

MOLEKÜLER ESASLI YÖNTEMLERİN GIDA KAYNAKLI MAYALARIN TANIMLANMALARINDA KULLANILMALARI

Seda Karasu Yalçın¹, Şule Şenses Ergül², Z. Yeşim Özbaş^{3*}

¹Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu

²R. S. Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Tüketici Güvenliği ve Sağlık Etkileri Araştırma Laboratuvarları, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe, Ankara

Geliş tarihi / Received: 25.03.2010

Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 26.05.2010

Kabul tarihi / Accepted: 28.05.2010

Özet

Mayalar, gıda endüstrisi açısından oldukça önemli mikroorganizmalar olup; çeşitli gıdaların hem üretilmelerinde hem de bozulmalarında rol alabilmektedirler. Mayaların tanımlanmalarında kullanılan kültürel yöntemlerin, zaman alıcı oldukları, doğruluk ve tekrarlanabilirlik oranlarının da düşük olduğu bilinmektedir. Bu nedenle; maya tanımlamada hızlı ve kesin sonuç veren DNA esaslı yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların, son yıllarda giderek yaygınlaştıkları görülmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmış DNA bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesimine dayanan "Restriction Fragment Length Polymorphism (kesim parçası uzunluk çeşitliliği; RFLP)" yöntemi, bu amaçla en sık kullanılan yöntemlerden birisidir. Moleküler esaslı yöntemlerin kullanılmasıyla, bir maya türüne ait suşların genotiplendirilmeleri de; Randomly Amplified Polymorphic DNA (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA; RAPD) gibi, çeşitli yöntemler ile yapılabilmektedir. Gıda kaynaklı mayaların moleküler yöntemlerle tanımlanmaları ve genotiplendirilmeleri; fermentasyonların kontrolünde, kontaminasyon kaynaklarının belirlenebilmesinde, gıda bozulmalarının önlenmesinde ve endüstriyel öneme sahip maya suşlarının belirlenmesinde, oldukça önemli bir yere sahiptir.

Anahtar kelimeler: Gıda, Maya, Moleküler tanımlama, Genotiplendirme, RFLP-PCR, RAPD-PCR

USE OF MOLECULAR BASED METHODS FOR IDENTIFICATION OF FOODBORNE YEASTS

Abstract

Yeasts, which are very important microorganisms for food industry, can contribute to both production and spoilage of various foods. It is known that culturing techniques used for yeast identification are time consuming and have low accuracy and reproducibility. For this reason, studies concerning the use of DNA based techniques giving fast and accurate identification results, have been increased in recent years. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), depending on cutting of the Polymerase Chain Reaction (PCR)-amplified DNA fragments by restriction enzymes, is given as one of the most common methods used for this purpose. Genotyping of the yeast strains of a species by molecular methods can be performed by various techniques such as Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Identification and genotyping of foodborne yeasts by molecular methods have major importance in monitoring fermentations, determination of contamination sources, preventing of food spoilage and determining of industrially important yeast strains.

Keywords: Food, Yeast, Molecular identification, Genotyping, RFLP-PCR, RAPD-PCR

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author ;

✉ yesim@hacettepe.edu.tr ☎ (+90) 312 297 7112 📠 (+90) 312 299 2123

GİRİŞ

Mayalar doğada yaygın olarak bulunan, çeşitli gıdaların hem üretilmelerinde hem de bozulmalarında önemli role sahip olan mikroorganizmalardır. Gıda endüstrisinde gerek üretim amacıyla kullanılan mayaların, gerekse bozulma etmeni olabilecek türlerin tanımlanmaları ve bu türler arasındaki farklılıkların ortaya konulması, iyi kalitede bir ürün elde edilmesi açısından önem taşımaktadır (1, 2). Son yıllarda, maya tanımlama ile ilgili yöntem yaklaşımlarında önemli değişikliklerin olduğu bilinmektedir. Bu değişikliklerin; temel biyolojik bilgilerin hızla artması, mayaların endüstriyel olarak kullanılmaları ve biyolojik yayılımlarına olan ilginin artması ve hızlı teknolojik gelişmelere bağlı olarak gerçekleştiği belirtilmektedir. Taksonomide kullanılan geleneksel yöntemlerin, mikroorganizmaların ekolojik kaynak, morfoloji, fizyoloji ve üreme gibi fenotipik özelliklerini belirlemeye dayandığı bilinmektedir. Ancak, bu teknikler kullanılarak elde edilen sonuçların yorumlanmasının, son 30 yılda hızlı bir değişime uğradığı belirtilmektedir. Bu değişime neden olarak; DNA ve RNA'nın yapı ve fonksiyonlarının daha da iyi anlaşılmasıyla, fenotipik farklılıkların her zaman genotipik çeşitliliğe işaret etmediğinin açıklık kazanması gösterilmektedir (3). Moleküler taksonomi alanında yapılan ilk çalışmaların ardından tanımlamada; ribozomal RNA (rRNA) veya tamamlayıcı molekülü olan ribozomal DNA (rDNA)'daki belirli bölgelerin hedeflendiği çeşitli tekniklerin geliştirildikleri ve günümüzde de sıklıkla kullanıldıkları bilinmektedir (3). Filogenetik çalışmalarda da kullanılan bu yöntemler; 26S rDNA, 18S rDNA veya 18rDNA'daki ara bölgelerin (ITS1 ve ITS2) tanımlanmasına yöneliktir. Günümüzde, DNA baz dizi analizi çalışmaları sonucunda oldukça fazla sayıda veri bankasının oluşturulması ve PCR teknolojisinin geliştirilmesiyle, mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tür ve suş düzeyinde tanımlanmaları mümkün olabilmektedir. Bu amaçla geliştirilen yöntemler arasında en sık kullanılanın, PCR ile çoğaltılmış DNA bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesimine dayanan; RFLP olduğu belirtilmektedir. Maya tanımlamada kullanılan PCR-RFLP yönteminin, türler arasındaki ayrımın yapılmasında oldukça faydalı bir yöntem olduğu bildirilmektedir (4). Aynı türe ait maya suşlarının ayrımları da, çeşitli moleküler tekniklerle yapılmaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan yöntemlerden biri olan; RAPD, nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş primerler kullanılarak ya-

