyal gelişim inhibe edildiğinde sayıları artabilmektedir (Engel vd., 1987). *Cr. albidus*, *Cr. flavus*, *Cr. curvatus*, *Cr. diffluens*, *Cr. humicola*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginosus*, *Trichosporon* türleri, ve *Y. lipolytica* çiğ ve pastörize süttten sıklıkla izole edilmektedirler (Davis 1970, Engel, 1986; Freitas vd., 1996; Walker ve Ayres, 1970). *Y. lipolytica*, *K. marxianus*, *D. hansenii* ve *S. cerevisiae* gibi inokülasyon deneyleriyle peynirden izole edilen birçok süt ürünleri mayanın sütte yüksek sayıda gelişebildiğini göstermiştir (Herbir ml'de 10⁸-10⁹ hücre). Bu gelişim türlerin laktoz ve laktik asit asimilasyonu, β galaktosidaz aktivitesi (E.C. 3.2.1.23) sitrik, laktik ve süksinik asit gibi organik asitlerin kullanımı ve lipolitik ve proteolitik aktivitelerle ve türlerin intrinsik özellikleriyle açıklanmaktadır.

Y. lipolytica ve *Candida catenulata*'nın süte inokülasyonu katılaşma ve gliserol üretimiyle sonuçlanmıştır (Roostita ve Fleet, 1996).

Tatlı ve ekşi kremlar maya türlerinin aktiviteleriyle bozulma eğilimi göstermekte ve köpüksü bir görünüm ve mayamsı kokuya neden olmaktadır. İdeal olarak bu ürünlerin herbir gramında 10 maya hücresinden daha az sayıda hücre bulunmalıdır (Fleet, 1990). *D. hansenii*, *Cr. diffluens*, *Cr. laurentii* (*Torula aurea*), *Rh. glutinis* ve *Rh. rubra* gibi lipolitik maya türleri bu ürünlerde sıklıkla izole edilse de *C. parapsilosis*, *I. orientalis* (*C. krusei*) ve *Trichosporon* türleride bulunabilmektedir (Davis, 1970). Tatlandırılmış ve konsantre sütler fermentatif mayalarla bozulabilmektedir (Olson ve Hammer, 1935). Mayaların aktivitesi sonucu tereyağı bozulması nadir görülmektedir. Fleet ve Mian 16 maya örneğinin 9'unda maya tespit edememiş ve kalan 7 örnekte ise sadece düşük sayıda maya gözlemlemiştir (Her bir gramda 10^3 hücreden daha az) *Rhodotorula* ve *Y. lipolytica*'ya ait lipolitik türler tereyağının bozulmasında oldukça önemlidir (Davis 1970; Fleet, 1990).

Mayalar fermentatif süt ürünlerinde (yoğurt ve krem peynir) paketin şişmesine ve istenmeyen tat oluşumuna neden olan en yaygın bozulma etkeni organizmalar olarak düşünülmektedirler (Rohm vd., 1991). Yoğurtların bozulmasında sadece *K. marxianus* ve *K. lactis* gibi laktozu fermente eden türler değil aynı zamanda *Hansenula* spp., *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *P. guilliermondii* ve *G.candidum* de bulunmaktadır (Engel, 1987). *Sporobolomyces* ve *Rhodotorula* cinsi Basidiomiset mayalarının yoğurtta bulunduğu da bildirilmiştir (Rohm vd., 1992; Suriyarachchi ve Fleet, 1981). Bozulmaya neden olan mayaların bazıları *Hansenula* spp. ve *S. cerevisiae* laktik asit bakterilerinin laktozu hidrolize etmesi sonucu üretilen galaktozu fermente edebilmektedirler (Glaeser, 1981). Karbonhidratların fermantasyonu sonucunda CO₂ üretilmekte ve paketin şişmesine neden olmaktadır. Meyvemsi, acı ve mayamsı tatlar gibi istenmeyen tat oluşumu meydana gelmektedir (Fleet, 1990).

Krem peynir mayaların neden olduğu bozulmanın duyuşal teşihisi için eşik değer türlere bağı olmakla birlikte 10^4 – 10^6 cfu/mg arasında değışmektedir. İyi üretim uygulamaları altında üretim anındaki maya hücre sayısı herbir gram üründe 10 hücreden az tercihen herbir üründe 1 hücreden az olmalıdır (Davis 1970; Fleet, 1990). Satış anında maya sayısı herbir gram üründe 100 hücreden daha az olmalıdır (Davis 1970).

Rafta bulunan ürünlerde maya hücre sayısı sıklıkla 10^3 hücre ile en yüksek 10^5 hücre bulunmaktadır (Suriyarachchi ve Fleet, 1981). Özellikle meyveli yoğurtlar mayalarla

bozulma eğilimindedir (Davis 1970; Fleet, 1990). Kontaminasyonun başlıca kaynakları üretim ve paketlenme bölgeleri çevreleri ve yoğurt üretiminde kullanılan meyvelerdir. İkinci durumda *C. magnoliae*, *C. parapsilosis*, *P. holstii*, *P. membranifaciens*, *Z. bailii*, *M. pulcherrima* ve *I. orientalis* gibi maya türleri sıklıkla izole edilmektedir (Meier vd., 1999). Son zamanlarda yoğurdun bozulmasına neden olan mayaların identifikasyonuna yönelik moleküler teknikler geliştirilmiştir. Dot blot hibridizasyonda 18S rDNA'nın dioksijenin etiketli probları kullanılmış ve yoğurtta bozulmaya neden olan çoğu mayanın tanımlanmasına olanak sağlanmıştır. İkinci yaklaşımın pratik teşhis sınırı her bir üründen 10^3 cfu/g'dır bu yüzden in situ teşhise bir zenginleştirme basamağıyla başlanması önerilmektedir (Kosse vd., 1997)

Mayalar taze ve yumuşak peynirlerde gazlı ve istenmeyen tat oluşumuna neden olmaktadır. Bu ürünlerde *Torulospira delbrueckii*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *Cr. spp.*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *P. fermentans*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. norvegensis*, *Rh. spp.* ve *Y. lipolytica* en sık izole edilen türlerdir (Westall ve Filtenborg, 1998). Mayaların neden olduğu peynirdeki şişme *K. marxianus* ve *Dekkara anomala* ile çok yakından ilişkilidir (Fadda vd., 2001; Fleet, 1990). Diğer yandan mavi damarlı peynirlerde yapı gelişiminde faaliyet gösterdiği için *K. marxianus* bu üründen arzu edilmektedir. Gaz üretimi yapı değişiminin ana sebebidir bu durum ise mayaların neden olduğu bozukluklardan birisidir. Mayaların neden olduğu diğer bir bozukluk ise nispeten uzun bir olgunlaşma periyodunun ardından özellikle peynir yüzeyinde oksidatif kararmayla kendini gösteren renk değişikliğidir. Kararma bozukluğuna başlıca *Yarrowia lipolytica* tarafından üretilen bir enzim olan tirozinaz'ın tirozini oksidasyonu neden olmaktadır. Bu durum genellikle pH bazık olduğunda olgunlaşmanın sonunda gözlemlenmektedir (Carreira vd., 1998; Ross vd., 2000). Peynirlerin tat ve yapısı etkilenmemesine rağmen, tüketiciler bu görünüşü beğenmemektedirler. Üretimden paketlenme bölgesine kadar olan aşamada mayaların bulunmasına tekrar bulaşma neden olmaktadır.

2.5. Enzimler

Yaşam iyi şekilde organize olmuş kimyasal reaksiyon serisine bağlıdır. Bu reaksiyonların çoğu, yaşamı sürdürmek için yavaş bir şekilde devam etmektedir. Dolayısıyla doğa, bizim enzim olarak adlandırdığımız katalistleri tasarlamıştır.

Enzimler kimyasal reaksiyonların hızını arttırmaktadır. Enzimlerin katalitik gücü virüslerden insana kadar tüm yaşam formlarında hayata dair işlemleri hızlandırmaktadır. Birçok enzim canlı organizmadan çıkarıldıktan sonra katalitik potansiyelleri değişmemektedir ve ticari amaçlar için enzimlerin katalitik gücünün kullanılması ve tanımlanması uzun zaman almamaktadır. Aslında, peynir, ekmek, alkollü içecekler ve etlerin yumuşatılmasıyla ilgili en eski bilgi eski zamanlardaki metinlerde yer almaktadır.

Bugün enzimler birçok yiyecek ve içecek üretim işlemlerinde ve çamaşır deterjanı gibi (protein lekelerini, proteolitik enzimler yardımıyla çıkarmaktadır.) sayısız tüketim ürünüde içerik olarak anahtar rol oynamaya devam etmektedir. Çoğu hastalık bir ya da birkaç enzimin normal aktivitesiyle ilişkilendirildiği için enzimler sağlık bilimleri de ilişkiye sahiptir. Dolayısıyla modern ilaç araştırmalarının çoğu bu enzimlerin kuvvetli ve spesifik inhibitörleri üzerine temellenmiştir. Enzimlere ilişkin elde edilen bilgiler sadece tatmin etmemiş aynı zamanda toplumun birçok pratik ihtiyaçlarını karşılamak için bu bilginin kullanılması sayesinde enzim çalışmaları ve enzimlerin faaliyetleri bilim adamlarını oldukça etkilemiştir.

2.5.1. Antik Çağda Kullanılan Enzimler

Enzimlerin ticari kullanımına ilişkin en eski bilgi Hammurabi yazıtlarındaki şarap yapımının tarifinde gelmektedir (eski Babylon, milattan önce 2100). Fermantasyon için enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanımı o çağdaki insanlarca oldukça yaygın kullanılmıştır. Yazıtlarda bu enzimlere ilişkin bilgi sadece Babylonlarda değil aynı zamanda Roma, Yunan, Mısır, Çin ve Hindistan eski uygarlıklarda da kullanılmıştır. Eski yazıtlar alkolün asetik aside enzimatik dönüşümüne temelli olan sirke üretimiyle ilgili sayısız kaynak içermektedir. Eski yaşamın vazgeçilmez maddesi olan sirke sadece gıdaların hazırlanmasında ve saklanmasında değil aynı zamanda tıbbi amaçlar için de kullanılmıştır.

Eski toplumlarda bir diğer önemli yiyecek süt ürünleridir. O zamanlar taze süt yeterli sürede saklanmadığı için, sütün peynire dönüşümü yiyecek üretiminin önemli bir parçası olmuş ve çiftçinin ürünü uzaktaki marketlere kabul edilebilir formda götürmesini mümkün kılmıştır.

Peynir birçok enzim aktivitesiyle aracılığıyla kesilmiş sütten yapılmaktadır. Eski zamanlarda bu amaç için en yaygın kullanılan maddeler incir ağacında ekstrakt olarak

elde edilen fişin ve çok bölmeli mideye sahip olan inek gibi hayvanların midesinin 4.kısımındaki bir eksrakt rennet olarak elde edilen rennindir. Çağlar boyunca kullanılan bir diğer yiyecek maddesi de ekmeçtir. Mayalar sayesinde ekmeğin kabarması eski çağlarda yaygın şekilde kullanılan ve karbondioksidin enzimatik üretiminden kaynaklanan bu işlem oldukça iyi bilinmektedir.

Eski zamanlardan beri kullanılan bir diğer enzim temelli işlem ise etin yumuşatılmasıdır. Birçok Pasifik adası yerlisi papaya meyvesinde elde ettikleri meyve suyunu oldukça sert etleri bile yumuşatmada kullanıldığı bilinmektedir. Bitki ekstraktlarından elde aktif enzim papain olarak bilinen proteaz, bugün bile ticari et yumuşatılmasında kullanılmaktadır. 1700'lerde İngiliz donanması Pasifik adalarını keşfetmeye başladığında, onlar papaya meyvesini etlerin yumuşatılmasında ve mantar hastalığının tedavisinde kullanıldığını görmüşlerdir. 18. yüzyılda Avrupa da papaya kullanımına ilişkin donanmanın raporu oldukça büyük ilgi uyandırmıştır ve sindirim enzimlerinin birçoğunun sistematik çalışmasına öncülük etmiştir.

2.5.2. İlk Zamanlardaki Enzimoloji

Eski çağda yaşayan insanlar enzimatik aktivitenin birçok pratik uygulamasını yapmıştır, ancak bu ilk uygulamalar herhangi bir sistematik çalışma ya da kullanılan işlemin kimyasal temelini anlamaktan ziyade deneysel gözlemleri ve halk bilgisini temel almıştır. 18. ve 19. yüzyıl bilimadamları daha sistematik bir şekilde enzimlerin aktivitelerini çalışmaya başlamıştır. Sindirim işlemi aydınlanma yıllarının popüler araştırma konusu olmuştur. Avcı kuşların taşlık olmadan eti nasıl sindirdiğini, ünlü Fransız bilim adamı Reaumur (1683-1757) şahinlerin sindirimi üzerine yapmış olduğu ilk çalışmalarının bazılarında göstermiştir. Reaumur mide dokusunun fiziksel aktivitesinden korunmak için sabitlenmiş bir et parçasının bulunduğu kafes tel içinde bir tüp tasarlamıştır. Reaumur mide içerisindeki taşlığa et içeren tüp yerleştirdiğinde etin 24 saat içerisinde sindirildiğini gözlemlemiştir. Dolayısıyla Reaumur tüp içerisine mide özsuyu temas ederek et sindirildiği için sindirimin sadece fiziksel işlemlerden ziyade kimyasal bir işlem olduğu sonucuna varmıştır. Benzer deneyi kemik ve bitki kısımlarıyla da denemiştir, etin sindirildiğini, kemiğin mide özsuyu aktivitesiyle büyük oranda yumuşatıldığını, bitki materyalinin çözücülere karşı dayanıklı olduğunu bulunmuştur. Reaumur'un çalışmaları Spallanzani (1729-1799) tarafından genişletilmiş birçok hayvanın midesine yerleştirilen bir metal tüp içerisindeki etin sindirimini göstermiştir.

Bugün enzimatik reaksiyonların yaygın özelliklerini tanımlamaktayız ancak Spallanzani zamanında bunların hepsi yeni ve heyecan verici bulgulardı. Aynı zaman periyodunda diğer biyolojik sistemin büyük çoğunluğunun enzimatik aktivitelerinin keşfi de gerçekleşmiştir. Örneğin, yaban turpundan elde edilen peroksidaz tanımlanmış ve tahıldaki α -amilazın aktivitesi gözlemlenmiştir. Bu maddelerle ilgili ilk gözlemler bitki ve hayvanlardan elde edilen ekstraktların enzimatik aktiviteye sahip olup olmadığını da göstermiştir.

19. yüzyılın ikinci yarısında bilim adamları saf formda aktif bileşen elde etmek için bu ekstraktların ayrıştırılma denemelerine başlamışlardır. Örneğin, 1897 yılında Bertand bitki özütünde lakkaz enzimini kısmen saflaştırmış ve Buchner rehidre edilerek kurutulan mayadanpreslenerek elde edilen suyu kullanarak canlı maya hücre yokluğunda alkolik fermantasyonun olabileceğini göstermiştir. Buchner buzdolabında 5 günlük depolama sırasında mayadan elde edilen suyun aktivitesinin azaldığını bildirmiştir. Eğer bu suya şeker kamışı ilave edilirse buzdolabı koşullarında aktivite 2 hafta kadar değişmemektedir. Aynı zaman periyodunda Kühne maya ekstraktlarından katalizi çalışmış, ilk defa enzim sözcüğünü kullanmıştır (Bu sözcük ortaçağ Yunan sözcüğü enzimostan türetilmiş, ekmeğin kabarması işlemiyle ilişkilendirilmiştir).

