



Çay Üretim Aşamalarından İzole Edilen Mayaların Tanımlanması

Elif SEVİM¹, Ali SEVİM¹, Hacer TAŞKIRAN GENÇ², Şengül ALPAY KARAOĞLU^{2*}

¹ Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, KIRŞEHİR

² Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, RİZE

Öz:Çay Dünya'da sudan sonra tüketilen en önemli içecektir. Bu çalışmada, çay yapraklarının tarladan fabrikaya gelişi ile başlayan çay işleme aşamalarından ve poşetlenen siyah çaydan izole edilen mayaların tanımlanması ve bir dizi biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada toplam 69 maya izolatu elde edilmiştir. İzolatların klasik yöntemler ve Vitek YBC tanımlama kart sistemi kullanılarak tür tanımlamaları yapılmıştır. Çalışmada izolatların %52.17'si Vitek YBC tanımlama sistemi ve klasik metotlar ile birlikte %94-99 doğrulukta tür seviyesinde tanımlanırken, diğer izolatlar tanımlanamamıştır. Çalışmada beş farklı cins (*Candida*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* ve *Trichosporon*) ve 11 farklı tür tespit edilmiştir. En sıklıkta rastlanan türler sırasıyla *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij, in Kreger-van Rij 1984) (%13), *Cryptococcus laurentii* (*Cryptococcus laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner, *Am. Midl. Nat.* 43: 249, 1950) (%11.5) ve *Candida krusei* (*Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev, Bot. Mater. Otd. Sporov. Rast. Bot. Inst. Komarova Akad. Nauk S.S.S.R. 13: 143, 1960)(%7) olarak tespit edilmiştir. İzolatların %5'inde slime aktivitesi pozitif, %51'inin ise hif ya da pseudohif oluşturmayıp maya formunda olduğu belirlenmiştir. İzolatların %39'unda % 0.001'lik sikloheksimit direnci belirlenmiştir. İzolatların % 43'ünün %50 ve 60'lık glikoz ortamında iyi üreyebildiği tespit edilmiştir. Üreme sıcaklıklarına bakıldığında izolatların 45 °C'de üreyemedikleri ancak 42 °C'de % 35'inin üreyebildiği belirlenmiştir. Fermentasyon testleri sonucunda izolatların % 52'sinin test edilen 9 farklı karbonhidrattan en az birini, RÇM 17C'nin ise 7 farklı karbon kaynağını fermente edebildiği belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda çay işleme aşamalarında ve paket çayda mayaların varlığı tespit edilmiş ve bu mayaların tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Çay, Maya, Klasik Tanımlama, Vitek -YBC kart Sistemi.

Identification of Yeasts Isolated from Tea Processing Stages

Abstract: Tea is the most popular beverage in the world after water. In this study, it was aimed to identify yeasts isolated from tea processing stages began with the arrival of the tea leaves from fields to the factory and the bagged black tea and to determine some biochemical properties of these yeasts. In this study, a total of 69 yeast isolates were identified. The isolates were identified using conventional techniques and Vitek YBC Identification Cart System. Although 52.17 % of the isolates were identified at species level between 94-99% accuracy with using conventional techniques and Vitek YBC Identification System, other isolates were not identified.



In this study, five different genus (*Candida*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* and *Trichosporan*) and 11 different species have been identified. The most frequently encountered species were determined as *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij, in Kreger-van Rij 1984) (%13), *Cryptococcus laurentii* (*Cryptococcus laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner, *Am. Midl. Nat.*43: 249, 1950) (%11.5) and *Candida krusei* (*Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev, Bot. Mater. Otd. Sporov. Rast. Bot. Inst. Komarova Akad. Nauk S.S.S.R. 13: 143, 1960) (%7).

Five percent of the isolates were found to be positive for slime activity and 51% of the isolates were found to be yeasts which don't form hypha or pseudohypha. Also, 39% of the isolates have resistant against cycloheximide (0.001%). It was determined that 43% of the isolates were able to grow in the presence of 50-60% glucose. Considering the growth temperatures, all isolates could not grow at 45°C but 35% of the isolates could grow at 42°C. Based on the results of fermentation tests, it was determined that 52% of the isolates could ferment at least one of the tested nine different carbohydrates and RÇM 17C could ferment 7 different carbon sources. In the result of this study, the presence of yeasts at tea processing stages and black tea were determined and these yeasts were indentified.

Key words: Tea, Yeast, Conventional identification, Vitek- YBC Card System.

Giriş

Çay tüm Dünya'da sudan sonra tüketilen en popüler içecektir. Çaylar fermentasyon dereceleri baz alındığında dört kategoride sınıflandırılır; non-fermentatif yeşil ve sarı çay, kısmi fermente olan Oolong-tip çay, tamamen fermente siyah çay ve post-fermente koyu yeşil çay (Xu ve ark., 2011).

Mayalar, bilimde, gıdada, sağlıkda ve tarımsal alanlarda endüstriyel önem taşımaktadır. Mayaların geleneksel endüstrideki önemi, birçok gıdanın fermenteri olup bunların başında bira, şarap, alkol, sake, ekmek, peynir, sosis, salam, turşu, sirke vb. gıdalar gelmektedir. Mayalar geleneksel gıdanın yanısıra çevresel biyoteknolojide (biyoremidasyon), probiyotik, yiyecek ve içecek kontrolünde, gıda katkı maddeleri üretimlerinde (Enzimler, flavonoidler, pigmentler, organik asitler), biyokatalizörler olarak (biyotransformatör, farmasötikler ve kimyasal aramaddeler) ve benzer protein üreticileri (enzim, hormon, aşı ve toksin) olarak kullanılmalarının yanısıra biyolojik (moleküler, genomik vb.) ve biyomedikal (ilaç ve metabolit vb) araştırmalarda önemli bir materyali oluşturmaktadır (Kurtzman ve ark., 2011).