pılan bir polimeraz zincir reaksiyonu olup, nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlamaktadır (5). Mayaların moleküler yöntemlerle tanımlanması ve tiplendirilmesi; şarap fermantasyonu gibi endüstriyel fermantasyonların kontrolünde, ekolojik çalışmalarda, gıda endüstrisinde kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesinde, gıda bozulmalarının kontrolünde ve ayrıca; endüstriyel öneme sahip ve çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılacak bazı türlerin tespitinde oldukça önemli bir yere sahiptir (3). Bu derlemede; gıda kaynaklı mayaların moleküler esaslı yöntemler ile tanımlanmalarının önemi ve bu amaçla kullanılan bazı yöntemler üzerinde durulmuştur.

GIDA MAYALARINDA MOLEKÜLER TANIMLAMANIN ÖNEMİ

Günümüzde, gıda endüstrisinde mikrobiyel bozulmaların büyük ekonomik kayıplara yol açtıkları ve bu nedenle gıda bozulmalarının engellenmesinin öneminin giderek arttığı bilinmektedir. Mayalar; meyveler, gazlı ve gazsız alkolsüz içecekler, yüksek şeker içerikli ve/veya asitliği yüksek gıdalarda bozulmalara neden olabilmektedirler (6). Başta *Zygosaccharomyces* cinsi içerisinde yer alan mayalar olmak üzere birçok maya türünün, bozulma belirtisi gözlenen bu tip gıdalardan izole edilebildikleri belirtilmektedir. Mikrobiyel bozulmaları kontrol edebilmek için, bir gıdada bulunan bozucu mikroorganizma türünün belirlenmesinin ardından, dikkatli bir izleme ile, mikroorganizmanın üretim hattını nasıl ve hangi kaynaklar aracılığı ile kontamine ettiğinin belirlenmesi ve bu bulaşının engellenmesi gereklidir. Belirtilen önlemlerin doğru bir şekilde alınabilmesinin bir yolunun; moleküler tiplendirme olduğu ifade edilmektedir. Üretim hattının izlenmesi ve kontaminasyon kaynaklarının saptanabilmesi amacıyla yapılan tanımlama ve tiplendirmelerin doğru yöntemlerle yapılması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan, mikroorganizmaların tür ve suş ayrımlarının başarılı bir şekilde yapılabildiği DNA-esaslı yöntemlerin doğru ve hızlı sonuç verdikleri ve gıda endüstrisinde sıkça rastlanan bozucu ve patojen mikroorganizmalardan kaynaklanan problemlerin çözümünde oldukça yararlı oldukları bilinmektedir (4).

Bazı mayaların, son yıllarda patojen özellik gösterdiğinin ortaya çıkması ve bu türlerin gıdalardan da izole edilmeleri, mayaları gıda endüstrisi açısından daha da önemli hale getirmiştir. Bazı *Candida* tür-

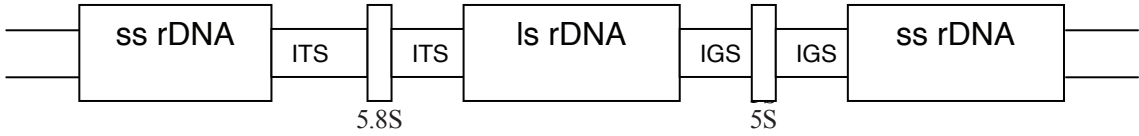
lerinin virulans özellik taşıdığı bilinmektedir. Bu türler arasında virulanslık düzeyi en yüksek olanın, *Candida albicans* olduğu, bunu da *Candida tropicalis*'in izlediği bildirilmektedir (7). Ancak; yıllardır patojen olduğu düşünülmeyen birçok mayanın da günümüzde, fırsatçı patojen olabileceği kabul edilmektedir (8, 9). Örneğin, son yıllarda yapılan araştırmalar, *Saccharomyces cerevisiae*'nin fungemi, pnömoni, endokardit, ürogenital yol ve deri enfeksiyonları taşıyan bazı insanlardan izole edildiğini ortaya koymuştur (10).