2.5.3. Günümüz Enzimolojisi

Enzim aktivitesinin detaylı mekanizması ve enzim yapısıyla ilişkisi ile ilgili temel sorular halen mevcuttur. Yeniçağda devam eden gelişme, protein yapısının biyofiziksel problemlerinin kullanımı ve moleküler biyolojik metodlarının enzimolojiye uygulanması ile bu soruların çözümüne en güçlü araçları sunmuştur. X ray kristallografisi enzimler ve enzim ligand komplekslerinin yapısını çözümlmek için rutin olarak kullanılmaya devam edilmektedir. Ayrıca yeni NMR metodları ve manyetikasyon transfer metodları bir çözümldeki küçük enzimlerin üç boyutlu ve ligand bağlı enzimlerin yapılarının değerlendirilmesini mümkün kılmıştır.

Sinkroton radyasyon kaynakları ile Laue ışınının uygulanması enzim aktivitesi sırasında reaksiyon esnasında oluşan yapıların belirlenebilmesi için bilim adamlarına olanak sağlamaktadır. Bu sayede enzim katalizinde özel adımların detaylı fotoğrafları alınabilmektedir. Işınsal (örneğin, dairesel çift renklilik, UV, floresan) ve titreşimsel (kızılötesi, Raman) spektroskopiler gibi diğer biyofiziksel metodlar çözümldeki enzim yapısı ve reaktiflik konusuna da uygulanabilmektedir. Bu spektroskopik metodların

çoğundaki teknik gelişmeler son derece güçlü ve enzimologlar için erişilebilir araçlar haline getirmiştir. Ayrıca moleküler biyoloji araçları bilim adamlarına yabancı konak organizmalarına enzimlerin klonlanması ve ifadesinin büyük bir etkinlikle yapılmasına olanak sağlamıştır. Enzimler izole edilmeden önce moleküler klonlamayla tanımlanamaz ve karakterize edilemezler. Doğal kaynaklarında yok denecek kadar az bulunan prokaryotik konaklar bu enzimlerin aşırı ifadesiyle enzimlerin saflaştırılmasına ve karakterizasyonuna olanak sağlamaktadır. Bu protein bilimi için oldukça büyük bir gelişmedir.

Enzim çalışmaları bilim camiası ve toplum için büyük bir öneme sahiptir. Birçok endüstriyel uygulamada enzimlerden faydalanmaya devam edilmektedir. Dahası yiyecek ve içecek üretiminde enzimlerin geleneksel kullanımı halen devam etmektedir. Yeniçağda tüketim ürünleri ve kimyasal üretimde enzimlerin rolü artarak genişlemektedir. Enzimler bugün stereospesifik kimyasal sentez, çamaşır deterjanları, kontakt lens için temizleme solüsyonu gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Modern enzimoljinin en heyecan verici alanlarından birisi de insan sağlığı ve veteriner hekimlikte ilaç olarak kullanılan enzim inhibitör uygulamalarıdır. Çoğu hastalıkta spesifik enzim inhibitörü içeren çoğu ilaç yaygın şekilde kullanılmaktadır. İnsan fizyolojisinde binlerce enzim izole edilemekte ya da karakterize edilmektedir. Hastalıkla ilişkili enzimler keşfedildikçe ve karakterize edildikçe, insan sağlığının gereksinimlerini karşılamada bu katalistlerin aktivitelerini önleyebilecek tasarımlara ihtiyaç duyulacaktır.

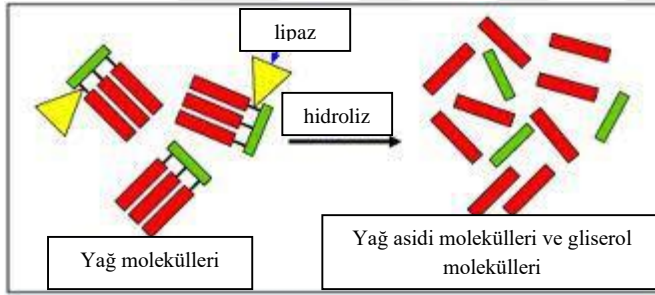
2.6. Lipazlar ve Özellikleri

Enzim aracılı proseslerin kullanımına eski uygarlıklarda rastlanmaktadır. Biyoteknoloji alanında mevcut olan birçok endüstriyel uygulama günlük hayatımızda evlerde kullandığımız biyoteknoloji ürünlerini oluşturmaktadır. Bunların bazıları enzimleri üretmeye yarayan ya da farklı gıdaların kalitelerini arttıran gıda uygulamalarıdır. Bugün yaklaşık 4000 enzim bilinmekte ve bunların 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin çoğu mikrobiyal orjinlidir. 1960'lere kadar enzimlerin toplam yıllık satışı birkaç milyon dolarken bugün pazarda harika bir gelişim gözlenmektedir (Godfrey ve West, 1996; Wilke, 1999). Fermantasyon prosesi, üretimin biyokimyası ve metodların iyileştirilmesi sayesinde enzimlerin birçoğu makul şekilde üretilebilmektedir. Enzim kullanım metodlarındaki gelişmelere olan talep de büyük oranda artmıştır. Enzimleri kataliz yeteneğiyle birçok farklı dönüşüm

meydana getirerek ticari olarak kullanılan enzimlerin çoğu üretilmeye devam etmektedir. Dünyadaki enzim talebi 12 büyük üretici ve 400 küçük tedarikçiyle karşılanmaktadır. Dünyadaki endüstriyel enzimlerin yaklaşık %60'ı Avrupada üretilmektedir. Bu endüstriyel enzimlerin yaklaşık %75'i (lipaz dahil) hidrolitiktir. Pazarın hakimi olan proteazlar tüm enzim satışının yaklaşık %40'ından sorumludur.

Lipazlar (EC 3.1.1.3) açığliserollerin hidrolizinden başlıca sorumlu olan hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Lipazlara doğada sıklıkla karşılaşılır ve lipidlerin (triacilgliserol) biyolojik dönüşümünden sorumludurlar. Sulu ve susuz ara yüzeylerde eşsiz faaliyet gösterme yetenekleri sayesinde esterazlardan ayrılmaktadır (Verger, 1997; Schmidt ve Verger, 1998).

Lipazlardaki arayüzey aktivitesi kavramı onların su ve lipid arasındaki katalitik aktivitelerinin kısıtlanmasından ortaya çıkmıştır. Lipazların katalitik aktivitesi büyük oranda maddelerin katı fazına bağlıdır.



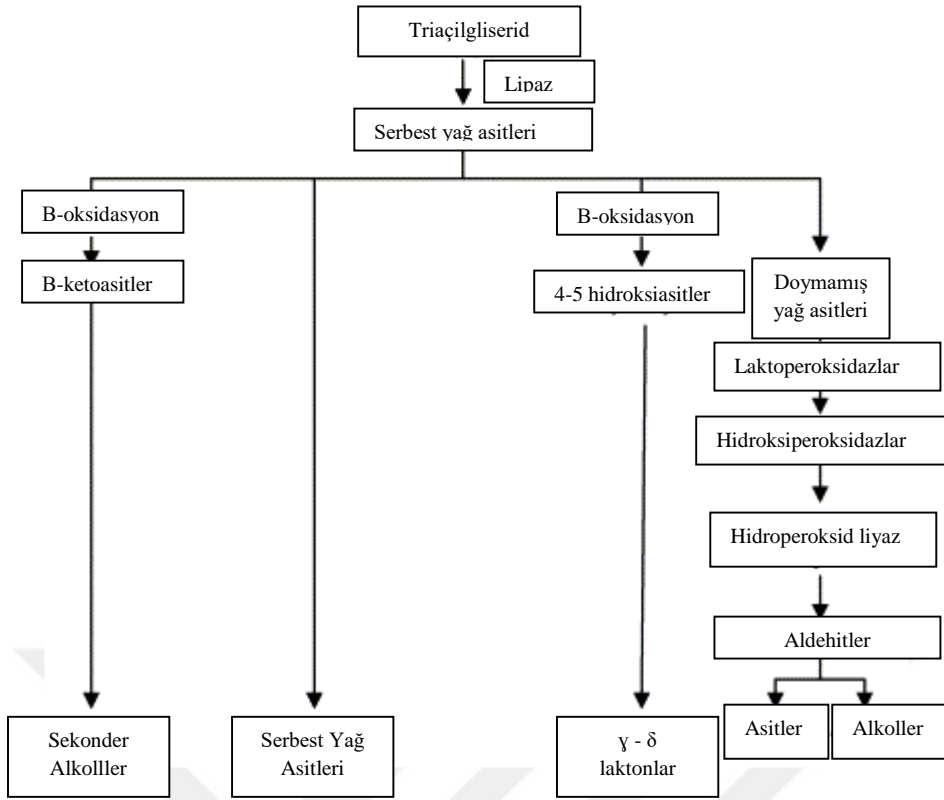
Şekil 2.3. Lipaz aktivitesi (El-Hofi vd., 2011)

Ticari olarak kullanılan lipazlar ekstraselüler lipazın büyük çoğunluğunu üreten mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Birçok lipaz organik çözücülerde aktiftir, bu enzimler esterifikasyon (Chowdary vd., 2001; Hamsaveni vd., 2001; Kiran vd., 2001a; Kiyota vd., 2001; Krishna ve Karanth, 2001; Krishna vd., 2001; Rao ve Divakar, 2001), transesterifikasyon ve glikoller, mentollerin seçici açılması ve peptid ve diğer kimyasalların sentezini içeren faydalı birçok reaksiyonu katalizlemektedirler. Gelecekteki beklenti ise şuan proteaz ve karbonhidrazlarda olduğu gibi lipazların da endüstriyel öneme sahip olmasıdır.

Lipazlar organik kimyada ürün işlenmesi, deterjan üretimi, biyosüpfaktanların sentezi, oleokimya endüstrisi, süt endüstrisi, agrokimya endüstrisi, kağıt üretimi, besin, kozmetik ve eczacılık sektörü gibi birçok alanda gelecek vaad eden uygulamalara

sahiptir. Yeni bileşiklerin sentezi lipaz temelli teknolojinin gelişimiyle bu enzimlerin kullanımını hızlı bir şekilde arttırmıştır (Liese vd., 2000). Bu sayede uygun özelliğe sahip lipazlar erişilebilir hale gelmiş lipaz temelli sentez ve ticari biyolojik dönüşüm yoluna girmiştir. Ticari olarak kullanılan lipazların çoğu çamaşır deterjanı olarak kullanılmaktadır. Deterjan enzimleri toplam lipaz satışının yaklaşık %32'sini oluşturmaktadır.

Lipazların çok azı oleokimyasal dönüşümlerde kullanılmaktadır (Bornscheuer, 2000). Lipazlar γ -linoleik asidin işlenmesinde, çoklu doymamış yağ asitleri, astaksantin, gıda boyaları, metil ketonlar, mavi küflü peynirin karakteristik tat molekülü, γ -dekalaktonun prekürsörü olarak kullanılan 4-hidroksidekanoik asit, meyvemsi tat, prepolimer olarak kullanılan dikarboksilik asitler, gliseridlerin daha değerli formlara interesterifikasyonu (örneğin kakao yağının çikolata üretiminde uzaklaştırılması) (Undurraga vd., 2001), trigliseridlerin 2 pozisyonundaki bitkisel yağların modifikasyonu, bebek mamalarında kullanılan insan sütündeki yağ ile benzer yağ elde etmede, isopropil myristat içeren lipid esterlerinde, kozmetik ürünlerinde, gıda ve farmasötik uygulamalarda emülsifiye eden ajan olarak kullanılan monogliseridlerin eldesinde önemli rol oynamaktadırlar.



Şekil 2.4. Serbest yağ asitlerinin katabolizması (El-Hofi vd., 2011)

Biyolojik aktivite bağlamında kiralitenin öneminin farkına varılmasıyla naproksen (Xin vd., 2001) ve ibuprofen (Lee vd., 1995; Ducret vd., 1998; Xie vd., 1998; Arroyo vd., 1999; Chen ve Tsai, 2000) gibi kiral antiinflamatuar ilaçları içeren enantiomerler; anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri gibi kan basıncı düşürücü ajanları (örneğin; captopril, enalapril, ceranopril, zofenapril ve lisinopril) ve dialtezem gibi kalsiyum kanalı bloklayıcı ilaçların saf olarak endüstriyel sentezi için etkili metodlara talebin artmasına neden olmuştur. Lipazlar bu ilaçların sentezinde de kullanılmaktadır (Berglund ve Hutt, 2000).

2.6.1. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemi

Lipaz analizi için tek bir evrensel metot yoktur. Bir mikroorganizmanın lipaz pozitif olarak tespit edilebilmesi için 3 faktörün birlikte çalışması gerekmektedir. Birincisi organizma üremek zorundadır, ikincisi uygun üretim koşullarında organizma lipaz üretebilmeli ve salgılayabilmelidir. Üçüncü olarak da enzimin tespit metodu yeterli duyarlılıkta olmalıdır (Hasan vd., 2009).

Ham ve saf lipaz örneklerinde lipaz aktivitesinin tespiti için birkaç metod geliştirilmiştir. Lipaz reaksiyonunun oranı; (a) substratın, trigliseridin kaybolma

oranına, (b) serbest yağ asitlerinin üretim oranına veya (c) emülsiyonun berraklaşma oranına göre tespit edilmektedir (Hasan vd., 2009).

Tributirin ve triolein gibi, ki bunlar besiyeri ortamını bulanıklaştırılar, substratlar içeren petri kaplarında kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zon lipaz varlığını katı besiyerlerinde göstermektedir. Lipolitik aktivitenin katı besiyerlerinde gösterilmesinde ayrıca Victoria Blue B, Spirit Blue, Nile Blue Sulphate ve Night Blue gibi boyalar da kullanılmaktadır. Açığa çıkan yağ asitlerinin pH'ı düşürmesine göre renk indikatörlerindeki değişim sonucu belirlemektedir. Titrasyon metodunda ise ortamda açığa çıkan serbest yağ asitleri NaOH veya KOH ile titre edilerek hesaplanmaktadır. Bu metotta genellikle zeytinyağı substrat olarak kullanılmaktadır. Nefelometri metodunda uzun zincir yağ asidi olan triolein digliseritlere yıkılmaktadır, trioleinin yıkımı bulanıklıktaki azalmayla sonuçlanmaktadır. Diğer lipaz aktivitesi tayin metodları da tablo 2.1.'de özetlenmiştir (Hasan vd., 2009).

Kullanılan Metotlar	
Katı Besiyerinde Tarama Metotları	Test kitleri
Substrat olarak yumurta sarısı kullanımı	Lipoprotein Lipaz ELIZA kiti
Titrimetrik Metotlar	EnzChek Lipaz Substratı
Nefelometri ve Türbidimetri (Bulanıklık ölçümü)	Koumarin-bazlı lipaz substratları
Triaçilgliserolden serbest bırakılmış gliserol	MarkerGene TM floresan lipaz tayin kiti
Elektrik iletkenliği	QuantiChrom TM lipaz tayin kiti (DLPS-100)
Wilhelmy Plaka Metodu	İmmünolojik metotlar
Akustik dalga iletkenliği	NMR metodu
Kolorimetrik metotlar	Atomik Güç Mikroskopisi
Fluorimetrik metotlar	Kızılötesi spektroskopisi
Kütle spektrometrisi	Elektron mikroskopisi ile tespit
Kromatografik Metotlar, (HPLC ve Gaz Kromatografisi)	Radyoaktif Yöntemler
Yüzeyler-arası Gerilim İzleme (Interfacial tension monitoring)	Yağ damlası metodu

Tablo 2.1. Lipaz enzimi aktivite tayin yöntemleri (Hasan vd., 2009)

2.6.2. Lipazların Uygulama Alanları

Lipazlar hayvansal ve bitkisel yağların işlenmesinde, deterjan ve yağ çıkarma formulasyonlarda, gıda işlenmesinde, kimyasalların ve ilaçların sentezinde, kağıt üretiminde ve ilaçların üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Rubin ve Dennis, 1997a,b; Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998). Lipazlar yağlı atıkların (Masse vd., 2001) ve poliüretanların (Takamoto vd., 2001) parçalanmasını hızlandırmak için kullanılmaktadır.

