

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

GELENEKSEL KÜFLÜ PEYNİRLERE HAS KÜFLERİN
GENETİK ÖZELLİKLERİNİN VE *PENICILLIUM*
ROQUEFORTI ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE
ELDE EDİLEN İZOLATLARIN PEYNİR ÜRETİMİNDE
KULLANIMI

DOKTORA TEZİ

Hatice Ebrar KIRTIL

İstanbul
Ocak-2025

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

GELENEKSEL KÜFLÜ PEYNİRLERE HAS KÜFLERİN
GENETİK ÖZELLİKLERİNİN VE *PENICILLIUM ROQUEFORTI*
ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE ELDE EDİLEN
İZOLATLARIN PEYNİR ÜRETİMİNDE KULLANIMI

DOKTORA TEZİ

Hatice Ebrar KIRTIL

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Banu METİN

Eş Danışman

Prof. Dr. Muhammet ARICI

İstanbul

Ocak-2025

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Banu METİN

Üye Prof. Dr. Hasan YETİM

Üye Doç. Dr. Mustafa YAMAN

Üye Doç. Dr. Ertan ERMİŞ

Üye Prof. Dr. Enes DERTLİ

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Erhan İÇENER
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Doktora tezi olarak hazırladığım “**Geleneksel Küflü Peynirlerden İzole Edilen Küflerin Genetik Özelliklerinin ve *Penicillium roqueforti* Çeşitliliğinin Belirlenmesi ve Elde Edilen İzolatların Peynir Üretiminde Kullanımı**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Hatice Ebrar KIRTIL

ÖN SÖZ

Türkiye küflü peynirlerine has küflerin çeşitliliğinin belirlendiği ve peynir üretiminde kullanım potansiyellerinin değerlendirildiği bu çalışma, sırasıyla, 119O314 ve 124O163 proje numaralarıyla TÜBİTAK TOVAG tarafından iki proje ile desteklenmiştir. Tez kapsamındaki analizlerin yapılmasını mümkün kıldığı için Kurum yetkililerine şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim süresince, desteğini, ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, bilgisiyle ve anlayışıyla bana her daim destek olan, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Banu METİN'e, yüksek lisans eğitimimde akademik yolculuğumu şekillendirerek, beni peynir küflerine yönlendiren, bu yolda tüm zorlukların üstesinden gelebileceğime inanan ve desteğini esirgemeyen kıymetli eş danışman hocam Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya, tez izleme toplantılarında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Hasan YETİM ve Prof. Dr. Zeynep Dilek HEPERKAN'a, kromatografi analizlerinde bilgilerini, desteklerini esirgemeyen ve zamanlarını ayıran değerli hocalarım Doç. Dr. Mustafa YAMAN ve laboratuvarlar koordinatör yardımcımız Yük. Kim. Bilal ÇAKIR'a, tez çalışmam boyunca, maddi-manevi destek aldığım değerli arkadaşlarım; mikrobiyolojinin keyfini, heyecanını ve çilesini paylaştığım Arş. Gör. Yasemin Şefika KÜÇÜKATA'ya ve desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Biset TOPRAK'a, 2011'den itibaren öğrencisi olduğum ve 2017'den itibaren kadrosunda bulunduğum İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümündeki tüm hocalarıma, her konuda, her daim yanımda olan annem Halime KIRTIL ve babam Enver KIRTIL başta olmak üzere, sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Hatice Ebrar KIRTIL
İstanbul-2025

ÖZET

GELENEKSEL KÜFLÜ PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN KÜFLERİN GENETİK ÖZELLİKLERİNİN VE *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE ELDE EDİLEN İZOLATLARIN PEYNİR ÜRETİMİNDE KULLANIMI

Hatice Ebrar KIRTIL

Doktora, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu METİN

Eş Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Ocak, 2025 - 189 + xviii Sayfa

Bu çalışmada, Türkiye küflü peynirlerine has farklı küflerin izole edilmesi ve tanımlanması, elde edilen *P. roqueforti* izolatlarının genetik, teknolojik ve metabolik özellikleri ile popülasyon yapısının tespit edilmesi ve seçilen izolatlar ile peynir üretimi amaçlanmıştır. Çeşitli yörelerden temin edilen 30 küflü peynirden 86 izolat, moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Bu izolatların çoğunluğunu *Penicillium* türlerinin, özellikle *P. roqueforti*'nin (n = 66/86) oluşturduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda tanımlanmış 54 *P. roqueforti* izolatı ile birlikte tüm *P. roqueforti* izolatlarında (n = 120), peynir küflerinde görülebilen *Wallaby* ve *CheesyTer* yatay gen transfer bölgeleri tespit edilmiştir. *P. roqueforti* izolatlarının eşey genotipi dağılımı, %95 oranında *MAT1-2* lehine belirlenmiştir. Morfolojik incelemede, patates dekstroz agar besiyerinde 7 morfotip tespit edilmiştir. *P. roqueforti* izolatlarının popülasyon yapısı, üç mikrosatelit bölgesi kullanılarak değerlendirilmiş ve 36 haplotip tespit edilmiştir. Farklı haplotipler arasından seçilen 20 izolatın 5 polimorfik lokus (*cmd*, *benA*, *proq235*, *proq631* ve *proq845*) dizilimleri kullanılarak filogenetik analizler yapılmış ve Türkiye izolatlarının küresel izolatlardan farklılıkları tespit edilmiştir. İzolatların bazı teknolojik özellikleri (misel gelişimi, tuza dayanıklılık, proteolitik ve lipolitik aktivite), besiyerinde (malt ekstraktı agar, mikolojik agar (%10 yağsız süt içeren) ve Tween 80 agar) incelenmiş ve temel bileşen analiziyle, dört grupta toplandıkları saptanmıştır. İzolatların uçucu bileşen profilinde

ve mikotoksin (mikofenolik asit ve rokfortin C) üretimlerinde suş bazlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu analizler sonucu seçilen izolatlar ile model peynir üretimi yapılmış ve 10 °C'de 6 hafta olgunlaştırılan peynirlerin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri ile uçucu bileşen ve mikotoksin üretimleri belirlenmiştir. KP44 ve 26KK5A izolatları, peynirlerde iyi gelişerek damarlı görünümü oluştururken, 4K2'nin gelişimi zayıf kalmıştır. Ayrıca, mikofenolik asit ve rokfortin C miktarları, peynirlerde oldukça düşük seviyelerde (sırasıyla, $<29,5 \mu\text{g/kg}$ ve $<0,8 \mu\text{g/kg}$) bulunmuştur. KP44 izolatının, peynir üretiminde potansiyel sekonder starter kültür olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Küflü peynir, *Penicillium roqueforti*, popülasyon genetiği, teknolojik özellikler, uçucu bileşen.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF GENETIC CHARACTERISTICS OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM TRADITIONAL MOLD-RIPENED CHEESES AND DETERMINATION OF *PENICILLIUM ROQUEFORTI* DIVERSITY AND UTILIZATION OF THE OBTAINED ISOLATES IN CHEESE PRODUCTION

Hatice Ebrar KIRTIL

Ph. D. Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Banu METİN

Co-supervisor: Prof. Muhammet ARICI

January, 2025 - 189 + xviii Pages

This study aimed to isolate and identify different molds specific to Turkish mold-ripened cheeses, characterize the genetic, technological, and metabolic properties of the *Penicillium roqueforti* isolates obtained, determine their population structure, and produce cheese using selected isolates. Eighty-six isolates from 30 mold-ripened cheeses collected from various regions were identified using molecular methods. The majority of these isolates were *Penicillium* species, particularly *P. roqueforti* (n = 66/86). Along with 54 previously identified *P. roqueforti* isolates, the horizontal gene transfer regions (*Wallaby* and *CheesyTer*) known to occur in cheese molds, was detected in all *P. roqueforti* isolates (n = 120). The distribution of mating genotypes among *P. roqueforti* isolates were predominantly in favor of *MAT1-2* (95%). Morphological analysis revealed seven morphotypes on potato dextrose agar. The population structure of *P. roqueforti* isolates was assessed using three microsatellite regions, identifying 36 haplotypes. Phylogenetic analyses were performed on 20 isolates selected from different haplotypes using sequences of five polymorphic loci (*cmd*, *benA*, *proq235*, *proq631*, and *proq845*), and differences between Turkish and global isolates were identified. Some technological properties of the isolates (mycelial growth, salt tolerance, proteolytic, and lipolytic activities) were examined on culture media (malt extract agar, mycological agar (including 10% skimmed milk and Tween

80 agar), and principal component analysis revealed that they clustered into four groups. Strain-specific differences were detected in the volatile compound profiles and mycotoxin (mycophenolic acid and roquefortine C) production of the isolates ($p < 0.05$). Based on these analyses, selected isolates were used to produce model cheeses, which were ripened at 10 °C for six weeks. Some physicochemical and microbiological characteristics of the cheeses, along with volatile compound profiles and mycotoxin production, were analyzed. The KP44 and 26KK5A isolates grew well in the cheeses, forming a characteristic blue-veined appearance, while 4K2 showed weak growth. Furthermore, the levels of mycophenolic acid and roquefortine C in the cheeses were quite low ($< 29.5 \mu\text{g/kg}$ and $< 0.8 \mu\text{g/kg}$, respectively). The KP44 isolate is recommended for evaluation as potential secondary starter culture in cheese production.

Keywords: Mold-ripened cheese, *Penicillium roqueforti*, population structure, technological properties, volatile compounds.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....	ii
ÖN SÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
KISALTMALAR	xvii

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ	1
1.1. Amaç	2
1.2. Yöntem.....	2
1.3. Kapsam.....	3

İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Küf ile Olgunlaştırılan Peynirler	4
2.1.1. Küflü Peynir Üretimi	4
2.1.2. Küflü Peynirlerin Mikrobiyotası ve Ticari Starter Kültür Kullanımı	5
2.1.3. Avrupa Tipi Küflü Peynirler	7
2.1.3.1. Mavi Peynirler	7
2.1.3.2. Camembert Tipi Peynirler	9
2.1.3.3. Diğer Küflü Peynirler	10
2.1.4. Türkiye Küflü Peynirleri.....	11

2.1.4.1. Erzurum Küflü Cıvıl Peyniri	12
2.1.4.2. Konya Küflü Tulum Peyniri	14
2.1.4.3. Divle Obruk Peyniri	14
2.1.4.4. Diğer Yöresel Küflü Peynirler.....	15
2.1.5. Küflü Peynirlerde Aroma Profili ve Uçucu Bileşenler	16
2.2. Funguslarda Adaptasyon ve Yatay Gen Transferi	18
2.3. Funguslarda Genetik Çeşitlilik.....	20
2.4. Funguslarda İkincil Metabolizma ve Mikotoksinler	21
2.5. <i>Penicillium roqueforti</i>	23
2.5.1. <i>P. roqueforti</i> 'nin Morfolojik Özellikleri.....	23
2.5.2. <i>P. roqueforti</i> 'nin Taksonomik Özellikleri	24
2.5.3. <i>P. roqueforti</i> 'nin Genomu ve Genetik Özellikleri	25
2.5.4. <i>P. roqueforti</i> 'nin Üreme Özellikleri	26
2.5.5. <i>P. roqueforti</i> 'nin Popülasyon Yapısı	27
2.5.6. <i>P. roqueforti</i> 'nin Fizyolojisi ve Metabolik Özellikleri	28
2.5.7. <i>P. roqueforti</i> 'nin İkincil Metabolitleri	29

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT	36
3.1. Materyal	36
3.1.1. Peynir Örnekleri.....	36
3.1.2. Besiyerleri, Kimyasallar ve Diğer Sarf Malzemeler.....	37
3.1.3. Peynir Üretiminde Kullanılan Malzemeler	37
3.2. Metot	38
3.2.1. Peynirlerden Küf İzolasyonu ve Stok Kültür Hazırlama	38
3.2.2. Küflerden DNA İzolasyonu	38
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	39
3.2.3.1. Tekrarlayan Element Dizilimi Temelli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rep-PCR) ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) ile Parmak İzi Analizleri	39
3.2.3.2. Internal Transcribed Spacer (ITS) Bölgesi ve β -tubulin (<i>benA</i>) Geninin Amplifikasyonu.....	41
3.2.3.3. <i>Penicillium roqueforti</i> İzolatlarının Genetik Özelliklerinin Belirlenmesi: Yatay Gen Transfer Bölgelerinin (<i>Wallaby</i> ve <i>CheesyTer</i>) PCR ile Taranması.....	42

3.2.3.4. <i>Penicillium roqueforti</i> İzolatlarının Eşey Genotipinin PCR ile Belirlenmesi	43
3.2.3.5. <i>Penicillium roqueforti</i> İzolatlarının Tür İçi Çeşitliliğinin Belirlenmesi Amacıyla Mikrosatelit Bölgelerinin ve Polimorfik Lokusların PCR ile Amplifikasyonu.....	44
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	45
3.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması, Dizilimlerin Belirlenmesi ve Elde Edilen Dizilimlerin Analizi	45
3.2.6. Popülasyon Yapısı Analizleri	46
3.2.7. Filogenetik Analizler.....	46
3.2.8. İzolatların Dizilerinin NCBI GenBank'a veri girişlerinin yapılması.....	47
3.2.9. Morfolojik Analizler	47
3.2.10. Seçilen <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının Teknolojik ve Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi	48
3.2.10.1. Misel Gelişimi (12°C ve 25°C'de)	48
3.2.10.2. Tuza Dayanıklılık.....	48
3.2.10.3. Proteolitik Aktivite.....	49
3.2.10.4. Lipolitik Aktivite	49
3.2.10.5. Uçucu Bileşen Analizi	49
3.2.10.6. Mikotoksin (Rokfortin C ve Mikofenolik Asit) Analizi	50
3.2.11. Peynir Üretiminde Kullanılan Çiğ Sütün Bazı Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	52
3.2.12. Seçilen İzolatlarla Model Peynir Üretimi	52
3.2.13. Peynirlerin Mikrobiyolojik ve Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	54
3.2.13.1. Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB) Sayımı.....	54
3.2.13.2. Toplam Maya-Küf (TMK) Sayımı.....	54
3.2.13.3. Toplam <i>Lactobacillus</i> (TLB) sayımı	55
3.2.13.4. Toplam <i>Lactococcus</i> (TLC) sayımı	55
3.2.13.5. pH Değerinin Belirlenmesi	55
3.2.13.6. Titre Edilebilir Asitliğin Belirlenmesi	55
3.2.13.7. Kuru Madde Tayini.....	55
3.2.13.8. Protein Tayini.....	56
3.2.13.9. Yağ Tayini	57
3.2.13.10. Kül Tayini	57
3.2.13.11. Mohr Yöntemi ile Tuz Tayini	57

3.2.14. Peynirlerde Uçucu Bileşen Analizi	58
3.2.15. Peynirlerde Rokfortin C (ROKC) ve Mikofenolik Asit (MPA) Analizi....	58
3.2.16. İstatistiksel Analizler	59

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA	60
4.1. Küf İzolatlarının Tanımlanması	60
4.1.1. İzolatların rep-PCR ile Analizi	60
4.1.2. ITS ve <i>benA</i> PCR ile Dizi Analizi Sonuçları	61
4.2. İzole Edilen Peynir Küflerinin Genetik Özellikleri	69
4.3. <i>P. roqueforti</i> Peynir İzolatlarının Morfolojik ve Genetik Çeşitliliği	71
4.3.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri.....	71
4.3.2. İzolatların Eşey Tipleri.....	74
4.3.3. İzolatların Yatay Gen Transfer Bölgeleri (<i>Wallaby</i> ve <i>CheesyTer</i>).....	78
4.3.4. İzolatların <i>mpaC</i> Gen Bölgesi.....	78
4.3.5. İzolatların RAPD-PCR ile Parmak İzi Analizi	78
4.3.6. İzolatların Mikrosatelit Analizleri ile Gruplandırılması	79
4.3.7. Filogenetik Analizler.....	86
4.4. Seçilen <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının Teknolojik ve Metabolik Özellikleri	91
4.4.1. İzolatların Misel Gelişimi	91
4.4.2. İzolatların Tuza Dayanıklılığı	92
4.4.3. İzolatların Proteolitik ve Lipolitik Özellikleri	94
4.4.4. <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının Teknolojik Özelliklerine Göre Gruplandırılması	98
4.4.5. İzolatların Uçucu Bileşen Profili	100
4.4.6. İzolatların Rokfortin C (ROKC) ve Mikofenolik Asit (MPA) Üretimi.....	105
4.5. Peynirlerin Özellikleri.....	111
4.5.1. Çiğ Sütün ve Peynirlerin Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri....	111
4.5.2. Peynirlerin Uçucu Bileşen Profili	116
4.5.3. Peynirlerde Rokfortin C (ROKC) ve Mikofenolik Asit (MPA) Varlığı.....	121

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER..... 126

KAYNAKÇA 133

EKLER..... 158

ÖZGEÇMİŞ..... 185



TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Mavi Peynirlere Ait Nem, Yağ, Protein ve Tuz Oranları	8
Tablo 2.2: İzolasyon Kaynaklarına Göre <i>P. roqueforti</i> Popülasyonlarının Özellikleri	28
Tablo 3.1: Peynir Üretiminde Kullanılan Çiğ Süte Ait Enerji ve Besin Öğeleri	37
Tablo 3.2: PCR Amplifikasyonları İçin Kullanılan Primerler	40
Tablo 3.3: Rep-PCR ve RAPD-PCR'da Kullanılan Bileşenler ve Oranları	41
Tablo 3.4: Rep-PCR ve RAPD-PCR'da Kullanılan Döngü Şartları	41
Tablo 3.5: ITS ve <i>benA</i> PCR'ında Kullanılan Bileşenler ve Oranları	42
Tablo 3.6: ITS ve <i>benA</i> PCR'ında Kullanılan Döngü Şartları	42
Tablo 3.7: <i>Wallaby</i> ve <i>CheesyTer</i> Bölgeleri İçin Yapılan PCR'da Kullanılan Döngü Şartları	43
Tablo 3.8: Mikrosatelitler ve Polimorfik Lokuslar İçin PCR'da Kullanılan Bileşenler ve Oranları	44
Tablo 3.9: Polimorfik Lokuslar ve Mikrosatelitlerin PCR Döngü Şartları	45
Tablo 3.10: Peynir Örnekleri ve Peynirlerin Üretiminde Kullanılan <i>P. roqueforti</i> İzolatları	54
Tablo 4.1: Peynir İzolatları (n = 86) ve Tanımlama Yöntemi	63
Tablo 4.2: Küf İzolatlarının (n = 82) Peynirlere Göre Dağılımı	68
Tablo 4.3: <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının PDA Besiyerinde Gruplandırılması	72
Tablo 4.4: Çalışmada Kullanılan <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının Genetik Özellikleri	75
Tablo 4.5: <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının Mikrosatelit Dizilimine Göre Alel Grupları	80
Tablo 4.6: İzolatların 12 °C ve 25 °C'de MEA'da Koloni Çapları	91
Tablo 4.7: İzolatların %0, %1, %3 ve %6 NaCl İçeren MEA'da Gelişimi	93
Tablo 4.8: Seçilen İzolatların Proteolitik ve Lipolitik Aktiviteleri Sonucu Oluşturduğu Zonlar	97
Tablo 4.9: Peynir Agarda (CA) Negatif Kontrol ve <i>P. roqueforti</i> İzolatları Ekstraktlarında Tespit Edilen Uçucu Bileşikler	101
Tablo 4.10: MPA ve ROKC İçin Lineerite Verileri, LOD ve LOQ Değerleri	105
Tablo 4.11: <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının YES Agarda Mikofenolik Asit ve Rokfortin C Üretimi	107

Tablo 4.12: Peynir Üretiminde Kullanılan Çiğ Sütün Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	111
Tablo 4.13: Peynir Örneklerinin Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	112
Tablo 4.14: Peynir Örneklerine Göre Tespit Edilen Uçucu Bileşikler	117
Tablo 4.15: Peynir Örneklerinde Mikofenolik Asit ve Rokfortin C Miktarı	122