Gıda endüstrisi açısından önemli bir mikroorganizma grubu olan mayaların tanımlanmaları; bir ürünlerdeki bozucu floranın ortaya konulması ve bozulmalara karşı önlemler alınması açısından yarar sağladığı gibi, ürünün kalite özelliklerini geliştiren floranın karakterizasyonu açısından da önem taşımaktadır (4). Örneğin; mayaların şarap kalitesi üzerinde belirleyici rol oynadıkları bilinmektedir. *S. cerevisiae*, şarap fermantasyonundan sorumlu esas mikroorganizma olarak bilinse de, üzüm floransından gelen *Saccharomyces* cinsi dışındaki birçok yabancı maya türünün de şarap kalitesine katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Bu yabancı maya suşlarının şarabın duyu özelliklerini geliştirebileceği gibi, suşa bağlı olarak fermantasyonun son aşamalarında şarabın bozulmasına da neden olabilecekleri bildirilmektedir (11, 12). Son yıllarda, şarabın kalitesini etkileyebilecek maya florasının saptanması ve standart kalitede şarap üretimi için şarap endüstrisinde maya tanımlama tekniklerinin kullanılması vazgeçilmez hale gelmiş; şarap mayalarının tür veya suş düzeyinde, moleküler yöntemlerle tanımlanmasını konu alan birçok çalışma rapor edilmiştir (13-17). Mayaların süt ve ürünlerinde de önemli mikroorganizmalar oldukları, özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (18). Özellikle şeker içeriği yüksek olan meyveli yoğurtlarda, *Zygosaccharomyces* spp. ve *S. cerevisiae* gibi ozmotolerant mayaların risk oluşturabildikleri bildirilmektedir (19). Bazı mayaların peynirlerde bozulmalara yol açtıkları bilinmesine rağmen (20), bazı türlerin de peynirin yapı ve aromasının olumlu yönde değişmesine katkıda oldukları belirtilmektedir (21). Bu nedenle; bazı maya türlerinin peynir üretiminde laktik asit bakterilerinin yanında, yardımcı (destek) starter olarak kullanılmaları konusundaki çalışmaların da yoğunlaştığı görülmektedir (21). Peynir kalitesinde olumlu etkiler yaratabilecek bu mayaların tanımlanmaları ve seçilmelerinde, moleküler esaslı yöntemlerin kullanılmalarının da giderek arttığı görülmektedir.

GIDA MAYALARININ TANIMLAMA VE GENOTİPLENDİRİLMELERİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER ESASLI YÖNTEMLER

Mayaların tanımlanmaları amacıyla kullanılan moleküler yöntemler arasında; DNA hibridizasyon tekniği, elektroforetik karyotiplendirme, RFLP, mitokondriyal ve ribozomal DNA sekans (dizi) analizi gibi teknikler yer almaktadır (2, 22). Bu yöntemlerden, PCR esaslı tekniklerin; mayaların hem tür, hem de suş düzeyinde tanımlanmalarına olanak sağladıkları bilinmektedir (2).

PCR yönteminde, DNA polimeraz enzimi yardımcı ile; genomun özgün bölgelerinin kopyalanması gerçekleştirilmektedir (23). Genetik yapıyı anlama isteği ile başlayıp bugüne kadar geçen son yaklaşık elli yıllık süreçte, moleküler biyolojinin başlı başına bir bilim dalı haline gelmesine yol açan pek çok gelişmenin yaşandığı belirtilmektedir. Bu gelişmelerden bazıları, restriksiyon endonükleazların keşfinin bir uzantısı olarak yorumlanmaktadır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri; kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki özgün bölgelerden DNA'yı kesen enzimlerdir. Restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen, birden fazla tiplendirme yöntemi bulunmaktadır. Bu metodların en sık kullanılanları; RFLP ve atılım alanlı jel elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)'dir (24). PCR ile çoğaltılmış DNA'nın, bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı karşılaştırılarak elde edilen çeşitliliğe "kesim parçası uzunluk çeşitliliği" adı verilmektedir (25). Bu yöntem, dört temel aşamada gerçekleştirilmektedir. Bunlar; DNA'nın izolasyonu ve çoğaltılması, DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi, kesilen DNA'ya uygulanan elektroforez işlemi ve en son aşamada ise; jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesi aşamalarıdır. RFLP analizinin; suşların yakınlıklarını belirlemede üstün avantajlara ve özellikle deneysel laboratuvar teknolojisinde önemli bir analiz kapasitesine sahip olduğu da belirtilmektedir. Bununla birlikte; bu teknikle ilgili karşılaşılan en büyük sıkıntının, yüzlerce kesim parçasının ortaya çıktığı durumlarda karmaşık profillerin karşılaştırılmalarındaki zorluk olduğu da belirtilmektedir.