Endüstri	Etki	Uygulama Ürünü
Süt ürünleri	Sütün, yağın hidrolizi, peynir olgunlaşması, tereyağının modifikasyonu	Süt, peynir ve tereyağında tat gelişim ajanı
Pastane ürünleri	Tat arttırma	Raf ömrünü uzatma
İçecekler	Aroma arttırma	Alkollü içecekler (şarap)
Gıda işleme	Kalite arttırma	Mayonez işleme ve köpürtme
Doğal gıda	Transesterifikasyon	Doğal besin
Et ve balık	Tat gelişimi	Et ve balık ürünlerde yağın giderilmesi
Çamaşırhane	Biyolojik bozulmanın azaltılması	Çamaşır temizliği
Kozmetik	Esterifikasyon	Cilt ve güneş kremi, duş kremi
Surfaktan	Lizofosfolipidlerin üretiminde fosfolipazla yer değiştirme	Poligliserol ve karbonhidrat yağ asidi esterleri, sos ve dondurma gibi gıda formülasyonlarında emülsifiye edici ve endüstriyel deterjan olarak kullanılmaktadır.
Kimyasal tarım maddesi	Esterifikasyon	Fenoksipropionat gibi herbisidler
İlaç	Ekzopolyester alkolleri	İlaç üretiminde çeşitli ara ürün üretmek için kullanılmaktadır.
Akaryakıt sanayi	Transesterifikasyon	Biyodizel üretimi
Kirlilik kontrolü	Bitkisel ve hayvansal yağların hidrolizi ve transesterifikasyonu	İnatçı lekeleri çıkarmak ve bitkisel ve hayvansal yağları hidrolize etmek
Kağıt sanayi	Hidroliz	Kağıt kalitesinin arttırımı

Tablo 2.2. Lipazların endüstriyel uygulamaları (Aravindan vd., 2006; Vulfson, 1994)

2.6.2.1. Deterjan Endüstrisinde Kullanılan Lipazlar

Gelişmiş ülkelerde deterjan içeriğinde enzimlerin kullanımı oldukça yaygındır. Şuan mevcut olan deterjanların yarısından fazlası enzim içermektedir. Çamaşır deterjanları çamaşırlara yumuşaklık katması, dayanıklılık sağlaması, yapısının bozulmaması, suda dağılmaması, gözlere ve ciltlere zarar vermemesi gibi özellikler sayesinde oldukça popüler olmuştur. Çok farklı marka ve çamaşır deterjanı çeşidi mevcuttur ve çoğu bazı kalite özelliklerine sahip olduğunu iddia etmektedir (Bajpai ve Tyagi, 2007). Son 20 yıldan beri katalitik davranışlarında harika bir beceri gösterdikleri için lipazların biyoteknolojik uygulamalarının öneminde oldukça büyük artış meydana gelmiştir. Deterjan endüstrisindeki son trend ise sadece enerji kazancı değil aynı zamanda kumaşın yapısını ve kalitesini korumaya yardımcı olmasıyla düşük sıcaklıkta yıkamadır (Weerasooriya ve Kumarasinghe, 2012). Deterjan endüstrisi miktar ve değer bakımından enzimlerin tüketicisidirler. Deterjanlarda enzim kullanımı inatçı lekeleri çıkarmaya ve deterjanı çevresel olarak güvenilir hale getirmeye yardımcı olmaktadır. Günümüzde birçok çamaşır deterjanı proteaz, amilaz, selülaz ve lipaz gibi enzim karışımını içermektedir (Jeon vd., 2009). Yağları hidrolizleyebilmeleri sayesinde lipazların endüstriyel ve evsel deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanımı oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Deterjan lipazları aşağıdaki gereksinimleri karşıladıkları için özellikle seçilir;

1. Düşük substrat spesifitesi, yani çeşitli karışımların yağlarını hidroliz edebilmeleri
2. Nispeten zorlu yıkama koşullarına dayanıklı olmaları (pH 10-11, 30-60 °C)
3. Zararlı sürfaktan ve enzimlere dayanıklı olmaları (örneğin, linear alkil benzen sülfanatlar (LAS) ve proteazlar) gibi özellikler birçok deterjan içeriğinde oldukça önem taşımaktadır. Arzu edilen özelliklere sahip lipazlar kesiksiz tarama (Yeoh vd., 1986; Wang vd., 1995; Cardenas vd., 2001) ve protein mühendisliği (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998) kombinasyonundan elde edilmektedir. 1994 yılında Novo Nordisk *Thermomyces lanuginosus* fungusundan izole edilen ilk ticari rekombinant lipazı ‘lipolase’ piyasaya sunmuştur.

2.6.2.2. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Lipazlar

Yağlar gıdaların en önemli unsurlardan birisidir. Trigliseridlerin besinsel ve duyuşal değeri ve fiziksel özellikleri gliserol omurgasındaki yağ asitlerinin pozisyonu, yağ asitlerinin zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi gibi faktörlerden büyük oranda etkilenmektedir. Lipazlar gliseriddeki yağ asidi zincirlerinin yerleşimini değıştirerek ve yağ asitlerinin bir ya da daha fazlasının yenileriyle yer değışimiyle lipidlerin özelliklerinin değışmesine olanak sağlamaktadır (Colman ve Macrae, 1980; Pabai vd., 1995 a, b; Undurraga vd., 2001).

Yüksek yağ içrikli kakao yağı, palmitik ve stearik asit içerir ve erime ısısı yaklaşık 37 °C'dir. Ağızda kakao yağının erimesi çikolata gibi ürünlerde arzu edilen ferahlatıcı duyuşu yaratmaktadır. Karışık hidroliz ve sentez reaksiyonları içeren lipaz temelli teknoloji daha az arzu edilen bazı yağların kakao yağlarına dönüştürülmesinde kullanılmaktadır (Colman ve Macrae, 1980; Undurraga vd., 2001).

Metabolik aktiviteleri sayesinde çoklu doymamış yağ asitleri, ilaç ve gıda katkıları olarak artan bir şekilde kullanılmaktadır (Gill ve Valivety, 1997a; Belarbi vd., 2000). Çoklu doymamış yağ asitlerinin çoğu lipid membranların ve prostoglandinlerin normal sentezi için gereklidir. Mikrobiyal lipazlar ringa yağı, tonbalığı yağı ve hodan yağı gibi hayvansal ve bitkisel yağlardan çoklu doymamış yağ asitleri elde etmek için kullanılmaktadır. Serbest çoklu doymamış yağ asitleri ve onların mono ve digliseridleri, antikolesterolemikler, antiinflamatuvarlar ve trombolitikleri içeren çeşitli ilaçların üretiminde kullanılmaktadır (Gill ve Valivety, 1997b; Belarbi vd., 2000). Ayrıca, lipazlar peynirin olgunlaşmasında, ekmek üretiminde ve içeceklerin tadının gelişiminde kullanılmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998). Lipazlar, et ve balık ürünlerinde yağların uzaklaştırılmasına da yardımcı olmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998).

2.6.2.3. Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisinde Kullanılan Lipazlar

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi her yıl büyük miktarda lignoselülozik biyokütleyi işlemektedir. Kağıt hamuru üretim teknolojisi yüksek çeşitlilik göstermekte ve mikrobiyal enzim uygulamalarına sayısız fırsat sunmaktadır.

Tarihsel olarak, enzimler kağıt endüstrisinde bazı kullanımlar bulmuştur, fakat bunlar ham nişasta modifikasyonu gibi alanlarla sınırlı kalmıştır (Bajpai, 1999). Ağacın hidrofobik bileşenleri ya da yapışkanlı tabaka kağıt hamuru ve kağıt üretiminde ciddi problemlere neden olmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998). Lipazlar kağıt yapımında, kağıt hamurunda yapışkanlı tabakayı kaldırmak için kullanılmaktadır. Japonya'daki, Nippon Kağıt Endüstrileri, ağaç trigliseridlerini %90'a kadar hidrolize eden *Candida rugosa* fungal lipazı kullanarak yapışkanlı tabakanın kontrolüne yönelik metod geliştirmişlerdir.

2.6.2.4. Organik Sentezlerde Kullanılan Lipazlar

Organik kimyasal sentezde lipazların kullanımı artan bir şekilde önem kazanmıştır. Lipazlar kimyasal seçici, bölgesel seçici ve stereoseçici dönüşümlerin büyük çoğunluğunda kullanılmaktadır. Organik kimyada katalist olarak kullanılan lipazların çoğu mikrobiyal orjinlidir. Bu enzimler reaksiyon karışımında hidrofilik-lipofilik ara yüzeylerde iş görmekte ve organik çözücülere karşı dayanıklılık göstermektedir.

Lipazlar su-sıvı ara yüzeylerinde suyla karışmayan trigliseridlerin hidrolizini katalizlemektedir. Verilen koşullar altında, reaksiyon karışımındaki su içeriği lipaz kataliz reaksiyonunun yönünü belirlemektedir. Çok az ya da hiç su olmadığında sadece esterifikasyon ve transesterifikasyon tercih edilmektedir. (Klibanov, 1997). Aşırı su olduğunda ise hidroliz tercih edilmektedir. Aşırı kritik çözücülerde bile lipaz katalizleme reaksiyonu tanımlanmıştır (Rantakyla vd., 1996; Turner vd., 2001; King vd., 2001).

2.6.2.5. Oleokimya Endüstrisinde Kullanılan Lipazlar

Oleokimyasal işlemlerde kullanılan lipazlar enerji kazandırmakta ve alkalizis, asidolizis, hidrolizis ve gliserolizis sırasında sıcaklıkla parçalanmayı minimize etmektedir (Vulfson, 1994; Bornscheuer, 2000). Lipazlar triaçilgliserolün ester bağlarının hidrolitik parçalanması doğada tasarlanmasına rağmen; lipazlar çok az miktarda su içeren çevrelerde ters reaksiyonu (ester sentezi) katalizleyebilmektedir. Hidroliz ve esterifikasyon, inesterifikasyon olarak bilinen bir prosesle kendiliğinden meydana gelmektedir.

Substratlara bağlı olarak, lipazlar asidolizisi (ailin bir kısmı ail gliserol ve karboksilik asit arasında yer değiştirir) ve alkolizisi (ailin bir kısmıail gliserol ve alkol arasında yer değiştirir) ve transesterifikasyonu (iki ail iki ail gliserolle yer değiştirir) katalizleyebilmektedir.

2.6.2.6. evre Yönetiminde Kullanılan Lipazlar

Biyolojik ışlah sürecinde lipazların kullanımı lipaz biyoteknolojisinde yeni bir alandır. Lipid işleme tesisleri ve restoran atıkları farklı kaynaklardan elde edilen lipazların yardımıyla temizlenebilmektedir. Bu sektörde, lipazlar hem doğal yerinde hem de doğal yeri dışında kullanılabilir (Pandey A., 1999). Endüstrilerde gözlenen hızlı gelişim nedeniyle evre kirliliği gitgide ciddi hale gelmiştir. Kirlenmiş toprakların enzimsel arıtımında lipaz üreten strainler anahtar rol oynamaktadır (Lin vd., 2012). Atıksu arıtımında, biyolojik ışlahta, yağla kirlenmiş çevrelerde, soğuk koşullarda ve aktif bileşiklerin sentezinde lipazlar büyük potansiyele sahipken (Buchon vd., 2000), ılıman bölgelerde sıcaklıkta meydana gelen büyük mevsimsel değişmeler nedeniyle petrol ve yağ gibi kirleticilerin parçalanmasında mikroorganizmaların etkinliğini büyük oranda azaltmaktadır (Ramteke vd., 2005).

2.6.2.7. ay İşlemede Kullanılan Lipazlar

Siyah ayın kalitesi büyük oranda çay filizlerinin maruz bırakıldığı dehidrasyon, mekanik frenleme ve enzimatik fermantasyonabağımlıdır. Siyah ayın üretimi sırasında membran lipidlerinin enzimatik parçalanması karakteristik tat oluşumu ile uçucu bileşiklerin oluşumunu başlatmakta bu ise tat gelişiminde lipidlerin önemini vurgulamaktadır (Latha ve Ramarethinam, 1999).

2.6.2.8. Biyosensör Olarak Kullanılan Lipazlar

Mikrobiyal lipazların biyosensör olarak kullanımı gelecek vaad eden yeni bir alandır. Biyosensörler doğada kimyasal ve elektronik olabilmektedir. Lipazların en önemli analitik kullanımı klinik amaçlar için lipidlerin belirlenmesidir. En temel kavram triailgliserolden gliserol oluşturmak, kimyasal ve enzimatik metodlarla serbest gliserollerin ya da alternatif olarak esterleşmiş yağ asitlerinin miktarını ölçmek için lipazlardan faydalanılmaktadır.

Spesifik olmayan lipaz, özellikle *C. rugosa*'nın spesifik yüksek aktivitesi gliserolün hızlı bir şekilde serbest kalmasını sağlamak için seçilmektedir. *C. rugosa* lipaz biyosensörü, DNA'daki biyotanıma gruplarını optik olarak birleştirmek için geliştirilmektedir (Pandey vd., 1999).

2.6.2.9. Tanı Aracı Olarak Kullanılan Lipazlar

Lipazlar tıp sektöründe hedef ilaç ya da marker olarak kullanılmaktadır. Lipazlar tanı aracı olarak kullanılabilen ve varlığı ya da artan seviyeleri belirli hastalık ya da enfeksiyon göstergesi olabilmektedir. Lipazlar gliserol oluşturmak için serum trigliseridlerinin enzimatik belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu işlem enzim bağlı kolorimetrik reaksiyonlarla belirlenmektedir. Kan serumundaki lipaz seviyesi akut pankreatit ve pankreas yaralanması gibi durumların teşhisinde tanı aracı olarak kullanılmaktadır (Lott ve Lu, 1991). Akut pankreatit aşırı alkol kullanımı ya da safra kanalının tıkanmasının bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Serum tripsin seviye ultrasonografisi, bilgisayarlı tomografi ve endoskopi ile yapılan kolanjiyo pankreatografi pankreatit için en doğru laboratuvar göstergesi olmasına rağmen, serum amilaz ve lipaz seviyesi akut pankreatitin tanısını doğrulamada halen kullanılmaktadır (Munoz ve Katerndahl, 2000). Kronik pankreatit tanısı ve ekzokrin pankreatit yetersizliğinin varlığı serum amilaz, pankreatik izoamilaz, lipaz, tripsinojen ve elastaz ölçümüyle belirlenmektedir (Pezzilli vd., 2000) . *P. acnes* (Pezzilli vd., 2000), *Corynebacterium acnes* (Higaki vd.,2000) ve *Staphylococcus aureus* (Simons vd., 1996) gibi patojenik bakteri lipazları akne hastalarında deri döküntüsü şeklinde kendisini göstermektedir.

2.6.2.10. Kozmetikler ve Parfümlerde Kullanılan Lipazlar

Lipazlar kozmetikler ve parfümlerde yüzey aktif madde ve aroma üretiminde aktivite gösterdikleri için potansiyel uygulamalara sahiptir. Retinoidler (Vitamin A ve türevleri) cilt bakım ürünleri gibi kozmetik ve ilaçlarda büyük ticari potansiyel göstermektedir. Suda çözünen retinol türevleri immobilize lipazların katalitik reaksiyonlarından hazırlanmaktadır (Metzger ve Bornscheuer, 2006).