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Küflü Peynir Üretim Aşamaları.....	5
Şekil 2.2: Avrupa Komisyonu Tarafından Verilen Coğrafi İşaretler.....	7
Şekil 2.3: Başlıca Mavi Peynirler: (A) Rokfor, (B) Danablu, (D) Stilton, (D) Peynirlerin Olgunlaştırıldığı Özel Oda ve Mağara	9
Şekil 2.4: Başlıca Beyaz Küflü Peynirler: (A) Camembert, (B) Brie	10
Şekil 2.5: Diğer küflü peynirler: (A) Cambozola, (B) Tomme de Savoie, (C) Gamalost ve (D) Peynirlerin olgunlaştırılması.....	11
Şekil 2.6: Türk Patent ve Marka Kurumu Tarafından Verilen Coğrafi İşaretler	12
Şekil 2.7: (A) Erzurum Küflü Civil Peyniri, (B) Konya Küflü Peyniri, (C-D) Divle Obruk Peynirleri, (E) Divle Obruk Mağarası.....	13
Şekil 2.8: Asetil-CoA ve Malonil-CoA Birimlerinin Kimyasal Yapısı	22
Şekil 2.9: İzopren ve İkidin Fazla İzopren Biriminden Oluşan Poliizopren (Terpen) Birimlerinin Kimyasal Yapısı	22
Şekil 2.10: Bir <i>P. roqueforti</i> İzolatının (A) PDA Besiyerinde Ön-Arka, (B) MEA Besiyerinde Ön-Arka, (C) YES Agar Besiyerinde Ön-Arka Koloni Morfolojileri ve Misel Yapısı.....	24
Şekil 2.11: <i>Roquefortorum</i> Serisinin Filogenetik İlişkisi.....	25
Şekil 2.12: <i>Penicillium roqueforti</i> (FM164) ve <i>P. chrysogenum</i> (Wisconsin 54-1255) Türlerinde (A) Rokfortin C Biyosentezi ve (B) İlgili Gen Kümeleri	32
Şekil 2.13: <i>Penicillium roqueforti</i> (FM164 ve CECT 2905)'nin (A) Mikofenolik Asit Biyosentezi ve (B) İlgili Gen Kümesi	35
Şekil 3.1: Küflü Peynir Örnekleri. (A) Erzurum Küflü Civil Peyniri, (B) Kars Küflü Çeçil Peyniri, (C) Divle Obruk Peyniri, (D) Sivas-Zara Küflü Peyniri, (E) Karaman Küflü Peyniri, (F) Konya Küflü Peyniri.....	36
Şekil 3.2: NCBI Genbank Veritabanına Girişi ve BankIt Yükleme Aracının Arayüzü	47
Şekil 3.3: Peynir Agarda Gelişen Küflerin Uçucu Bileşen Analizi İçin Hazırlanan Headspace Vialleri ve GC-MS Sistemi.....	50
Şekil 3.4: YES Agarda Gelişen Küflerin Metabolit Ekstraksiyonunda Faz Ayrımı ve HPLC Sistemi.....	51
Şekil 3.5: Tulum Peynirinin Üretimi.....	52

Şekil 3.6: Tulum Peyniri Üretim Aşamaları	53
Şekil 3.7: Peynir Ekstraktlarında Santrifüj Sonrası Faz Ayrımı	58
Şekil 4.1: Bazı Küflü Peynir İzolatlarının (GTG)5 rep-PCR Jel Görüntüsü.....	61
Şekil 4.2: Bazı İzolatların ITS ve <i>benA</i> Amplikonlarının Agaroz Jel Görüntüsü.....	62
Şekil 4.3: <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının (n=120) Türkiye Haritasında Dağılımı	68
Şekil 4.4: Küf İzolatlarının <i>Wallaby</i> PCR Amplikonlarının Jel Görüntüsü.....	69
Şekil 4.5: Küf İzolatlarının <i>Cheesyter</i> PCR Amplikonlarının Jel Görüntüsü	70
Şekil 4.6: Bazı İzolatların RAPD-PCR Amplikonlarının Agaroz Jelde Görüntüsü ..	79
Şekil 4.7: Bazı <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının Proq02_2 Bölgesine Ait PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntüsü	80
Şekil 4.8: <i>P. roqueforti</i> izolatlarının Proq01_3 lokusundaki alellerinin gösterimi	81
Şekil 4.9: <i>P. roqueforti</i> izolatlarının Proq16 lokusundaki alellerinin gösterimi	82
Şekil 4.10: <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının (n =120) Popülasyon Yapısı	84
Şekil 4.11: <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının (n = 120) Splitstree Diyagramı	85
Şekil 4.12: <i>Penicillium roqueforti</i> İzolatlarının <i>BenA</i> (A) ve <i>Cmd</i> (B) Dizilerini Kullanarak Maksimum Likelihood Metoduna Göre Filogenetik Analizi	87
Şekil 4.13: <i>Proq235</i> , <i>Proq631</i> ve <i>Proq845</i> Lokuslarının Birleştirilmiş Veri Setini Kullanarak <i>Penicillium roqueforti</i> izolatlarının Maksimum Likelihood Metoduna Göre Filogenetik Analizi.....	90
Şekil 4.14: Teknolojik Özelliklerine Göre Peynir İzolatlarının (n=20) ve CECT 2905 Neotip Suşunun Temel Bileşen Analizinin (PCA) Bir Çıktısı Olan Skor Grafiğinde Gruplandırılması	99
Şekil 4.15: Peynir Agarda Gelişen <i>P. roqueforti</i> CECT 2905, 4K2, KP44 ve 26KK5A İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin Toplam İyon Kromatogramı (TIC)...	104
Şekil 4.16: MPA (4 µg/mL) ve ROKC (2 µg/mL) Standart Mikslerine Ait HPLC-PDA Kromatogramları	106
Şekil 4.17: <i>P. roqueforti</i> 26KK5A İzolatının YES Agar Ekstraktına Ait HPLC-PDA Kromatogramları	108
Şekil 4.18: Olgunlaşma Süresi Sonunda, <i>P. roqueforti</i> İzolatlarının Peynirlerde Oluşturduğu Damarlı Yapılar ve Peynirlerin Görünümleri.....	113
Şekil 4.19: Peynir Örneklerinin Toplam İyon Kromatogramı (TIC)	119
Şekil 4.20: TP5 Peynir Örneği Ekstraktına Ait HPLC-PDA Kromatogramları.....	121

KISALTMALAR

ACN	: Asetonitril
CA	: Peynir Agar
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle spektroskopisi
C/N	: Karbon Azot Oranı
DAD	: Diyot Dizilimli Dedektör
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Ed.	: Editör
FLD	: Floresans Dedektör
HGT	: Yatay Gen Transferi
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HT	: Haplotip
IDF	: Uluslararası Sütçülük Federasyonu
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
MEA	: Malt Ekstraktı Agar
MPA	: Mikofenolik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
NCBI BLAST	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Temel Yerel Hizalama Aracı
NSLAB	: Starter Olmayan Laktik Asit Bakterileri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA (HPLC)	: Fotodiyot Dizilimli Dedektör
ROKC	: Rokfortin C
Sf.	: Sayfa
TEPGE	: Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü
TPE	: Türk Patent Enstitüsü
UV	: Ultraviyole
vd.	: Ve Benzeri
vd.	: Ve Diğerleri
YPD	: Maya Ekstraktı Pepton Dekstroz Sıvı Besiyeri

YES	: Maya Ekstraktı Sükroz Agar
bp	: Baz Çifti
dk	: Dakika
IC ₅₀	: Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
g	: Gram
kb	: Kilobaz
kbp	: Kilobaz Çifti
kg	: Kilogram
L	: Litre
LD ₅₀	: Öldürücü Doz
m	: Metre
µm	: Mikrometre
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
µM	: Mikromolar
µL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
ng	: Nanogram
ppm	: Milyonda Bir
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
sn	: Saniye
V	: Volt

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Küflü peynirler, olgunlaşma sürecinde peynirin yüzeyinde ve iç kısımlarında küflerin gelişmesiyle üretilir. Dünyada en çok bilinen ve tüketilen küflü peynir çeşitleri, Rokfor, Danablu, Gorgonzola, Stilton gibi mavi peynirlerdir (Cantor vd., 2017; Martin ve Coton, 2017; Metin, 2018). Bu peynirler, Avrupa Komisyonu tarafından verilmiş coğrafi işaretlerle koruma altına alınmıştır (Anonim, 2024a). Ayrıca mavi peynirler, 1992 yılında ortaya çıkan “Fransız Paradoksu” ile de ilişkilendirilmiştir. Bu kavram, Fransızların doymuş yağ içeriğince zengin bir beslenme şekline sahipken, kardiyovasküler hastalıklar kaynaklı ölümlerinin düşük oranlarda tespitiyle ortaya çıkmıştır (Renaud ve Lorgeril, 1992; Petyaev ve Bashmakov, 2012). Bunun sebeplerinden biri olarak, mavi peynirlerden gelen andrastin A ve B gibi biyoaktif sekonder metabolitlerden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Cantor vd., 2017). Bu durum, mavi peynirlerin seçkin organoleptik özelliklerinin yanında, biyolojik açıdan değerini gündeme getirmiştir. Ülkemizde, mavi peynirlere benzer olarak üretilen Erzurum Küflü Civil, Kars Küflü Çeçil, Konya Küflü Tulum, Karaman Divle Obruğu Tulum ve Antakya Küflü Sürkü gibi pek çok küflü peynir üretilmektedir (Metin, 2018; Çakmakçı ve Salık, 2021). Ancak bu peynirden sadece, Erzurum Küflü Civil, Divle Obruğu Tulum peyniri ve Antakya Küflü Sürkü coğrafi işaret almıştır (TPE, 2024a).

Penicillium roqueforti, küflü peynirlerin olgunlaştırılmasında sekonder starter olarak kullanılan filamentli bir fungustur. Bu tür, mavi peynirlere karakteristik mavi yeşil rengini vererek damarlı bir yapı oluşturur (Cantor vd., 2017). *P. roqueforti*, peynir pıhtısı üzerine püskürtülerek ya da direkt olarak süt içine katılarak peynire inoküle edilmektedir (Metin, 2018). Ticari starter kültür kullanılmadığında *P. roqueforti*, ortamdaki gelerek peynirde spontan olarak gelişebilir. Ülkemizde küflü peynirler, genellikle bu yöntemle üretilmektedir. Spontan fermantasyon ile üretilen bu peynirlerde, mikotoksijenik küfler de üreyebilir. Bu durum, halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından ciddi problem oluşturan mikotoksin riskini de beraberinde getirmektedir. Ayrıca, bu peynirlerin üretiminin geleneksel metotlarla, yöreye has

küçük ölçekli işletmelerde veya evlerde yapılması, bu peynirlerin sadece yerel olarak bilinmelerine neden olmuştur. Endüstriye tam anlamıyla entegre edilemediği için, küflü peynirlerin üretiminde standardizasyon sağlanamamıştır.

Son yıllarda, Avrupa tipi küflü peynirlerden izole edilen *P. roqueforti* suşları genetik ve metabolik özelliklerine göre gruplandırılmıştır. Rokfor, Termignon ve diğer Avrupa peynirlerinden izole edilen *P. roqueforti* suşlarının çeşitliliği ortaya konmuş ve peynir üretiminde oluşturduğu farklılıklar çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir (Fernandez-Bodega vd., 2009; Ropars vd., 2014; 2016; Gillot vd., 2015; 2017; Coton vd., 2020; Dumas vd., 2020; Caron vd., 2021; 2024; Crequer vd., 2023; 2024). Ülkemizde ise yöresel küflü peynirlerimizle ilgili çok az sayıda çalışma olup, küflerin genetik özellikleri ve *P. roqueforti* çeşitliliği ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.1. Amaç

Bu çalışmada;

- Geleneksel Türkiye küflü peynirlerinden izole edilen küflerin genetik özelliklerinin, *P. roqueforti* izolatlarının çeşitliliğinin ve popülasyon yapısının belirlenmesi,
- Genetik olarak farklı *P. roqueforti* izolatlarının teknolojik (gelişme hızı, tuza direnç, lipolitik ve proteolitik aktivite) ve metabolik özelliklerinin besiyerinde tespiti,
- Seçilen *P. roqueforti* izolatlarıyla model peynir üretimi ve peynirlerin fizyokimyasal ve mikrobiyolojik analizlerinin yapılması; *P. roqueforti* izolatlarının uçucu bileşen ve mikotoksin (Mikofenolik asit ve Rokfortin C) üretme özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.
- Çalışmanın bir diğer amacı da, elde edilen izolatlardan uygun starter kültür belirleme imkanının araştırılmasıdır.

1.2. Yöntem

Çalışma kapsamında, Konya, Erzurum, Kars, Karaman, Sivas gibi illerden temin edilen küflü peynirlerden izole edilen küflerde, morfolojik inceleme ve rep-PCR ile ön

tanımlama yapılmıştır. Ön tanımlamaya göre seçilen izolatlar, ITS bölgesi ve *benA* geninin amplifikasyonu, moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. İzolatların genetik çeşitliliği RAPD-PCR ve üç mikrosatelit bölgesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Genetik olarak farklı olduğu tespit edilen 20 izolat seçilmiş ve bu izolatların beş polimorfik lokus dizilimleri kullanılarak, dünyada izole edilmiş olan diğer *P. roqueforti* izolatlarıyla filogenetik analize tabi tutulmuştur. Ayrıca, bu izolatların teknolojik özellikleri, uçucu bileşen profili ve mikotoksin üretimi (MPA ve ROKC) besiyerinde incelenmiştir. Uçucu bileşen analizleri için GC-MS sistemi, mikotoksin analizleri için HPLC sistemi kullanılmıştır. Bu analizler sonucu seçilen üç izolat, tip suş ile birlikte peynir üretiminde kullanılmıştır. Peynirlerin kimyasal, mikrobiyolojik, uçucu bileşen ve mikotoksin (MPA ve ROKC) üretim özellikleri belirlenmiştir. İzolatlar ve peynirler arasındaki farklılıklar, istatistiksel metotlarla değerlendirilmiştir.

1.3. Kapsam

Bu araştırma kapsamında yapılan analizlerle, Türkiye küflü peynirlerinden izole edilen küflerin özellikleri ve *P. roqueforti* çeşitliliği ilk defa belirlenmiş, ayrıca Avrupa tipi peynirlerden ve peynir dışı ortamlardan *P. roqueforti* izolatlarıyla benzerlikleri/farklılıkları ortaya konmuştur. Tüm bu bulgular, farklı özelliklere sahip çeşitli küflü peynirlerin üretimi için önem taşımaktadır. Bu çalışma, yerli sekonder starter kültürlerin geliştirilmesi, dünya genelinde üretilen binlerce çeşit küflü peynirin tat, koku, aroma ve tekstür farklılıklarının anlaşılması ve yöresel küflü peynirlerimizin dünyaya tanıtılması için literatüre önemli katkılar sunmaktadır. Ayrıca, ülkemizde kontrollü koşullarda küflü peynir üretimi, oldukça büyük bir öneme sahiptir. Böylece, küflü peynirlerin hijyenik ve kontrollü şartlarda üretiminde standardizasyona katkı sağlamak amacıyla, starter olarak kullanılabilecek olası suşlar için bilimsel veriler sunulmuştur.

İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

Bu bölümde, küf ile olgunlaştırılan peynirlerin üretimi değerlendirilmiş, Avrupa’da ve Türkiye’de üretilen küflü peynir çeşitleri incelenmiştir. *Penicillium roqueforti* türünün taksonomisi, morfolojisi, genetiği ve metabolik aktiviteleri ele alınmış; özellikle uçucu bileşen profili ile ikincil metabolitler ve mikotoksinler üzerine detaylı bilgiler sunulmuştur.

2.1. Küf ile Olgunlaştırılan Peynirler

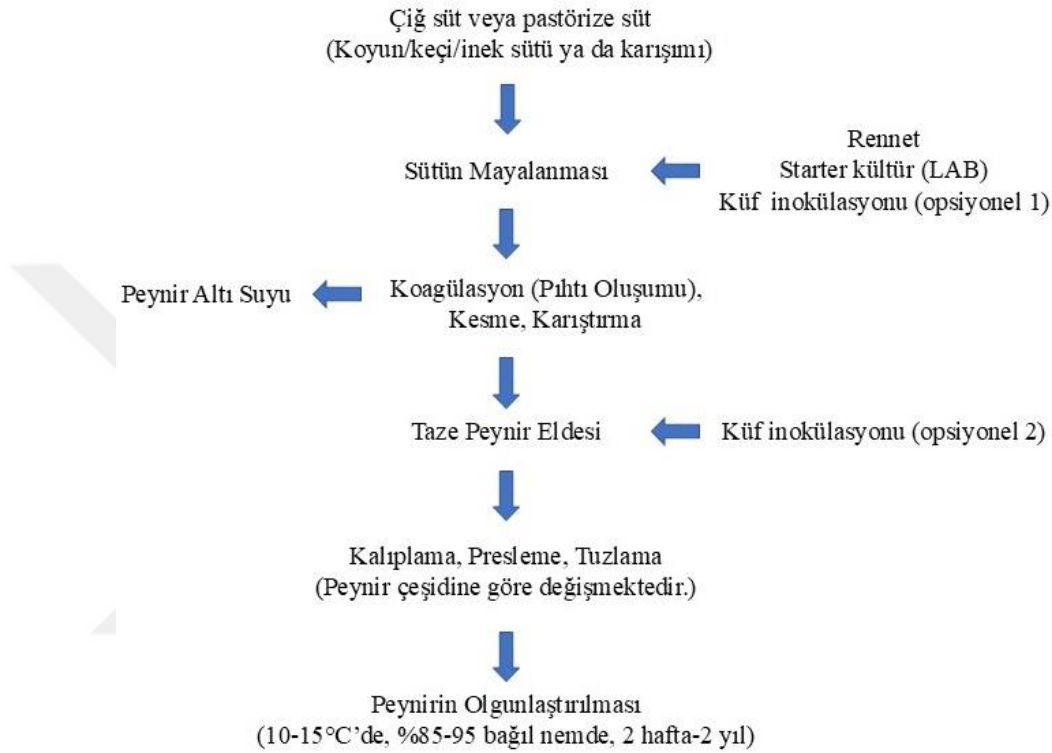
Süt ürünleri arasında en zengin çeşide sahip olan peynirler, hem besleyici yönü hem de lezzeti ile gıda sanayinde önemli bir konuma sahiptir. Dünyada, farklı üretim teknikleri ve hammaddeler kullanılarak binlerce çeşit peynir üretilmektedir. Peynir çeşitleri içerisinde küf ile olgunlaştırılan peynirler veya diğer adıyla küflü peynirler, ayrı bir yere sahiptir. Bu peynirler, kendilerine has özellikleri nedeniyle, dünyada seçkin mutfak kültürünün bir parçası haline gelmiştir (Cantor vd., 2017; Martin ve Coton, 2017; Metin, 2018).

Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF)’nun 2022 yılı verilerine göre, dünyada yıllık 23,2 milyon ton peynir üretimi yapılmıştır. Peynir üretiminde, Avrupa Birliği (27 ülke) toplam 9,5 milyon ton ile ilk sırada yer alırken, sıralamayı 6,4 milyon ton ile ABD, 1 milyon ton ile Brezilya ve yaklaşık 732 bin ton ile Türkiye takip etmiştir. Küflü peynir üretimi ise, dünyada toplam peynir üretiminin %3-4’ünü oluşturmaktadır (IDF, 2023; TEPGE, 2023).