Şekil 1. rDNA'nın tekrarlanan birimleri (4)

[Küçük rRNA geni (ss rDNA veya 18S rDNA), transkripsiyonu yapılmayan bölgeler (ITS), 5.8S rRNA geni, büyük rRNA geni (ls rDNA veya 26S rDNA), genler arası bölge (IGS) ve 5S rDNA geni]

Maya tanımlamada kullanılan PCR-RFLP yönteminin, türler arasındaki ayrımın yapılmasında oldukça faydalı bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Yöntemde, PCR ile çoğaltılan, türe özgü nükleik asit dizilimi, rRNA alt birimini kodlayan bölgeden (ss rDNA veya 18S rDNA) seçildiğinde, cins ve tür düzeyinde ayrım yapmak mümkün olabilmektedir (4, 26). Funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik değişkenliklerin belirlenmesi çalışmalarında, rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizilerinin, yaygın olarak kullanıldıkları belirtilmektedir. Funguslarda rRNA gen kümesi olarak da bilinen çekirdek rDNA, her genomda bir kaç yüz kopyası olan ve ardışık olarak tekrarlanan rDNA birimleri şeklinde organize olmuştur (27, 28). Şekil 1'de; rDNA'nın tekrarlayan birimlerden oluşan yapısı gösterilmektedir. rRNA gen kümesinin, hem çekirdek, hem de mitokondride bulunduğu ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana geldiği bilinmektedir. Tekrarlanan her birimde üç rRNA geni bulunmaktadır. Bunlar; küçük rRNA geni (ss veya 18S rDNA), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (ls veya 26S rDNA)'dir (28). Alt birimler arasındaki ara (spacer) bölgeler, transkripsiyonu yapılmayan bölgeler (internal transcribed spacer- ITS) ve genler arası bölge (intergenic spacer- IGS) olarak adlandırılmaktadır (4, 28). 5S rRNA geni ise; transkripsiyonu yapılan bölgeye komşu olarak, genler arası bölgede yer almaktadır (27). Funguslarda 18SrDNA bölgesinin nispeten yavaş bir şekilde evrim geçirdiği ve uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanıldığı bildirilmektedir. Mitokondriyal rDNA genlerinin ise; daha hızlı evrim geçirdikleri ve yakın akraba organizmaların ayrılmasında kullanıldıkları bilinmektedir (29). Ancak, kodlanmayan bölgelerin (ITS ve IGS), en hızlı evrim geçiren bölgeler oldukları ve bir tür içerisindeki suşların veya bir cins içerisindeki fungal türlerin karşılaştırılmalarında daha faydalı oldukları belirtilmektedir (28, 29).

18S rDNA'yı çoğaltabilmek için, bu genin korunmuş bölgeleri esas alınarak, evrensel bir maya primer çiftinin oluşturulduğu bildirilmektedir. Bu primer çifti, test edilen bütün maya suşlarının 18S rDNA'sının 1230 baz çifti (bç) büyüklüğündeki bir bölgesinin çoğaltılmasını sağlamakta, bu da; bu primer çiftinin çok geniş bir uygulama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (4). 18S rDNA'yı çoğaltabilmek için; NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6, NS7 ve NS8 primerleri kullanılabilir (29). 18S rDNA'yı hedefleyen PCR-RFLP ile, PCR ürününe farklı kesim endonükleazları eklenerek (*AvaI*, *TaqI*, *HhaI*, *CfoI*, vb.), parmak izleri elde edilmektedir. Burada kullanılacak olan kesim enzimlerinin seçiminin, yöntemin tür ayrımındaki başarısının belirlenmesi açısından oldukça önemli olduğu belirtilmektedir. Örneğin; *MseI* enziminin, *Pichia membranefaciens*, *S. cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailii* ve *Z. rouxii* türlerinin birbirinden ayrımında kullanıldığı belirtilmektedir. Türlerden her birinin kendine özgü bir kesim profile sahip olduğu, aynı tür içerisindeki suşların ise, aynı profile sahip oldukları bilinmektedir. *AvaII* kesim enziminin, *Z. bailii* ve *Z. rouxii*'nin ayrımında kullanılabildiği ifade edilmektedir. *CfoI* kesim enziminin ise; *P. membranefaciens* ve diğer dört türün ayrımında kullanıldığı bildirilmektedir (4).