2.6.2.11. Tıbbi Uygulamalarda Kullanılan Lipazlar

Petek güvesi (*Galleria mellonella*)'den izole edilen lipazlar *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) üzerinde bakteriosidal etkiye sahip olduğu bulunmuştur. İlk çalışma ilaçların umut vaat eden yeni kaynakların bulunması için biyolojik ve diğer

materyallerin seçili olmayan incelenmesinin bir parçası olarak dikkate alınmaktadır. *Candida rugosa*'dan elde edilen lipaz düşük serum kolesterol seviyesinde kullanılan bir ilaç olan lovastatin sentezinde kullanılmaktadır. *S. marcescens* lipazı üzerine yürütülen bir çalışma 3 fenilglisidik asit esterinin asimetrik hidrolizi yaygın şekilde koroner damar genişletici olarak kullanılan diltiazem hidroklorin sentezinde anahtar ara ürün olduğunu göstermiştir (Matsumae vd., 1993).



Cins	Tür	Kaynak
<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>	Wang vd., 1995; Frense vd., 1996; Yee vd., 1995; Brocca vd., 1998; Xie et vd., 1998
	<i>C. tropicalis</i>	Takahashi vd., 1998
	<i>C. antarctica</i>	Weber vd., 1999; Jaeger ve Reetz, 1998; Arroyo vd., 1999
	<i>C. cylindracea</i>	Kamiya ve Gotto, 1998; Helisto ve Korpela, 1998
	<i>C. parapsilosis</i>	Lacointe vd., 1996
	<i>C. deformans</i>	Lacointe vd., 1996
	<i>C. curvata</i>	Ghosh vd., 1996
	<i>C. valida</i>	Ghosh vd., 1996
<i>Yarrowia</i>	<i>Y.lipolytica</i>	Merek ve Bednasski, 1996;Pignede vd., 2000
<i>Rhodotorula</i>	<i>Rho. glutinis</i>	Papaparaskevas vd., 1992
	<i>Rho. Pilimornae</i>	Tahoun vd., 1985
<i>Pichia</i>	<i>Pi. bispora</i>	Hou, 1994
	<i>Pi. maxicana</i>	Hou, 1994
	<i>Pi. Sivicola</i>	Sugihara vd., 1995
	<i>Pi. xylosa</i>	Sugihara vd., 1995
	<i>Pi. Burtonii</i>	Sugihara vd., 1995
<i>Saccharomyces</i>	<i>Sa. lipolytica</i>	Tahoun vd., 1985
	<i>Sa. Crataegenesis</i>	Hou, 1994
<i>Torulospora</i>	<i>Torulospora globora</i>	Hou, 1994
<i>Trichosporon</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>	Dharmsthiti ve Ammaranond, 1997

Tablo 2.3. Lipaz üreten mayalar (Sharma vd., 2001)

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Örnekler

Süt ve süt ürünlerinde mayaların neden olduğu bozulmalar bu ürünlerde bulunan mayaların lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Ürünlerdeki mayaların izolasyonunda Gaziantep ilinde üretilen süt ve süt ürünleri (yoğurt, tereyağı, Antep peyniri, kaymak ve lor peyniri) kaynak olarak kullanılmıştır. Bozulma sürecini hızlandırmak için süt ürünleri 4 gün boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.1.2. Mayaların İzolasyonu ve Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri

1. Tripton Glikoz Yeast Ekstrakt Kloramfenikol Agar (TYGCA)

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

Bu besiyeri mayaların izolasyonunda kullanılmıştır (Deak vd., 1998; Welthogen ve Viljaen, 1999; Beuchat vd., 2001).

2. Tribütirin Agar

PDA	39 g
Tribütirin	10 ml
Distile su	1000 ml

Bu besiyeri mayaların lipolitik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Rapp ve Backhaus, 1992).

3.1.3. Çözelti, Tampon ve Boyalar

Çalışmada kullanmış olduğumuz çözelti ve kimyasallar aşağıda yer almaktadır.

Peptonlu Su

Pepton	1 g
Distile Su	1000 ml

Süt ürünlerinden maya izolasyonu için dilüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Lizis Solüsyonu

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

Kloroform / İzoamilalkol; 24:1 v/v

24 kısım kloroform ve bir kısım izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır.

Tris-Borate-EDTA tamponu (TBE)

Stok Solüsyon (5x/lt)

54 g Tris base

27,5 g Borik asit

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

1x Çalışma Solüsyonu

89 mM Tris base

89 nM Borik asit

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

dNTP Karışımı (Thermo; her deoksinükleotidtrifosfattan 100 mM)

Primerler

ITS1 - 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3'

ITS4 - 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'

Taq DNA Polimeraz (Thermo 500 U)

MgCl₂ Solüsyonu (Thermo 500 U)

Marker DNA'lar (Fermantas)

Jel Yükleme Tamponu

- % 0,25 Bromfenol mavisi

Etidyum Bromür Solüsyonu

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

3.1.4. Çalışmadan Kullanılan Başlıca Cihazlar

- Hassas terazi (Denver Instrument)
- Vorteks
- Etüv (Mettler)
- Mikrosantrifüj (Nüve)
- Spektrofotometre (Thermo Multiskan)
- Yatay elektroforez (Thermo Easy Cast)
- Güç kaynağı
- Thermal Cycler (Thermo)
- Jel görüntüleyici (Bio Rad Gel Doc)

3.2. Metod

3.2.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Mayaların İzolasyonu

Gaziantep iline ait süt ve süt örneklerinden mayaların izolasyonu için çeşitli süt ve süt ürünleri örneklerinden 10 g/ml alınarak içerisinde 90 ml steril peptonlu su bulunan erlenlere aktararak 10 dakika homojenize edilmiştir. Karışım homojenize hale getirildikten sonra 10^{-1} 'lik seyreltmeden içerisinde 9 ml fizyolojik su bulunan tüplere 1'er ml alınarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 'lik ardışık seyreltmeler yapılmıştır. Bu seyreltmelerden 1'er ml alınarak TGYCA (Trypton Glikoz Yeast Ekstrakt Kloramfenikol Agar) içeren petrilere aktararak paralel ekim yapılmıştır. 30 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılan petrilere gelişen maya kolonilerinin toplam sayıları belirlenmiştir. Belirlenen bu kolonilerden farklı görünüme sahip olanlar seçilerek saf kültür etmek amacıyla yatık olarak hazırlanmış TGYCA içeren ortamlara aseptik koşullarda alınarak 30 °C'de 3 gün inkübe edildikten sonra stok kültür olarak kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. İzolatların Tribütirin Agarda Ekstrasellüler Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Maya izolatlarının lipolitik aktivitelerinin tespiti amacıyla Tributirinli Agar besiyerleri hazırlanmıştır. Potato Dekstroz Agar'a %1 oranında tribütirin ilave edilerek hazırlanan ortam 121⁰C'de 15 dakika bekletilerek sterilize edilmiş ve daha sonra tribütirinin emülsifikasyonunu sağlamak için besiyeri ortamı iyice karıştırılmış ve daha sonra aseptik koşullarda petrilere aktarılmıştır. Petrilere oda sıcaklığında bekletilerek soğumaya bırakılmıştır. Bir gece önce TGYCA'da aktive edilen mayalar 1 ml'lik Fizyolojik tuzlu su içerisinde inoküle edilmiş ve süspanse edilen mayalar Tributirinli Agar içeren petrilere 50 µl'lik spot ekimler yapılmıştır. 30 ⁰C'de 5 gün inkübasyona bırakılan petrilereki açılma zonları ölçülerek mayaların lipaz aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.3. Lipolitik Aktiviteye Sahip Mayalardan DNA İzolasyonu

Lipolitik aktivite gösteren maya izolatlarının genotipik tiplendirilmesinde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir.

1. Potato Dextrose Agarda aktive edilen 5 günlük kültürden bir öze dolusu alınarak içerisinde 100 µl lizis solüsyonu bulunan 1,5 ml'lik eppendorf tüpün içerisine transfer edilir. Oluşturulan süspanسیون iyice karıştırılarak 37 ⁰C'de 60 dakika inkübasyona bırakılır (İnkübasyon sırasında tüplerin iyice karışması sağlanır).
2. 100 ⁰C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilen tüpler daha sonra 14.000 g'de 15 dakika santrifüj edilir.
3. Üstteki sıvı dikkatlice alınarak yeni bir eppendorf tüpün içerisine aktarılır.
4. Nükleik asitlerin çöktürülmesi için eşit hacimde soğuk etanol ilave edilir. (-20 ⁰C'de 30 dakika)
5. Elde edilen karışım 14.000 g'de, 4 ⁰C'de, 15 dakika santrifüjlenir ve üstteki sıvı atılır kalan pellet liyofilizatörde kurutulur.
6. Son aşamada ise, pellet 100 µl distile suda tekrar süspanse edilir (Fernandez vd., 1999, Chen vd., 2000; Peterson vd., 2001).

3.2.4. İzole edilen DNA'ların Saflık Kontrolü

İzole edilen genomik DNA'lar agaroz jel elektroforezde kontrol edildikten sonra spektrofotometre kullanılarak saflık kontrolleri ve miktar tayinleri yapılmıştır (Sambrook vd., 1989; Ausubel vd., 1997).

Agaroz jel elektroforez, % 1,5'lük agaroz içeren 5 µg/ml etidyum bromid'li jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlama ve elektroforez aşamasında TBE tamponu kullanılmış, 5 µl DNA solüsyonu, 2 µl yükleme solüsyonuyla karıştırılarak 50 V'ta 45 dakika yürütme yapılmıştır. Elektroforez işleminde O'GeneRuler 50 bp DNA marker olarak kullanılmıştır. Yürütme işlemi sonunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların tam bir bütünlüğe sahip olduğunu göstermektedir (Sambrook vd., 1989; Ausubel vd., 1997).

3.2.5. DNA'ların ITS PCR İle Amplifikasyonu

Amplifikasyon işlemi optimizasyonu yapılmış 25 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki bileşenler PCR tüpüne toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde ilave edilmiştir.

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

Amplifikasyon işlemi Thermal Cycler'da (Thermo) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

- İlk denatürasyon işlemi 95 °C'de, 5 dakika

- 40 döngü, her döngüde;

- | | |
|---------------|----------|
| I. 95 °C'de | 1 dakika |
| II. 58 °C'de | 2 dakika |
| III. 72 °C'de | 3 dakika |

Son döngüden sonra PCR tüpleri 72 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

Reaksiyon bittikten sonra PCR tüpleri 4 °C'de bekletilmiştir.

3.2.6. ITS PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Elektroforez işleminde Thermo marka 24.5 x 18 cm boyutlarında bir cihaz kullanılmıştır. Elektroforez, 80V'ta 3 saat sürdürülmüş Bromfenol mavisi başlangıç noktasında 11 cm uzaklaşınca sonlandırılmıştır. Elektroforezde TBE tamponu kullanılmış ve işlem %1,5'lük agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Yanısıra, agaroz jel içerisine, son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik Etidyum bromür solüsyonundan ilave edilmiştir (Ausubel vd., 1997; Fernandez vd., 1999, Chen vd., 2000; Peterson vd., 2001).

Elektroforez işleminde, 3 µl jel yükleme tamponu ve 8 µl PCR ürünüyle karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, örneklerle beraber DNA markerı da kuyucuğa yüklenerek (O'GeneRuler 50 bp DNA) jelde yürütülmüştür.

Elektroforez işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Elektroforez işleminden önce cihazın tepsisi çıkarılarak iyice temizlenir.
2. Cihazın tankları uygun seviyeye kadar TBE ile doldurulur.
3. 250 ml'lik temiz bir erlen içerisine 100 ml TBE ile 1,5 g agaroz ilave edilerek süspanse edilir.
4. Hazırlanan agaroz süspansiyonu mikrodalga fırında eritilerek berraklaştırılır.

5. Agaroz solüsyonu 60 °C'a kadar soğutulur ve son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik Etidyum bromür solüsyonundan ilave edilir.
6. Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilerek 0,5 – 1 mm'lik yüksekliğe ayarlanır.
7. 60 °C'a soğutulan agaroz solüsyonu jelde hava kabarcığı oluşmayacak şekilde elektroforez tepsisine dökülür.
8. Oda sıcaklığında bekletilerek donması sağlanan jeldeki taraklar dikkatlice çıkartılır.
9. Elektroforez tankına jelin yüzeyini 1 mm kaplayacak şekilde TBE ilave edilir.
10. PCR ürünleri ve marker DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez işlemi başlatılır.
11. Elektroforez işlemi bromfenol mavisi başlangıç noktasında 11 cm uzaklaşınca sonlandırılır.
12. Jelde ayrılan bantlar UV translüminatörde incelenerek analiz edilir.

BÖLÜM 4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. İzolatların Elde Edilmesi

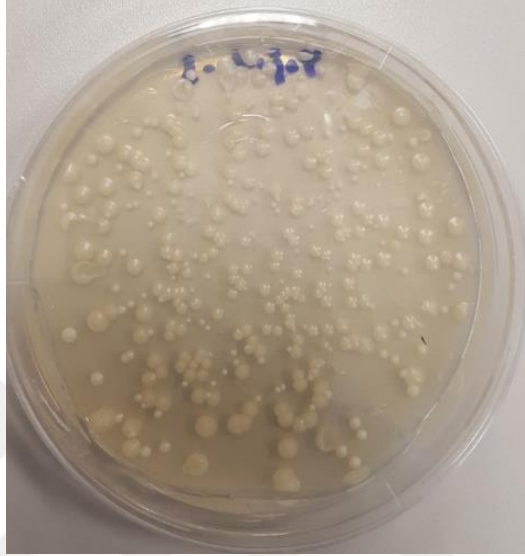
Gaziantep ilinde Süt ürünleri üretim tesisinden 5 farklı örnek elde edilmiştir. Daha önce 3.2.1. nolu bölümde anlatıldığı yöntemle 5 farklı süt örneğinden farklı morfolojiye sahip maya kolonileri seçilerek toplam 66 adet izolat elde edilmiştir. Süt örneklerindeki toplam maya sayıları 10^4 - 10^6 arasında olduğu bulunmuştur. Süt ve süt ürünlerinden izole edilen maya sayıları ve izolat numaraları aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Örnek	Toplam Maya Sayısı	İzolat Numaraları
Yoğurt	6×10^6	Y1,Y2,Y3,Y4,Y5,Y6,Y7,Y8
Antep Peyniri	1×10^4	AP1,AP2,AP3,AP4,AP5,AP6
Kaymak	$1,2 \times 10^5$	K1,K2,K3,K4,K5,K6,K7,K8,K9,K10,K11,K12, K13,K14,K15
Lor Peyniri	$1,5 \times 10^5$	LP1,LP2,LP3,LP4,LP5,LP6,LP7,LP8,LP9,LP10, LP11,LP12,LP13,LP14,LP15,LP16
Tereyağı	$1,8 \times 10^4$	T1,T2,T3,T4,T5,T6,T7,T8,T9,T10,T11,T12,T13, T14,T15,T16,T17,T18,T19,T20,T21

Tablo 4.1. Mayaların İzole Edildiği Kaynaklara Göre Türlerin Dağılımı

4.1.2. Koloni morfolojisinin incelenmesi

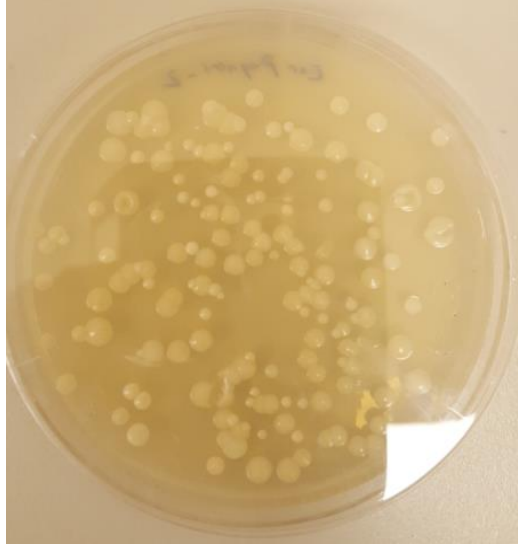
Koloni morfolojilerinin incelenmesi amacıyla petri plaklarına TGYCA (Tryptone Glucose Yeast Extract Chloramphenicol Agar) besiyerleri hazırlandı. Her bir süt ürününden paralel ekim yöntemiyle TGYCA besiyerlerine ekildi ve 30⁰C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oluşan tek koloniler koloni mikroskopunda incelenerek koloni morfolojileri saptandı.