Çayın aromasına ve daha iyi fermente olmasına katkıda bulunan mayaların tanımlanması, endüstriyel potansiyeli yüksek yeni yerel suşların elde edilmesini, bilimsel ve ekonomik yeni çalışmalara temel teşkil edeceği düşünülmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda bölgemizin önemli geçim kaynağı olan ve de ülke ekonomisinde önemli bir yer tutan çaydaki maya türlerinin belirlenmesi hem ticari hem de sağlık açısından önemli olacağı düşünülmektedir. Bu amaçla, 2004-2005 yıllarında Çay-Kur'a bağlı iki çay fabrikasında işleme aşamalarından alınan çay örneklerinden ve Rize Ticaret Borsası, Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'na gelen kuru siyah çay numunelerinden izole edilen maya izolatlarının tanımlanması ve çeşitli özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çay örneklerinde bulunabilen maya türlerinin belirlenmesi ve çeşitli özelliklerinin araştırılması, çayın işleme aşamalarında ve siyah çayda patojen veya fermentasyonda etkili türlerin bulunup bulunmadığı konusunda bilgi vereceği ve daha kaliteli çay üretimine fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma Rize'de yetiştirilen çaylardaki maya türlerinin belirlenmesi açısından yapılan ilk çalışmadır.



Materyal ve Metot

Çay Örneklerinin Toplanması

Bu çalışma, Mayıs 2004 – Eylül 2005 tarihleri arasında, Çaykur'a ait Cumhuriyet ve Zihniderin Çay fabrikalarından, yaş çayın fabrikaya girişi ile kuru çay olarak çıkışı arasındaki siyah çay üretim basamaklarında belirlenen 10 farklı istasyondan ve Rize Ticaret Borsası, Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'na gelen ambalaj (siyah) çaylarda alınan örneklerden yapılmıştır. Çalışmada çay fabrikasından izole edilen maya izolatları RÇM, ambalajlı çaylardan izole edilen maya izolatları HTM olarak isimlendirilmiştir. Çay fabrikalarından siyah çay üretim basamaklarında belirlenen istasyonlardan her sürgün döneminde (yılda 3 sürgün) olmak üzere toplamda 60 örnek alınmıştır.

Çay Örneklerinden Mayaların İzolasyonu

Belirlenen çay fabrikalarından her istasyondan yaklaşık olarak 50 gr çay örneği steril kaplara alınarak hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Belirlenen 10 farklı istasyondan alınan çay örneklerinden ve Rize Ticaret Borsası, Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'na gelen ambalaj (siyah) çaylardan 10 gr tartılıp, 90 ml steril serum fizyoloji içeren cam erlenlere aktarılmıştır. Erlenler çalkalamalı su banyosunda 30 dk. bekletilerek örneklerin serum fizyoloji içerisinde homojen dağılımı sağlandı. Daha sonra seri dilüsyonlar hazırlanarak 10^{-1} ve 10^{-3} dilüsyonlardan Yeast Pepton Dekstroz (YPD) agara ekim yapılarak 25°C 'de 24-48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda YPD agar besiyerinde farklı morfolojiye sahip tüm kolonilerden YPD agar besiyerlerine tek koloni ekimleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen saf kültürlerin gliserol stokları yapılmış ve izolatların tanımlanabilmesi için bir takım morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler gerçekleştirilmiştir (Bilgehan, 2004).

Maya İzolatlarının Tanımlanması

Çay örneklerinden izole edilen maya izolatlarının tanımlanması Kreger van Rij, (1984)

ve Kurtzman ve Fell, (1998) tarafından önerilen morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler gerçekleştirilerek belirlenmiştir (Kreger-Van Rij, 1984; Kurtzman ve Fell, 1998). Tanımlanan maya izolatları Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında muhafaza edildi.

Maya İzolatlarının Morfolojik ve Mikroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çay örneklerinden izole edilen izolatların koloni morfolojileri, koloni renkleri, mikroskopik görünümleri, vejetatif üreme özellikleri, hifa ve pseudohifa oluşturma özellikleri Patato Dextrose Agar (PDA) ve Malt Extract Agar (MEA) besiyerlerine ekimleri yapılarak belirlendi (Barnett ve ark., 1983).

İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çay örneklerinden izole edilen maya izolatlarının farklı sıcaklıklarda üreme özelliği Glikoz Yeast Peptone (GYP) Besiyeri kullanılarak test edilmiştir. Maya izolatlarının 24-48 saatlik kültürlerden GYP sıvı besiyerine ekimleri yapıldı. Ekimleri yapılan tüpler 17°C , 25°C , 37°C , 40°C ve 45°C 'de 24-48 saat inkübasyona bırakılarak farklı sıcaklıklarda üreme özellikleri belirlendi (Barnett ve ark., 1983).

İzolatların %50 ve %60 glikoz içeren besiyerinde üreme özellikleri Glukoz Agar Besiyerinde (1lt için, 40 gr yeast ekstrakt, 50 gr veya 60 gr glikoz, 15 gr agar) belirlenmiştir (Wickerham, 1951).

İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Çay örneklerinden izole edilen maya izolatlarının biyokimyasal özellikleri üreaz üretimi, nitrat kullanımı, nişasta hidrolizi, indol, metil red/voges prouskauer testi, sitrat kullanımı, esculin hidrolizi ve selülaz üretim testleri ile belirlendi (Bilgehan, 2004; Yarrow, 1999; Koneman ve ark., 1997; Hols ve ark., 1994).



İzolatların fermentasyon özellikleri %2'lik glikoz, galaktoz, laktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, mellebiyoz, selobiyoz ve %4'lük rafinoz solüsyonlarından hazırlanan besiyerlerine (1 lt için, 4.5 gr yeast ekstrakt, 7.5 gr pepton, 4 ml bromotimol mavisi (0.5 mg/ml)) ekilmesi ile belirlenmiştir (Barnett, 1983).