2.1.1. Küflü Peynir Üretimi

Küflü peynirler, peynir sütüne ya da telemesine sekonder starter olarak kullanılan küflerin ilavesiyle veya olgunlaştırma sürecinde mağara ya da mahzen ortamından gelen küf sporlarının peynire bulaşarak gelişmesiyle üretilmektedir (Fox vd., 2017; Metin, 2018). Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği’nde küflü peynirler, kullanımına izin

verilen küf kültürleri ile olgunlaştırılan, çeşidine özgü karakteristik özellikler gösteren, kontrollü iklimlendirme sağlanabilen ve hijyen koşulları uygun yerlerde küflendirilerek üretilen peynir olarak tanımlanmıştır (Anonim, 2015). Küflü peynirlerin üretim akış şeması Şekil 2.1’de gösterilmiştir (Fox vd., 2017; Cantor vd., 2017). Şekil 2.1’e göre küflü peynir üretiminde, sütün mayalanma aşamasında ya da sonraki aşamalarda elde edilen taze peynire küf sporu inoküle edilebilir.



Şekil 2.1: Küflü peynir üretim aşamaları

Kaynak: Fox vd., 2017; Cantor vd., 2017

Olgunlaştırma sürecinde peynirde gelişen küfler, deasidifikasyon, proteolitik ve lipolitik aktiviteleriyle bu peynirlere has koku, aroma, tat ve tekstür oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

2.1.2. Küflü Peynirlerin Mikrobiyotası ve Ticari Starter Kültür Kullanımı

Küflü peynirler, primer ve sekonder starter kültürlerden oluşan kompleks bir mikrobiyotaya sahiptir (Martin ve Coton, 2017). Mikrobiyotada starter laktik asit bakterileri (LAB), starter olmayan laktik asit bakterileri (NSLAB), diğer bakteriler, mayalar ve küfler interaksiyon halindedir (Cantor vd., 2017; Fox vd., 2017). Ticari olarak kullanılan starter kültürler, genellikle liyofilize formda, toz halde kullanılır

(Kılıç vd., 2011). Geleneksel yöntemle üretilen peynirlerde, süttten ve çevreden gelen mikroorganizmalar spontan olarak gelişir (Cantor vd., 2017).

Peynirlerde mezofilik ve termofilik LAB, primer starter kültür olarak kullanılır (Cantor vd., 2017). Mezofilik starter olarak, laktik asit üreten *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis* ve *cremoris*) kullanılır. Bazen de starter kültür miksinde, CO₂ üreten ve böylece peynire hava girişini sağlayacak boşluklar oluşturarak küflerin gelişimine destek olabilecek, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Leuconostoc* spp.'nin sitrat pozitif suşları yer alır. Termofilik starterler olarak, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kullanılabilir. Primer starterler, laktozu kullanarak laktik asit üretir ve sütü asitlendirir (Fox vd., 2017; Martin ve Coton, 2017). Ayrıca, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Pediococcus* spp. ve *Enterococcus* spp. NSLAB olarak küflü peynir mikrobiyotasında bulunabilir (Cantor, 2017; Sionek vd., 2023). Küflü peynirlerin olgunlaştırılmasında sekonder starter olarak, mavi peynirlerde *P. roqueforti* kullanılırken, beyaz küflü peynirlerde *Penicillium camemberti* ve diğer küflü peynirlerde (bkz. 2.1.3.3) *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Trichothecium* spp., *Sporendonema* spp. ve *Scopulariopsis* spp. kullanılabilir (Ropars vd., 2012a; Fox vd., 2017; Metin, 2018; De Respini vd., 2023). Küf sporları süte direkt olarak katılarak, peynir pıhtısına püskürtülerek ya da peynirin üretildiği ortamdan gelerek peynirde gelişir (Cantor vd., 2017). Ortamdan gelen küf türleri arasında, çoğunlukla *Penicillium* spp. yer alır. Ancak, bazı *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp. gibi küf türlerinin peynire kontaminasyonu, peynirde istenmeyen tat, koku, görünüm ve renk oluşumuna (siyah, koyu kahve vb.) neden olarak bozulmaya yol açabilir (Fox vd., 2017). Küfler, LAB'm ürettiği laktik asit ve sitratı kullanabilir (deasidifikasyon). Böylece ortam pH'ını, 4,5'tan 7'ye yükselterek nötralize ederler. Küflerin proteolitik aktiviteleri (endopeptidaz ve ekzopeptidaz enzimleri) sonucu, kazein hidrolize olur. Böylece ortamda serbest aminositler, amonyak ve uçucu bileşenler oluşur ve olgunlaşma hızlanır. Küflerin lipolitik aktiviteleriyle, serbest yağ asitleri, metil ketonlar, sekonder alkoller vb. oluşur. Bu aktiviteler sonucu, küflü peynirlere has tat, lezzet, aroma ve tekstür gelişir (Gürsoy ve Kesenkaş, 2011; Fox vd., 2017). Küflerin yanı sıra, sekonder starter olarak mikrobiyotada mayalar da bulunmaktadır. Filamentli bir fungus olarak değerlendirilen *Geotrichum candidum*'un yanı sıra öne çıkan maya türleri, *Debaryomyces hansenii*, *Candida lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia*

fermentans ve *Rhodotorula mucilaginosa*'dır. Mayalar, peynir matriksinde fermente edilmemiş karbonhidratları, az miktarda bulunan sitrik ve asetik asidi kullanır ve lezzet gelişiminde rol oynar (Cantor, 2017; Fox vd., 2017; Martin ve Coton, 2017).

2.1.3. Avrupa Tipi Küflü Peynirler

Dünyada farklı süt kaynağı, bileşenler ve farklı üretim teknikleri kullanılarak üretilen küflü peynirlerden mavi veya mavi damarlı (blue veya blue-veined) peynirler ve beyaz küflü (white mold-ripened) yumuşak peynirler ön plana çıkmaktadır (Cantor vd., 2017; Fox vd., 2017; McSweeney vd., 2017; Spinnler vd., 2017). Bunlar haricinde, hem beyaz küf hem de mavi küf kullanılarak üretilen hibrit peynirler ve diğer küflü peynirler bulunmaktadır (Fox vd., 2017). Bu peynirler, üretildikleri bölgelere özgü özelliklerinin ve kalitelerinin korunması amacıyla Avrupa Komisyonunca coğrafi işaretlerle (Şekil 2.2) koruma altına alınmıştır (Anonim, 2024a). Bu işaretlerden menşe adı koruması (Protected Designation of Origin, PDO), bir ürünün tamamen belirli bir bölgede üretildiğini ve üretildiği bölgenin özelliklerini taşıdığını göstermektedir. Coğrafi işaret koruması (Protected Geographical Indication, PGI), bir ürünün en az bir aşamasının belirli bir coğrafi bölgede yapıldığını göstermektedir. Geleneksel ürün garantisi (Traditional Speciality Guaranteed, TSG) ise, bir ürünün belirli geleneksel yöntemlerle veya bileşenlerle üretildiği anlamına gelmektedir.



Şekil 2.2: Avrupa Komisyonu tarafından verilen coğrafi işaretler

Kaynak: Anonim, 2024a

2.1.3.1. Mavi Peynirler

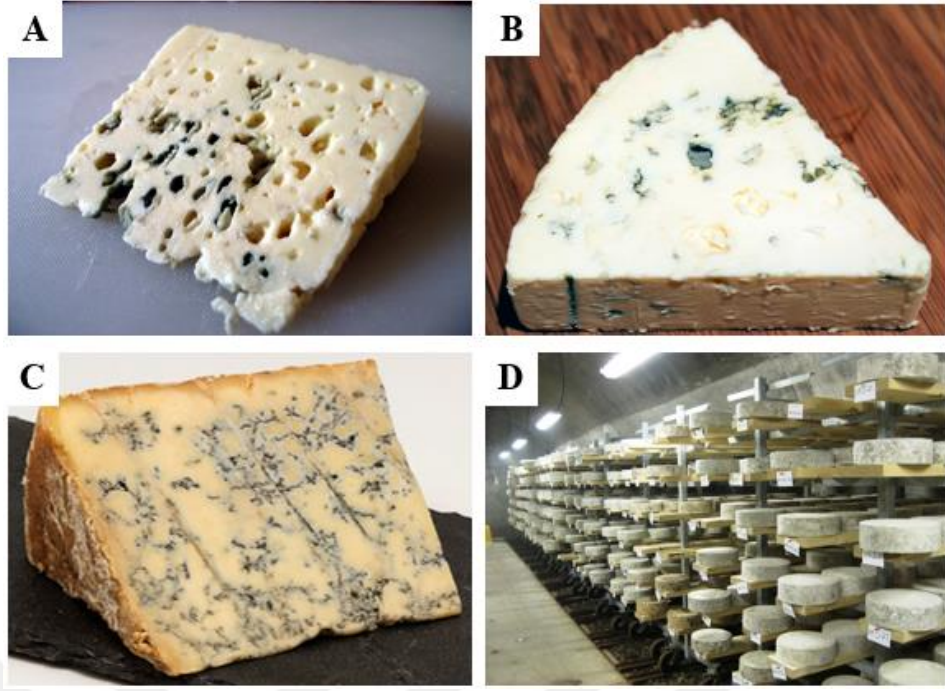
Mavi (blue) ya da mavi damarlı peynirler, olgunlaşma sürecinde *P. roqueforti* türünün peynirde gelişerek, mavi-yeşil renkte damarlı görünüm oluşturması ile karakterize edilir ve yarı sert yapıdadır (Cantor vd., 2017; Fox vd., 2017). Rokfor, Bleu de

d'Auvergne, Fourme d'Ambert (Fransa), Danablu (Danimarka), Stilton (Birleşik Krallık), Gorgonzola (İtalya) ve Cabrales (İspanya) en çok bilinen mavi peynirlerdendir (Şekil 2.3). Üretim teknikleri değişmekle birlikte bu peynirler, starter kültür eklendikten sonra sütün 30 °C'de mayalanması, iki saat sonra pıhtının oluşumu ve kesilmesiyle elde edilir. Sonrasında peynir altı suyu süzülür ve pıhtı silindirik kaplara alınarak kalıplanır. *P. roqueforti* sporları, mayalanma öncesinde süte ya da peynir pıhtısına ilave edilir. Kuru tuzlamadan sonra, peynirlerde delikler açılır. Bu delikler, peynirin iç kısımlarına hava girişini sağlayarak, küfün peynirin içinde de gelişmesini ve damarlı görüntünün oluşmasını sağlar. Peynirler %85-95 bağıl nemde, 8-15 °C'de mağaralarda, mahzenlerde ya da kontrollü iklimlendirme odalarında olgunlaştırılır (Cantor vd., 2017; Fox vd., 2017). Farklı tekniklerle üretilen mavi peynirlerin kimyasal kompozisyonu da değişmektedir. Bu peynirlerin pH değerleri olgunlaşma sürecinde artar. Kalıplama aşamasında taze peynirin pH değeri, 4,6-5,0 aralığındayken, olgunlaşma süresi sonrası 6,0-6,5 aralığında veya daha yüksek değerlere ulaşır (Fox vd., 2017). Ayrıca, peynirlerin nem, yağ, protein ve tuz oranları, kullanılan süt türüne, üretim şekline ve üretildiği bölgeye özgü farklılıklar gösterebilir. Örneğin, Rokfor, Cabrales, Stilton gibi peynirler, genellikle daha yüksek yağ ve protein içeriğine sahiptir (Cantor vd., 2017). Çeşitli mavi peynirlere ait nem, yağ, protein ve tuz oranları, Tablo 2.1' verilmiştir.

Tablo 2.1: Mavi peynirlere ait nem, yağ, protein ve tuz oranları

Peynir Çeşidi	% Nem	% Yağ	% Protein	% Tuz
Rokfor	42-44	29	20	4,1
Cabrales	35,4-41,6	33,8-38,2	20,4-23,6	1,8-3,4
Stilton	37-41,6	32-35,2	21-28,7	2,2-2,7
Danablu	42,7-47,3	29-31	18,5-23,9	3-3,9
Gorgonzola	42,2-49,6	29,6-31	19-22,9	1,6-2,9

Kaynak: Cantor vd., 2017; Fox vd., 2017

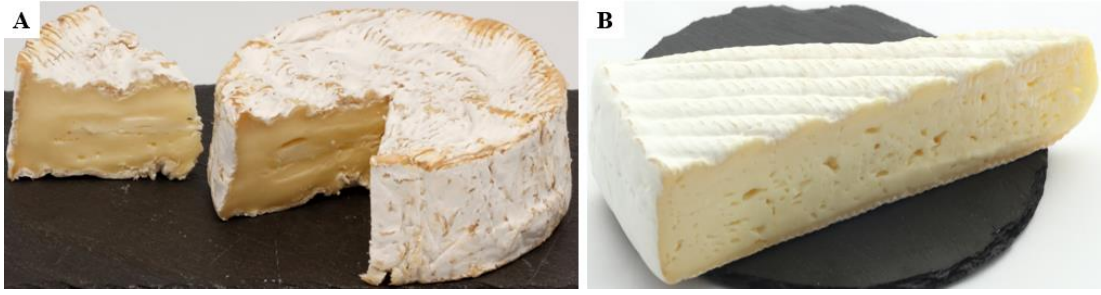


Şekil 2.3: Başlıca mavi peynirler: (A) Rokfor, (B) Danablu, (C) Stilton, (D) Peynirlerin olgunlaştırıldığı özel oda

Kaynak: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Roquefort.jpg>>; <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Danish_Blue_cheese.jpg>; <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blue_Stilton_02.jpg>; <<https://www.flickr.com/photos/38911797@N07/3798776531>> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

2.1.3.2. Camembert Tipi Peynirler

Camembert tipi peynirler, beyaz küf olarak bilinen *P. camemberti* gelişmesiyle karakterize edilir ve yumuşak yapıdadır. Bu grupta öne çıkan Camembert ve Brie peynirleri (Fransa) (Şekil 2.4), endüstriyel olarak geniş çaplı üretilmektedir (Fox vd., 2017; Spinnler vd., 2017). Beyaz küflü peynirlerin üretiminde ilk olarak süt, starter kültür eklendikten sonra 30 °C’de mayalanır. Endüstriyel üretimde *P. camemberti* sporları, doğrudan pıhtıya eklenir. Peynir pıhtısı kalıplandıktan sonra, salamuraya alınır ve peynirin dış yüzeyi kuru tuzla kaplanır. Peynir yüzeyi, 12 °C’de 1-2 hafta kurutulduktan sonra, peynirler mahzenlerde veya kontrollü iklimlendirme odalarında olgunlaştırılır (Fox vd., 2017; Spinnler vd., 2017).



Şekil 2.4: Başlıca beyaz küflü peynirler: (A) Camembert, (B) Brie

Kaynak: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Camembert_de_Normandie_%28AOP%29_11.jpg>; <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brie2.JPG>> Erişim

Tarihi: [01.01.2025]

2.1.3.3. Diğer Küflü Peynirler

Cambozola (Fransa), Gorgonzola Dolce (İtalya) ve Bleu de Bresse (Fransa) peynirleri, hem *P. roqueforti*'nin ve hem de *P. camemberti*'nin kullanımı ile üretildiği için, hibrit küflü peynirler olarak adlandırılmaktadır. Bu peynirler yumuşak bir dokuya sahiptir; iç kesitinde mavi damarlar oluşurken, yüzeyleri beyaz küf tabakasıyla kaplanır (Fox vd., 2017). Saint Nectaire, Tomme de Savoie ve Reblochon peynirlerinde (Fransa) gri-kahve rengi veren *Mucor* spp., *Fusarium domesticum* ve pembe küf olarak nitelendirilen *Trichothecium roseum*, Cantal ve Salers peynirlerinde (Fransa) kırmızı küf olarak bilinen *Sporendonema casei*, Gamalost peynirinde (Norveç) *Mucor mucedo* ve *Mucor racemosus*, Ticino Alp peynirinde (İsviçre) ise *Scopulariopsis flava* ve *Scopulariopsis fusca* türleri sekonder starter olarak peynire ilave edilir ya da spontan fermantasyon ile peynirde gelişir (Ropars vd., 2012a; Metin, 2018; De Respini vd., 2023). Fermente kırmızı pirinç küfö olarak bilinen *Monascus* spp. ile, kırmızı *Monascus* peyniri (Çin) de yapılmaktadır (Xia vd., 2020). Diğer küflü peynirlere örnekler, Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5: Diğer küflü peynirler: (A) Cambozola, (B) Tomme de Savoie, (C) Gamalost ve (D) Peynirlerin olgunlaştırılması

Kaynak: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cambozola_cheese.jpg>; <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:WikiCheese_-_Tomme_de_Savoie_-_20150619_-_002.jpg>; <<https://www.flickr.com/photos/quickfix/8412959346/>>; <<https://freerangestock.com/photos/125348/tomme-de-savoie-cheese-.html>> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

2.1.4. Türkiye Küflü Peynirleri

Avrupa tipi mavi peynirlere benzer olarak ülkemizde, Konya Küflü Tulum (Gök, Yeşil) peyniri ve Erzurum Küflü Civil peyniri en çok tüketilen küflü peynirlerdendir (Çakmakçı, 2011; Metin, 2018). Ayrıca, Karaman Divle Obruk peyniri de ön plana çıkmaktadır (Çakmakçı, 2011; Ozturkoglu-Budak vd., 2016; Metin 2018). Bunların yanı sıra, Karaman, Sivas, Hatay, Bingöl, Kars gibi yörelere ait çeçil, tulum, çömlek, küp tipi peynirler de küflendirilerek tüketime sunulmakta ve daha çok mahalli olarak bilinmektedir (Arslan ve Kadı, 2021).

Avrupa’da endüstriyel olarak üretilen küflü peynirlerde starter kültür kullanılmakta, Türkiye’de ise daha çok spontan fermantasyon uygulanmaktadır (Metin, 2018).

Ülkemizde küflü peynirler, yerel olarak sevilerek tüketilmekte ancak çoğunlukla endüstriyel boyutta üretilmediğinden yeteri kadar tanınmamaktadır (Metin, 2018). Avrupa tipi küflü peynirler, coğrafi işaret olarak tescillenmiştir (Şekil 2.2). Ülkemizde ise son yıllarda, coğrafi işaret başvuruları önem kazanmaktadır. Coğrafi işaretler, mahreç işareti ya da menşe adı olarak tescil edilmektedir (Şekil 2.6). Mahreç işareti, bir ürünün en az bir özelliği veya üretim aşamasının belirlenmiş coğrafi alanda gerçekleşmiş ve bu coğrafi alanla özdeşleşmiş olduğunu gösterir. Menşe adı ise, bir ürünün üretiminin tüm aşamalarının belirli bir coğrafi bölgede gerçekleştiğini ve bu bölgeye has özellikler taşıdığını simgeler (TPE, 2024b). Türkiye’de coğrafi işaret olarak tescillenmiş 39 peynir çeşidi bulunmaktadır (TPE, 2024a). Bunlar arasında, küflü peynirlerimizden Erzurum Küflü Civil (Göğermiş) peyniri 2012’de mahreç işareti, Karaman Divle Obruğu Tulum peyniri 2017’de menşe adı, Antakya Küflü Sürkü (Çökeleği) ise 2018’de mahreç işareti almıştır. Balıkesir Kepsut Bükdere Küflü Katık peyniri için 2021 yılında ve Bayburt küflü peyniri için ise 2023 yılında mahreç işareti başvurusu yapılmıştır (TPE, 2024a).