Resim 4.1. Yoğurttan izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü



Resim 4.2. Kaymaktan izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü



Resim 4.3. Lor peynirinden izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü



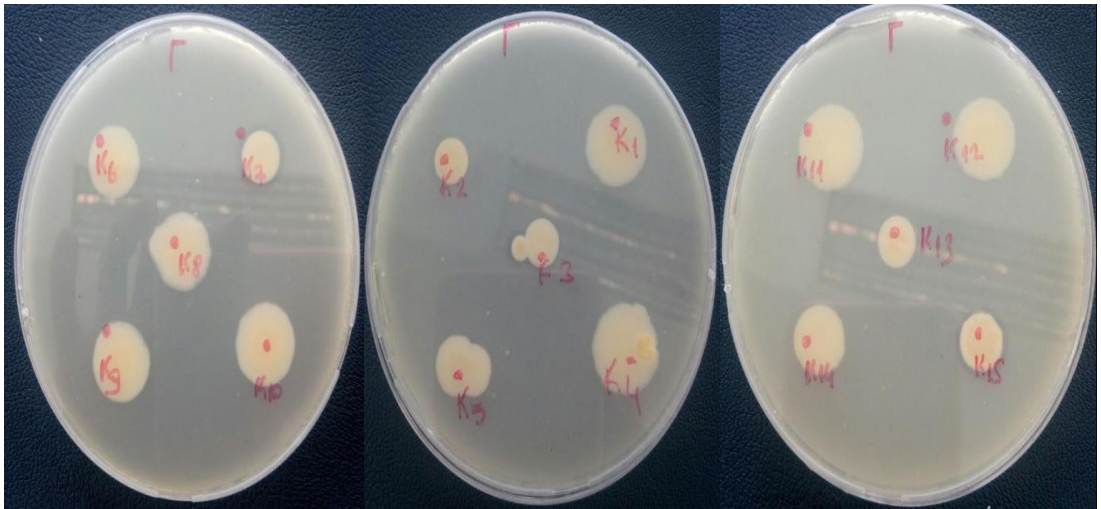
Resim 4.4. Tereyeğindan izole edilen mayaların TGYCA'da 3 günlük genel koloni görünüşü



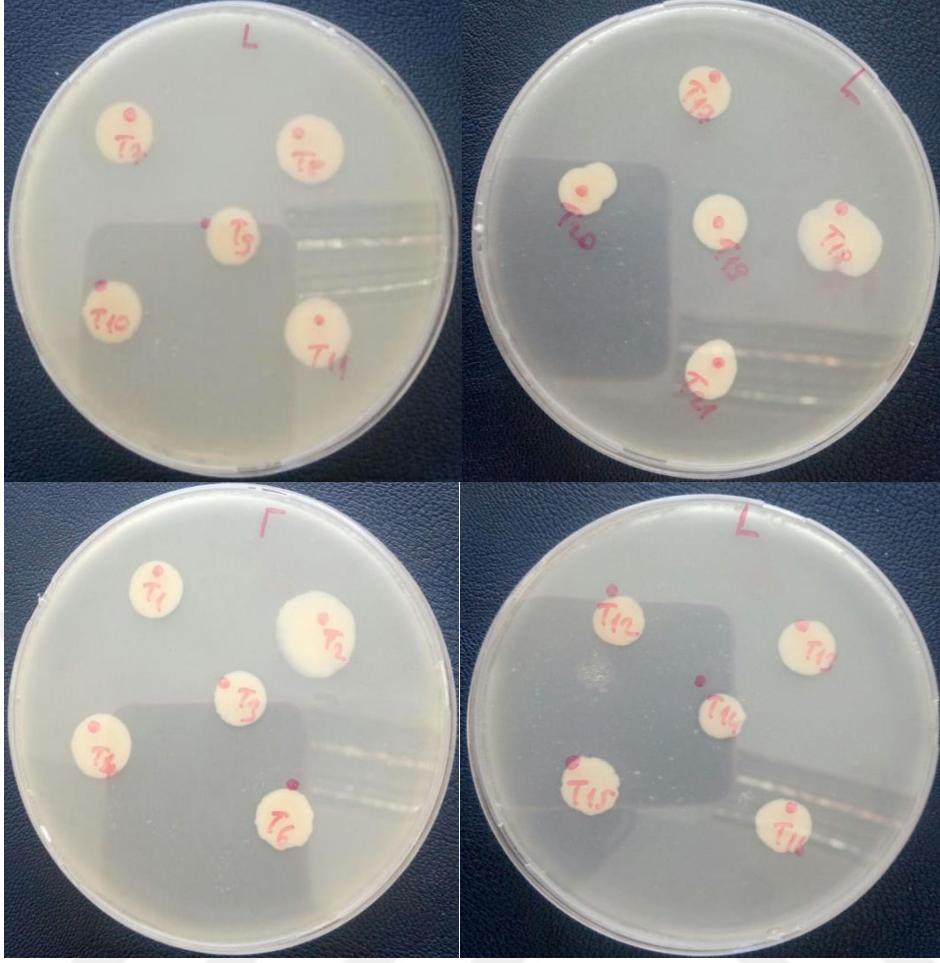
Resim 4.5. Gaziantep peynirinden izole edilen mayaların TGYCA’da 3 günlük genel koloni görünüşü

4.1.3. İzolatların Tribütirin Agardaki Ekstraselüler Lipaz Aktivite Tayini

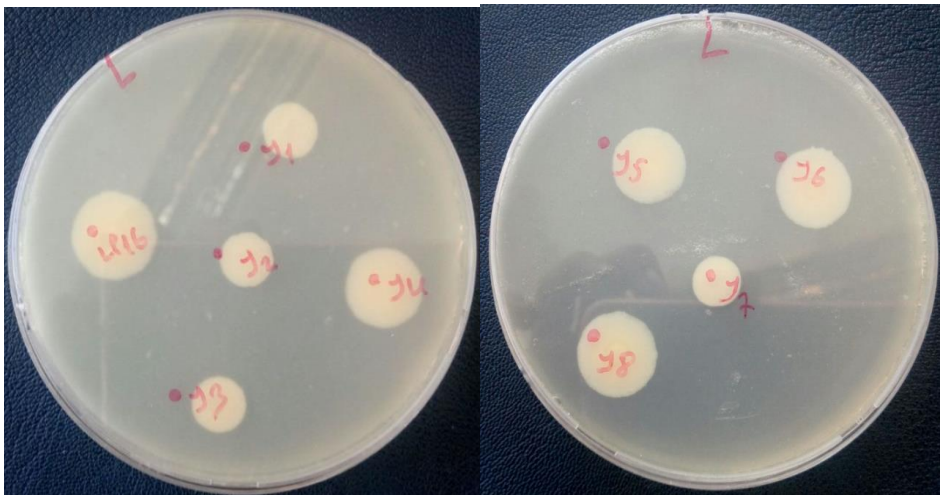
Farklı koloni morfolojisine sahip 66 izolat lipolitik aktivite tespiti amacıyla Tributirinli Agar besiyerlerine ekilmiştir. Lipaz pozitif izolatlar besiyerinde tributirinin parçalanmasına bağlı olarak berraklık oluşmakta negatif izolatlar da ise herhangi bir değişim gözlenmemektedir. Lipolitik aktivitenin değerlendirilmesinde berraklık derinliği 1. günden sonra ölçüldü ve 5. güne kadar devam edildi.



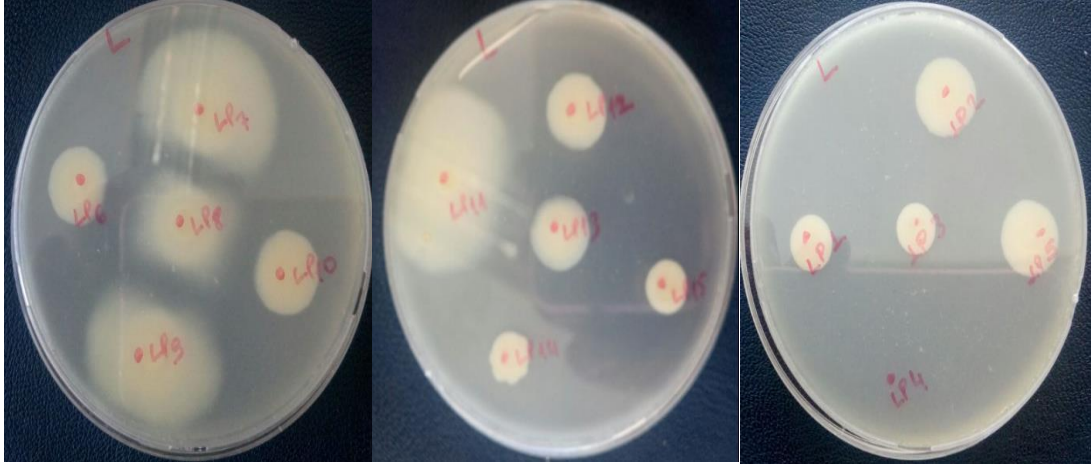
Resim 4.6. %1’lik Tribütirin içeren Potato Dextrose Agar’da kaymak örneklerinin 30 °C’de kolonilerin 5 günlük görünümü



Resim 4.7. %1'lik Tribütirin içeren Potato Dextrose Agar'da tereyağı örneklerinin 30 °C'de kolonilerin 5 günlük görünümü



Resim 4.8. %1'lik Tribütirin içeren Potato Dextrose Agar'da yoğurt örneklerinin 30 °C'de kolonilerin 5 günlük görünümü



Resim 4.9. %1'lik Tribütirin içeren Potato Dextrose Agar'da lor peyniri örneklerinin 30 °C'de kolonilerin 5 günlük görünümü

İzolot No	120 saat	İzolot No	120 saat	İzolot No	120 saat
Y1	1	K12	1	T5	1
Y2	1	K13	0,5	T6	-
Y3	1	K14	0,5	T7	1,5
Y4	1	K15	1	T8	1
Y5	-	LP1	1	T9	1
Y6	-	LP2	3	T10	1
Y7	1,5	LP3	1	T11	1
Y8	1	LP4	-	T12	1
AP1	-	LP5	1	T13	1
AP2	-	LP6	-	T14	1
AP3	-	LP7	-	T15	2
AP4	-	LP8	-	T16	1
AP5	1	LP9	-	T17	1
AP6	-	LP10	-	T18	1
K1	1	LP11	-	T19	-
K2	1	LP12	-	T20	1
K3	1	LP13	-	T21	2
K4	1	LP14	-		
K5	2	LP15	1		
K6	1	LP16	1,5		
K7	0,5	T1	-		
K8	1	T2	-		
K9	2	T3	1,5		
K10	1	T4	-		
K11	1	T5	1,5		

Tablo 4.2. İzolatların Tribütirin Agarda Büyüme Esnasında Oluşan Lipaz Aktivitesi(mm açık zon)

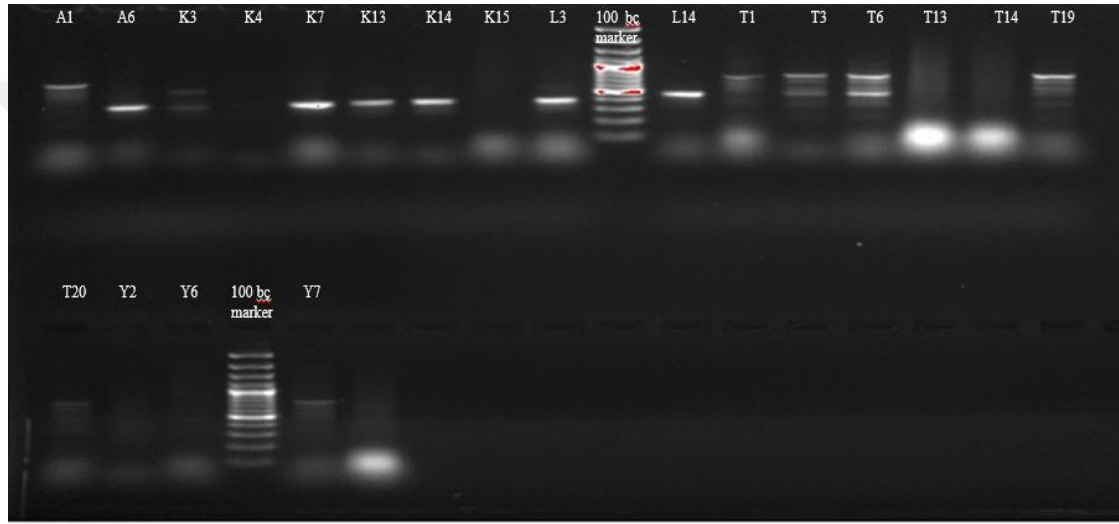
-: Lipaz aktivitesi negatif

4.1.4. DNA İzolasyonu

Koloni morfolojisi farklı olan 66 izolatın lipolitik aktivitesi yapılmış ve bunlardan yüksek lipolitik aktiviteye sahip olan 20 izolat seçilmiştir. Elde edilen 20 izolat Petersen vd.'ne (2001) göre genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

4.1.5. ITS PCR

Yüksek lipolitik aktiviteye sahip olan örneklerden elde edilen DNA'lar ITS1 ve ITS4 primerleri ile 5,8S rRNA genlerini ifade eden ITS dizileri sekans analizi için amplifiye edilmiştir. Bu işlem sonucunda çoğaltılan DNA'ların, agaroz jel elektroforezinde gözlenen bantları Resim3.10'da gösterilmiştir.