İzolatların Slime Aktivitesinin Belirlenmesi

Çay örneklerinden izole edilen izolatların slime aktiviteleri Kongo Kırmızısı Agar (Congo Red Agar) metodu ile gerçekleştirildi. İzolatlar SDA (Sabouraud Dextrose Agar) besiyerinde üretildi ve taze kültürlerden Kongo Kırmızısı Agar (Brain Heart Infusion Broth 37g/l, glikoz 80 g/l, agar 10 g/l, kongo kırmızısı 0.8 g/l) besiyerine yeniden ekimleri gerçekleştirildi. Petri kapları 25°C'de 3-5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda koyu kırmızı renk oluşumu pozitif, pembe ve beyaz renklerin oluşumu ise negatif olarak kabul edildi (Freeman ve ark., 1989).

Jerm Tüpü Oluşumu

Jerm tüpü oluşumu testi için insan serumu kullanıldı. Test solüsyonu ¼ steril su ile sulandırılarak taze olarak hazırlandı. Bu amaçla 0.5-1.0 ml steril serum içinde test edilecek maya hücrelerinin taze kültürlerinden (1 günlük kültür) 10^5 - 10^6 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon hazırlandı ve 25°C'de 1-3 saat inkübe edildikten

sonra mikroskopta lam lamel preparatı hazırlanarak jerm tüpü oluşumu incelendi. Flamentöz yapı oluşturan maya hücreleri pozitif olarak değerlendirildi. Negatif kültürler 24-48 saat bekletildikten sonra tekrardan kontrol edildi. Pozitif kontrol olarak *Candida albicans* ATCC 60193 suşu kullanıldı (Yarrow, 1999).

Vitek YBC Doğrulama Testi

Çay örneklerinden izole edilen maya izolatlarının tanımlanması için Vitek Maya Biyokimyasal Kart Kiti (YBC) (Biomérieux, France) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Taze hazırlanan maya kültürlerinden önceden hazırlanmış steril 0,45 M'lık NaCl içerisinde aktararak Vitek Colorimeter Product (No: 52- 1210) cihazı ile McFarland 2.0 bulanıklığına ayarlandı. Solüsyonlar kartlara yüklenerek kartların 30°C'de 24 ve 48 saat inkübasyonu sağlandı. Test sonuçları, 24. veya 48. saatte değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmamızda, 2004-2005 yıllarında Çay-Kur'a bağlı iki (Zihniderin ve Cumhuriyet) fabrikadan, çay işleme aşamalarını temsilen 10 farklı noktadan alınan 60 örnekten (RÇM) ve Rize Ticaret Borsası, Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'na gelen 10 adet ambalaj siyah çaylarda (HTM) yapılan analizler sonucunda izole edilen toplam 69 maya incelenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Çay numunelerinin alındığı noktalar ve maya izolasyon sayısı

Numune Alınan Nokta	Maya İzolasyonu			
	Cumhuriyet Çay Fabrikası	Zihniderin Çay Fabrikası	Toplam	
	Sayı	Sayı	Sayı	Yüzde (%)
1. Fabrika Girişi	2	1	3	4
2. Soldurma Girişi	3	1	4	6
3. Solduma Çıkışı	2	2	4	6
4. Rotervan 1	1	2	3	4
5. Rotervan 2	1	1	2	3
6. Fermentasyon Girişi	2	1	3	4
7. Fermentasyon Ortası	6	4	10	15
8. Fermentasyon Çıkışı	5	6	11	16
9. Fırın Girişi	4	3	7	10
10. Fırın Çıkışı	0	0	0	0
11. Ambalaj			22	32
Toplam			69	100



İzole ve karakterize edilen maya örneklerinin suş numaraları ve PDA besiyerindeki koloni morfoloji ve mikroskopik özellikleri Tablo 2'de verilmiştir. İzolatların çoğu beyaz ve krem renkte olup sadece HTM 28 izolatu turuncu renktedir. İzolatların 46 (%67)'si gibi büyük çoğunluğu S (düzgün) tipi, 15 (%22)'i R (pürtüklü) tipi ve 8 (%11)'i M (mukoit) tipi koloni morfolojisine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada izolatların çeşitli besiyerlerinde tomurcuklanma şekilleri ve spor oluşturma özellikleri de incelenmiştir. İzolatların 15'inde ballitospur, 2'sinde askospor ve birinde artrospur gözlemlenmiştir. HTM 16 izolata ise hem ballitospur hemde askospor oluşumu tespit edilmiştir. Çalışmada izolatların bir kısmının sıvı, bir kısmının katı bazılarının ise her iki ortamda hifa oluşturdıkları gözlenmiştir. Herhangi bir ortamda hifa oluşturmayan izolatlarda jerm tüpü testi yapıldığında ise pseudohifa oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmada herhangi bir besiyerinde ve şartlarda hifa ya da pseudohifa oluşturmayan, sadece maya formunda bulunan izolat sayısı ise 35 (%51) olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Çalışmada maya izolatlarının tanımlanması için bir dizi biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik testler ve bunun yanısıra Vitek 2 YBC kart sistemi kullanılmıştır. Bu özellikler içinde patojenitede rol oynayan, mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarından (fagositozdan) koruyan, tıbbi mikolojide patojenite faktörü olarak bilinen slime aktivite varlığı incelendiğinde HTM 15, HTM 18, HTM 26, HTM 28 ve RÇM 21B izolatlarının (%7)'inin pozitif olduğu, geri kalan 64 (%93) izolatın ise negatif olduğu belirlenmiştir. İzolatların ozmolaritesini belirlemek amacıyla yüksek şeker içerikli (%50 ve %60) ortamda üreme özellikleri incelendi. İzolatların 30'unun her iki ortamda da oldukça iyi üreme özelliği gösterdiği tespit edildi. Maya izolatlarının belirli sıcaklıklarda üreme özellikleri test edildiğinde ise tüm izolatların 17°C, 25°C ve 37°C'de üreyebildiği, ancak 45 °C'de ise hiçbir izolatın üreyemediği belirlendi. Çalışmada 42°C'de izolatların 24 (% 35)'ünün (HTM-4, 5, 10, 12, 13, RÇM-4C, 7B, 9B, 9D, 14, 17C, 18A₂,