Ribozomal DNA'daki ara bölgelerin (ITS ve IGS), PCR-RFLP analizi, mayaların tanımlanmasında kullanılabilen bir başka yöntemdir. ITS bölgesinin; ITS1, NL2 (4), ITS2, ITS5, ITS3 ve ITS4 primerleri ile; IGS bölgesinin ise, JV51ET ve JV52ET primerleri ile çoğaltıldıkları belirtilmektedir (4, 29). ITS amplifikasyon ürünlerinin uzunluğunun türden türe değişebildiği, bu nedenle, ampikonun boyut farkından da tür ayrımına gidilebileceği bildirilmiştir. ITS-PCR-RFLP'nin, 18S rDNA-PCR-RFLP yaklaşımına göre, daha hassas bir ayrım yapabildiği belirtilmektedir. Granchi et al. (30) tarafından yapılan bir çalışmada; spontan bir şarap fermantasyonunda belirli aşamalarda izole edilen 174 adet mayanın tanımlanabilmesi amacıyla, ITS bölgesinin çoğaltıldığı RFLP yönteminin kullanıldığı bil-

dirilmiştir. *CfoI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII* ve *HinfI* kesim enzimlerinin kullanılmasıyla, türlerin birbirinden ayrılabilirdiği rapor edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada; çeşitli gıdalar ile şarap, bira ve alkolsüz içeceklerden izole edilen toplam 128 maya türü; 18S rDNA ve ITS bölgelerinin aynı anda çoğaltılması ile tanımlanmışlardır. Bu çalışmada; gen bölgelerinin NS1 ve ITS2 primerleri ile çoğaltıldığı ve ampikonun *AluI*, *HaeIII*, *MspI* ve *RsaI* enzimleri ile kesildiği rapor edilmiştir (27, 31). Zott et al. (32) tarafından yapılan bir başka çalışmada da; kırmızı şaraptan soğuk maserasyon aşamasında izole edilen mayaların moleküler tanımlamalarının, PCR-ITS-RFLP yöntemi ile yapıldığı bildirilmiştir. Çalışmada; *Pichia anomala*, *Pichia fermentans*, *Hanseniaspora spp.*, *Candida parapsilosis*, *Issatchenkia orientalis*, *Metchnikowia pulcherima* ve *Hanseniaspora uvarum* türlerinin bu yöntemle tespit edilebildiği rapor edilmiştir. Petersen et al. (33) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise; yüzeysel olgunlaştırılmış peynirlerden izole edilen, *Debaryomyces hansenii*, *S. cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *Y. lipolytica* ve *Kluyveromyces lactis* türlerine ait mayaların tanımlanmalarının, ITS-PCR-RFLP ile yapıldığı belirtilmektedir. Çalışmada, ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesinin çoğaltıldığı ve bu amaçla, ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanıldığı bildirilmiştir. Elde edilen ampikonların, *BamHI*, *DpnI*, *Fnu4HI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HpaII*, *NlaII*, *Sau3AI* ve *TaqI* enzimleri ile kesildikleri belirtilmiştir.

Mayaların moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanabilmeleri için, PCR-RFLP dışında; sekans (DNA dizi) analizi, PCR-Denatüre Edici Gradient Jel Elektrofrezisi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) ve eş zamanlı PCR (Real Time, RT-PCR veya Quantitative, Q-PCR) gibi teknikler de kullanılabilir. Cappa and Cocconcelli (34) tarafından yapılan bir çalışmada; meyveli yoğurt ve Grana peynirinden izole edilen küf ve mayaların tanımlanmalarının, 18S rDNA sekans analizi ile yapıldığı bildirilmiştir. Bozulmuş meyveli yoğurttan izole edilen 6 maya izolatının aynı DNA sekansına sahip oldukları ve bunların; *Zygosaccharomyces microellipsoides* olarak tanımlandıkları rapor edilmiştir. Cocolin et al. (35) tarafından yapılan bir çalışmada; şarapta bozulmaya neden olan *B. bruxellensis* ve *Brettanomyces anomala* türlerinin tanımlanabilmesi için, 26S rDNA bölgesinin çoğaltıldığı bir PCR-RFLP yönteminin geliştirildiği bildirilmektedir. Çalışmada tamamlayıcı testler olarak da; PCR-DGGE, RT-PCR-DGGE

ve hibridizasyon (melezleme) tekniklerinin uygulandığı rapor edilmiştir (35). Patojen özellik gösteren mayaların tanımlanmasında, tespit yanarda sayımın da mümkün olduğu; RT-PCR'in kullanımının daha yararlı olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada; sulara bulunabilen patojen *Candida* türlerini (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. lusitaniae*) tespit etmek için bir RT-PCR yönteminin geliştirildiği bildirilmiştir (36). Gerçekleştirilen bir başka araştırmada ise; portakal sularındaki bozucu mayaların tanımlanabilmesi ve sayımı amacıyla, RT-PCR yönteminin kullanıldığı rapor edilmiştir (37).