Resim 4.10. Yüksek lipaz aktivitesine sahip örneklerin, PCR sonucunda elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü

4.1.6. DNA Dizi Analizi

Elde edilen ampliconlar sekans analizleri için 96 kuyucuklu pleyt içerisinde sekans firmasına gönderilmiştir. Firma saflaştırmayı takiben NextSeq Series cihazı ile sekans analizini gerçekleştirmiştir. Elde edilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılmıştır. Sekans analizi sonucunda yüksek lipolitik aktiviteye sahip suşların tür düzeyinde identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan suşların dağılımı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

İzolat	Tür	Genetik Benzerlik Oranı (%)
A1	<i>Kluyveromyces lactis</i> PMM-410 L	99%
A6	<i>Candida intermedia</i> B-NC-12-F29	99%
K13	<i>Candida intermedia</i> B-NC-12-F29	99%
K14	<i>Candida intermedia</i> B-NC-12-F3	99%
K15	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ZT-Kma.11	99%
K3	<i>Yarrowia lipolytica</i> M3	91%
K7	<i>Candida intermedia</i> B-NC-12-F29	99%
L14	<i>Pichia fermentans</i> 10651	98%
L3	<i>Candida intermedia</i> B-NC-12-F3	99%
T13	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ZT-Kma.11	99%
T14	<i>Candida intermedia</i> C1/23	99%
T15	<i>Kluyveromyces marxianus</i> LEV-03-ITTG	97%
T19	<i>Candida intermedia</i> C1/23	99%
T1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> Kw1609	98%
T20	<i>Pichia fermentans</i> 10651	99%
T3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> WM 03.289	99%
T6	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ZT-Kma.8	99%
Y2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ZT-Kma.11	99%
Y6	<i>Kluyveromyces marxianus</i> WM 03.289	98%
K4	<i>Candida intermedia</i> B-NC-12-F3	99%

Tablo 4.3. DNA dizi analizi sonucu tanımlanan izolatlar

BÖLÜM 5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıdaların bozulması büyük bir ekonomik kayba yol açmasına rağmen altında yatan mekanizmayı anlamak halen güçtür. Bozulmaya neden olan organizmaların yüksek sayıda mevcudiyeti gıdaların bozulmasına neden olacağı çok açıktır. Ancak mikroorganizmaların yüksek sayıya ulaşması ve meydana gelen bozulma gıdanın çeşidine, mevcut iç ve dış faktörlere, bozulmaya neden olan spesifik mikroorganizmaların aktivitelerine bağlı olarak önemli derecede değişiklik gösterebilmektedir.

Sütün kimyasal kompozisyonu maya türlerinin çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri sayesinde gelişimi desteklemektedir. Süt ve süt ürünlerinde bulunan mayaların süt ve süt ürünleri üretiminin ilk aşamalarında oldukça önemli olduğu, birçoğunun mikrofloranın önemli bir bileşeni olduğu düşünülmekte, hepsi olmasa bile süt ürününün olgunlaşması sırasında özellikle peynirlerde doğal kontaminant olarak bulunmaktadır. Çiğ ve pastörize süt sıklıkla mayalarla kontamine olmasına rağmen populasyonun bakterilerle karşılaştırıldığında; genellikle düşük olduğu ($<10^4$ cfu/ml) mayaların gelişiminin ise hızlı gelişen bakterilerin sınırlandığı bildirilmiştir (Fleet, 1990; Deak, 1991). Sütteki bakteri ve maya etkileşimleri üzerine yapılan çalışmalar, maya gelişimini sınırlayan mekanizmanın belirlenmesine yönelik olmuştur. Muhtemel açıklamalar bakteriler tarafından substratı kullanmak için yapılan rekabet ya da bakteriyel metabolitlerin mayalar üzerine antogonistik etki yaptığı yönündedir. Birçok yumuşak peynir bakteri ve mayaların gelişimini de desteklemektedir (Choisy vd., 1987; Gripon, 1987).

Macaristan da yapılan bir çalışmada süt ürünlerindeki mayaların büyük çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada süt ürünlerinden toplanan 62 izolat basit identifikasyon yöntemiyle tanımlanmış ve izolatlar 26 tür içerisinde gruplandırılmıştır. En sık karşılaşılan izolat *D. hansenii* (% 22.6), *G. candidum* (% 16.1), *Y. lipolytica* (% 9.7), *K. lactis*(% 4.8) ve *C. catenulata* olmuştur.

Bu baskın maya türleri önceki raporlara göre çeşitli süt ürünlerinde sıklıkla gözlenmiştir. Roostita ve Fleet (1996) Kamember ve mavi damarlı peynirlerden elde ettikleri 240 izolatta *D. hansenii*, *C. lipolytica*, *D. kefir*, *C. intermedia*, *S. cerevisiae*, *C. albidus* ve *K. marxianus* türlerini en sık karşılaşılan türler olarak belirlemişlerdir.

Tempel ve Jacobsen (1998) çiğ süt ve mavi damarlı yarı yumuşak geleneksel bir Danimarka peyniri olan Donoblo'nun olgunlaşması sırasında mayaların varlığını çalışmışlardır. Donoblo'nun üretiminde en baskın türün *Candida famata* (teleomorph: *D. hansenii*) ikinci olarak da *C. catenulate* olduğunu bildirmişlerdir.

Prillenpen vd. (1999) Avusturya, Danimarka, Fransa, Almanya ve İtalya gibi ülkelerdeki farklı peynirlerde 39 türle ilişkili 76 strain izole etmiş; *D. hansenii*, *G. candidum*, *I. orientalis*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* ve *C. catenulate* en baskın tür olarak belirlemiştir. Andrighetto vd. (2000) İtalyan inek, buffalo, keçi ve Yunan koyun peynirinden 48 strain izole etmiş ve bunların 42' sinin *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *T. delbrueckii* olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan bu çalışmada Gaziantep iline ait farklı süt örnekleri toplanmış ve elde edilen örneklerden maya izolasyonu yapılmıştır. Daha önceki çalışmalarda araştırmacılar süt ve süt ürünlerinde bozulmaya neden olan mayaların izolasyonunda TGYCA (Trypton Glikoz Yeast Ekstrakt Kloramfenikol Agar) besiyerini kullanmışlardır. Yapmış olduğumuz çalışmada süt ve süt ürünlerinde bozulmaya neden olan mayaların izolasyonu için TGYCA kullanılmıştır. Bu besiyerinde içerilen kloramfenikol küf üremesine engel olduğundan dolayı mayaların izolasyonunda önemlidir (Deak vd., 1998).

Çeşitli gıda kaynaklarından izole edilen mayaların tanımlanmasında biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik karakterleri kapsayan konvansiyonel ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Süt ürünlerindeki mayaların tanımlanmasında biyokimyasal ve fizyolojik testlerin güvenilir olmadığı Rohm vd. tarafından gösterilmiştir. Farklı süt ürünlerindeki mayaların biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılmalı analizi, farklı orjine sahip olan benzer türler için farklı sonuçlar üretebileceğini göstermiştir. Standart fenotipik testler genellikle bir grup maya üzerine uygulansa da bir diğer grup için yararlı olmamaktadır.

Askomisetik mayaların karakterizasyonu için kullanılan birçok test basidiomisetik mayaların tanımlanması için uygun olmamaktadır. DNA fingerprinting teknikleri, D1/D2 domaininin sekans analizi temelli yaklaşımlar ve fenotipik çalışmalar gıda bozulmasına neden olan mayalar için güvenilir tanı sistemleri olmuştur.

DNA sekans tayini, identifikasyon, taksonomik ve filogenetik çalışmalar için kullanılan en önemli karakterdir. rDNA'nın avantajı, bütün yaşayan organizmalarda bulunması ve çoklu kopyalar halinde ortak bir evrimsel orijine sahip olmasıdır ve çok korunmuş olan rDNA bir türe ait olan bütün strainler arasında hem farklılıkları göstermek hem de daha yüksek taksonları betimlemek için kullanılmaktadır (Kurtzman, 2006). Bu nedenle, 2000'li yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerin gündeme gelmesiyle birçok maya genus ve türü için klasik yöntemlerin moleküler biyolojik yöntemlerle desteklenmesi gereği ortaya çıkmıştır (Boekhout vd., 2003).

Bilinen tüm mayaların D1/D2 bölgesinin sekanslarına NCBI, EMBL ya da DDBJ sekans veritabanlarına ulaşılabilmektedir. Son 15 yıldır yapılan kapsamlı araştırmalar D1/D2 domaininin mayalar arasında yeterli derecede farklı olduğunu ortaya çıkarmış, tür içi ve türler arası ilişkinin belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir (Kurtzman ve Robnett, 1997; 1998; Fell vd., 2000). Kurtzman ve Robnett (1998) askomisetik mayaların benzer türlere ait bu bölgede % 1'den daha az nükleotid farklılığı sergilediğini göstermiştir. Diğer yandan Fell vd. (2000) basidiomisetik mayaların farklı türlerinde D1/D2 domaininin 600 baz çiftinin iki nükleotidinde farklılık gösterdiğini varsaymıştır. Şuanki sekans veritabanı asko-basidiomisetik mayanın 700 D1/D2 sekansını içermektedir ve ağırlıklı olarak maya taksonomistlerinden gelen yeni bilgilerle devamlı olarak zenginleşmektedir.

Araştırmamızda izole edilen maya izolatlarının tanımlanması için genetik ve moleküler biyolojik yöntemlerin her ikisinden de yararlanılmış, yüksek lipolitik aktiviteye gösteren izolatlar internal transcribed spacer (ITS) 5,8S ribozomal DNA bölgesinin (ITS-PCR) PCR amplifikasyonu kullanılarak da tanılamaya tabi tutulmuştur. PCR amplifikasyonu sonucu oluşan PCR fragmentlerinin, sekans analizi yapılmış ve genotipik tanılamamanın doğruluğu test edilmiştir. Elde edilen 20 izolat *Candida intermedia* (% 40), *Kluyveromyces marxianus* (% 40), *Pichia fermentans* (% 10), *Kluyveromyces lactis* (% 5) ve *Yarrowia lipolytica* (% 5) şeklinde dağılım göstermiştir. Proteaz, fosfolipaz ve lipaz gibi mikrobiyal enzimler süt ürünlerinin

bozulmasına indirekt etki ederler, bu enzimler enzim üreten mikroorganizmalar tarafından parçalanırsa bile gıda da değişmeden aktif kalabilmektedir. Örneğin; çiğ sütteki fosfolipaz üretimi sütün doğal lipazlarının yağ asitlerine dönüşmesi nedeniyle acı tat oluşumu meydana getirmektedir (Fox vd., 1976). Sıcaklığa dayanıklı lipazlar UHT sütte ekşi tat gelişimiyle ilişkilendirilmektedir. UHT süt, yağ, bazı peynirler ve süt tozu gibi ürünler kalıntı lipazlardan bile etkilenmektedir. Kısa zincirli yağ asitlerinin serbest kalması ekşi tat ve koku oluşumu meydana getirirken, uzun zincirli yağ asitlerinin serbest kalması sabunlu tat meydana getirmektedir. Doymamış yağ asitlerinin aldehit ve ketonlara oksidasyonu okside bir tat oluşumu meydana getirmektedir (Deeth ve Fitz-Gerald, 1983). Tereyağının ekşimesine çiğ sütteki lipaz aktivitesi ya da son ürün tereyağındaki sıcaklığa dayanıklı mikrobiyal lipazlar neden olmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada, süt ve süt ürünlerinden elde edilen 66 izolat tribütirin agarda büyüme boyunca oluşan ekstraselüler lipaz aktivitesi de ölçülmüştür. A1, A6, K3, K4, K7, K13, K14, K15, L3, L14, T1, T3, T6, T13, T14, T15, T19, T20, Y2, Y6 numaralı izolatların 120 saat sonunda en yüksek lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Lipazlar geniş çapta kullanılan çok yönlü enzimlerdir. Lipazların ince kimyasalların üretiminde ve oleokimya endüstrisindeki yüksek değerli uygulamalardaki önemi gün geçtikçe artmaktadır. Lipazlar bölgesel seçici ve stereoseçici biyodönüşümleri gerçekleştirebilme ve rasemik karışımların çözülmesini sağlama gibi özelliklere de sahiptir. Geliştirilmiş özellikli lipazlar doğal seçimle üretilmekte ve protein mühendisliği bu enzimlerin kullanımını genişletmek için çalışmaktadır. Eş zamanlı olarak biyoreaktör ve reaksiyon teknolojilerinde etkili lipaz kullanımı için büyük gelişmeler meydana gelmiştir. İmmobilize enzim reaktörleri ve çok aşamalı reaksiyon sistemleri lipazların katalitik işlemlerinde büyük oranda etkilenmiştir (Balcaño vd., 1996; Bouwer vd., 1997; Giorno vd., 1995, 1997; Malcata vd., 1991, 1992b; Xu vd., 2000, 2001; Xin vd., 2001).

Çoğu organizmalar gibi lipazlar mayalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Oldukça önemli biyokatalistler arasındaki lipazlar sulu ve susuz ortamlarda özgün reaksiyonlar gerçekleştirebilmektedir. Kullanım kolaylığı, geniş substrat toleransı, çeşitli sıcaklıklar altında yüksek stabilite, yüksek enantioseçicilik ve kolay erişilebilirlik lipazlara olan büyük rağbeti açıklamaktadır.

Sonuç olarak; bugün lipazlar endüstriyel mikrobiyoloji ve biyoteknolojinin farklı alanlarında büyük bir uygulama alanına sahip olmuştur. Kontrollü diyet yiyeceği üretimi, et teknolojisi ve sosis işleme lipazların gıda endüstrisindeki ticari potansiyele sahip alanlardan birkaçıdır. Lipazların uygulama alanları hızlı bir şekilde genişlemekte ve gıda endüstrisinde halen araştırılmaktadır.

Ekstrem koşullarda, uygulamalarını genişletmek için protein ve genetik mühendisleri tarafından lipazların özellikleri geliştirilmektedir. Enzimlerin immobilizasyonunda, çeşitli yenilikler bu enzimin gıda işleme teknolojisinde etkili ve verimli biyokatalist olarak kullanımında önemli bir rol oynamaktadır. Gıda endüstrisinden ziyade, lipazlar ince kimyasalların sentezinde, biyodizel üretiminde, biyopolimerik materyalin üretiminde, deterjan endüstrisinde, organik sentezde, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde, kişisel bakım ürünlerinin içerik sentezinde, surfaktanların ve yapısal trigiliseridlerin sentezinde, oleokimya endüstrisinde, kimyasal tarım maddelerinin üretiminde, pestisid endüstrisinde ve çevre yönetiminde uygulama alanına sahiptir.

Bu çalışmayla süt ve süt ürünleri endüstrisindeki bozulma etkeni mayaların moleküler yöntemle doğru bir şekilde saptanabildiği ve bozulmaya etkisi olan maya suşlarının potansiyel lipaz üretici suşlar olduğu gösterilmiştir. Tanımlanan bu suşlar içerisindeki *Candida intermedia*, endüstriyel mikrobiyolojinin hizmetine sunulmuş olup, lipaz üretimine alternatif bir kaynak olması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Akpınar, O. (2008). Süt ve süt ürünlerinden *Yarrowia lipolytica* izolasyonu, identifikasyonu ve ürettikleri alkalın proteaz ve ribonükleaz enzimlerinin aktivitelerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Antinone, M. J., & Ledford, R.A. (1993). Reduction of diacetyl in cottage cheese by *Geotrichumcandidum*. *Cultured Dairy Products Journal*. **28**, 26–30.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*. **6**, 141-158.
- Arroyo, M., Sanchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V. (1999). Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme Microb Technol.***24**, 3–12.
- Atlas, R. M. & Bartha, R. (1993). Fundamentals and applications. In: Atlas R. M. & Bartha, R. (eds), *Microbial Ecology*. Benjamin Cummings Publishers, Redwood City, California, 563-565.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. (1997). Short Protocols in Molecular Biology, John Wilwy and Sons, 3rd ed., N. Y.
- Bajpai, D. and Tyagi, V. K., (2007). Laundry detergents: Anoverview, *J. Oleo. Sci.*, **56**, 327-340.
- Balcaõ, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb Technol.* **18**, 392–416.
- Baleiras, Couto M. M., Eijnsma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J. H. H., van der Vossen JMBM (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **62**, 41–46.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (2000).How yeasts are classified.In: Barnett, J. A., Payne, R.W. & Yarrow, D. (eds), *Yeasts: Characteristics andIdentification*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, 15-22.