Şekil 2.6: Türk Patent ve Marka Kurumu tarafından verilen coğrafi işaretler
Kaynak: TPE, 2024b

2.1.4.1. Erzurum Küflü Civil Peyniri

Civil peyniri, Erzurum’un yanı sıra Bayburt, Kars, Ağrı, Ardahan, Iğdır, Van, Bitlis ve Muş yörelerinde de üretilmekte ve “Çeçil peyniri, iplik, tel ve çekme peynir” olarak da isimlendirilmektedir. Yağsız inek sütüne (belirli düzeyde asitlendirilmiş) maya ilavesi sonrası, ısıtılmış işlem uygulanarak (55-65 °C’de) elde edilen telemin yoğrulması sonucu üretilir (Çakmakçı, 2011; Coşkun, 2021; Çakmakçı ve Salık, 2021; Yıldız vd., 2021). Tahta kepçelerle toplanan ve karıştırılıp yoğrulan teleme, tahta kepçelerle toplanır, çekilir ve asılarak tel tel, lifli yapı oluşması sağlanır. Böylece, az yağlı ya da yağsız olarak elde edilen peynir, taze olarak tüketilebildiği gibi, salamuraya (%10-12

NaCl) alınarak ya da kuru tuzlandıktan sonra sade olarak ya da lor (%25-30 oranında) ile keçi tulumlarına ya da plastik bidonlara basılıp iki şekilde olgunlaştırılabilir (Cakmakci vd., 2014; Çakmakçı ve Salık, 2021; Yıldız vd., 2021). Plastik bidonların kapakları, sıkıca kapatılır ve delinir. Bidonlar, kalan peynir altı suyunun akması için ters çevrilir ve depolanır (Arslan ve Kadı, 2021). Küflendirilerek tüketilen civil peynirine, halk arasında “göğermiş peynir” de denir. Küflü Civil (Şekil 2.7), taze peynirin 8-12 °C’de 90 ila 180 gün küflendirilerek olgunlaştırılması ile üretilir (Çakmakçı, 2011; Cakmakci vd., 2015). Küflü Civil peynirinin, nem, yağ, protein ve tuz oranları, sırasıyla, %45,2-57,3, %1-6,2, %30,1-43,5 ve %2,9-7,5 aralıklarında belirlenmiştir (Cakmakci vd., 2012; Cantor vd., 2017). Bu peynirin mikrobiyotasında, *Lactobacillus malefermantans*, *Lactobacillus (Limosilactobacillus) fermentum*, *Lactobacillus (Lentilactobacillus) parabuchneri* gibi LAB; *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica* gibi mayalar yer almıştır (Şengül, 2006; Yıldız vd., 2021). Peynirin olgunlaşma sürecinde ise mikrobiyotada, *P. roqueforti* türü başta olmak üzere, *Penicillium* spp. öne çıkmıştır (Cakmakci vd., 2012).



Şekil 2.7: (A) Erzurum Küflü Civil Peyniri, (B) Konya Küflü Peyniri, (C-D) Divle Obruk peynirleri, (E) Divle Obruk mağarası

Kaynak: Kirtil vd., 2024; <<https://obrukpeyniri.com/>> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

2.1.4.2. Konya Küflü Tulum Peyniri

Küflü Tulum, Orta Anadolu’da özellikle Konya ve Karaman yörelerinde, koyun, keçi ya da inek sütünden üretilir (Hayaloğlu ve Kırbağ, 2007). Pıhtılaşma sonrası elde edilen teleme, bir bez torbada toplanır, nohut büyüklüğünde parçalara ayrılır, tuzlanır ve ön olgunlaştırma için bir torbada 10 gün boyunca bekletilir. Taze peynir, deri tulumlara (keçi vb.) ya da plastik bidonlara basılır ve 6-12 °C’de, %80-90 bağıl nemde 90 güne kadar olgunlaştırılır. Bu süre sonunda ambalajlar açılır ve peynir, küf gelişimini kolaylaştırmak için, 5-6 cm bloklar halinde dilimlenir (Hayaloglu vd., 2007; Ünsal, 2017; Metin, 2018). Peynir dilimleri, üst üste çuvala yerleştirilir ve soğuk hava depolarında ya da mağaralarda, istenen mavi-yeşil küf oluşumu gözlenen kadar, spontan olarak 15-20 gün küflendirilir (Ünsal, 2017; Yurt vd., 2023). Konya küflü peynirine (Şekil 2.7), halk arasında “gök, yeşil peynir” de denir (Çakmakçı, 2011). Bu peynirlerin nem, kuru maddede yağ, protein ve tuz (nemde) içerikleri, sırasıyla, %37,65-54, %6,21-40,09, %26,18-44,85 ve %4,70-10,23 aralıklarında belirlenmiştir (Hayaloglu vd., 2008). Ayrıca, mikrobiyotasında bakteri türlerinden *Levilactobacillus* spp., *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*; mayalardan *Pichia membranifaciens*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida zeylanoides*; filamentli funguslardan ise *Geotrichum candidum* ve *Penicillium roqueforti* türü olgunlaşma sürecinde öne çıkmıştır (Seri ve Metin, 2021; Yurt vd., 2023).

2.1.4.3. Divle Obruk Peyniri

Karaman’ın Ayrancı ilçesinde üretilen yağlı bir peynir olan Divle Obruk Peyniri (Şekil 2.7), tulum peynirleri grubundandır. Divle köyünde obruk denilen yeraltı mağarasında (232 m uzunluğunda ve 70 m derinliğe sahip) olgunlaştırıldığı için, bu adı almıştır (Ozturkoglu Budak vd., 2016; Ünsal, 2017). Divle Obruğu’nun (Şekil 2.7) sıcaklığı, yaz aylarında bile 4-5 °C ve ortam nemi %80-85 olduğundan, bu mağara peynirler için soğuk hava deposu görevi görür. Üretimi diğer tulum peynirlerine benzer olup, tam yağlı koyun sütü kullanılır. Peynir, maya ile pıhtılaşmanın ardından 55-60 °C’de 5-10 dk ısıtılır (Ünsal, 2017; Çakmakçı ve Salık, 2021). Elde edilen teleme bez torbaya alınır ve peynir altı suyunun süzülmesi için, peynir torbası 24 saat asılarak bekletilir. Daha sonra taze peynir parçalanır, soğuk suya bastırılarak (2’şer saat arayla 3 kez) peynir altı suyu uzaklaştırılır ve tekrar bez torbaya alınarak 24 saat daha askıda

bırakılır. Bu süre sonunda taze peynir ufalanır ve %3-4 oranında tuzlanır. Tuzlanan peynir, 24 saat dinlendirildikten sonra, koyun ya da keçi tulumlarına basılır ve iyice kurumaları için serin bir yerde 5-10 gün bekletilir. Bu süre sonunda tulumların ağızları dikilir ve deri yüzeyi iğnelerle delinerek kalan peynir altı suyunun akması sağlanır. Peynir, Divle Obruğu'nda Mayıs ayından Ekim ayına kadar, yaklaşık 4-6 ay olgunlaştırılır (Ünsal, 2017; Ozturkogl u Budak, 2023). Böylelikle peynirlerde, mağaranın doğal mikrobiyotasından gelen mikroorganizmalar gelişir. Peynirlerin basıldığı tulumların yüzey rengi, olgunlaşma süresi ilerledikçe küflerin gelişimi ile mavi renge sonra da mayaların ve özellikle korineform (çomak şeklinde) bakterilerin (*Brevibacterium linens*, *Arthrobacter* spp. vb.) gelişimi ile kırmızıya döner (Ozturkogl u Budak, 2016).

2.1.4.4. Diğer Yöresel Küflü Peynirler

Yöresel küflü peynirlerimiz arasında, çeşitli yörelere ait sürk, küp, çömlek, dorak ve diğer tulum peynirleri öne çıkmaktadır. Bu peynirler, bölgesel olarak üretilmekte, mahalli olarak bilinmekte ve isteğe bağlı olarak küflendirilmektedir (Şengün vd., 2006; Çakmakçı, 2011; Ünsal, 2017; Çakmakçı ve Salık, 2021; Esen ve Çetin, 2021). Hatay Küflü Sürkü (Çökeleği) yapımında, önce yayık altı ayranı ve asitliği yükseltilmiş inek sütünün kaynatılması (90-95 °C'de) ile çökelek elde edilir (Esen ve Çetin, 2021). Bu çökeleğe biber salçası, tuz ve çeşitli baharatlar (yabani kekik, nane, karabiber, kırmızıbiber, kişniş vb.) eklenir ve karışım homojen hale gelene kadar yoğrulur. Böylece, kırmızı-turuncu peynir elde edilir ve avuç büyüklüğünde parçalar alınarak koni şekli verilir. Konik şekilli peynir topları, plastik bidonlara alınarak 3-4 hafta küflendirilir (Çakmakçı ve Salık, 2021). Isparta, Kayseri, Niğde, Aksaray, Nevşehir, Kırşehir ve Sivas yörelerine ait tulum peynirlerine benzeyen küp, çömlek ve testi peynirleri de isteğe göre küflendirilerek tüketilmektedir (Ünsal, 2017). Balıkesir'e ait Kepsut Bükdere Küflü Katık peyniri, oğlak derilerinde olgunlaştırılan bir çeşit tulum peyniridir (Sarıt aş, 2023). Başta Bingöl olmak üzere, Tunceli, Elazığ, Erzurum, Erzincan, Muş ve Malatya illerinde üretilen, dorak ya da sert o isimleriyle de bilinen, tomas peyniri de küflendirilir (Ünsal, 2017). Ayrıca, son yıllarda Erzincan Tulum peynirinin de küflendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Çakır ve Çakmakçı, 2024).

2.1.5. Küflü Peynirlerde Aroma Profili ve Uçucu Bileşenler

Küflü peynirlerde *Penicillium* cinsi küflerin baskın türleri oluşturduğu, özellikle bu peynirlere tat, koku, aroma ve mavi-yeşil rengi veren *P. roqueforti*'nin ön plana çıktığı belirtilmiştir (Cakmakci vd., 2012a; Ozturkoglu-Budak, 2016a; Kırtıl vd., 2021; Seri ve Metin, 2021). Mavi peynirlerin ortak özelliği, olgunlaşma sürecinde bu peynirlere has mavi-yeşil renk oluşumunu sağlayan ve aroma, lezzet ve görünümü kazandıran *P. roqueforti* türüdür (Ardö, 2011; Cantor vd., 2017). Mavi-yeşil renkli küf gelişiminden dolayı Konya Küflü Tulum, Erzurum Küflü Civil gibi peynirlerimiz, Avrupa tipi Rokfor, Stilton gibi mavi peynirler grubuna yakın olarak değerlendirilebilir. Ancak yöresel küflü peynirlerimiz hem tekstür olarak hem de tat, aroma ve lezzet olarak bu tip peynirlerden farklıdır. Son yıllarda, Rokfor ve diğer Avrupa peynirlerinden izole edilen *P. roqueforti* çeşitliliği ve peynir üretiminde oluşturduğu farklılıklar çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Fernandez-Bodega vd., 2009; Ropars vd., 2014; 2016; Gillot vd., 2015; 2017a; Coton vd., 2020; Dumas vd., 2020; Caron vd., 2021; Crequer vd., 2023; 2024).

Peynir üretiminde ve olgunlaşmasında, bir dizi kimyasal ve biyokimyasal aktiviteler sonucu çeşitli bileşikler oluşmaktadır. Bu aktivitelerin gerçekleşmesinde, starter kültür olarak kullanılan bakteriler yanında, sekonder starter olarak ortamda bulunan mayalar ve küfler önemli rol oynar (Avşar vd., 2011). Mavi küflü peynirlerin olgunlaşma sürecinde öne çıkan *P. roqueforti*'nin glikolitik, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri sayesinde küflü peynirler, kendine has organoleptik özelliklerini kazanır (Cantor vd., 2017; Yavuz vd., 2021; Lopez-Diaz vd., 2023; Martin ve Cotter, 2023). Peynirin olgunlaşma süreci, oldukça dinamik bir süreçtir. Bu süreçte, *P. roqueforti*'nin ekstrasellüler ve intrasellüler çeşitli proteaz (aspartil proteaz ve metalloproteaz), peptidaz (alkalin metalloamino-peptidaz, asit karboksi-peptidaz, alkalin karboksi-peptidaz ve amino-peptidaz) ve lipaz enzimleri aktif rol oynar (Coton vd., 2020; Lopez-Diaz vd., 2023). Süt bileşenlerinden kazeinler, trigliseritler, laktoz ve sitrat kullanılarak çeşitli uçucu bileşiklere dönüştürülür. Kazeinler ilk olarak, orta uzunlukta peptitlere, kısa peptitlere ve en son serbest aminoasitlere dönüşür (Larsen vd., 1998; Fernandez-Bodega vd., 2009; Gillot vd., 2017a). Bu süreç, peynirin lezzet gelişimini ve tekstürünü etkiler. Olgunlaşma sürecinde protein matriksinin hidrolizi, peynir tekstürünün yumuşamasına neden olur ve su aktivitesini (a_w) düşürür. Peynirde proteoliz yeterli değilse peynir kuru ve sert; çok fazla ise yumuşak olacaktır (Lopez-

Diaz vd., 2023). Lipolitik aktivite sonucu, çeşitli uçucu ve uçucu olmayan aroma bileşikleri oluşur. İlk olarak trigliseritler, lipaz enzimi ile serbest yağ asitlerine (free fatty acids, FFA) parçalanır (β -oksidasyon). Daha sonra, FFA'lar β -ketoasitlere ve bunlar dekarboksilasyonla metil ketonlara dönüşür. Metil ketonlar ise, ilgili sekonder alkollere indirgenir (Larsen ve Jensen, 1999; Salvatore vd., 2015). Laktoz ve sitrat kullanımı (glizolik) ile ortaya çıkan bileşikler, laktik asit, pirüvat, CO₂, diasetil, asetoin, 2,3-bütandiol, asetaldehit, asetik asit, etanol ve propiyonik asittir (Cantor vd., 2017; Yavuz vd., 2021; Lopez-Diaz vd., 2023). Peynirlerin uçucu bileşen profillerinde özellikle, primer ve sekonder alkoller, esterler, aldehitler, ketonlar, laktonlar, furanlar, azot bileşikleri, pirazinler, kükürt bileşikleri, terpenler, fenolik bileşikler, serbest yağ asitleri, alkenler ve alkanlar öne çıkmaktadır (Avşar vd., 2011; Fox vd., 2017; Lopez-Diaz vd., 2023). Bu bileşikler, olgunlaşma sürecinde küflü peynirlere has aromayı ve lezzeti geliştirir (Cantor vd., 2017; Lopez-Diaz vd., 2023).

Peynirde uçucu bileşenlerin ekstraksiyonu, izolasyonu ve tespitinde pek çok yöntem kullanılmaktadır. En çok kullanılan yöntemler; statik ve dinamik tepeboşluğu (headspace) teknikleri, katı-faz mikroekstraksiyon (solid-phase microextraction, SPME) yöntemi, sıvı-sıvı veya sıvı-katı direkt ekstraksiyonu (organik solvent yardımıyla), CO₂ ile yapılan süperkritik akışkan ekstraksiyonu, buhar distilasyonu veya düşük sıcaklık ve yüksek vakumda yapılan distilasyon, direkt termal desorpsiyon, karıştırıcı bar sorptiv ekstraksiyon ve olfaktometridir. Bu yöntemler, gaz kromatografisi ve kütle spektrometrisi sistemleriyle (GC, GC-MS ve GC-MS/MS) entegre edilir (Avşar vd., 2011; Yavuz vd., 2021).

Son yıllarda, küflü peynirlerimizde uçucu bileşen profilinin belirlendiği bazı çalışmalar yapılmıştır (Ozturkoglu-Budak vd., 2016b; Gurkan vd., 2018; Boran vd., 2023). Divle-Obruk peynirlerinin uçucu bileşen profilinde, bütanoik asit, asetik asit, valerik asit, etil-bütanoat, 2-bütanol, 2-bütanon, 2-heptanon, α -pinen ve toluen öne çıkmış ve 110 bileşik tespit edilmiştir (Ozturkoglu-Budak vd., 2016b). Küflü Civil peynirlerinde, 3-metil-bütanol, 2-nonanol, 2-heptanon, metil dodekanoat, bütanoik asit ve dekanolik asit başta olmak üzere, 85 uçucu bileşik tespit edilmiştir (Gurkan vd., 2018). Boran vd. (2023), ürettikleri küflü peynirlerde, 32 uçucu bileşik belirlemiş ve bunlardan 1-bütanol, 2-bütanol, 2-heptanol, nonan-2-ol, etil asetat, etil bütirat, hekzanoik asit ve oktanoik asit öne çıkmıştır. Ancak, Türkiye küflü peynirlerini temsil ettiği genetik çalışmaları ile belirlenmiş *P. roqueforti* suşlarının hem besiyerinde, hem

de model peynirde uçuğu bileşen profiline etkisinin incelendiği herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir.

2.2. Funguslarda Adaptasyon ve Yatay Gen Transferi

Organizmaların çevrelerine nasıl uyum sağladıkları ve biyoçeşitliliğin nasıl ortaya çıktığını anlamak için, adaptif ayrışma (adaptive divergence, seçilim altındaki popülasyonun farklılaşması) mekanizmalarını incelemek gerekir. Adaptif ayrışma, ortak bir atadan gelen organizmaların farklı çevre koşullarına ya da ekolojik nişlere uyum sağlamak için, hızla çeşitlenmesini içerir. Genetik farklılıkların ortaya çıkması ve bunların doğal seçilimle desteklenmesi ile, türler ya da bireyler arasında genetik farklılık ortaya çıkar (Tusso vd., 2021). Bu kavram, domestikasyon prosesini beraberinde getirmiştir (Ropars vd., 2015; Giraud vd., 2017). Domestikasyon sürecini geçirmemiş yakın akraba popülasyonlarının mevcut olması, bu popülasyonların özelliklerini ve genomlarının adapte olmuş popülasyonlarla karşılaştırılmasını mümkün kılar. Bu nedenle, adaptasyon mekanizmalarını aydınlatmak için, domestikasyon prosesini anlamak gerekir (Gladieux vd., 2014). Adaptasyona uğramış organizmalardaki genetik çeşitlilik ve alt bölünme çalışmaları, genetik kaynakların korunması için de önem arz eder (Cheeseman vd., 2014; Ropars vd., 2015). Funguslar, adaptif ayrışma çalışmalarında, deneysel çalışmalara uygulanabilirlikleri nedeniyle önemli ökaryotik modellerdir (Gladieux vd., 2014). Birçok fungus, gıda üretiminde kullanılır ve bu durum funguslarda değişikliklere yol açmıştır (Dupont vd., 2017). Özellikle gıda üretiminde kullanılan bazı maya ve küf türleri, aynı ortamda geliştirilip aktarıldığı için, zamanla yabani popülasyonlarından genetik olarak farklılaşmış ve insanlar için yararlı olan belirli fenotiplere evrilmiştir (Gallone vd., 2016; Dumas vd., 2020). Bu olay, domestikasyon olarak adlandırılmaktadır. Farklı gıdaların üretiminde kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*, adaptif ayrışmaya en önemli örnektir. Örneğin, bu mayanın farklı suşları, farklı gıdalarda kullanımında bağımsız olarak domestikasyon prosesinden geçmiştir (Novo vd., 2009). Benzer bir örnek olarak, sake, soya sosu ve miso üretiminde kullanılan *Aspergillus oryzae* verilebilir (Gibbons vd., 2012). Mikotoksijenik bir tür olan *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*'nin yabani akrabasıdır. *A. oryzae*, bu türün toksin üretmeyen bir soyunun, insan seçilimi altında adapte olmuş versiyonu olarak düşünülmektedir (Gibbons vd., 2012; Bodinaku vd., 2019).

Ekmek, şarap, bira ve peynir üretiminde kullanılan mayalar ve küfler üzerinde yapılan adaptasyon çalışmaları, yatay gen transferi (HGT) gibi genomik mekanizmaları açığa çıkarmıştır (Gibbons ve Rinker, 2015; Bodinaku vd., 2019). Önceleri HGT, prokaryotlar arasında yaygın, ancak ökaryotlarda nadir ve sınırlı etkilere sahip bir mekanizma olarak kabul edilmekteydi (Keeling, 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, aynı ya da farklı türlere ait genomlar arasında, hatta prokaryot kökenli bir genetik materyalin bir ökaryot konağa aktarıldığını gösteren örneklere rastlanmıştır (Cheeseman vd., 2014; Ropars vd., 2015). Bu transferlerde yer alan genlerin sayıları ve boyutları farklılık göstermekte ve tek bir genin, tam bir metabolik yolun ya da neredeyse tüm genomun ökaryotik konaklara entegrasyonu gibi durumlar belirlenmiştir (Andersson vd., 2009; Syvanen, 2012). HGT'nin retrotranspozonlar, hareketli DNA elemanları, tekrarlı indüklenmiş nokta mutasyonları ve hibridizasyon gibi araçlar ve mekanizmalar ile sağlanmış olabileceği vurgulanmıştır (Dumas vd., 2020).