Moleküler tekniklerle tanımlanan, aynı türe ait suşların ayrımı; PFGE, mitokondriyal DNA'nın kesim analizi (mtDNA-RFLP), RAPD, genomu tekrarlayan bölgelerinin çoğaltılması ve Amplified Fragment Length Polymorphism (çoğaltılmış fragmentlerin uzunluk polimorfizmi; AFLP) gibi yöntemlerle yapılabilmektedir (27). Bu yöntemlerden, mitokondriyal DNA'nın kesim analizi, *S. cerevisiae* suşlarının birbirinden ayrımında kullanılabilir. *S. cerevisiae*'nin 65-80 kb'lık küçük bir molekül olan; mitokondriyal DNA (mtDNA)'sının restriksiyon enzimleri ile kesimi, polimorfizmin başarılı bir şekilde ortaya konulmasını sağlamaktadır. Mayanın mtDNA'sının izolasyonu için geliştirilen yöntemin ilk aşamasında, hücredeki çekirdek DNA'sı ve mtDNA'nın izolasyonunun yapıldığı ifade edilmektedir. Maya mtDNA'sının yaklaşık %75 oranında AT bazlarını içerdiği, bunun yanında, yaklaşık 200 bölgesinin ise, GC bazları açısından zengin olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, toplam DNA'nın GCAT-özgün bir enzimle kesimi, hem GC, hem AT bakımından zengin bölgelerin kesilememesi ile sonuçlanmaktadır. Bunun sonucunda da, mtDNA'da düşük sayıda kesim bölgesi sağlanırken, çekirdek DNA'sı birçok yerinden kesilerek oldukça küçük parçacıklara ayrılmaktadır. Bu küçük DNA parçaları, jel elektrofrezisinde, mtDNA ile kıyaslandığında, neredeyse görünmez halde olmakta, böylece mtDNA'nın kesim profili rahatlıkla incelenebilmektedir. Bu yöntemde, bütün enzimlerin, polimorfizmi aynı derecede ortaya çıkaramadıkları, bunun çalışılan türe bağlı olduğu belirtilmektedir (27). mtDNA-RFLP yönteminin, özellikle şarap mayalarının tiplendirilmesinde başvurulan bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada, spontan şarap fermantasyonlarının belirli aşamalarında izole edilen 100 adet *S. cerevisiae*

suşunun tiplendirilmesinin; mtDNA-RFLP ile yapıldığı bildirilmiştir (16). Bu yöntemin başka maya türlerinin tiplendirilmesinde de kullanılabilirdiği bilinmektedir. Yüzeyi olgunlaştırılmış peynirlerden elde edilen maya izolatları ile bu peynirler açısından önemli olabilecek bazı ticari suşları içeren toplam 60 adet maya suşunun tanımlanmasında, ITS-PCR ve ITS-PCR-RFLP yöntemlerinin kullanıldığı bir çalışmada; 20 adet *D. hansenii* suşunun ayırımında mtDNA-RFLP yönteminin kullanıldığı rapor edilmiştir (38).

RAPD, nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan bir polimeraz zincir reaksiyonu olup, nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir (5). Bu yöntemde; bilinen özgün bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir (25). DNA parmak izi olarak da adlandırılan RAPD'in temeli, yaklaşık 10 nükleotidlik ve nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primerin kullanımına dayanmaktadır (5, 36). Bu primerler tasarlanırken, primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha büyük olmasına dikkat edildiği belirtilmektedir (5). Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları, agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşmasına neden olmaktadır. Yöntemde; bağlanma sıcaklığının 40-50°C'ye veya 37°C'ye düşürüldüğü bilinmektedir (25, 27). Düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen bağlanma aşamasında, seçilen primerler, kromozom üzerinde hem kendilerine özgü bölgelere, hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda; primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olduğundan, agaroz jel elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüklerinin de farklı oldukları bilinmektedir (25). Sonuç olarak, farklı suşlar, bant profilleri arasındaki fark gözetilerek ayrılabilir. Bu tekniğin suş düzeyinde ayırma performansının, referans kültürlerin farklı suşlarının incelenmesi ile kanıtlandığı bildirilmektedir (27).