18B, 19B₂, 22, 29C, 37D, 40B, 42H, 55K, 86H₁, 104K, 108C₁, 119H) üreyebildiği, diğerlerinin ise bu sıcaklıkta üreyemedikleri belirlendi. İzolatların 26 (% 39)'ünün (HTM-4, 11, 13, 15, 28, RÇM-1H, 4A₁, 4A_x, 7B, 9D, 11, 17C, 18A₂, 18B, 19B₁, 29C, 37D, 38B, 40B, 42H, 56K, 86H, 86H₁, 104K, 119H, 133K) % 0.001'lik siklohegzimit direncine sahip oldukları belirlendi. İzolatların diğer biyokimyasal özellikleri Tablo 3'de verilmiştir.

Fermentasyon testleri sonucunda, izolatların birçoğunun sükrözu, glikozu, trehalozu, maltozu, galaktozu, mellebiyozu, laktozu ve rafinozu fermente edebilirken, hiçbir izolatın cellobiyozu fermente edemediği tespit edilmiştir. Fermentasyon testleri sonucunda izolatların 36 (% 52)'ünün test edilen 9 farklı karbon kaynağından en az birini, RÇM 17C izolatının test edilen 9 karbon kaynağından 7'sini (glukoz, galaktoz, maltoz, laktoz, trehaloz, rafinoz, sukroz), RÇM 16 izolatının ise 5'ini (glukoz, galaktoz, maltoz, sukroz, trehaloz) fermente edebilme özelliğinde olduğu gözlemlendi. RÇM9D izolatu ise 3 farklı karbon kaynağını (galaktoz, laktoz ve sukroz) fermente edebilme özelliğinde olduğu belirlenmiştir. Bunun yanısıra RÇM36 izolatu galaktozu, RÇM 25 izolatu glukoz ve galaktozu, RÇM 23 izolatu maltoz ve trehalozu, RÇM9E izolatu glukoz ve maltozu, HTM1 izolatu melobiyoz ve rafinozu, RÇM55K izolatu ise trehaloz ve melobiyoz karbon kaynaklarını fermente edebilme özelliğinde olduğu belirlenmiştir. Fermentasyon testleri sonucunda 2 izolatın (RÇM4C, RÇM108C₁) sukroz ve trehalozu, HTM27 ve RÇM9B'nin sukroz ve glikozu, HTM5 ve RÇM86H'in sukroz ve melobiyozu, HTM26 ve RÇM11'in rafinozu, RÇM86H₁ ve RÇM119H'in trehalozu fermente edebildiklerini göstermiştir. Çalışmada, HTM10, RÇM21B ve RÇM53N izolatlarının maltozu, HTM13, RÇM24 ve RÇM38B izolatlarının glukozu, HTM4, HTM11, RÇM4A₁, RÇM4A₂, RÇM4A_x, RÇM4B, RÇM7B, RÇM18A₂, RÇM19B₁, RÇM56K ve RÇM104K izolatlarının ise sadece sukrozu fermente edebildiği belirlenmiştir.



Tablo 2. Maya izolatlarının morfolojik ve mikroskobik özellikleri
^a; askospor, ^{art}; artrospor, ^b; Ballitospor, MP; Monopolar, ML; Monolateral, BP; Bipolar veya bilateral, MTP ; Multipolar veya multilateral

Koloni Şekli	Koloni Rengi	Gerçek/Yalancı Hifa	Tomurcuklanma şekli	Spor Oluşturma	Maya İzolatları	
S-TİPİ	Krem	+	MP	-	HTM2, RÇM4B, RÇM34D, RÇM35D	
				+ ^b	HTM4, HTM5, RÇM53N	
			ML	-	HTM13	
				MTP	-	RÇM53K
		-	MP	-	HTM1, RÇM53L ₁ , RÇM133K	
				+ ^b	RÇM18A ₂	
			ML	-	HTM12, RÇM1H, RÇM23, RÇM37D	
				+ ^b	RÇM86H	
	MTP	-	HTM15, RÇM9E, RÇM14, RÇM21B			
		+ ^{b,a}	HTM16			
	Beyaz	+	MP	-	RÇM9D	
				MTP	-	RÇM7B, RÇM11, RÇM42H
				ML	-	RÇM9B, RÇM22
		-	MP	-	HTM3, HTM6, RÇM7C	
				+ ^b	RÇM36B, RÇM84B	
			MTP	-	HTM26, RÇM16, RÇM24, RÇM119H	
				+ ^b	HTM27, RÇM102J	
			ML	-	HTM29, RÇM25	
+ ^b	RÇM48E, RÇM86H ₁					
BP	-	RÇM55K				
Turuncu	-	MP	-	HTM28		
R-TİPİ	Krem	+	MP	-	HTM11, RÇM4A ₂ , RÇM19B ₂ , RÇM29C, RÇM104K	
				ML	-	RÇM19B ₁
			MTP	-	RÇM18B, RÇM40B, RÇM108C ₁	
		-	BP	-	RÇM4A ₁	
				+ ^b	RÇM4A _x	
			MP	-	RÇM17C	
	MTP	-	RÇM32B ₂			
	Beyaz	+	MP	-	HTM10	
+ ^b				RÇM38B		
M-TİPİ	Krem	+	ML	-	HTM17	
				+ ^{art}	HTM18	
				MTP	+ ^a	HTM19, HTM20
		-	MP	+ ^b	HTM21	
				-	HTM7	
				ML	-	RÇM4C
MTP	-	RÇM36C				



Tablo 3. Maya izolatlarının fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri*

*:İnd: İndol, MR: Metil Red, VP:Voges Prouskauer, Cit: Sitrat hidrolizi, Esc: Eskulin hidrolizi, Nit: Nitrat hidrolizi, Üre: Üre hidrolizi, NiP: Niasasta üretimi, SelP: Selüloz üretimi, +: pozitif, -: negatif, Z: zayıf pozitif.