Avrupa tipi peynirlerden izole edilen *Penicillium* türlerinde (*P. roqueforti*, *P. camemberti* ve diğer bazı *Penicillium* türleri), peynir kaynaklı suşların çoğunda yatay olarak aktarıldığı düşünülen genomik bölgeler (horizontal gene transfer regions, HGTs) tespit edilmiş ve bu bölgelerin, farklı türler arasında birbiriyle %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu bölgelerden *Wallaby*, 500 kb büyüklüğünde olup, 250'den fazla geni barındırmakta; bir diğeri, *CheesyTer* ise yaklaşık 80 kb'lık bir bölge olup, 40 kadar gen içermektedir (Cheeseman vd., 2014; Ropars vd., 2015). *Wallaby* bölgesinin peynir kaynaklı küflere, bazı antimikrobiyal fonksiyonları ve diğer türlere karşı rekabetçi özellikleri kazandırdığı bildirilmektedir (Ropars vd., 2015). *CheesyTer* bölgesinin ise, laktoz permeaz, β -galaktosidaz gibi laktoz metabolizmasından sorumlu enzimleri kodlayan genleri ve gelişme hızına etki eden genleri barındırdığı ifade edilmektedir (Cheeseman vd., 2014). Böylece peynir dışı ortamdan ve çeşitli kaynaklardan gelerek asırlar boyunca peynir matriksinde üreyen küflerin, peynir ortamına adapte olmasının ve bu ortamda gelişme göstermesinin, peynir küflerinin evriminde önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır (Dumas vd., 2020; Ropars vd., 2020a). Ayrıca, *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgelerini genomlarında barındıran izolatlar, peynirde diğer mikotoksijenik türlerin gelişimini baskılayabilir ve böylece biyokontrol ajanı olarak görev yapabilir (Hymery vd., 2014; Perrone ve Susca, 2017).

2.3. Funguslarda Genetik Çeşitlilik

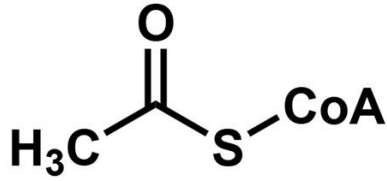
Fungusların büyük çeşitliliğe sahip olduğu düşünülmekte ve bu çeşitlilik içerisinde, yaklaşık 1,62 milyon türün olduğu tahmin edilmektedir (Hawksworth vd., 1991). Ancak, bu organizmaları tanımlamadaki kısıtlar nedeniyle oldukça az sayıda tür belirlenebilmiştir. Ekolojik nişlerinde farklılık gösteren ve bu nedenle incelenmesi gereken birçok tanımlanmamış kriptik türün bulunduğu öngörülmektedir (Giraud vd., 2008). Bu türlerin tanımlanmasında ve genetik olarak farklılıkların belirlenmesinde, mikrosatellitler ve polimorfik lokuslar sıklıkla kullanılmaktadır (Gillot vd., 2015). Polimorfik lokuslar, farklı bireyler ve popülasyonlar arasında, genetik çeşitlilik gösteren DNA bölgeleridir ve baz dizilimindeki farklılıklar şeklinde ortaya çıkar. Böylece bir popülasyonda, farklı aleller taşıyan bireyler belirlenebilir ve birbirinden ayırt edilebilir (Taylor vd., 1999a). Alel, bir genin bir özelliğini, karakterini belirleyen alternatif formdur (Shapiro vd., 2018). Mikrosatellitler, evrensel olarak genomda yaygın bulunan kodominant (heterozigotlarda her iki alel çiftinin de etki göstermesi) genetik markörlerdir ve genomdaki DNA diziliminin en değişken lokuslarından (Madesis vd., 2013). Homozigotluk, bir bireyin belirli bir lokus için özdeş alellere sahip olması; heterozigotluk ise, bir genin iki farklı alel bulundurmasıdır (Griffiths vd., 2004). Basit dizi tekrarları (simple sequence repeats – SSRs, basit tekrarlı diziler; simple repetitive sequences – SRS) veya genomda bir lokusta arka arkaya gelen kısa ardışık tekrarlar (simple tandem repeats – STRs) olarak, Litt ve Luty (1989) ve Tautz (1989) tarafından tanımlanmıştır. Bu lokuslar, ökaryotik genom boyunca kısa tekrarlı nükleotid dizileri halinde yer almakta ve genetik ilişkinin belirlenmesi, popülasyon genetiği, genom haritalama gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır (Bagshaw, 2017). Bu diziler, genellikle 1-6 baz çifti uzunluğunda olup, tekrar sayısı 100'den daha azdır ve bu tekrarlar $(CA)_n$, $(AT)_n$, $(CAA)_n$ vb. şeklinde gösterilmektedir (Özşensoy ve Kurar, 2012; Madesis vd., 2013). Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizilerinin bir türe ait bireylerde aynı olmasına karşın, mikrosatelit dizilerin tekrar sayısı bireyler arasında değişebilmektedir. Böylece tür içi polimorfizm de tespit edilebilmektedir. Polimorfizm, genomda belirli bir DNA dizisinin, farklı bireyler veya popülasyonlar arasında iki ya da daha fazla varyant formunun bulunmasıdır. En çok görülen polimorfizm çeşidi, bir DNA dizisindeki tek bir nükleotidin değişimi ile oluşan tek nükleotid polimorfizmi (SNP)'dir. Bunun yanı sıra, mikrosatellitler ve polimorfik

lokuslar gibi, daha büyük DNA parçalarını içeren, daha uzun dizilerdeki nükleotid farklılıklarını kapsayan polimorfizmler de bulunmaktadır (Karki vd., 2015).

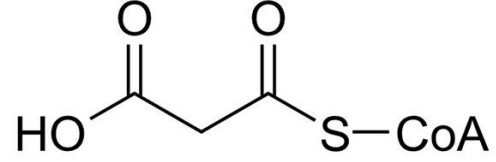
2.4. Funguslarda İkincil Metabolizma ve Mikotoksinler

Sekonder metabolitler, organizmanın yaşamını sürdürmesi için doğrudan gerekli olmayan, ancak çeşitli biyolojik rollere sahip, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Brakhage vd., 2013). Bu metabolitler arasında, antibiyotikler, mikotoksinler ve bazı biyoaktif bileşikler bulunmaktadır. Bazıları tıp ve farmakoloji alanında kullanılırken, bazıları insan sağlığına zararlı etkiler gösterebilir. Mikotoksinler, kanserojen, mutajen veya teratojen etkilerle sağlık sorunlarına yol açmanın yanı sıra ekonomik kayıplara da neden olabilir (Hymery vd., 2014). Sekonder metabolitlerin sentezi, terpen sentaz, poliketid sentaz ve ribozomal olmayan peptid sentaz gibi kompleks enzimlerin aktiviteleri ve bu enzimleri kodlayan genlerle kontrol edilir. Bu süreci yöneten genler, genellikle birbirine yakın bir şekilde yerleşmiş ve bir gen kümesi içinde organize edilmiştir (Brown vd., 2011). Bu metabolitler, asetil-CoA türevi poliketidler, asetil-CoA türevi terpenler ve aminoasit türevi peptidler şeklinde gruplandırılabilir. Küflerde sekonder metabolitlerin sentez yolları beş başlıkta özetlenebilir (Sweeney ve Dobson, 1999; Yun vd., 2015; Atanasova-Penichon vd., 2018; Li vd., 2020; Dai vd., 2022; Wu vd., 2022; Metin, 2023; Stroe vd., 2023). Bunlar:

Poliketid Sentaz (PKS) Yolağı: Poliketidlerin sentezi, poliketid sentazların (PKS) asetil-CoA ve malonil-CoA gibi birimlerinin (Şekil 2.8) art arda bağlanması ile gerçekleşir. PKS'ler, yağ asidi sentazlarına (FAS) benzer şekilde birden fazla işlevsel bölgeye (domain) sahip enzimlerdir (Stroe vd., 2023; Wang vd., 2023). Poliketidler, en önemli sekonder metabolitler gruplarından (Brakhage vd., 2013). Aflatoksinler, fumonisinler, okratoksinler ve zearalenon gibi mikotoksinler, bu yolak ile sentezlenir (Avalos ve Limon, 2022; Wang vd., 2023). Ayrıca PKS yolağı ile, *P. roqueforti*'nin ürettiği mikofenolik asit ve andrastin A da sentezlenir (Chavez vd., 2023; Metin vd., 2023).



Asetil-CoA



Malonil-CoA

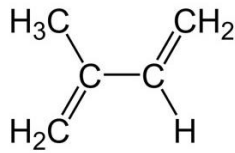
Şekil 2.8: Asetil-CoA ve Malonil-CoA birimlerinin kimyasal yapısı

Kaynak: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acetate_pathway.svg>;

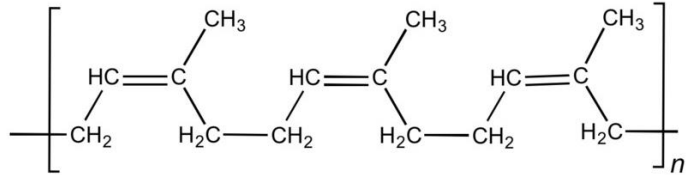
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malonyl-CoA_ACP_transacylase_reaction.svg>

Erişim Tarihi: [05.01.2025]

Terpen Sentaz (TPS) Yolağı: Terpenoid bileşikler, terpen sentazların izopren (C₅H₈) birimlerini (Şekil 2.9) birleştirmesi ve düzenlenmesiyle sentezlenir. Bu bileşikler, monoterpenler (iki izopren birimi), seskiterpenler (üç izopren birimi), diterpenler (dört izopren birimi) olmak üzere üçe ayrılır ve izopren birimlerinin farklı kombinasyonlarıyla çeşitlenebilir (Brakhage vd., 2013; Avalos ve Limon, 2022). Trikotesenler (DON, T-2 ve HT-2 toksinleri), fumitremorgen gibi bazı toksinler ve *P. roqueforti*'nin ürettiği uçucu bileşiklerden monoterpenler ve seskiterpenler, terpen sentaz aktivitesiyle üretilir (Atanasova-Penichon vd., 2018; Chavez vd., 2023; Metin vd., 2023).



İzopren



Poliizopren

Şekil 2.9: İzopren ve ikiden fazla izopren biriminden oluşan poliizopren (terpen) birimlerinin kimyasal yapısı

Kaynak: <<https://picryl.com/media/isoprene-structure-489531>>;

<<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PolyIsopreneCorrected.png>>

Erişim

Tarihi: [05.01.2025]

Ribozomal Olmayan Peptid Sentaz (NRPS) Yolağı: Aminoasitlerin birleşimi katalize edilerek, NRPS enzimleri tarafından ribozomal olmayan yolla peptid yapılı bileşikler sentezlenir. NRPS enzimleri, sadece 20 aminoasiti değil, aynı zamanda

hidroksi-, metil-, β -aminoasitler gibi modifiye aminoasitleri, yağ asitlerini ve α -hidroksi asitleri de yapıya dahil edebilir (Viggiano vd., 2020; Dai vd., 2022).

Hibrit PKS-NRPS Yolağı: Bu yolak ile, çeşitli kimyasal özelliklere sahip aminoasitler ile farklı poliketid birimleri birleşerek, çeşitliliği ve işlevselliği artan metabolitler sentezlenir (Viggiano vd., 2020). Enniatinler ve tenuazonik asit gibi mikotoksinler, bu şekilde hem PKS hem de NRPS enzimlerinin ortak aktivitesini içeren yolak ile üretilir (Yun vd., 2015; Li vd., 2020).

Şikimat ve Mevalonat Yolağı: *P. roqueforti*'nin ürettiği bazı indol alkaloidleri (izofumigaklavin, agroklaivin, festuklaivin gibi klavinler), triptofan ile başlayarak sentezlenir. Şikimat yolağı ile üretilen korizmat, triptofan sentezi için ara bileşiktir. Mevalonat yolağı ile, klavin alkaloidlerindeki izoprenoid yapılar ve izopren birimleri birleşerek terpenoid yan zincirleri sentezlenir (Wolff vd., 2020). Rokfortin C de bu yolak kullanılarak üretilir (Fernandez-Bodega vd., 2017).

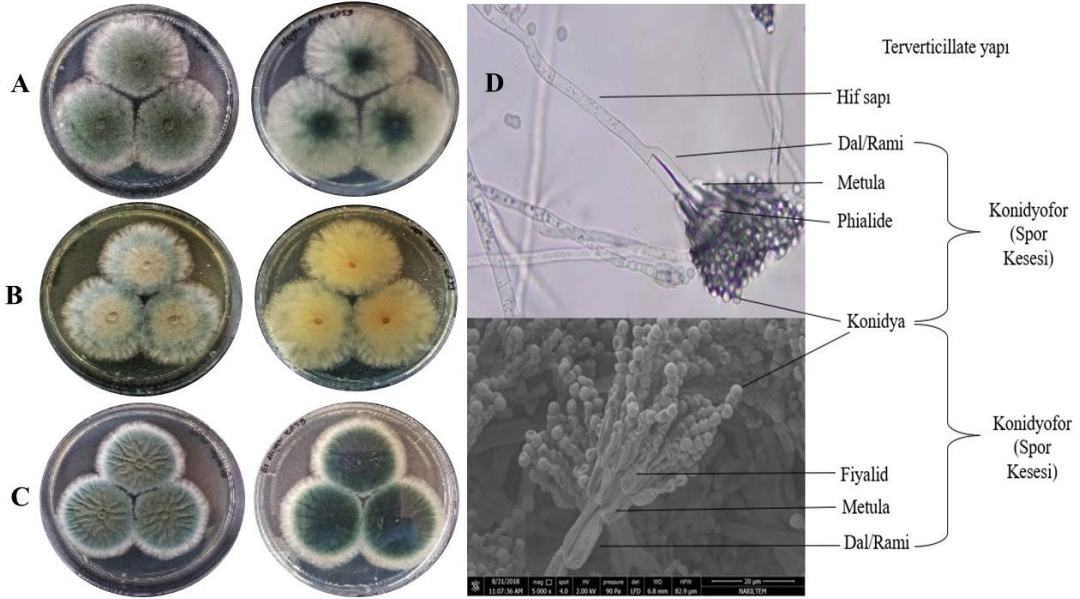
2.5. *Penicillium roqueforti*

Saprotrof ve filamentli bir fungus türü olan *P. roqueforti*, genellikle tahıl, yem, kereste gibi ortamlardan izole edilir. Bu tür, olgunlaşma sürecinde, küflü peynirlere has aroma, lezzet ve görünümü kazandırır (Ardö, 2011; Cantor vd., 2017; Coton vd., 2020; Kırtıl vd., 2020).

2.5.1. *P. roqueforti*'nin Morfolojik Özellikleri

P. roqueforti koloni morfolojisini incelemek için, çoğunlukla patates dekstroz agar (PDA), maya ekstraktı sükroz agar (YES), malt ekstraktı agar (MEA), yulaf ezmesi agar (OA), Czapek-Dox agar (CDA), Czapek maya ekstraktı agar (CYA), kreatin ve sükroz agar (CREA) besiyerleri kullanılmıştır (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014). Koloni çapı, CDA'da ve MEA'da 14 gün inkübasyon sonrası 40-70 mm büyüklüğüne ulaşır ve konidyumları (eşeysiz sporlar) tipik mavi-yeşil renktedir (Coton vd., 2020). Farklı *P. roqueforti* suşlarının PDA üzerinde, makroskopik farklılıklar gösterdiği belirlenmiş ve 9 farklı morfotip saptanmıştır (Gillot vd., 2015). Konidyum denilen eşeysiz sporlar, açık yeşil, gri, koyu yeşil, sarımsı ya da zeytin yeşili renklerinde olabilir (Şekil 2.10). Koloni dokusu ise, kadifemsi ile yünlü yapı arasında

değişebilir. Koloni kenar genişliği de değişmektedir. Koloni yüzeyinde ise, eksüdat (hücre dışına salgılanan sıvı) oluşumu bildirilmiştir. Miseller, 100-200 µm uzunluğunda hif uzantılarına yani, uzun ipliksi yapılara sahip konidyoforlardan (spor keseleri) oluşur (Şekil 2.10). Konidyoforlar, genellikle üç dallıdır (terverticillate yapı). Konidyoforların ucunda, silindirik metulalar ve onların ucunda şişe şeklinde fiyalidler bulunur. Fiyalidler, 3-4,5 µm çapında küresel şekilli konidyumlar (konidya) üretir (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014; Coton vd., 2020).



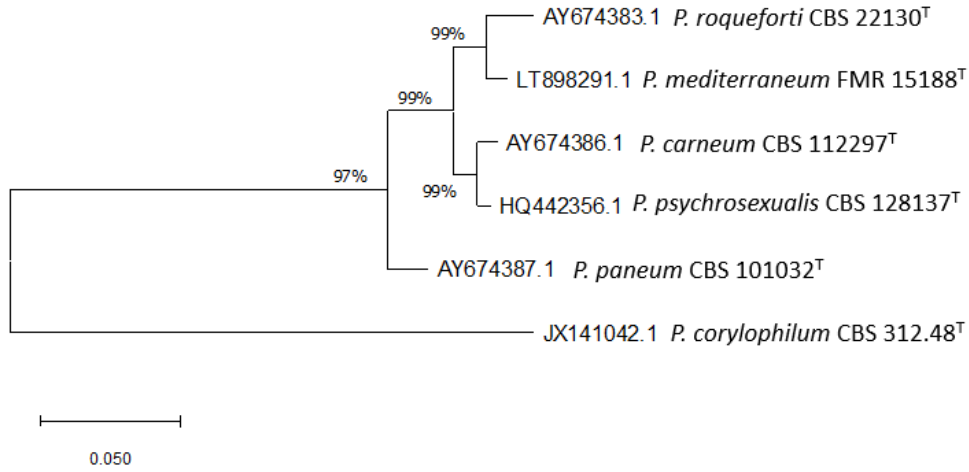
Şekil 2.10: Bir *P. roqueforti* izolatının (A) PDA besiyerinde ön-arka, (B) MEA besiyerinde ön-arka, (C) YES agar besiyerinde ön-arka koloni morfolojileri ve misel yapısı

Kaynak: Kırtıl, 2018; Kırtıl vd., 2020; Seri ve Metin, 2021

2.5.2. *P. roqueforti*'nin Taksonomik Özellikleri

P. roqueforti, *Aspergillaceae* ailesinden (şube, altşube, sınıf, takım: *Ascomycetes*, *Pezizomycotina*, *Eurotiomycetes*, *Eurotiales*) *Penicillium* cinsine ait 354 tür arasında bulunmaktadır (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014). Ayrıca bu tür, filogenetik olarak yakın olduğu *P. carneum*, *P. paneum*, *P. psychrosexualis* ve *P. mediterraneum* ile birlikte *Roquefortorum* serisinde yer almaktadır (Houbraken vd., 2016; Guavera-Suarez vd., 2020; Coton vd., 2020). *P. carneum*, *P. paneum* ve *P. psychrosexualis*, farklı ekstroliit üretimleri ve *benA* (beta-tubulin) gen dizisinde yer alan değişiklikler (polimorfizm) ile *P. roqueforti*'den ayrılmıştır (Houbraken vd.,

2010). Ayrıca, İspanya’da otobur hayvan dışkısı örneklerinden izole edilmiş olan *P. mediterraneum*, ITS (internal transcribed spacer), *benA*, *cmdA* (calmodulin) ve *rpb2* (RNA polimeraz II alt birimi) genleri dizilimleri kullanılarak birleştirilmiş filogenetik analiz ile, farklı bir tür olarak tanımlanmıştır (Guavera-Suarez vd., 2020). Şekil 2.11’de *Roquefortorum* serisinde yer alan beş türün *benA* dizilimleri ve maksimum-likelihood metodu kullanılarak elde edilen filogenetik ilişkisi gösterilmiştir (Kırtıl vd., 2020).