Mayaların tiplendirilmesinde RAPD-PCR yönteminin kullanıldığı birçok çalışma rapor edilmiştir. Huang et al. (39) tarafından yapılan bir çalışmada; bira ve şarap endüstrisi ile ilişkili mayaları içeren *Saccharomyces sensu stricto* grubunun tanımlanmasında, RAPD-PCR kullanılmıştır. Bu grubun, fizyolojik ve morfolojik testlere dayanan geleneksel yöntemlerle tanımlanmasında yanlış sonuçlar elde

edilebildiği bildirilmektedir. Bu nedenle, *Saccharomyces sensu stricto* grubunun ayırımında; DNA baz dizi analizi, PFGE, mtDNA-RFLP, ITS-PCR-RFLP ve RAPD gibi yöntemlere başvurulduğu belirtilmektedir. Huang et al. (39) tarafından yapılan çalışmada; S. bayanus'tan klonlanan özgün DNA dizisinin, iki adet primerin dizaynında kullanıldığı bildirilmiştir. Bu primerlerin de, *Saccharomyces sensu stricto* grubunun multipleks PCR ve RAPD ile ayırımında kullanıldıkları rapor edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada; yüksek şeker içerikli bir sıranın doğal fermantasyonu sırasında, ortamdaki *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların dağılımları incelenmiştir (40). Çalışmada, toplam 78 adet izolatın, 5.8S ITS rRNA bölgelerinin çoğaltıldığı, PCR-RFLP ile tanımlandığı ve RAPD-PCR ile suş ayırmalarının yapıldığı bildirilmektedir. Uygulanan RAPD-PCR'da M13 primerinin kullanıldığı ve incelenen; *Candida apicola*, *S. cerevisiae*, *Candida zemplinina* ve *Z. bailii* türlerine ait izolatların farklı suşlarının tespit edilebildiği bildirilmiştir (40).

Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç vermesi açısından geniş kullanım alanı bulan, hem klinik hem de gıda kaynaklı mayaların tiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan RAPD yönteminin en önemli dezavantajı, henüz standardizasyonunun sağlanamamış olması şeklinde ifade edilmektedir (25). RAPD yönteminin tekrarlanabilirliğinin halen tartışılan bir konu olduğu da belirtilmektedir (4). Bu probleminin, özellikle reaksiyon sıcaklık profillerine dikkat edilerek aşılabileceği de belirtilmektedir. Quesada and Cenis (41) tarafından yapılan bir çalışmada; RAPD'in tekrarlanabilirliğinin sağlanabilmesi için; reaksiyon koşullarının, kullanılan reaktiflerin ve hatta ısı döngü cihazlarının standardizasyonu önerilmektedir.

SONUÇ

Gıdalarda yararlı veya zararlı etkiler yaratabilen mayaların tanımlanmalarında kullanılan kültürel yöntemlerin, zaman alıcı olduğu ve bazen yanlış tanımlamalara yol açabildiği bilindiğinden, günümüzde maya tanımlamada moleküler yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu amaçla sıklıkla başvuru alan, hızlı ve daha doğru sonuçlar veren PCR esaslı yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların son yıllarda giderek yoğunlaştığı görülmektedir (42). Bu yöntemlerin etkin bir şekilde kulla-

nılabilmeleri için, proses koşullarının optimizasyonu ve standardizasyonunun gerekliliği üzerinde durulmaktadır. Gıda kaynaklı mayaların moleküler düzeyde doğru bir şekilde tanımlanmalarının; gıdalardaki mayalardan kaynaklanabilecek risklerin azaltılması, maya kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi veya gıdanın kalitesinin geliştirilmesine katkıda bulunabildiği gibi; bazı gıda prosesleri için suş seçiminde de yararlı olabileceği bildirilmektedir. Bu açıdan bakıldığında; bozulmuş veya doğal maya florası belirlenmek istenen bir gıdadan izole edilerek, moleküler yöntemlerle tanımlanan her mayanın, gıda fermantasyonları veya endüstriyel fermantasyon proseslerinde değerlendirilebilecek potansiyel bir suş olarak düşünülmesi gerektiği de bildirilmektedir (4).