Glukoz		Biyokimyasal Özellikler									Maya İzolatları
%50	%60	İnd	MR	VP	Cit	Esc	Nit	Üre	NiP	SelP	
+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	HTM1, HTM15
+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	HTM3, HTM6, HTM27, RÇM18A ₂ , RÇM42H, RÇM 53L ₁ , RÇM56K
+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	HTM4, HTM21, RÇM119H
+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	HTM5, HTM19, RÇM17C
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	HTM11, RÇM108C ₁
+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	RÇM37D, RÇM40B, RÇM55K
+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	RÇM48E, RÇM84B, RÇM53N
+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	HTM20, RÇM29C
+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	HTM29, RÇM24
+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	HTM17, HTM26
+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	HTM28, HTM2,
+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	RÇM 4A ₁
+	Z	-	-	-	-	-	+	+	+	+	HTM7, RÇM19B ₁ , RÇM21B
+	Z	-	-	-	-	-	+	-	-	+	HTM10, HTM16, RÇM9B, RÇM9E
+	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	+	HTM13, RÇM22
+	Z	-	-	-	+	-	+	+	-	+	HTM18, RÇM18B, RÇM23
+	Z	-	-	-	+	-	-	-	-	+	RÇM4A ₂ , RÇM4A _x , RÇM16, RÇM19B ₂ ,
+	Z	-	+	-	-	-	-	+	+	+	RÇM11, RÇM36C
+	Z	-	-	-	+	-	+	-	-	+	RÇM102J
Z	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	HTM12, RÇM34D
Z	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	RÇM 14
Z	Z	-	-	-	+	+	+	+	+	+	RÇM1H, RÇM35D
Z	Z	-	-	-	+	+	+	-	-	+	RÇM4B, RÇM4C, RÇM7B
Z	Z	-	-	-	-	-	+	-	-	+	RÇM9D, RÇM86H, RÇM86H ₁
Z	Z	-	+	-	-	-	-	-	-	+	RÇM25, RÇM133K
Z	Z	-	+	-	-	+	+	-	-	+	RÇM36B, RÇM 38B, RÇM104K
-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	RÇM 7C
-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	RÇM32B ₂



Çalışmada 69 maya izolatının %52.17'si (36 izolat) Vitek 2 YBC kart sistemi ve biyokimyasal test sonuçlarına göre %94-99 doğruluk oranı ile tanımlanmıştır. Biyokimyasal, morfolojik ve Vitek sonuçlarına göre 33 izolat ise tanımlanamamıştır. Çalışma sonucunda tanımlanan maya izolatları incelendiğinde 5 farklı cins ve 11 farklı türün varlığı belirlenmiştir (Tablo 4). Yapılan çalışmanın sonucuna göre çay örneklerinden izole edilen mayalar içinde en fazla belirlenen cins *Candida* olarak tespit edilmiştir. Çalışmada en fazla belirlenen türler ise sırasıyla *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij, in Kreger-van Rij 1984)(%13), *Cryptococcus laurentii* (*Cryptococcus laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner, *Am. Midl. Nat.* 43: 249, 1950) (%11.5) ve *Candida krusei* (*Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev, *Bot. Mater. Otd. Sporov. Rast. Bot. Inst. Komarova Akad. Nauk S.S.S.R.* 13: 143, 1960) (%7) olarak tespit edilmiştir. Bu türleri sırasıyla *Candida tropicalis* (*Candida tropicalis* (Castell.) Berkhout, *De Schimmelgesl. Monilia, Oidium, Oospora en Torula, Dissset. Utrecht:* 44, 1923), *Cryptococcus luteolus* (*Hannaella luteola* (Saito) F.Y. Bai & Q.M. Wang, in Wang & Bai, *FEMS Yeast Res.* 8(5): 805, 2008) (%4), *Candida parapsilosis* (*Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice, *Annlis Parasit. hum. comp.* 10: 1, 1932), *Candida lusitanae* (*Clavispora lusitanae* Rodr. Mir., *Antonie van Leeuwenhoek* 45(3): 480, 1979), *Saccharomyces cerevisia* (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, *Meddn Carlsberg Lab.* 2: 29, 1883) ve *Geotrichum capitatum* (*Saprochaete capitata* (Diddens & Lodder) de Hoog & M.T. Sm., *Stud. Mycol.* 50(2): 508, 2004) (% 3), *Candida albicans* (*Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout, *De Schimmelgesl. Monilia, Oidium, Oospora en Torula, Dissset. Utrecht:* 44, 1923) ve *Trichosporon pulluans* (*Trichosporon pullulans* (Lindner) Diddens & Lodder, *Die anaskosporogenen Hefen, II Hälfte:* 410, 1942) (% 1,5) izlemektedir.

Tartışma

Bu çalışmada, 2004-2005 yılları arasında Çay-Kur'a bağlı iki çay fabrikasında işleme aşamalarında alınan çay örneklerden izole edilen 47 adet (RÇM) ve Rize Ticaret Borsası, Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'na gelen kuru siyah çay numunelerinden izole edilen 22 adet (HTM) olmak üzere toplam 69 maya izolatı tanımlanmıştır. Bu çalışma ülkemiz için Rize çay bitkisinin işleme aşamalarından ve siyah çaydan maya izolasyonu ve tanımlanması açısından yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışma ile Rize bölgesinde üretilen çaya özgü maya mikrobiyotası hakkında bilgiler literatüre kazandırılmıştır.