Şekil 2.11: *Roquefortorum* serisinin filogenetik ilişkisi

Kaynak: Kırtıl vd., 2020

Peynir küflerinin moleküler tanımlanmasında, 18S rRNA ve 28S (D1/D2) rRNA üniversal gen bölgeleri, yetersiz kalmakta ve türler arası ayrımı sağlamamaktadır. Bu nedenle tanımlamada, ITS bölgesinin yanı sıra, *benA*, *cmdA* ve *rpb2* genlerinden türetilen markörler ile MLST analizi (çoklu bölge dizi tiplemesi) tercih edilmektedir (Houbraken vd., 2010; Visagie vd., 2014; Houbraken vd., 2016; Guevara-Suarez vd., 2020).

2.5.3. *P. roqueforti*'nin Genomu ve Genetik Özellikleri

İlk dizilenen *P. roqueforti* genomu (FM164 suşu), 2013 yılında erişime (GenBank erişim numarası: GCA_000513255.1) açılmıştır (Cheeseman vd., 2014). Bu genomun boyutu 28,4 Mb olup, %48,7 GC içeriğine sahiptir ve 12.425 gen içerdiği tahmin edilmiştir. Ayrıca bu genlerin, 12.319 proteine ve 106 psödogene karşılık geldiği ifade edilmiştir.

2.5.4. *P. roqueforti*'nin Üreme Özellikleri

Funguslar, çoğunlukla eşeysiz üreyen türlere sahip bir grup olarak kabul edilmiştir. (Taylor vd., 1999b). Ancak popülasyon genetiği ve genomik karakterizasyon çalışmaları sonucunda, eşeysiz olarak ürettiği varsayılan türlerde, eşeyli üremeye özgü özellikler tespit edilmiş ve laboratuvar çalışmalarında birçok tür için eşeyli üreme gösterilmiştir (Ropars vd., 2012b).

Çoğu ökaryot, yaşam döngülerinin en az bir noktasında eşeyli üreme ile rekombinasyon yapabilmektedir (Birky vd., 1999). Eşeyli üreme, türlerin uzun vadeli devamlılığı için elzem görülmektedir. Deneysel çalışmalar, eşeyli üremenin, eşeysiz üremeye kıyasla zararlı mutasyonların birikimini azalttığını göstermiştir (Bruggeman vd., 2003). *P. roqueforti*'nin bazı koşullarda eşeyli üreme yapabildiği ve insandaki X ve Y kromozomlarına benzer şekilde, iki ayrı eşey tipi ile karakterize iki ayrı eşey genotipi (*MAT1-1* ve *MAT1-2*) belirlenmiştir (Ropars vd., 2012b). *MAT* genleri, eşeyli üremeyi sağlayan feromonlar ve feromon reseptörlerinin üretimini indükleyen transkripsiyon faktörlerini kodlar (Ropars vd., 2014). Ancak, peynir üretiminde starter olarak kullanılan *P. roqueforti* suşlarında eşeyli üreme, ne doğal ne de kontrollü şartlar altında gözlemlenmiştir. Çünkü endüstriyel suşlar, üreticileri tarafından klonal olarak çoğaltılır (Ropars vd., 2014). Ropars vd. (2012b), farklı ortamlardan izole ettikleri *P. roqueforti* suşlarının eşey tiplerini belirlemişler ve sonraki çalışmalarında (Ropars vd., 2014), bu suşlardan farklı eşey tiplerine sahip olanları çaprazlayarak eşeyli üremeyi indüklemişlerdir.

Eşeyli üreme, suş geliştirme çalışmalarının çaprazlama vasıtasıyla zıt eşey tiplerine sahip suşlar kullanılarak yapılmasına olanak vermektedir (Böhm vd., 2013). Ayrıca, eşeyli üreme, hem rekombinasyonun sağlanmasını, endüstriyel suşların dönüştürülmesini ve iyileştirilmesini, yeni fenotiplerin oluşturulmasını ve klonal çoğalma sonucu biriken zararlı mutasyonların ve dejenerasyonun ortadan kaldırılmasını mümkün kılabileceği, hem de daha ekonomik olduğundan önem taşımaktadır (Ropars vd., 2014). Bu sayede, farklı fenotipik ve genotipik özelliklere sahip yeni bireyler geliştirilerek yeni sekonder starterler üretilebilir.

2.5.5. *P. roqueforti*'nin Popülasyon Yapısı

Funguslarda, mikrosatelitlerin türe özgü tanımlamada güçlü bir markör olduğu ifade edilmiştir (Giraud vd., 2010; Gillot vd., 2015; Demers ve Jimenez-Gasco, 2016). Peynir yapımında kullanılan funguslar, gıdalarda kullanım ile insan seçilimi altında çeşitlenmiş ve spesifik özellikler kazanmıştır. Ropars vd. (2014), 11 mikrosatelit markörü kullanarak, genetik olarak farklı *P. roqueforti* popülasyonları tespit etmiştir. Bu çalışmada, popülasyonlar içinde rekombinasyon izleri bulunmasına rağmen, genetik kümeler arasında gen akışının az olduğu tespit edilmiştir. Rekombinasyon, genetik materyalin yeniden düzenlenmesini sağlar (Griffiths vd., 2004). Gen akışı, alellerin bir popülasyondan diğerine başarılı bir şekilde aktarılmasıdır. Bu süreç, popülasyonlar, türler, bireyler arasındaki genetik çeşitliliği artırabilir, nadiren azaltabilir ya da bazen adaptasyonlara karşı bir denge unsuru olarak hareket edebilir (Ellstrand ve Rieseberg, 2016). Gillot vd. (2015), Avrupa tipi küflü peynirlerden izole edilen *P. roqueforti* suşlarında 8 polimorfik lokus (*benA*, *cmd*, *cct8*, *tsr1*, *mcm7*, *Proq235*, *Proq631*, *Proq845*) ve 4 mikrosatelit bölgesi (*Proq16*, *Proq17*, *Proq01_3*, *Proq02_2*) tespit etmişlerdir. Böylece bu lokuslardan dizayn edilen primerler ile mikrosatelit bölge uzunluğunu belirleyerek veya dizilim analizleri ile, bu suşların genetik çeşitliliğini tespit etmiş ve suşları, peynir çeşidine spesifik olarak farklı popülasyonlarda sınıflandırmışlardır.

Son çalışmalarda, *P. roqueforti*'nin beş farklı popülasyonu belirlenmiştir (Tablo 2.2). Bu gruplar, Rokfor peyniri, Termignon peyniri ve diğer mavi peynir izolatlarının yer aldığı üç peynir popülasyonundan ve gıda kontaminantı olarak değerlendirilen, kereste ve silaj gibi peynir dışı farklı ekolojik ortamlardan gelen iki popülasyondan oluşmaktadır (Gillot vd., 2015; Coton vd., 2020; Dumas vd., 2020; Crequer vd., 2023) (Tablo 2.2). Bu popülasyonlar, fenotipik, genotipik ve metabolik farklılıklar göstermektedir. Diğer mavi peynir izolatlarının yer aldığı Popülasyon 4 ve Termignon izolatlarından oluşan Popülasyon 5, *Wallaby* ve *CheesyTer* gen bölgelerini barındırmaktadır. Ayrıca Popülasyon 4'te, mikofenolik asit biyosentezinde anahtar gen olan *mpaC*'de 174 bp'lik bir delesyon olduğu için, bu toksinin üretimi tespit edilememekte ya da oldukça düşük düzeyde yapılmaktadır (Gillot vd., 2017b; Coton vd., 2020; Crequer 2024). Rokfor peynirinin izolatlarından oluşan Popülasyon 3 izolatlarının genomunda, gıda dışı kaynaklardan izole edilen Popülasyon 1 ve Popülasyon 2'deki gibi, HGT bölgeleri bulunmamakta ve *mpaC* geni yer almaktadır.

Rokfor peyniri popülasyonunun farklı bir kaynaktan (peynir dışı ortam), mağara ortamından gelerek peynire yerleşmiş olabileceği öne sürülmüştür (Ropars vd., 2017). Ayrıca bu popülasyon, Rokfor peynirinin geleneksel üretiminde, çavdar ekmeğinde geliştirilip peynire bulaştırıldığı için de, diğer peynir popülasyonlarından farklı özellikler kazanmış olabilir (Ropars vd., 2017; Dumas vd., 2020). Termignon peyniri popülasyonu (Popülasyon 5) ise, diğer iki peynir popülasyonundan farklı genetik ve metabolik özellikler göstermiştir. Bu peynir, Fransız Alpleri’nde geleneksel yöntemle ve spontan küflendirme ile üretilmektedir. Peynir popülasyonları arasındaki farklılıkların, ortam koşullarındaki ve geleneksel peynir üretimindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (Crequer vd., 2023; 2024).

Tablo 2.2: İzolasyon kaynaklarına göre *P. roqueforti* popülasyonlarının özellikleri

Popülasyon Çeşidi	İzolasyon Kaynağı	HGT Bölgeleri		Metabolitler	
		Wallaby	CheesyTer	<i>mpaC</i> Geni Delesyonu	Metabolitler
Popülasyon 1	Kereste*	-	-	-	10’den fazla metabolit ve 60’tan fazla uçucu bileşik**** üretimi
Popülasyon 2	Silaj*	-	-	-	
Popülasyon 3	Rokfor peyniri	-	-	-	
Popülasyon 4	Diğer mavi peynirler	+	+	+**	
Popülasyon 5	Termignon peyniri	+***	+	-	

*Gıda kontaminantı (gıdalarda bozulmaya yol açan) olarak değerlendirilmiştir.

**Mikofenolik asit biyosentezinde anahtar gen olan *mpaC*’de delesyon olduğundan mikofenolik asit üretimi düşük/yok.

***Bu bölge, Popülasyon 5’e ait 4 izolattan 2’sinde tespit edilmiştir.

****Popülasyon 1, 2, 3 ve 5’teki suşlar, uçucu bileşik çeşitliliğine sahipken; Popülasyon 4’te çeşitlilik oldukça düşük.

Kaynak: Coton vd., 2020; Dumas vd., 2020; Crequer vd., 2023; 2024

2.5.6. *P. roqueforti*’nin Fizyolojisi ve Metabolik Özellikleri

P. roqueforti’nin gelişmesi için optimum koşullar, 25 °C’de aerobik bir ortamda 5-7 gündür. Bu tür, peynir üretiminde zorlu çevresel koşullara yüksek derecede tolerans gösterir; peynirin olgunlaşma sıcaklığı 10-12 °C’de, hatta 4-5 °C’de depolama sıcaklığında da gelişmeye devam eder. Mikroaerofilik koşullara, yüksek konsantrasyonlardaki CO₂’ye ve propiyonik asit, sorbik asit, laktik asit, asetik asit gibi organik asitlere dayanıklıdır. *P. roqueforti*, pH 3-10,5 aralığında gelişebilir ve optimum gelişme pH’ı 6’dır. Ayrıca, %5’e kadar NaCl içeren ortamlarda gelişmeye devam eder (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014; Coton vd., 2020).

P. roqueforti, geniş pH toleransı, pentozları ve heksozları metabolize etme kabiliyeti gibi özellikleri ile, uygun fermentasyon koşulları altında, hem temel metabolik aktiviteleriyle primer metabolitler, hem de yaşamsal faaliyetler için elzem olmayan sekonder metabolitler üreten potansiyel bir hücre fabrikasıdır (Mioso vd., 2015; Metin, 2023). Birçok *P. roqueforti* suşu, laktoz permeaz ve β -galaktosidaz enzimlerini kullanarak laktozu metabolize eder (Ropars vd., 2015; Coton vd., 2020). Proteolitik ve lipolitik aktiviteleri gelişmiştir ve bu aktiviteler sonucu, biyoaktif peptitler ile 2-heptanon, 8-nonen-2-on, 2-tridekanon gibi uçucu bileşikler üretir. Ayrıca, *P. roqueforti*, mavi-yeşil renk pigmentlerinin üretiminden sorumlu olan melanin biyosentezi gen kümesine sahiptir. Bu mekanizma, spor yüzeyini kaplayan pigment oluşumunu sağlar ve küflü peynirler kendine has mavi-yeşil damarlı görünümünü alır (Bodinaku vd., 2019; Coton vd., 2020; Cleere vd., 2024). *P. roqueforti*'nin DHN-melanin biyosentez gen kümesi tanımlanmış olup, 19 kb büyüklüğünde 6 geni içermektedir. UV mutajenez yöntemleriyle gen kümesinde yapılan değişiklikler sonucunda kahverengi, pembe, yeşil, koyu mavi ve beyaz gibi farklı renklerde sporlar elde edilebileceği ve bu çeşitliliğin peynir endüstrisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Cleere vd., 2024).

2.5.7. *Penicillium roqueforti*'nin İkincil Metabolitleri

P. roqueforti'nin sekonder metabolitleri arasında, rokfortin A, C ve D, mikofenolik asit, PR toksin ve klavin alkaloidleri (izofumigaklavin A ve B, agroklavin, festuklavin) gibi mikotoksinler öne çıkarken, antitümör özellikler gösteren andrastin A ve B gibi biyoaktif bileşikler de yer alır (Nielsen vd., 2006; Hymery vd., 2014; Garcia-Estrada ve Martin, 2016). *P. roqueforti*'nin son çalışmalarda, sekonder metabolitleri arasında sitreozokumarin, eremofortinler (A-E), orsellinik asit, sesterterpenoidler (peniroksin A-C, 1-7 ve rokformin A), tetrapeptidler (D-Phe-L-Val-D-Val-L-Phe ve D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr), *cis*-bis(metiltilyo)silvatin, saytalon (scytalone), melanin ve annullatin D bildirilmiştir (Hammerl vd., 2019a, 2019b; Chavez vd., 2023; Metin vd., 2023).

Mikotoksin üretimini, genetik faktörler, epigenetik düzenleme ve çevresel faktörler etkileyebilir (Brown vd., 2011; Fontaine vd., 2015a). Genetik faktörler arasında, gen kümelerindeki mutasyonlar, delesyonlar sayılabilir. Gen kümelerindeki genlerin aktifleşerek ifade edilmesi ya da sessizleşmesi oldukça karmaşık epigenetik

düzenlemeler ile sağlanabilir (Brakhage vd., 2013). Mikotoksin üretimini etkileyen çevresel faktörlere pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, oksijen miktarı, substrat koşulları ve ortamdaki mikroorganizmaların birbirleriyle etkileşimi (interaksiyon) gibi etkenler örnek verilebilir (Fontaine vd., 2015a). Örneğin, peynir ortamında PR toksin, mikroaerofilik koşullar ve peynirdeki amino asit kompozisyonu nedeniyle daha az kararlı bir form ve daha düşük toksisiteye sahip olan PR imine dönüşür (Hymery vd., 2014).

Crequer vd. (2024)'e göre, Tablo 2.2'de verilen peynir harici popülasyonlar (Popülasyon 1 ve 2), peynir suşlarında bulunmayan çeşitli yağ asitleri, uçucu bileşikler ve terpenoidler üretmiştir. Peynir harici ortamdan gelen popülasyonların, buldukları ekolojik nişlerdeki zorlu koşullar nedeniyle, yüksek metabolit çeşitliliğini koruduğu tespit edilmiştir. *P. roqueforti*'nin evrimsel süreçte peynir üretimine adaptasyonu sonucu, belirli metabolitlerin üretimi azalmıştır. Özellikle peynir popülasyonları, peynir harici popülasyonlara göre daha düşük metabolik çeşitliliğe sahiptir. En güçlü domestikasyon sendromuna sahip olan diğer mavi peynirler popülasyonu (Popülasyon 4), tespit edilen metabolitler (mikofenolik asit, andrastin A ve PR toksini vb.) açısından en düşük üretim miktarına ve mikofenolik asit üretiminde anahtar olan *mpaC* geninde 174 bp'lik bir delesyona sahiptir ve bu da mikofenolik asit üretimini önemli ölçüde düşürmekte veya tamamen engellemektedir (Gillot vd., 2017b; Coton vd., 2020). Yine bu popülasyonda, PR toksin gen kümesindeki ORF 11'deki erken durdurma kodonu, PR toksininin tespit edilememesini ve eremofortin A ve B ara ürünlerinin birikimini açıklamaktadır. Rokfor popülasyonunda (Popülasyon 3), PR toksin veya eremofortin A ve B üretimi tespit edilmemiş, ancak bir indel veya çerçeve kayması mutasyonu bulunamamış, bu da aşağı regülasyonu düşündürmüştür. Termignon peynir popülasyonu (Popülasyon 5), peynir ve peynir dışı popülasyonlar arasında metabolit profilleri sergilemiştir.

Küflerin ürettiği ikincil metabolitlerden en önemlileri olan mikotoksinler, ekonomik zararlara ve sağlık problemlerine (kanserojen, teratojen, mutajen etkiler) neden olmaktadır (Martin ve Coton, 2017). Özellikle rokfortin C ve mikofenolik asit, *P. roqueforti*'nin ürettiği başlıca metabolitlerdendir. Rokfortin C, antibakteriyel özelliğinin yanında, düşük de olsa nörotoksik ve sitotoksik etkileri belirlenmiş bir mikotoksindir. Mikofenolik asit ise, antimikrobiyal ve immünosupresif özellikleri

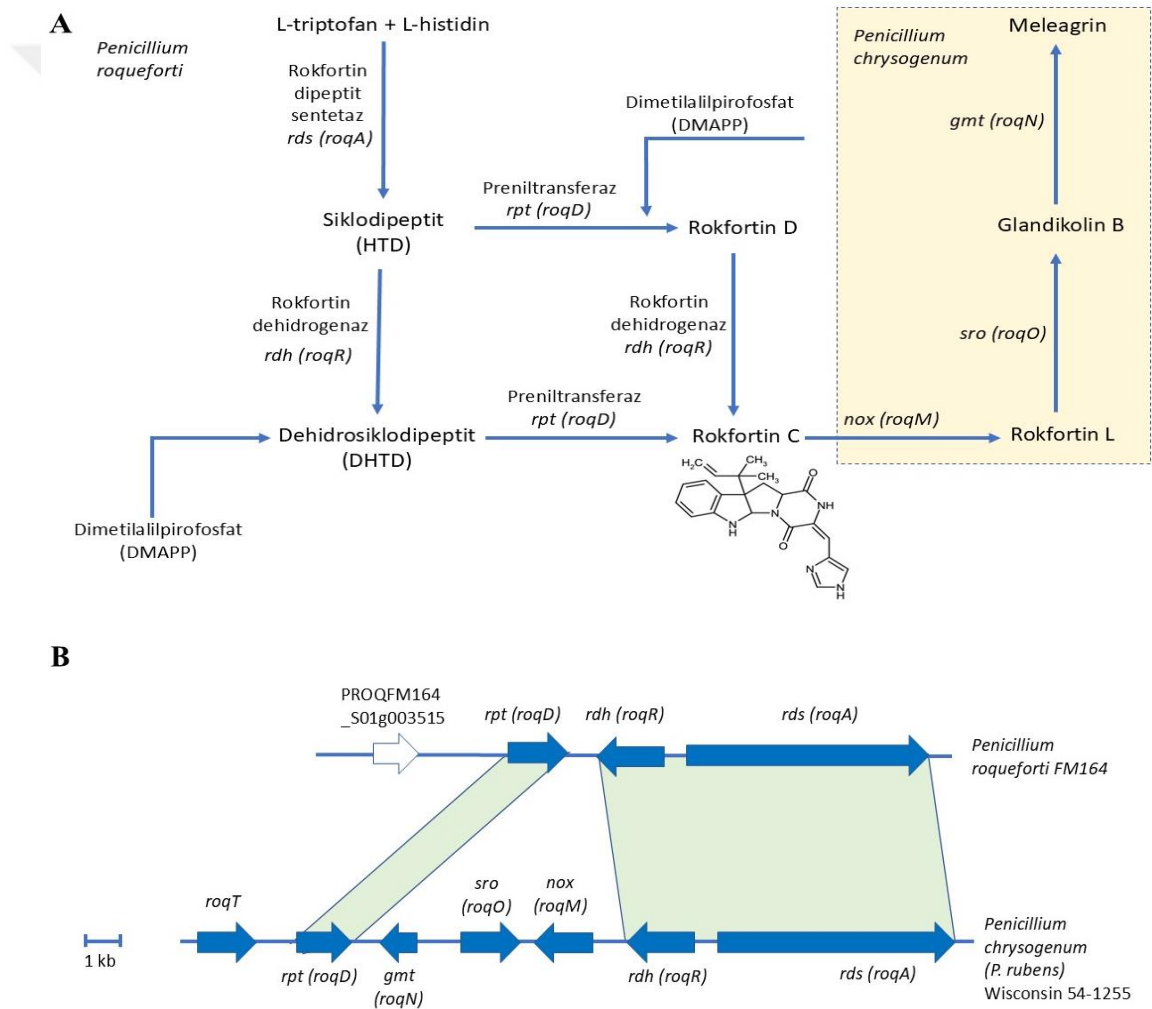
bulunan bir metabolittir. Mikotoksin oluşumunu, çevresel faktörlerin yanı sıra substrat yapısı da etkilemektedir (Fontaine vd., 2015a; Gillot vd., 2017b; Metin, 2023).