KAYNAKLAR

- Lopes MB, Soden A, Martens A., Henschke PA, Langridge P. 1998. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int J System Bacteriol*, 48: 279-286.
- Hierro N, González Á, Mas A, Guillamón JM. 2004. New PCR-based methods for yeast identification. *J Appl Microbiol*, 97: 792-801.
- Vaughan-Martini A. 2003. Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine. *Int Microbiol*, 6: 175-182.
- Van Der Vossen JMBM, Rahaoui H, De Nijs MWCM, Hartog BJ. 2003. PCR methods for tracing and detection of yeasts in the food chain. In: *Yeasts in Food*, Boekhout T, Robert V (eds), Bayerlein GmbH, Neuss, Germany, pp. 123-137.
- Arı Ş. 2008. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Temizkan G, Arda N (editörler), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye, s. 101-120.
- Deák T, Beuchat LR. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, CRC Press, USA, 210p.
- Fujita S, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clinical Microbiol*, 39(10): 3617-22.
- Boekhout T, Phaff H. 2003. Yeast Biodiversity. In: *Yeasts in Food*, Boekhout T, Robert V (eds), Bayerlein GmbH, Neuss, Germany, pp. 1-38.
- Jacquez N, Casaregola S. 2008. Safety assesment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *Int J Food Microbiol*, 126: 321-326.
- Posteraro B, Sanguinetti M, Romano L, Torelli R, Novarese L, Fadda G. 2005. Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*, 103(3): 295-304.
- Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res*, 4: 865-877.
- Capece A, Fiore C, Maraz A, Romano, P. 2005. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *J Appl Microbiol*, 98: 136-44.
- Antunovic Z, Irinyi L, Sipiczki M. 2005. Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *J Appl Microbiol*, 98: 971-979.
- Martorell P, Fernandez-Espinar T, Querol A. 2005. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *Int J Food Microbiol*, 101: 293-302.
- Nikolaou E, Andrighetto C, Lombardini A, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. 2007. Heterogeneity in genetic and phenotypic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from red and white wine fermentations. *Food Control*, 18: 1458-65.
- Schuller D, Pereira L, Alves H, Cambon B, Dequin B, Casal M. 2007. Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. *Yeast*, 24: 625-636.
- Oelofse A, Lonvaud-Funel A, Toit M. 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiol*, 26(4): 377-385.
- Kumura H, Tanoue Y, Tsukahara M, Tanaka T, Shimazaki K. 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *J Dairy Sci*, 87: 4050-4056.
- Senses-Ergul S, Ágoston R, Belák Á, Deák T. 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *Int J Food Microbiol*, 108:120-124.
- Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J*, 11: 259-274.
- Kesenkaş H, Akbulut N. 2006. Mayaların peynir üretiminde destek starter kültür olarak kullanımı. *Ege Üniv Zir Fak Dergisi*, 43(2): 165-174.
- Heras-Vazquez FJL, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez JM, Rodriguez-Vico F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*, 3: 3-9.
- Köksal F. 2001. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, Durmaz R (editör), Kozan Ofset, Ankara, Türkiye, s. 15-43.
- Bulut Y, Doymaz MZ. 2001. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ve mikrobiyolojideki önemi. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, Durmaz R (editör), Kozan Ofset, Ankara, Türkiye, s. 109-122.

25. Yağcı A. 2001. Restriction fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, Durmaz R (editör), Kozan Ofset, Ankara, Türkiye, s. 149-160.
26. Možina SS, Dlačny D, Deák T, Raspor P. 1997. Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and yeasts by PCR ribotyping. *Lett Appl Microbiol*, 24: 311-315.
27. Fernandez-Espinar MT, Martorell R, De Llanos R, Querol A. 2006. Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. In: *Yeasts in Food and Beverages* ed: Querol A. and Fleet G (eds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp: 55-82.
28. Çebi Kılıçoğlu M, Özkoç İ. 2008. Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. *OMÜ Zir Fak Dergisi*, 23(1): 65-72.
29. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols, a guide to methods and applications*, Innis MA, Gelfond DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), Academic Press Inc., USA, pp. 315-322.
30. Granchi L, Bosco M, Messini A, Vincenzini M. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J Appl Microbiol*, 87: 949-956.
31. Dlačny D, Tornai-Lehoczki J, Péter G. 1999. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *System Appl Microbiol*, 22: 445-453.
32. Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A. 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int J Food Microbiol*, 125: 197-203.
33. Petersen KM, Møller PL, Jespersen L. 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int J Food Microbiol*, 69: 11-24.
34. Cappa F, Cocconcelli PS. 2001. Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *Int J Food Microbiol*, 69: 157-160.
35. Coccolin L, Rantsiou K, Lacumin L, Zironi R, Comi G. 2004. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Appl Environ Microbiol*, 70(3): 1347-1355.
36. Brinkman NE, Haugland RA, Wymer LJ, Byappanahalli M, Whitman R., Vesper SJ. 2003. Evaluation of a rapid, quantitative, Real-Time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. *Appl Environ Microbiol*, 69(3): 1775-1782.
37. Renard A, Marco PG, Egea-Cortines M, Weiss J. 2008. Application of whole genome amplification and quantitative PCR for detection and quantification of spoilage yeasts in orange juice. *Int J Food Microbiol*, 126: 195-201.
38. Petersen KM, Møller PL, Jespersen L. 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int J Food Microbiol*, 69: 11-24.
39. Huang CH, Lee FL, Tai CJ. 2008. A novel specific DNA marker in *Saccharomyces bayanus* for species identification of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *J Microbiol Methods*, 75: 531-534.
40. Tofalo R, Chavez-Lopez C, Di Fabio F, Schirone M, Felis GE, Torriani S, Paparella A, Suzzi G. 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *Int J Food Microbiol*, 130(3): 179-187.
41. Quesada MP, Cenis JL 1995. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *American J Enol Vitic*, 46(2): 204-208.
42. Jancy J, Barbier G. 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol*, 25: 839-848.