Çay işleme aşamalarının her biri kalite için önemli olmakla birlikte mikrobiyolojik açıdan fermantasyon aşaması, kıvrımın başlamasından oksidasyonun tamamlanmasına kadar geçen zaman olup bu evrede mayaların varlığının ve kaliteye olan etkinliğinin önemli olduğu düşünülmektedir. Fermantasyon esnasında nispi rutubetin %90-95, sıcaklığın 24-26 °C olması ideal bir oksidasyon için gereklidir (Lee, 1983). Literatürdeki bilgiler ile benzer olarak çalışmamızda da, çayın işleme aşamalarında izole edilen mayaların yarısının fermentasyon ve fermentasyon çıkış aşamalarında elde edildiği görülmektedir.

Çalışmada tanımlanan maya izolatlarının tümünün 45°C'de üreyemedikleri, 24 izolatın 42°C'de üreyebildiği tespit edilmiştir. İzolatların tümünün 17°C, 25°C ve 37°C üreyebildiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda 37°C üreyebilme özelliği gösteren izolatların memeli vücut sıcaklığında rahatlıkla üreyebileceklerini göstermektedir.

Literatürde çay bitkisinin işleme aşamalarından ve siyah çaydan mayaların izolasyonu ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Kozaki ve ark., 1972; Herrera ve Calderon-Villagomez, 1989; Mayser ve ark., 1995; Liu ve ark., 1996; Markov ve ark., 2001; Ramadani ve Abulreesh, 2010). *Saccharomyces* cinsi özellikle *S. cerevisiae* ise bu çalışmalarda oldukça sık rastlanan bir türdür (Herrera ve Calderon-Villagomez, 1989; Liu ve ark., 1996; Markov ve ark., 2001).



Tablo 4. Çay örneklerinden elde edilen maya izolatlarının teşhis sonuçları

Bölüm	Sınıf	Taksonomik Özellikler			İzolat Numarası
		Familiya	Cins	Tür	
Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetaceae	<i>Candida</i>	<i>C. famata</i>	HTM 3-27-29 RÇM 7C-24-36B-48E-84B-102J
				<i>C. krusei</i>	HTM 10-12-21 RÇM22-34D
				<i>C. tropicalis</i>	RÇM 86H ₁ -108C ₄ -119H
				<i>C. parapsilosis</i>	RÇM 17C-53L ₁
				<i>C. lusitanae</i>	RÇM 14-23
				<i>C. albicans</i>	RÇM18B
				<i>S. cerevisiae</i>	HTM16 RÇM 25
				<i>Geotrichum</i>	RÇM 9B-32B ₂
				<i>Endomycetaceae</i>	
				Basidiomycota	Tremellomycetes
<i>C. luteolus</i>	RÇM 21B				
<i>Trichosporon</i>	HTM 28				
Tiplendirilemeyen	HTM 1-2-4-5-6-11-13-15-26 RÇM 4A ₁ -4A ₂ -4A ₃ -4B-4C-7B-9D-9E-11-16-18A ₂ -19B ₁ - 19B ₂ -29C-37D-38B-40B-42H-53N-55K-56K-86H-104K- 133K				
Toplam				69	



Çalışmamızda da hem çayın işlenme aşamasından (RÇM 25) hemde paket siyah çaydan (HTM 16) *S. cerevisiae* türü izole edilmiştir.

Candida'lar çayda büyük oranda bulunan diğer bir maya cinsidir. Birçok çalışmada *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. obutsa* ve *C. colliculosa* gibi türler izole edilmiştir (Kozaki ve ark., 1972; Herrera ve Calderon-Villagomez, 1989; Liu ve ark., 1996; Ramadani ve Abulreesh, 2010; Teoh ve ark., 2004). Çalışmamızda ise izolatların % 72 gibi büyük çoğunluğu *Candida* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda *C. albicans*, *C. lusitanae* ve *C. parapsilosis* çay bitkisinin işlenme aşamalarından izole edilmiştir. Fakat bu türler çayın işlenme aşamalarından sıklıkla izole edilen maya türleri değildir ve genellikle patojen olarak nitelendirilirler (Pichova ve ark., 1999; Kuhn ve ark., 2002). *Candida* infeksiyonlarının oluşmasında konakçı savunma sisteminin yanında *Candida*'ya ait virulans faktörlerinde önemi vardır. Özellikle konakçı epitel hücrelerine yapışma, jerm tüpü oluşturma ve proteinaz enzim oluşturma özellikleri önemli virulans faktörleri olarak bildirilmektedir (Pfaller ve ark., 1995). Çalışmamızda Jerm tüpü ve slime faktör pozitif birlikteliği olan hiçbir *Candida* izolatu belirlenmemiştir. Ancak izolatların yine de fırsatçı patojen olma riski her zaman göz önünde tutulmalı ve bu doğrultuda gerekli önlemler alınmalıdır.

Cryptococcus cinsi genellikle toprakta yaşayan telemorf, besiyeri ortamında maya formunda üreyen bir mantardır (Ross ve Taylor, 1981). Bugüne kadar yaklaşık olarak 37 türü tanımlanmıştır ve bunların çoğu toprakta yaşayıp insan için patojen değildirler. Fakat *Cryptococcus neoformans* iyi bilinen fırsatçı patojen olup insanlardan mukokutanöz, kutanöz, solunum yolu, sentral sistem, sistemik ve organ sistemleri enfeksiyonuna neden olmaktadır (Pfaller, 1995). Çalışmamızda *C. laurentii* ve *C. luteolus* olmak üzere *Cryptococcus* cinsine ait 2 tür izole edilmiştir. *Cryptococcus* cinsine ait olan 12 izolatin 8'i *C. laurentii* ve 1'i *C. luteolus* olarak teşhis edilmiştir.