- Barns, S. M., Lane, D. J., Sojin, M. L., Bibeau, C. & Weisberg, W. G. (1991). Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bacteriol.* **173**, 2250-2255.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J Appl Bacteriol.* **97**, 1038–1044.
- Belarbi, E.H, Molina, E., Chisti, Y.A. (2000). Process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosa pentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microb Technol.* **26**, 29-516.
- Bell, S., Goldman, V. M., Bistran, B. R., Arnold, A. H., Ostroff G. H, Forse R. A. (1999). Effect of β -glucans from oats and yeast on serum lipids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **39**, 189–202.
- Berglund, P., Hutt, K. (2000). Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. In: Patel RN, editor. Stereoselective biocatalysis. New York: Marcel Dekker.
- Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R. J. (1999). Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. *Fd Contr.* **10**, 27–33.
- Boekhout, T. and Robert, V. (2003). Yeasts in Food: Beneficial and detrimental aspects. 1st edition. Behr, Hamburg: Woodhead.
- Bohn, J. A., Be Miller, J. N. (1995). (1–3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure – functional activity relationships. *Carbohydr Polym.* **28**, 3–14.
- Bornscheuer, U. T., editor. Enzymes in lipid modification. (2000). Weinheim: Wiley-VCH.
- Bouwer, S. T., Cuperus, F. P., Derksen, J. T. P. (1997). The performance of enzyme-membrane reactors with immobilized lipase. *Enzyme Microb Technol.* **21**, 6-291.
- Brakhage, A. & Turner, G. (1995). Biotechnical genetics of antibiotic biosynthesis. In: Kück U. (ed), *The Mycota, II, Genetics and Biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg, 263-285.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina L., Schmid, R. D. (1998). Design, total synthesis and functional over expression of the *Candida rugosa* lip 1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci.* **7**, 22-1415.
- Buchon, L., Laurent, P., Gounot, A. M., Guespin, M .J. F. (2000). Temperature dependence of extracellular enzyme production by psychotrophic and psychrophilic bacteria. *Biotechnol. Lett.* **22**, 1577-1581.

Cadez, N., Raspor, P., de Cock, A. W., Boekhout, T., Smith, M. T. (2002). Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Res.* **1**, 279–280.

Cai, J., Roberts, I. N. & Collins, M. D. (1996). Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 542-549.

Capece, A., Salzano, G., Romano, P. (2003). Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int J Food Microbiol.* **84**, 33–39.

Cardenas, J., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M-S, Sanchez-Montero J-M, Valmaseda M., Elson S. W, Sinisterra J-V. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *J Mol Catal B: Enzy.* **14**, 23-111.

Carreira, A., Paloma, L., Loureiro, V. (1998). Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes' cheese. *Int. J. Fd Microbiol.* **41**, 223–230.

Caruso, M., Capece, A., Salzano, G., Romano, P. (2002). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Lett Appl Microbiol.* **34**, 323–328.

Chen, J-C, Tsai, S-W. (2000). Enantioselective synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugose* lipase immobilized on accurel MP1000. *Biotechnol Prog.* **16**, 92-986.

Chen, Y. C., Eisner, J. D., Katar, M. M., Rassouljian-Barrett S.L., Lofe K., Yarfitz S. L., Limaye, A. P., Cookson, B. T. (2000). Identification of Medically Important Yeasts Using PCR- Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology.* **38**, 2302- 2310.

Chowdary, G. V., Ramesh M. N., Prapulla S.G. (2001). Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis. *Process Bioche.* **36**, 9-331.

Cottrell, M., Kovk, J. K. F., Lategam, P. M., Britz T. Z. (1986). Long chain fatty acid composition as an aid in the classification of the genus *Saccharomyces*. *Syst Appl Microbiol.* **8**, 166–168.

Daniel, H. M. & Meyer, W. (2003). Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 61-78.

Davis, J. G. (1970) Laboratory control of yogurt. *Dairy Ind.* **35**, 139–144.

Deak, T. and Beuchat, L. R. (1996). Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Inc., Baton, FL. 210 pp.

Deak, T., Beuchat, L. R., Guerzoni, M. E., Lillie, A., Peter, G., Rohm M., Schnürer F., Tabajdi P. V., Westphal, S. (1998). A collaborative study on media for the enumeration of yeast in foods. *Int. Journal of Food Microbiol.* **43**, 91-95.

Deak, T., Chen, J., Beuchat, L. R. (2000). Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 4340–4344.

Deeth, H. C., & Fitz-Gerald, C. H. (1983). Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In P. F. Fox (Ed.), *Developments in dairy chemistry*, London: Applied Science. **2**, 195–239.

Dharmsthiti, S., Ammaranond, P. (1997). Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). *Biotechnol Appl Biochem.* **26**, 6-111.

Dlauchy, D, Tornai-Lehoczki, J, Gábor P (1999). Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Syst Appl Microbiol.* **22**, 445–453.

Dobzhansky, T., Cooper, D. M., Phaff, H. J., Knapp, E. P. & Carson, H. L.(1956). Differential attraction of species of *Drosophila* to different species of yeasts. *Ecol.* **37**, 544-550.

Downey, W. K. (1980). Review of the progress of dairy science: flavor impairment from preandpost-manufacture lipolysis in milk and dairy products. *Journal of Dairy Research.***47**,237–252.

Ducret, A., Trani, M., Lortie, R. (1998). Lipase catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 6-212.

Dumont, J. P., Delespaul, G., Miquot, B., & Adda J. (1977). Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle. *Lait.* **57**, 619–630.

El-Hofi, M., El-Tanboly., E-S. and Abd-Rabou, N. S. (2011). Industrial Application of Lipases in Cheese Making: A review. *Internet Journal of Food Safety.* **13**, 293-302.

Engel, G. (1986). Yeast in silage and raw milk. *Milchwissenschaft.* **41**, 633–637.

- Engel, G., Einhoff, K., Prokopek, D., Teuber, M.(1987). Beziehungen zwischen Hefenart, Hefenzahl und hefenbedingten sensorischen Fehlern in Magerquark nach Zugabe definierter Hefenarten. *Milk Sci. Int.* **42**, 428–430.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol.* **49**, 329–337.
- Esteve-Zarzoso, B., Zorman, T., Belloch, C., Querol, A. (2003). Molecular characterisation of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Syst Appl Microbiol.* **26**, 404–411.
- Fadda, M. E., Cosentino, S., Deplano, M., Palmas, F. (2001). Yeast populations in Sardinian feta cheese. *Int. J. Fd Microbiol.* **69**, 153–156.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. & Statzell-Tallman A.(2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J.Syst. Bacteriol.* **50**, 1351-1371.
- Fernández-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **78**, 87–97.
- Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, **68**, 99–211.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology.* **86**, 11 – 22.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **79**, 339-354.
- Fox, C. W., Chrisope, G. L., & Marshall R. T. (1976). Incidence and identification of phospholipase C-producing bacteria in fresh and spoiled homogenized milk. *Journal of Dairy Science.* **59**,1857–1864.
- Freitas, A.C., Pintado, A.E.; Pintado, M. E.; Malcata, F. X. (1999). Organic acids produced by lactobacilli, enterococci and yeasts isolated from Picante cheese. *Eur. Food Res. Technol.* **209**, 434–438.
- Frohlich-Wyder, M. T. (2003). Yeasts in dairy products: In: Boekhout, T., Robert, V. (eds) Yeasts in foods. Beneficial and detrimental aspects. Behr, Hamburg, pp 209–237.
- Fuson, G. B., Price, C. W. & Phaff, H. J. (1980). Deoxyribonucleic acid base sequence relatedness among strains of *Pichia ohmeri* that produce dimorphic ascospores. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 217-219.

- Ghosh, P. K., Saxena, T. K., Gupta, R., Yadav, R. P., Davidson, S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog.* **79**, 57-119.
- Gill, I., Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids: Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* **15**, 9-401.
- Giorno, L., Moliari, R., Drioli, E., Bianchi, D., Cesti, P. (1995). Performance of a biphasic organic/aqueous hollow fiber reactor using immobilized lipase. *J Chem Technol Biotechnol.* **64**, 52-345.
- Giudici, P., Masini, G., & Caggia, C. (1996). The role of galactose fermenting yeast in plain yogurt spoilage. *Annali di Microbiologia Ed Enzimologia.* **46**, 11-19.
- Godfrey, T., West, S. (1996). Introduction to industrial enzymology, in *Industrial enzymology.* Stockton Press, New York. **2**, 1-8.
- Golden, D. A., Beuchat, L. R., Hitchcock, H. L. (1994) Changes in fatty acid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. *Int J Food Microbiol.* **21**, 293-303.
- Guillamón, J. M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer ITS region. *Arch Microbiol.* **169**, 387-392.
- Hagedorn, S., Kaphammer, B. (1994). Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu Rev Microbiol.* **48**, 773-800.
- Hagler, A. N. & Ahearn, D. G. (1987). Ecology of aquatic yeasts. In: Rose, A. H. & Harrison, J. S. (eds), *The Yeasts and the Environment.* Academic Press, London, **2**, 181-205.
- Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter, M. F. H., Vogelmann S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci Technol.* **16**, 4-11.
- Hamsaveni, D. R., Prapulla, S. G., Divakar, S. (2001). Response surface methodological approach for the synthesis of isobutylisobutyrate. *Process Biochem.* **36**, 9-1103.
- Harrison, J. S. (1993). Food and fodder yeast. In: Rose A. H., Harrison J. S. (eds) *The yeasts*, vol 5.
- Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances.* **27**, 782-798.

Helisto, P., Korpela, T. (1998). Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme Microb Technol.* **23**, 7-113.

Hendriks, L., Goris, A., Van der Peer, Y., Neefs, J. M., Vancannycyt, M., Kersters, K., Berny, J. F., Hennebert, G. L. & de Wachter, R. (1992). Phylogenetic relationships among ascomycetes and ascomycetes-like yeasts deduced from small ribosomal sub-unit RNA sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 98-104.

Hendriks L., Goris A., Van der Peer, Y., Neefs J. M., Vancannycyt, M., Kersters, K., Hennebert, G. L. & de Wachter, R. (1991). Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of the small ribosomal sub-unit RNA sequences. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1223-1230.

Herzberg, M., Fischer, R. & Titze, A. (2002). Conflicting results obtained by RAPD-PCR and large subunit rDNA sequences in determining and comparing yeast isolates isolated from flowers: a comparison of two methods. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1423-1433.

Higaki, S., Kitagawa, T., Kagoura, M., Morohashi, M. and Yamagishi, T. (2000). Correlation between *Propionibacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. *J. Dermatol.* **27**, 519-522.

Horwood, J. F., Stark, W., & Hull, H. H. (1987). A fermented, yeasty flavour defect in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* .**42**, 25-26.

Hou, C.T. (1994). pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. *J. Ind. Microbiol.* **13**, 8-242.

Jaeger, K. E., Reetz, T. M. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 396-403.

James, S. A., Cai, J., Roberts, I. N., Collins, M. D. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **47**, 453-460.

Jenson, I. (1998). Bread and baker's yeast. In: Wood BJ (ed) *Microbiology of fermented foods*. Blackie, London.**1**, 172-198.

Jeon, J. H., Kim, J. T., Kim, Y. J., Kim, H. K., Lee, H. S., Kang, S. G., Kim, S. J., Lee J.H. (2009). Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 865-874.

Johnson, E. A., Schroeder, W. (1995). Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Stud Mycol.* **38**, 81–90.

Kamiya, N., Gotto, M. (1998). Preparation of surfactant coated lipases utilizing the molecular imprinting technique. *J Ferment Bioeng.* **85**, 9-237.

Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U. T.(1998). Biotransformations with lipases. In: Rehm H. J, Pihler G., Stadler A., Kelly P. J. W,editors. *Biotechnology.* **8**, 37–192.

King, J. W., Snyder, J. M., Frykman, H., Neese, A. (2001). Sterol ester production using lipase-catalyzed reactions in super criticalcarbondioxide. *Food Res Technol.* **212**, 9-566.

Kiran, K. R., Manohar, B., Divakar, S. A.(2001). Central composite rotatable design analysis of lipase catalyzed synthesis oflauroyl lactic acid at bench-scale level. *Enzyme Microb Technol.* **29**, 8-122.

Kiyota, H., Higashi, E., Koike, T., Oritani, T. (2001). Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron: Asymmetry*, **12**, 8-1035.

Klibanov A. M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.* **15**, 97–101.

Kosse, D., Seiler, H., Amann, R., Ludwig, W., Scherer S. (1997). Identification of yoghurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**, 468–480.

Kreger-van Rij, N. J. W. (1984). General classification. In: Kreger-van Rij N. J. W. (ed), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 3rd edn. Elsevier Science BV,Amsterdam, The Netherlands, 15-16.

Kreger-Van, Rij N. J. W. (1984). *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam.

Krishna, S. H, Sattur, A. P., Karanth, N. G. (2001). Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl isobutyrate-optimization usingcentral composite rotatable design. *Process Biochem.* **37**, 9–16.

Krishna, S. H., Karanth, N. G. (2001). Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A kinetic study. *Biochim Biophys Acta.* **1547**, 7-262.

Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1994). Synonymy of the yeast genera *Wingea* and *Debaryomyces*. *Ant. v. Leeuwenhoek.* **66**, 337-342.

Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1995). Molecular relationships amonghyphal ascomycetous yeasts and yeast like taxa. *Can. J. Bot.* **73**, 824-830.

Kurtzman, C. P. (1984). Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Ant. v. Leeuwenhoek*. **50**, 209-217.

Kurtzman, C. P., Phaff, H. J. & Meyer, S. A. (1983). Nucleic acid relatedness among yeasts. In: Smith A. R. W., Spencer J. F. T. & Spencer D. M. (eds), *Yeast Genetics, Fundamental and Applied Aspects*. Springer, Berlin Heidelberg, 139-166.

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

Lachance, M. A. & Starmer, W. T. (1998). Ecology and Yeasts. In: Kurtzman C. P. & Fell J. W. (eds), *The Yeasts, a Taxonomy Study*, 4th edn. *Elsevier Science BV*, Amsterdam, The Netherlands, pp. 21-30.

Lacointe, C., Dubreucq, E., Galzy, P. (1996). Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases. *Biotechnol Lett*. **18**, 74-869.

Latha, K. and Ramarethinam, S. (1999). Studies on lipid acylhydrolases during tea processing. *Ann. Plant Physiol*. **3**, 73–78.

Lee, W. M., Kim, K. J., Kim, M. G., Lee, S. B. (1995). Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: effects of organic solvents and temperature. *J Ferment Bioeng*. **6**, 5-613.

Li, W. H. (1997). *Molecular evolution*. Sinauer, Sunderland, MA.

Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. editor.(2000). *Industrial biotransformations*. Weinheim: Wiley-VCH.

Lin, J. F., Lin, Q., Li, J., Fei, Z. A., Li, X. R., Xu, H., Qiao, D. R. and Cao Y. (2012). Bacterial diversity of lipase-producing strains in different soils in southwest of China and characteristics of lipase. *Afr. J. Microbiol. Res*. **6**, 3797-3806.

Lopandica, K., Zelgerb, S., Ba'nszkyc, L. K., Eliskases-Lechnerd F., Prillingera H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*. **23**, 341-350.

Lott, J. A. and Lu, C. J. (1991). Lipase isoforms and amylase isoenzymes—assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis. *Clin. Chem*. **37**, 361-368.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. **86**, 23 – 50.

Lucke, F. K. (1998). Fermented sausages, *Microbiology of fermented foods*. *Wood BJ* (ed) *Blackie*. **2**, 441–483.