Mikotoksin tespitinde, enzim bağlı immunosorbent testi (ELISA) ve lateral akış cihazları gibi immunoassay tabanlı yöntemlerin yanında, ince tabaka kromatografisi (TLC), farklı dedektörlerle (FLD, UV, DAD ve/veya PDA) kombine edilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektroskopisi ya da kuadropol uçuş zamanlı kütle spektroskopisi ile birleştirilmiş sıvı kromatografisi (LC-MS, LC-MS/MS, LC-QTOF/MS) sıklıkla kullanılmaktadır (Gillot vd., 2017a; Agriopoulou vd., 2020; Janik vd., 2021).

Ülkemizde, küflü tulum ve küflü civil peynirlerinden izole edilen *P. roqueforti*'lerin mikotoksin üretimlerinin değerlendirildiği az sayıda çalışma mevcuttur (Erdoğan vd., 2003; Erdoğan ve Sert, 2004; Cakmakci vd., 2012a; 2015; Ertaş Onmaz vd., 2021; Ozturkoglu-Budak vd., 2023). Ancak, Erdoğan vd. (2003); Erdoğan ve Sert (2004) ve Cakmakci vd. (2012a) çalışmalarında, *P. roqueforti* izolatlarının bazı mikotoksinleri araştırılmış, ancak sadece kalitatif analiz yapılmıştır. Cakmakci vd. (2015), küflü civil peynirinden izole ettikleri *P. roqueforti* izolatlarının mikofenolik asit ve rokfortin C üretimlerini kantitatif olarak incelemişler, ancak suş bazında detaylı bir değerlendirme yapmamışlardır. Ozturkoglu-Budak vd. (2023) ise, bu mikotoksinleri sadece bir *P. roqueforti* izolatında incelemiştir.

P. roqueforti'nin ürettiği mikotoksinlerden biri olan rokfortin C, indol alkoloidleri grubundadır (Fontaine vd., 2015a; Kosalková vd., 2015). Ayrıca bu mikotoksini, *P. chrysogenum* (*P. rubens* olarak yeniden adlandırılan) türünün de ürettiği bilinmektedir (García-Estrada vd., 2011; Ali vd., 2013; Metin, 2023). Şekil 2.12'de her iki türün rokfortin C biyosentezi (A) ve ilgili gen kümeleri (B) verilmiştir. Rokfortin C biyosentezi, bir ribozomal olmayan peptid sentaz olan rokfortin dipeptid sentetaz (*rds/roqA*) ile L-triptofanın ve L-histidinin kondenzasyonu ile başlar ve bir diketopiperazin halkası olan siklodipeptid oluşur (Kosalková vd., 2015; Metin, 2023). Siklodipeptid oluşumundan sonra, biyosentez iki yola ayrılır. Oluşan dipeptid, önce prenilasyon (*rpt/roqD*) ile rokfortin D'ye dönüştürülebilir ve ardından hidrojenasyon (*rdh/roqR*) ile rokfortin C'ye dönüşebilir ya da ikinci yolda önce dehidrojenasyon (*rdh/roqR*) ve sonra prenilasyon (*rpt/roqD*) ile rokfortin C'ye çevrilir. *P. chrysogenum*, rokfortin C'yi rokfortin L ve glandikolin B üzerinden meleagine dönüştürebilir (García-Estrada vd., 2011; Ali vd., 2013). *P. roqueforti*'de rokfortin C

gen kümesinde 3 gen bulunurken, *P. chrysogenum*'da 7 gen bulunur (Metin, 2023). *P. roqueforti* rokfortin C biyosentezi gen kümesinde bir ribozomal olmayan peptid sentetazı kodlayan *rds* (*roqA*), bir dehidrogenazı kodlayan *rdh* (*roqR*) ve bir rokfortin preniltransferazı kodlayan *rpt* (*roqD*) genleri bulunmaktadır (Şekil 2.12). Gen kümesinin bir parçası olduğu öne sürülmüş (García-Estrada ve Martín, 2016) *gmt* (*roqN*) geninin ise, yeni çalışmalarda (Metin, 2023) gen kümesine ait olmadığı değerlendirilmiştir. *P. roqueforti*'nin rokfortin C biyosentezi gen kümesinde bulunmayan *nox* (*roqM*), *sro* (*roqO*) ve *gmt* (*roqN*) genlerinin *P. chrysogenum*'da rokfortin C'den meleagrin oluşumunda rol oynadığı belirtilmiştir (García-Estrada vd., 2011; Ali vd., 2013).



Şekil 2.12: *Penicillium roqueforti* (FM164) ve *P. chrysogenum* (Wisconsin 54-1255) türlerinde (A) rokfortin C biyosentezi ve (B) ilgili gen kümeleri

Kaynak: Fontaine vd., 2015a; Kosalková vd., 2015; García-Estrada vd., 2011; Ali vd., 2013; García-Estrada ve Martín, 2016; Metin, 2023)

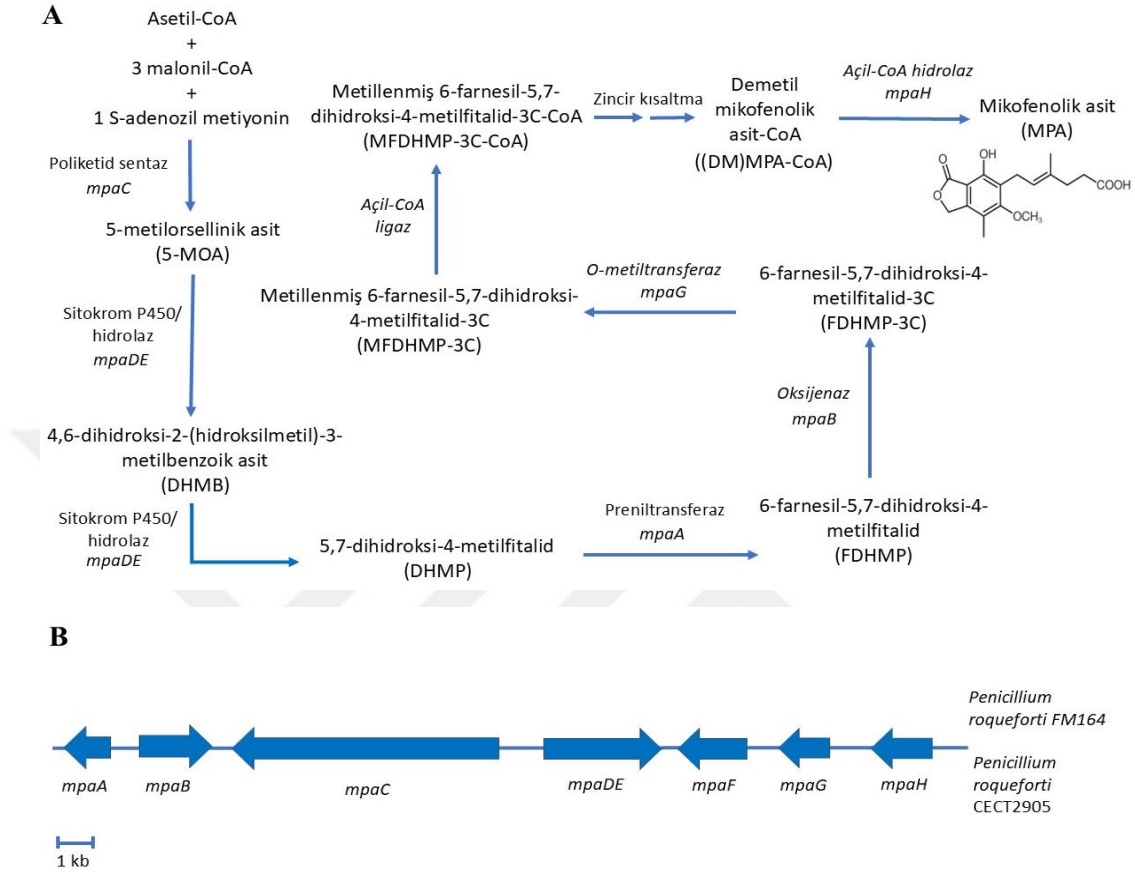
ROKC'nin, nörotoksik ve antimikrobiyel etkileri raporlanmıştır. Bu mikotoksinin köpeklerde ve farelerde toksik etkileri bulunmaktadır (Chavez vd., 2023; Metin, 2023). Farelerde yapılan bir çalışmada LD₅₀ değeri (denek hayvanlarının %50'sinin ölümüne neden olan doz), 15-20 mg/kg iken, başka bir çalışmada fareler üzerinde LD₅₀ değeri, 169-189 mg/kg olarak bildirilmiştir (Scott vd., 1976; Arnold vd., 1978). Fontaine vd. (2016) ve Hymery vd. (2018), ROKC'nin insan bağırsak hücreleri (Caco-2) ve monositik hücreler (THP-1 ve CD14+) üzerinde sitotoksitesini incelemiştir. Hücrelerin ROKC'ye 48 saat maruziyeti sonucu, monositik hücrelerin Caco-2 hücrelerine göre ROKC'ye daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Monositik hücrelerin (THP-1 ve CD14+) ROKC'ye maruziyeti sonrası IC₅₀ değeri (%50 inhibisyon konsantrasyonu), sırasıyla, 55 µM ve 45 µM olarak belirlenmiştir (Fontaine vd., 2016). Bu çalışmada, Caco-2 hücrelerinin ROKC'ye maruziyeti sonrası IC₅₀ değeri ise, >100 µM olarak raporlanmıştır. Perez-Fuentes vd. (2024), insan nöroblastoma hücrelerinin ROKC'ye 24 saat maruziyeti sonrası IC₅₀ değerini, 49,5 µM olarak tespit etmiş ve kaspaz-8 aracılı apoptoz indüklenmiştir. ROKC'nin toksisite mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bu bileşiğin sıçan ve insan sitokrom P450 enzimlerini inhibe ettiği bildirilmiştir (Aninat vd., 2001; Metin vd., 2023).

P.roqueforti'nin ürettiği bir diğer mikotoksin olan mikofenolik asit, meroterpenoid yapıda ve poliketid sentaz (PKS) ile üretilen poliketid-terpenoid bir bileşiktir (Del-Cid vd., 2016; Chavez vd., 2023; Metin, 2023). Bu bileşik, bir fitalid çekirdeğine bağlanmış bir terpenoid yan zincirden oluşur. Bu yapı, MPA'ya fonksiyonel özellikler kazandırmıştır (Garcia-Estrada ve Martin, 2016). MPA'nın antimikrobiyel ve antipsoriatik (sedef hastalığına karşı etkili) etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Gillot vd., 2017b; Metin, 2023). Ayrıca immünosupresif etkisi de olduğu için, organ nakli hastalarında organ reddini önlemek ve otoimmün hastalıkların tedavisinde immünosupresan (bağışıklık baskılayıcı) olarak kullanılmaktadır. MPA'nın bu etkilere sahip ilaçları, mikofenolat mofetil ve mikofenolik asit sodyum tuzu olarak iki formda üretilmektedir (Allison ve Eugui, 2005; Siebert vd., 2020). Bu ilaçlar, DNA sentezinde pürin monofosfat oluşumunda rol oynayan inosin 5'-monofosfat dehidrogenaz (IMPDH) enziminin inhibitörü olarak işlev görür ve B ve T lenfositlerinin çoğalmasını engeller (Gillot vd., 2017b). *P. roqueforti* dışında, *P. glabrum*, *P. brevicompactum* ve *P. rubens* tarafından da üretilmektedir (Requeira vd., 2011; Mahmoudian vd., 2021). *P. roqueforti*'de MPA'nın biyosentezi, 24,4 kb uzunluğunda ve 7 gen bulunduran bir

gen kümesi tarafından gerçekleştirilir ve bu gen kümesi, *P. brevicompactum*'daki gen kümesine benzerlik göstermektedir (Del-Cid vd., 2016; Metin, 2023). Bu biyosentez Şekil 2.13'te verildiği gibi, bir asetil-CoA, üç malonil-CoA ve bir S-adenozil-L-metiyonin ile, *mpaC* geninin kodladığı poliketid sentaz tarafından 5-metilorsellinik asit (5-MOA) oluşumu ile başlar (Regueira vd., 2011; Hymery vd., 2014; Del-Cid vd., 2016; Gillot vd., 2017b). Bu bileşik (5-MOA), *mpaDE* geni tarafından kodlanan sitokrom P450 monooksijenaz ve hidrolaz enzimleriyle hidroksillenir ve sırasıyla, 4,6-dihidroksi-3(hidroksimetil)-3-metilbenzoik asit (DHMB) ve 5,7-dihidroksi-4-metilfitalid (DHMP) oluşur (Chavez vd., 2023). Sonrasında, *mpaA* geni tarafından kodlanan preniltransferaz ile 6-farnesil-5,7-dihidroksi-4-metil fitalid (FDHMP) katalizlenir ve bu bileşik, *mpaB* geninin kodladığı oksijenaz enzimiyle üç karbon atomu daha az bir bileşik olan 6-farnesil-5,7-dihidroksi-4-metil fitalid-3C (FDHMP-3C) formuna dönüşür (Zhang vd., 2019). Bu bileşik de, *mpaG* geni tarafından kodlanan O-metiltransferaz ile metillenir (MFDHMP-3C) (Zhang vd., 2015). MPA sentezinin MFDHMP-3C'ye kadar olan kısmı, sitoplazmada gerçekleşir ve bu bileşik peroksizoma girerek CoA ile bağlanır (Zhang vd., 2019; You vd., 2021). Sonrasında, β-oksidasyon ile zincir kısaltma yapılır ve demetil mikofenolik asit-CoA ((DM)MPA-CoA) oluşur. En son bu bileşik, *mpaH* tarafından kodlanan bir açıl-CoA hidrolaz tarafından hidrolize edilerek mikofenolik asit (MPA) üretilir (Zhang vd., 2019; Metin vd., 2023). MPA gen kümesinin içinde, IMPDH enzimini kodlayan *mpaF* geni de tespit edilmiştir. Bu bulgu, MPA'yı üreten küfün geliştirdiği öz savunma mekanizmasını göstermektedir. Bu enzim sayesinde küf, ürettiği MPA'dan etkilenmez ve kendi metabolik süreçlerini devam ettirir (Hansen vd., 2011; Del-Cid vd., 2016).

Son çalışmalarda, *P. roqueforti*'nin mikofenolik asit üretiminin suşa bağlı olduğu bildirilmiştir (Fontaine vd., 2015a; Coton vd., 2020). Tablo 2.2'de verilen *P. roqueforti* popülasyonlarından, Rokfor ve Termignon peynirleri dışındaki diğer mavi peynirlerden izole edilen suşlardan oluşan Popülasyon 4'te, *mpaC* geninin 3'-ucunda 174 baz çifti uzunluğunda bir delesyon belirlenmiş ve bunun sentezlenen protein uzunluğunda 14 aminoasitlik bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Fontaine vd., 2015a). Böylece, daha kısa *mpaC* genine sahip olan suşların düşük miktarda ya da hiç MPA üretmediği gözlemlenmiştir. Ancak, *mpaC* geninde herhangi bir delesyon olmayan suşlar arasında da, MPA üretiminde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Buna, ilgili gen kümelerinde veya regülatör genlerde, dizi varyasyonları gibi

faktörlerin etki edebileceği vurgulanmıştır. *P. roqueforti*'nin ROKC, MPA ve andrastin A gibi metabolitlerinin üretiminde, regülatör *pcz1* geninin önemi belirlenmiştir (Fontaine vd., 2015; Rojas-Aedo vd., 2018).



Şekil 2.13: *Penicillium roqueforti* (FM164 ve CECT 2905)'nin (A) mikofenolik asit biyosentezi ve (B) ilgili gen kümesi

Kaynak: García-Estrada ve Martín, 2016; Zhang vd., 2019; Metin, 2023

Hayvanlarda yapılan deneylerde, MPA'nın akut toksisite oluşturması için yüksek konsantrasyonlara (LD₅₀ değeri için 450-2500 mg/kg) ihtiyaç duyulmuştur (Schneweis vd., 2000; Malekinejad vd., 2015). Fontaine vd. (2016)'nın yaptığı çalışmada, 48 saat maruziyet sonrası MPA'nın 780 µM'nın üzeri (IC₅₀ değeri) konsantrasyonda, monositleri ve Caco-2 hücrelerini etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan hücrelerin ROKC'ye (IC₅₀ değerleri 45-100 µM), MPA'dan daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, ROKC ve MPA'nın birlikte sitotoksik etkisi de değerlendirilmiştir. Buna göre, yüksek konsantrasyonlarda ROKC/MPA'ya eş zamanlı maruz bırakılan Caco-2 hücrelerinin canlılığı önemli ölçüde azalmıştır. Monositik hücrelerde ise, ROKC/MPA'ya 3-6 saatlik maruziyet sonrası apoptoz oranı doza bağlı olarak artmıştır. Ancak, Caco-2 hücrelerinde apoptoz gözlenmemiştir

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

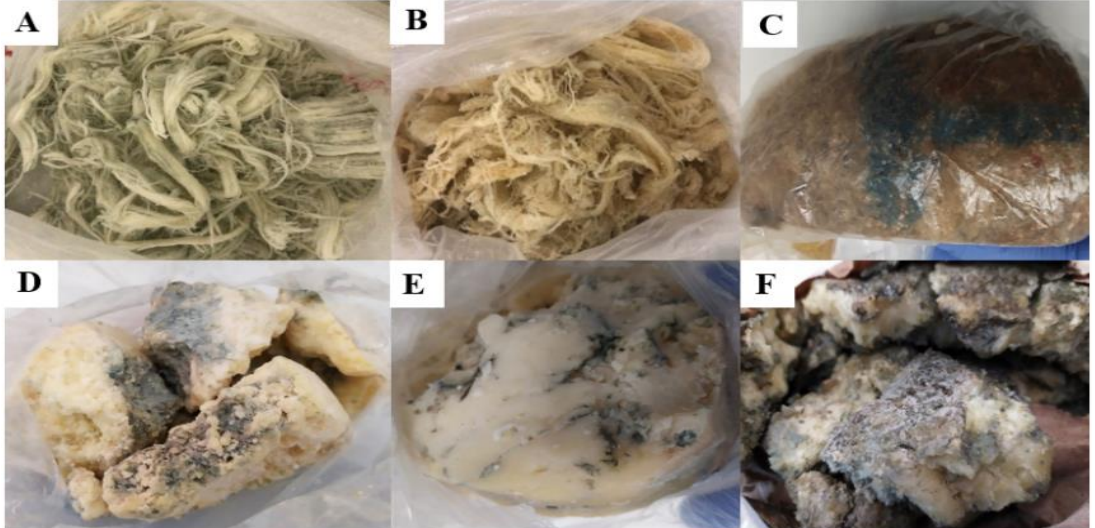
MATERYAL VE METOT

Bu bölümde araştırmada kullanılan materyaller ve metotlar ele alınmıştır. Peynir örnekleri, Ekim 2019-Ocak 2021 tarihleri arasında toplanmıştır. Metot kısmında örneklerden küf izolasyonu, DNA ekstraksiyonu, izolatların tanımlanması, genetik analizleri, teknolojik ve metabolik özelliklerinin analizleri, peynir üretimi ve analizleri ve istatistiksel metotlar detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Peynir Örnekleri

Çalışma kapsamında 5 Konya Küflü Tulum peyniri, 1 Divle Obruğu Küflü Tulum peyniri, 19 adet Erzurum Küflü Civil peyniri, 3 adet Kars Küflü Civil peyniri, 1 adet Karaman'dan ve 1 adet Sivas Zara'dan Tulum peyniri olmak üzere, 30 adet küflü peynir, yerel pazarlardan ve köylerden temin edilmiş (Şekil 3.1) ve laboratuvarında en çok bir hafta içinde analiz edilmek üzere +4 °C'de depolanmıştır.