Literatürde bu iki türün insanlarda patojen olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Neves ve ark. (2015) yılında yaptıkları bir çalışmada servikal kanser tedavisi gören bir kadında *Cryptococcus laurentii*'nin bir fungal sepsise neden olduğu gösterilmiştir. Hunter-Ellul ve ark. (2014) yılında yaptıkları bir çalışmada *C. luteolus*'un TiplI diyabetli bir hastada tenosinovite (tendon kılıfı enflamasyonu)'ye neden olduğu gösterilmiştir. Çoğunluğu patojen olmayan *Cryptococcus* cinsine ait hiçbir tür daha önce yapılan hiçbir çalışmada siyah çay ve işlenme aşamasındaki çaydan izole edilmemiştir. Çalışmamızda literatürde ilk olarak, hem paket siyah çaydan hem de işlenme aşamasındaki çay örneklerinde *C. laurentii* ve *C. luteolus* Vitek 2 YBC kat sistemine göre %99 doğruluk oranı ile tanımlanmıştır. Bu türlerin gıdalarda bulunması özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde ciddi sağlık sorunlarına neden olabileceği için arzu edilmez (Pitt ve Hocking, 2009). Bu nedenle çay örneklerinde bu maya türlerinin varlığı ve sayısının bilinmesi gıda kodeksi çalışmalarına katkı sağliyağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada *Geotrichum* cinsine ait 2 adet *G. capitatum* (RÇM 9B ve 32B₂) izole edilmiştir. *Geotrichum* cinsi dünya çapında hububat ve süt ürünlerinin yanında toprak, su, hava, kanalizasyon gibi ortamlarda yaygın bulunan bir maya cinsi olmasına rağmen, *Geotrichum capitatum* ise çoğunlukla enfeksiyon etkeni olarak bilinmektedir (Carmichael, 1957; Girmenia ve ark., 2005; Garcia-Ruiz ve ark., 2013). Çalışmamızda *G. capitatum* izolatlarının slime oluşturma özelliklerinin olmaması yanında yinede fırsatçı patojen olma riskleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Trichosporon cinsi fermentatif olmayan veya zayıf fermentatif fungusları içerir. Bu funguslar maya formunda olup eşeyli üreme fazları yoktur. Artrospor ve blastosporlar ile çoğalırlar. Maya benzeri kolonilere sahiptirler. Üreaz enzimi üretimi bu cinsin önemli bir özelliğidir (Sutton ve ark., 1998).



Trichosporon spp. anamorfik Basidiomycetes mayalarından olup, doğada yaygın olarak toprakta, sedimentlerde, atık sularda, çamurda, odunda, kağıt hamurunda ve klinik örneklerde bulunmaktadır. Çoğunluğu saprofitik türlerden oluşan bu cinsin insanlarda hastalığa sebep olan türleride (*T. cutaneum* syn. *T. beigeli*, *T. asteroides*, *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asahii* ve *T. mucoides*) literatürde bulunmaktadır ve son raporlar *Trichosporon* cinsinin sahip olduğu virulans faktörlerinin hematolojik kanserli hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olan ikinci veya üçüncü en yaygın tür olduğunu göstermiştir (Gueho ve ark., 1992-1993; Colombo ve ark., 2011). Çalışmamızda *Trichosporon* cinsine ait 2 adet suş izole edilmiş ve biri *T. pulluans* (HTM 28) olarak tanımlanırken diğer izolat (HTM 2) tanımlanamamıştır. Her iki izolatta ürün olan siyah çaydan izole edilmiştir. *Trichosporon* cinsinin patojen olabilme riskinin önemli olması durumu göz önüne alındığında ciddi bir durum olarak düşünülmektedir.

Çalışmada izole edilen maya türlerinin çay işleme aşamalarından ya da poşet siyah çaydan

izole edilmeleri çayın içecek olarak tüketilmesinde bir sıkıntı oluşturmamaktadır. Çünkü çay demlendiği için demleme sıcaklığında bu mikroorganizmaların hiç biri canlı kalmamaktadır. Ancak poşet çaylarda uzun süre yüksek sıcaklığa maruz bırakılmadığından dolayı bu etkenler elimine olamayacağı ve tüketici için risk oluşturacağı unutulmamalıdır. Bu nedenden dolayı imalatı esnasında sterilizasyon işleminde daha dikkatli olunması gerektiği aşıkardır. Çalışmanın sonucunda elde edilen ve tanımlanan mayaların, test sonuçlarıyla birlikte hem laboratuvarımız hem de ülkemiz suş koleksiyonuna bir kaynak teşkil edecektir. Bu çalışma ülkemiz için Rize çay bitkisinin işleme aşamalarından ve siyah çaydan maya izolasyonu ve tanımlanması açısından yapılan ilk çalışmadır.

Teşekkür

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: RTEÜ-2010.102.03.1).