- Lukondeh, T., Ashbolt, N. J., Rogers, P. L. (2003). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* **30**, 52–56.
- Lyons, T. P., Jacques, K. A., Dawson, K. A. (1993). Miscellaneous products from yeasts. In: Rose A. H., Harrison J. S. (eds) *The yeasts*, vol 5. Yeast technology, 2nd edn. Academic, London, pp 293–325.
- Malcata, F. X., Garcia, H. S., Hill, C. G., Amundson, C. H. (1992). Hydrolysis of butter oil by immobilized lipase using a hollow fiber reactor: Part I. Lipase adsorption studies. *Biotechnol Bioeng.* **39**, 57–647.
- Malcata, F. X., Hill, C. G., Amundson, C. H. (1991). Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butter oil. *Biotechnol Bioeng.* **38**, 68–853.
- Mase, T., Matsumiya, Y., Akiba, T. (1995). Purification and characterization of a new lipase from *Fusarium sp.* YM-30. *Biosci Biotechnol Biochem.* **59**, 2-1771.
- Masse, L., Kennedy, K. J., Chou, S. P. (2001). The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 35-629.
- Matsumae, H., Furui, M. and Shibatani, T. (1993). Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 93-98.
- Meier, C. and Wyder, M.T. (1999). Klassifizierung von Hefeisolaten aus Joghurt mittels Sequenzierung der D2 Domäne auf der 28S rDNA. In: Miescher, S.: Antimicrobial and autolytic systems of dairy propionibacteria. Ph.D. DISS. ETH No. 13486. Zürich, Switzerland: Swiss Federal Institute of Technology, 1–138.
- Merek, A., Bednasski, W. (1996). Some factors affecting lipase production by yeast and filamentous fungi. *Biotechnol Lett.* **18**, 60-1155.
- Meroth, C., Hammes, W., Hertel, C. (2003). Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 7453–7461.
- Metzger, J. O. and Bornscheuer, U. (2006). Lipids as renewable resources: Current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 13-22.
- Meyer, S. A. & Phaff, H. J. (1969). Deoxyribonucleic acid base composition in yeasts. *J. Bacteriol.* **97**, 52-56.

- Moreira da Silva, M., Malfeito-Ferreira, M., Aubyn, S., Loureiro, V. (1994). Long chain fatty acid composition as criterion for yeast distinction in the brewing industry. *J Inst Brew.* **100**, 17–22.
- Munoz, A. and Katerndahl, D.A. (2000). Diagnosis and management of acute pancreatitis. **62**, 164–174.
- Nashif, S. A., & Nelson, F. E. (1953). The lipase of *Pseudomonas fragi*. III. Enzyme action in cream and butter. *Journal of Dairy Science.***36**, 81–488.
- Naumova, E. S, Korshunova, I. V., Jespersen, L., Naumov, G. I. (2003). Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS. Yeast Res.* **3**, 177–184.
- Nguyen, H. V., Gaillardin, C. A. (1997). Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the Non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit. *Syst Appl Microbiol.* **20**, 286–294.
- Nguyen, H. V., Lepingle, A., Gaillardin, C. A. (2000). Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst Appl Microbiol*, **23**, 71–85.
- Nguyen, H. V., Pulvirenti, A., Gaillardin, C. (2000). Rapid differentiation of the closely related *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* strains isolated from dairy products using selective media and PCR/RFLP of the rDNA non transcribed spacer 2. *Can J Microbiol.* **46**, 1115–1122.
- Nguyen, T. H., Fleet, G. H., Rogers, P. L. (1998). Composition of the cell wall of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol.* **50**, 206–212.
- Olson, H. C., Hammer, B. W. (1935). Observations on yeasts causing gas in sweetened condensed milk. *Iowa State Coll. J. Sci.* **10**, 37–43.
- Öztürk Yalçın, H.T. (2007). Beyaz Peynirlerde Bozulmaya Neden Olan *Yarrowia lipolytica* ve *Debaryomyces hansenii*' nin fenotipik ve genotipik identifikasyonu. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A. (1995). Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 77-669.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V. T., (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **29**, 119-131.

- Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J. (1992). Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol Lett.* **14**, 397–402.
- Patil, K. J., Chopda, M. Z. and Mahajan, R. T. (2011). Lipase biodiversity. *Indian J. Sci. Tech.*, **4**, 971-982.
- Peppler, H. J. (1970). Food yeasts. In: Rose A. H., Harrison J. S. (eds) *The yeasts*, vol 3. *Yeast technology*. Academic, London, pp 421–462.
- Petersen, K. M., Moller, P. L., Jespensen, 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.
- Petersen, S. W. & Kurtzman, C. P. (1991). Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**, 124-129.
- Pezzilli, R., Talamini, G. and Gullo, L. (2000). Behaviour of serum pancreatic enzymes in chronic pancreatitis. *Dig. Liver Dis.***32**, 233–237.
- Phaff, H. J. & Starmer, W. T. (1980). Specificity of natural habitats for yeasts and yeast like organisms, In: Skinner F. M., Passmore S. M. & Davenport R.R. (eds), *Biology and Activities of Yeasts*. Academic Press, London. 79-102.
- Phaff, H. J. (1986). Ecology of yeasts with actual and potential value in Biotechnology. *Microbiol. Ecol.* **12**, 31-42.
- Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M., Nicaud, J. M. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol.* **182**, 10-2802.
- Pöggeler, S. (2001). Mating-type genes for classical strain improvements in ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 589-601.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* **16**, 675–729.
- Price, C. W., Fuson, G. B. & Phaff, H. J. (1978). Genome comparison in yeasts systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiol. Rev.* **42**, 161-193.
- Pulvirenti, A., Nguyen, H., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S., Zambonelli, C. (2000). *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol Lett.* **192**, 191–196.

Ramteke, P. W., Joseph, B. and Kuddus, M. (2005). Extracellular lipases from anaerobic microorganisms of Antarctic. *Indian. J. Biotech.*, **4**, 293-294.

Rantakyla, M., Alkio, M., Paltonen, O. (1996). Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl) glycosidic ester in supercritical carbondioxide by immobilized lipase. *Biotechnol Lett.* **18**, 94-1089.

Rao, P., Divakar, S. (2001). Lipase catalyzed esterification of a-terpineol with various organic acids: application of the Plackett–Burman design. *Process Biochem.* **36**, 8-1125.

Rapp, P., Backhaus, S. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. *Enzyme Microb Technol.* **14**, 43-938.

Redzepovic, S., Orlic, S., Sikora, S., Majdak, A., Pretorius, I. S. (2002). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett Appl Microbiol.* **35**, 305–10.

Reilly, C.E. (1991). Vitamins. In: Goldberg I., Williams R. (eds) *Biotechnology and food ingredients*. van Nostrand Reinhold, New York, pp 415–432.

Rohm, H.(1991). Importance of yeasts and moulds in the dairy industry. Part II. *Deutsche Milchwirtschaft Hildesheim.***42**, 478–480.

Rohm, H., Eliskasses, F., & Bräuer, M. (1992). Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, **72**, 370–376.

Romero, P., Patiño, B., Quirós, M., González-Jaén, M-T, Valderrama, M-J, Silóniz M-I, Peinado J.M. (2005) Differential detection of *Debaryomyces hansenii* isolated from intermediate moisture foods by PCR-RFLP of the IGS region of rDNA. *FEMS Yeast Res.* **5**, 455–461.

Roostita, R., Fleet, G.H.(1996). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blueveined cheeses. *Int. J. Fd. Microbiol.* **28**, 393–404.

Rose, A. H. and Harrison, J. S. (1969a). The Yeasts: Biology of Yeasts. *Journal of Basic Microbiology.* **1**,83-84.

Ross, H. M. Harden, T. J., Nichol A. W., Deeth H. C. (2000). Isolation and investigation of microorganisms causing brown defects in mould-ripened cheeses. *Austr. J. Dairy Technol.* **55**, 5–8.

Rubin, B, Dennis, E. A, editors. (1997). Lipases: Part A. *Biotechnology Methods in enzymology.* *Academic Press.* **284**, 1–408.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Shuman, H. A. (1989). *Molecular Clonning: a Laboratory Manual*, 2 nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Samelis, J., Sofos, J. N. (2003). Yeasts in meat and meat products. In: Boekhout T, Robert V (eds) Yeasts in food. Beneficial and detrimental aspects. Behr, Hamburg, pp 239–266.
- Sandula, J., Krogar, G., Kacurakova, M., Machova, E. (1999). Microbial (1–3)-b-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *CarbohydrPolym.* **38**, 247–258.
- Scheda, R., Yarrow, D (1966). The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeast. *Arch Microbiol.* **55**, 209–225.
- Scheda, R., Yarrow, D (1968). Variations in the fermentative pattern of some *Saccharomyces* species. *Arch Microbiol.* **55**, 209–225.
- Schmidt, R. D. and Verger, R.(1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie* (International ed. in English). **37**, 1608-1633.
- Schwan, R. F., Wheals, A.E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **44**, 1–17.
- Shah, N. P. (1994). Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*, **49**,432–437.
- Sharma, R., Chistib, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Elsevier Science Inc.* **19**, 627 – 662.
- Simons, J. W. F. A., Adams, H., Cox, R. C., Dekker, N., Gotz, F., Slotboom, A. J. and Verheij, H. M. (1996). The lipase from *Staphylococcus aureus*: Expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase, *Eur J Biochem.***242**, 760–769.
- Spencer, J. F. T. & Spencer, D. M. (1997). Taxonomy: the names of the yeasts. In: Spencer, J. F. T. & Spencer, D. M. (eds), Yeasts in Natural and Artificial Habitats. *Springer-Verlag*, Berlin, pp. 11-32.
- Stam, H., Hoogland, M., Laane, C. (1998). Food flavours from yeast. In: Wood B.J. (ed) Microbiology of fermented foods, vol 2, 2nd edn. Blackie, London, pp 505–542.
- Stead, D. (1986). Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research.* **53**, 481–505.
- Sugihara, A., Scnoo, T., Enoki, A., Shimada, Y., Nagao, T., Tominaga Y. (1995). Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **43**, 81-277.
- Suriyarachchi, V. R.; Fleet, G. H. (1981). Occurrence and growth of yeasts in yogurts. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 574–579.

- Tahoun, M. K., E-Kady, I., Wahba, A. (1985). Production of lipases from microorganisms. *Microbiol Lett.* **28**, 9-133.
- Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H. D., Borncheuer, U. T., Schmid, R. D., Tanka A. (1998). Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng.* **86**, 8-164.
- Takamoto, T., Shirasaka, H., Uyama, H., Kobayashi, S. (2001). Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane inorganic solvent. *Chem Lett.* **6**, 3-492.
- Tornai-Lehoczki, J., Dlauchy, D. (2000). Delimitation of brewing yeast strains using differentmolecular techniques. *Int J Food Microbiol.* **562**, 37-45.
- Tredoux, H. G., Kock, J. L. F., Lategan, P. M., Muller H. B. (1987). A rapid identification technique to differentiate between *S. cerevisiae* strains and other yeast species in the winery industry. *Am J Enol Vitic.* **38**, 161-164.
- Turner, C., Persson, M., Mathiasson, L., Adlercreutz, P., King, J.W. (2001). Lipase-catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat-soluble vitamin determination in milk powder and infant formula. *Enzyme Microb Technol.* **29**, 21-111.
- Undurraga, D., Markovits, A., Erazo S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochem.* **36**, 9-933.
- Van der Walt J. P. & Yarrow D. (1984). Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: Kreger-van Rij(ed), *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 3rd edn. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, 45-105.
- Van der Walt, J. P. (1987). The yeasts – a conspectus. *Stud. Mycol.* **30**, 19-31.
- Van der Walt, J. P. (2000). Progress with a natural system for the ascomycetous yeasts. Proceedings ISY 2000. 10th International symposium on yeasts, Arnhem, Aug 27th-Sept 1st 2000.
- Vandamme, E. J., Soetaert, W. (2002). Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J Chem Technol Biotechnol.* **77**, 1323-1332.
- Vasdinyei, R., Deak, T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int J Food Microbiol.* **86**, 123-130.
- Vaughan-Martini A. (2003). Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine. *Int. Microbiol.* **6**, 175-182.

- Vaughan-Martini, A. and Martini, A. (1998). *Saccharomyces Meyen ex Reess*. In *The Yeast, A Taxonomic Study*, Elsevier Science. **4**, 358–372.
- Verger, R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artefacts. *Trends in Biotechnology*. **15**, 32-38.
- Vivier, D., Rivemale M., Reverbel, J. P., Ratomahenina, R., & Galzy, P. (1994). Study of the growth of yeasts from Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*. **22**, 207–215.
- Vulfson, E.N. (1994). Industrial applications of lipases. In: Woolley P, Peterson S.B., editors. *Lipases—their structure, biochemistry and applications*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1994. pp. 271–88.
- Walker, H. W., Ayres, J. C.(1970). Yeasts as spoilage organisms. In: *The yeasts, Yeast technology*(edited by Rose, A. H.; Harrison, J. S.). London, U.K.: *Academic Press*. **3**, 464–527.
- Wang, J. J. and Frank, J. F.(1981). Characterization of Psychrotrophic Bacterial Contamination in Commercial Buttermilk. *Journal of Dairy Science*. **64**, 2154-2160.
- Wang Y., Srivastava K. C., Shen G. J., Wang H. Y. (1995). Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus strain*, A30-1 (ATCC 53841). *J Ferment Bioeng*. **79**, 8-433.
- Weber, N., Klein, E., Mukerjee, K.D. (1999). Long chain acyl thioesters prepared by solvent free thioesterification and transesterification catalyzed by microbial lipases. *Appl Microbiol Biotechnol*. **51**, 4-401.
- Weerasooriya, M .K. B. and Kumarasinghe, A. A. N. (2012). Isolation of alkaline lipase from rubber seed- Partial purification, characterization and its potential applications as a detergent additive. *Indian J. Chem. Techn*. **19**, 244-249.
- Welthogen, J. J., Viljaen, B. C., (1999). Comparison of ten media for the enumeration of yeast in dairy products. *Food Research International*. **30**, 207-211.
- Westall, S. and Filtenborg, O. (1998). Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Fd Microbiol*. **15**, 243–249.
- Xie, Y. C, Liu, H. Z, Chen, J. Y. (1998). *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification of racemic ibuprofen and chemical hydrolysis of S-ester formed. *Biotechnol Lett*. **20**, 8-455.
- Xin, J. Y., Li, S. B., Xu, Y., Chui, J. R., Xia, C. G. (2001). Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. **76**, 85-579.

- Xu, J. H., Kato, Y., Asano, Y. (2001). Efficient preparation of (R)- α -monobenzoyl glycerol by lipase catalyzed asymmetric esterification: optimization and operation in packed bed reactor. *Biotechnol Bioeng.* **73**, 9-493.
- Xu, X., Balchen, S., Jonsson, G., Adler-Nissen, J. (2000). Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a flat membrane reactor. *J Am Oil Chem Soc.* **77**, 41-1035.
- Yalçın, H. T. and Çorbacı, C. (2013). Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production. *Turkish Journal of Biochemistry.* **38** (1), 141-158.
- Yamamoto, N., Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K., Totsuka, A. (1991). Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am J Enol Vitic.* **42**, 358–363.
- Yang, R., Li, D. & Zhao, J. (2001). 26S rDNA D1/D2 domain sequence analysis of the pathogenic strain from the first case of disseminated trichosporonosis in China. *Chin. Med. J.* **81**, 472-475.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: Kurtzman C. P. & Fell J. W. (eds), *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, 77-100. *Yeast technology*, 2nd edn. *Academic*, London, pp 399–434.
- Yee, L. N., Akoh, C. C., Phillips, R. S. (1995). Terpene ester synthesis by lipase catalyzed transesterification. *Biotechnol Lett.* **17**, 67–70.
- Yeoh H. H., Wong F. M., Lin G. (1986). Screening for fungal lipases using chromogenic lipid substrates. *Mycologia.* **78**, 298–300.
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughan, L., Dussap, C. G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany J. P. (2004). Adsorption of Zearalenone by β -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Protect.* **67**, 1195–1200.