Kaynaklar

- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., *Yeast: Characteristics and identification*, Cambridge University Press, p. 13-27, New York (1983).
- Bilgehan H., *Klinik Mikrobiyoloji*, Fakülteler Kitapevi, Barış yayınları, 4. Baskı, s. 650-731, İzmir (2004).
- Carmichael J.W., *Geotrichum candidum*, *Mycologia*, 49, 13-19 (1957).
- Colombo A.L., Padovan A.C.B., Chaves G.M., *Current Knowledge Of Trichosporon spp. And Trichosporonosis*, *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 682-700 (2011).
- Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T., *New method for detecting slime producing by coagulase negative staphylococci*, *Journal of Clinical Pathology*, 42, 872-874 (1989).
- Garcia-Ruiz J.C., Lopez-Soria L., Olazabal I., *Invasive infections caused by Saprochaete capitata in patients with haematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy*, *Rev. Iberoam. Micol.*, 30, 248-255 (2013).
- Girmentria C., Pagano L., Martino B., *Invasive infections caused by Trichosporon species and Geotrichum capitatum in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature*, *J. Clin. Microbiol.*, 43, 1818-1828 (2005).
- Gueho E., Improvisi L., de Hoog G.S., *Trichosporon on humans: A practical account*, *Mycoses*, 37, 3-13 (1993).
- Gueho E., Smith M.T., de Hoog G.S., Billon-Grand G., Christen R., Batenburg-van der Vegte W.H., *Contributions to a revision of the genus Trichosporon*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 61, 289-316 (1992).
- Guo Y., Ma Y., Zhan Z., Li B., Dingkuhn M., Luquet D., De Reffye P., *Parameter optimization and field validation of the functional-structural model GREENLAB for maize*, *Annals of Botany*, 97, 217-230 (2006).



- Herrera T., Calderon-Villagomez A., *Species of yeasts isolated in Mexico from the tea fungus*, Rev. Mex. Micol., 5, 205–210 (1989).
- Hols P., Rerain T., Garmyn D., Bernard N., Delcour J., *Use of homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering of Lactobacillus plantarum for α -amylase and levanase expression*, Applied and Environmental Microbiology, 60, 1401-1413 (1994).
- Hunter-Ellul L., Schepp E.D., Ilea A., Wilkerson M.G., *A rare case of Cryptococcus luteolus- related tenosynovitis*. Infection, 42, 771-774 (2014)
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C., *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology*, Lippincott, pp.1296-1395, New York (1997).
- Kozaki M., Koizumi A., Kitahara K., *Microrganisms of zoogloeal mats formed in tea decoction*, Journal of Food and Hygienic Society of Japan, 13, 89-96 (1972).
- Kreger-Van-Rij N.J.W., *The Yeasts: A Taxonomic Study*, (3rd ed), Elsevier, 1082 pp, Amsterdam (1984).
- Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A., *Comparison of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces*, Infect. Immun., 70, 878-888 (2002).
- Kurtzman C.P., Fell J.W., *The Yeasts, A taxonomic study*, (4th ed), Elsevier Press, pp.1055, Amsterdam (1998).
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., *The yeast a Taxonomic Study Vol 1*, Fifth ed. Elsevier B.V., pp. 9-65, Oxford (2011).
- Lee F.A., *Tea. Basic Food Chemistry*, Sekond edition. The Avi Publishing Company Inc., pp. 419-439, Westport, Connecticut (1983).
- Liu C.H., Hsu W.H., Lee F.L., Liao C.C., *The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation*, Food Microbiol., 13, 407–415 (1996).
- Markov S.L., Malba'sa R.V., Hauk M.J., Cvetkovic D.D., *Investigation of tea fungus microbe associations. The yeasts*, Acta Period. Technol., 32, 133–138 (2001).
- Mayser P., Fromme S., Leitzmann C., Grunder K., *The yeast spectrum from tea fungus Kombucha*, Mycoses, 38, 289-295 (1995).
- Middelhoven W.J., *Trichosporon wieringae sp. nov., ananamorphic basidiomycetous yeast from soil, and assimilation of some phenolic compounds, polysaccharides and other non-conventional carbon sources by saprophytic Trichosporon species*, Antonievan Leeuwenhoek, 86, 329-337 (2004).
- Neves,- R.P., Gonc R., de Lima Neto A., *Cryptococcus laurentii fungaemia in a cervical cancer patient*, The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 19, 660-663 (2015).
- Pfaller M.A., Messer S.A., Hollis R.J., *Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility and slime production among clinical isolates of Candida parapsilosis*, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 21, 9-14 (1995).
- Pichova I., Pavlíkova L., Dostál J., Dolejší E., Hruková-Heidingsfeldová O., Weber J., Ruml T., Souek M., *Secreted aspartic proteases of Candida albicans, Candida tropicalis, Candida parapsilosis and Candida lusitania*, Eur. J. Biochem., 268, 2669-2672 (1999).
- Pitt J.I., Hocking A.D., *Fungi and food spoilage*, 3 th. edition. Springer, New York, USA (2009).
- Ramadani A.S., Abulreesh H.H., *Isolation and identification of yeast flora in local kombucha sample: AL NABTAH*, Umm. Al Qura. Univ. J. App. Sci., 2, 42–51 (2010).
- Ross A., Taylor I.E., *Extracellular glycoprotein from virulent and avirulent Cryptococcus species*, Infection and Immunity, 31, 911–918 (1981).
- Spencer D.L., Kurth K.T., Menon S.A., VanDyk T., Minion F.C., *Non-conventional yeasts*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 147-56 (2002).



- Sutton D.A., Fothergill A.W., Rinaldi M.G., *Guide to Clinically Significant Fungi*, 1st ed., Williams & Wilkins, Baltimore (1998).
- Teoh A.L., Heard G., Cox J., *Yeast ecology of kombucha fermentation*, Int. J. Food Microbiol., 95, 119–126 (2004).
- Wickerham L.J., *Taxonomy of Yeast*, United States Department of Agriculture, Technical bulletin no: 1029 (1951).
- Wolfe A.P., Pruss D., *Transcription regulators that acetylate histones*, Cell, 84, 817-819 (1996).
- Xu A., Wang Y., Wen J., Liu P., Liu Z., Li Z., *Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea*, International Journal of Food Microbiology, 146, 14-22 (2011).
- Yarrow D., *The yeast, A Taxonomic Study*, Fourth edition, Elsevier science B.V., pp.77-100, New York (1999).