Şekil 3.1: Küflü peynir örnekleri. (A) Erzurum Küflü Civil Peyniri, (B) Kars Küflü Çeçil Peyniri, (C) Divle Obruk Peyniri, (D) Sivas-Zara Küflü Peyniri, (E) Karaman Küflü peyniri, (F) Konya Küflü Peyniri

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Konya Küflü Tulum (KP kodlu) (Seri ve Metin, 2021) ve Rize-Ardeşen Golot (Metin, 2020) peynirlerinden önceden izole edilmiş ve tanımlanmış 54 *P. roqueforti* izolatu da çalışma kapsamında kullanılmıştır. Ayrıca, teknolojik ve metabolik özellikler için yapılan analizlerde, rokfor peyniri izolatu olan *P. roqueforti* CECT 2905 neotip suşu referans olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri, Kimyasallar ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasalların, besiyerlerinin ve sarf malzemelerin listesi EK1’de, besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması EK2’de verilmiştir.

3.1.3. Peynir Üretiminde Kullanılan Malzemeler

Peynir üretiminde kullanılan tam yağlı çiğ inek sütü, Tarım Kredi Hayvancılık A.Ş. (Lüleburgaz, Kırklareli)’den temin edilmiştir. Çiğ süte ait enerji ve besin öğeleri, Tablo 3.1’de verilmiştir. Peynir mayası (1/10.000 MCU/mL kuvvetinde; mikrobiyel enzim çözeltisi olarak (*Mucor miehei*’den üretilen proteaz), MAYASAN Gıda San. ve Tic. A.Ş.’den; starter kültür olarak ise, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Dairycol CM 102 10U, liyofilize beyaz peynir kültürü), Maysa Gıda San. ve Tic. A.Ş.’den temin edilmiştir. Peynir üretiminde, yerel marketlerden temin edilen kaya tuzu kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Peynir üretiminde kullanılan çiğ süte ait enerji ve besin öğeleri

Enerji ve Besin Öğeleri	100 g
Enerji (kj/kcal)	287/68
Yağ (g)	3,8
-Doymuş yağ (g)	2,6
Karbonhidrat (g)	4,5
-Şekerler (g)	3,5
Protein (g)	3,4
Tuz (g)	0,1

Kaynak: Etiket bilgileri

3.2. Metot

3.2.1. Peynirlerden Küf İzolasyonu ve Stok Kültür Hazırlama

Küf izolasyonunda, 10 g peynir örneği ve %2 sodyum sitrat çözeltisinden 90 mL alınarak, 2 dk homojenize edilmiş (Bagmixer 400 Stomacher, Interscience, Saint Nom, Fransa) ve ¼ gücündeki ringer çözeltisi ile seri dilüsyonlar hazırlanarak 10^{-6} 'ya kadar seyreltilmiştir. Dilüsyonlardan 0,1 mL örnek alınarak, yayma metodu ile patates dekstroza agara (PDA) 2 paralel olacak şekilde ekim yapılmış ve petriyeler 25 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir (Ergün vd., 1992; Seri ve Metin, 2021). İnkübasyon sonrası PDA'da gelişen küflerden farklı morfolojik özellik (koloni rengi ve tekstürü vb.) gösteren suşlar seçilerek, iki kez PDA besiyerine üç çizgi ekimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış izolatlar, %20 gliserol içeren maya ekstraktı pepton dekstroza (YPD) sıvı besiyeri içeren kriyotüplerde geliştirilerek -80 °C'de saklanmıştır (Metin, 2020). Daha önce Konya Küflü (Seri ve Metin, 2021) ve Rize-Ardeşen Golot (Metin, 2020) peynirlerinden izole edilmiş ve tanımlanmış izolatlar (n=78) da çalışma kapsamında kullanılmıştır.

3.2.2. Küflerden DNA İzolasyonu

Küflerin moleküler düzeyde tanımlanması için DNA izolasyonu, Seri ve Metin (2021) metoduna göre yapılmıştır. Küfler, 20 mL YPD sıvı besiyerinde 115 rpm'de 48 saat geliştirilmiştir. Steril mikrosantifüj tüplerine 0,1 mm çapında 200 mg (1,5 spatül) cam boncuk eklenmiştir. Küçük toplar şeklinde gelişen küf miselleri filtrelenerek steril mikrosantrifüj tüplerine iki öze miktarı alınmıştır. Tüplere, liziz solüsyonu 1X TEN (Tris-HCl-EDTA-NaCl, EK2) tamponundan 400 µL eklenmiş ve hücreler süspansiyon edilmiştir. Tüpler 1 dk yüksek devirde vortekslenildikten sonra, Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazında homojen bir görüntü oluşana dek 50 Hz'de toplamda 8-10 dk karıştırılmıştır. Tüpler her 2 dk'da bir 2'şer dk olacak şekilde buzda bekletilmiştir. Hücreler parçalandıktan sonra DNA izolasyonuna, Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit'in (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) prosedürü ile devam edilmiştir. Buna göre, tüplere 10 µL proteinaz K ilavesinden sonra 100 µL %10'luk SDS eklenmiş ve karışım vortekslenmiştir. Tüpler, 55 °C'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, tüplere 20 µL RNase A eklenerek iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir. Ardından, tüpler

maksimum hızda santrifüjlenmiştir. Süpernatantın tamamı (yaklaşık 500 µL) pipetle çekilerek, yeni tüplere aktarılmıştır. Aynı miktarda (500 µL) binding buffer ve %96'lık etanolden 500 µL eklendikten sonra, tüpler karıştırılmıştır. Bu karışım, spin kolonlarına aktarılmıştır. Spin kolonları, 10.000xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Bu işlem, 2 defa tekrarlanmıştır. Kolonların filtre kısımları, yeni toplama tüplerine alınmıştır. Kolonların filtre kısımlarına 500 µL wash buffer 1 eklenmiş ve kolonlar, 10.000xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Toplama tüplerinde filtrelenen kısım atılmıştır. Spin kolonlarında filtre üzerine 500 µL wash buffer 2 eklenmiş ve kolonlar, maksimum hızda 3 dk santrifüjlenmiştir. Filtreli kısım, yeni toplama tüplerine aktarılmış ve üzerine 70 µL elution buffer eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir. Bu tüpler, maksimum hızda 1 dk santrifüjlenerek genomik DNA elde edilmiştir. İzole edilen DNA'ların kalitesi BioSpec Nanospektrofotometre (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile ölçülmüştür. DNA'ların en az 50 ng/µL konsantrasyonda ve A260/A280 oranının 1,7-2,0 arasında olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.2.3.1. Tekrarlayan Element Dizilimi Temelli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rep-PCR) ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) ile Parmak İzi Analizleri

İzolatların moleküler tanımlanması öncesinde, türler arası farklılıkları belirlemek ve birbirine benzeyen bant görünüşlerine sahip izolatları gruplandırmak ve ön tanımlama için bir parmak izi analizi olan rep-PCR (Tekrarlayan element dizilimi temelli polimeraz zincir reaksiyonu) kullanılmıştır. Bu analiz (GTG)₅ primeri (Tablo 3.2) ile gerçekleştirilmiştir (Redondo vd., 2009). PCR miksi son hacim 25 µL olacak şekilde, Tablo 3.3'te verilen oranlara göre hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu ise, T100 Thermal Cycler (Biorad, California, ABD) cihazında Tablo 3.4'te verilen koşullara göre gerçekleştirilmiştir. *P. roqueforti* izolatları arasındaki farklılıkları belirlemek ve gruplandırma yapmak için, bir diğer parmak izi analizi olan RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'da da, Tablo 3.3'teki oranlar ve Tablo 3.4'teki koşullar kullanılmıştır. RAPD-PCR, M13F primeri (Tablo 3.2) ile gerçekleştirilmiştir (Miot-Sertier ve Lonvaud-Funel, 2007).

Tablo 3.2: PCR amplifikasyonları için kullanılan primerler

Bölge	Primer adı	Primer dizilimi	Kaynaklar									
-	(GTG) ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGTG	Versalovic vd., 1994									
-	M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT	Miot-Sertier ve Lonvaud-Funel, 2007									
ITS	ITS1	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC	White vd., 1990									
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC										
<i>benA</i>	Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass ve Donaldson, 1995									
	Bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC										
<i>cmd</i>	Cmd5	5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	Hong vd., 2005									
	Cmd6	5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG										
<i>Proq01_3</i>	PROQ01_3-F	5'-TGTGTA CTCCACAGCGGCTA	Gillot vd., 2015									
	PROQ01_3-R	5'-TTGTCTTTTCGGGTGTCCAAT										
<i>Proq02_2</i>	PROQ02_2-F	5'-CCACTGTTAGAATCGCTGGG		Gillot vd., 2015								
	PROQ02_2-R	5'-CGTGAACGTGGAGTTGACTG										
<i>Proq16</i>	PROQ16-F	5'-TTGAGGATTTCCGGAGACAA			Gillot vd., 2015							
	PROQ16-R	5'-ATGCGCAATAAGACCCAAGA										
<i>Proq235</i>	Proq235F	5'-CAACAACCTCGGGTGCTTTG				Gillot vd., 2015						
	Proq235R	5'-TTGTGTGTCAAGACCCGGAC										
<i>Proq631</i>	Proq631F	5'-GGGGATGTCAGGTGGGTTTT					Gillot vd., 2015					
	Proq631R	5'-GGGCTCAAAGATGCGAAACG										
<i>Proq845</i>	Proq845F	5'-AACTTGCTTACCCTCGGCG						Gillot vd., 2015				
	Proq845R	5'-CTCGTTGGCAATACTGCTGG										
<i>Wallaby</i>	Wallaby1F	5'-GGCTCCTGCAGTAGACCAAG							Gillot vd., 2015			
	Wallaby1R	5'-TTTGCCTTGGCTGAGTCTTT										
	Wallaby2F	5'-CGCTATAACGGAAGCAGGAG								Gillot vd., 2015		
	Wallaby2R	5'-CCCGTCCTTTTTAGACACCA										
	Wallaby3F	5'-GCAACAGATCCAGCAGTTCA									Gillot vd., 2015	
	Wallaby3R	5'-CGTTTCTCCTGAGTCCTTGC										
	Wallaby0F	5'-AATGATCCAGTGTACGGGCT										Gillot vd., 2015
Wallaby0R	5'-AAGAGACAAGCAAAGGAGGC											
<i>CheesyTer</i>	CheesyTer1F:	5'-ATCTCGACGACATAGGCAGG	Gillot vd., 2015									
	CheesyTer1R	5'-GGAGCGTGCAGATGAGAAAG										
	CheesyTer2F	5'-CGTACGTCAAGCCTGGAATG		Gillot vd., 2015								
	CheesyTer2R	5'-AAGGCCATCATCATCGACCT										
	CheesyTer3F	5'-CCCAAAGCCATGACCAACAA			Gillot vd., 2015							
	CheesyTer3R	5'-ACGTCTTCTGTCCGACAAT										
<i>MAT1-1</i>	MAT1-1F	5'-CTCACCCCTGTCTGGTTGGAT				Bu çalışma						
	MAT1-1R	5'-TGCTTGTGCCACTCTTCATC										
<i>MAT1-2</i>	MAT1-2F	5'-ACTTGGTCAAGGATGCCAAC					Bu çalışma					
	MAT1-2R	5'-ACGACGAGGAGCGTACTGAT										

Tablo 3.3: Rep-PCR ve RAPD-PCR’da kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşenler	Miktarlar
ddH ₂ O (Ultra Saf Su)	16,875 µL
10X Dream Buffer (20 mM MgCl ₂ , Thermo Fisher Scientific)	2,5 µL
dNTP (2,5 mM, son hacimde 0,2 Mm, Invitrogen)	2 µL
(GTG) ₅ Primeri (Rep-PCR) / M13F (RAPD-PCR) (10 µM, Invitrogen)	2 µL
Dream Taq polimeraz (5 U/µL, Thermo Fisher Scientific)	0,125
Şablon DNA (~ 50 ng)	1,5 µL
Toplam PCR Miksi	25 µL

Kaynak: Seri ve Metin, 2021

Tablo 3.4: Rep-PCR ve RAPD-PCR’da kullanılan döngü şartları

PCR aşaması	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	7 dk
Denatürasyon	90 °C	30 sn
Bağlanma	40 °C	60 sn
Uzama	65 °C	8 dk
Son uzama	65 °C	16 dk
Döngü sayısı	30x	

Kaynak: Redondo vd., 2009

3.2.3.2. Internal Transcribed Spacer (ITS) Bölgesi ve β -tubulin (*benA*) Geninin Amplifikasyonu

Küf izolatları, internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin ve β -tubulin geninin amplifikasyonu ile tanımlanmıştır. ITS bölgesi ile amplifikasyonda, ileri primer ITS1 ve geri primer ITS4 (Tablo 3.2) kullanılmıştır (White vd., 1990). β -tubulin geni amplifikasyonu ise ileri primer Bt2a ve geri primer Bt2b ile (Tablo 3.2) gerçekleştirilmiştir (Glass ve Donaldson, 1995). PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) miksi, Tablo 3.5’te verildiği gibi hazırlanmıştır. PCR ise, Tablo 3.6’daki şartlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak (DNA kontaminasyonunu kontrol amaçlı), DNA yerine steril saf su kullanılmıştır.

Tablo 3.5: ITS ve *benA* PCR’ında kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşenler	Miktarlar
ddH ₂ O (Ultra Saf Su)	16,875 µL
10X Dream Buffer (20 mM MgCl ₂ , Thermo Fisher Scientific)	2,5 µL
dNTP (2,5 mM, son hacimde 0,2 mM, Invitrogen)	2 µL
İleri Primer (10 µM, Invitrogen)	1 µL
Geri Primer (10 µM, Invitrogen)	1 µL
Dream Taq polimeraz (5 U/µL, Thermo FisherScientific)	0,125
Şablon DNA (~ 50 ng)	1,5 µL
Toplam PCR Miksi	25 µL

Kaynak: Metin 2020; Seri ve Metin, 2021

Tablo 3.6: ITS ve *benA* PCR’ında kullanılan döngü şartları

PCR aşaması	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	94 °C	1 dk
Denatürasyon	94 °C	30 sn
Bağlanma	48-52 °C	30 sn
Uzama	72 °C	1 dk
Son uzama	72 °C	10 dk
Döngü sayısı	34x	

Kaynak: Metin, 2020

3.2.3.3. *Penicillium roqueforti* İzolatlarının Genetik Özelliklerinin Belirlenmesi: Yatay Gen Transfer Bölgelerinin (*Wallaby* ve *CheesyTer*) PCR ile Taranması

İzole edilen küflerden *Penicillium* spp. olarak tanımlananların genetik özellikleri, *Wallaby* ve *CheesyTer* genomik bölgelerinin PCR ile var/yok analizi yapılarak incelenmiştir (Ropars vd., 2015). PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler, Tablo 3.2’de verilmiştir.

Wallaby ve *CheesyTer* bölgeleri için kullanılan PCR şartları Tablo 3.7’de verilmiştir. PCR sonuçlarında, *Wallaby0* primerleri, *Wallaby* bölgesinin olmadığını belirlemek için; *Wallaby1*, *Wallaby2* ve *Wallaby3* primerleri ise, *Wallaby* bölgesinin farklı kısımlarını çoğaltmak üzere kullanılmıştır. *CheesyTer*’de ise 3 primer çiftinin herhangi birinden sonuç alınması, bu bölgenin izolatların genomunda var olduğunu göstermiştir. Hiçbirinden sonuç alınmamışsa, bu bölgelerin genomda yer almadığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu bölgelerin PCR ürünlerinin boyutları:

- *Wallaby* bölgesi PCR ürünleri (Wallaby0, Wallaby1, Wallaby2, Wallaby3): 800-900 bp arası,
- *CheesyTer* bölgesi PCR ürünleri:
 - CheesyTer1; 400-500 bp arası
 - CheesyTer2; 500 bp civarı
 - CheesyTer3 ise, 400 bp civarı olarak agaroz jelde bulunmuştur.

PCR miksi ise Tablo 3.4'te verilen oranlar ile hazırlanmıştır. Agaroz jel elektroforezinde görüntüleme, 1.2.2.4'te ifade edildiği gibi yapılmıştır.

Tablo 3.7: *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgeleri için yapılan PCR'da kullanılan döngü şartları

PCR aşaması	Wallaby0		Wallaby1/Wallaby2/ Wallaby3		CheesyTer1/CheesyTer2/ CheesyTer3*	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	94 °C	5 dk	94 °C	5 dk	94 °C	5 dk
Denatürasyon	95 °C	30 sn	95 °C	30 sn	94 °C	30 sn
Bağlanma	60 °C	30 sn	58 °C	30 sn	60-50 °C	30 sn
Uzama	72 °C	30 sn	72 °C	2 dk	72 °C	30 sn
Döngü sayısı	35x		35x		1.step 20x, 2.step 35x	
Son uzama	72 °C	10 dk	72 °C	10 dk	72 °C	10 dk

*Touchdown PCR yöntemi kullanılmıştır

Kaynak: Ropars vd., 2015

3.2.3.4. *Penicillium roqueforti* İzolatlarının Eşey Genotipinin PCR ile Belirlenmesi

Tablo 3.2'de belirtilen *MAT1-1* ve *MAT1-2* primerleri kullanılarak, Tablo 3.5'teki şartlar ve Tablo 3.6'daki miks kullanılarak PCR yapılmış ve jel elektroforezinde primerlere ait gözlenen bantlar değerlendirilerek eşey tipinin o olduğu sonucuna varılmıştır. Primer tasarımı, Primer 3 yazılımı (Untergasser vd., 2012) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3.5. *Penicillium roqueforti* İzolatlarının Tür İçi Çeşitliliğinin Belirlenmesi Amacıyla Mikrosatelit Bölgelerinin ve Polimorfik Lokusların PCR ile Amplifikasyonu

Gillot vd. (2015) tarafından, *P. roqueforti* suşları için polimorfik olduğu tespit edilmiş 5 lokusun (β -tubulin, cmd, proq235, proq631 ve proq845) ve 3 mikrosatelit bölgesinin (proq16, proq01_3 ve proq02_2) PCR’da amplifikasyonu, 120 *P. roqueforti* izolatu kullanılarak, Türkiye peynirleri kaynaklı *P. roqueforti* izolatlarının çeşitliliği belirlenmiştir. PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler, Tablo 3.2’de verilmiştir. PCR miksi, Tablo 3.8’de verildiği gibi hazırlanmıştır. Negatif kontrol olarak (DNA kontaminasyonunu kontrol amaçlı), DNA yerine steril saf su kullanılmıştır. Polimorfik lokuslar ve mikrosatelitlerin PCR miksi Tablo 3.8’de ve döngü şartları ise, Tablo 3.9’da verilmiştir.

Tablo 3.8: Mikrosatelitler ve polimorfik lokuslar için PCR’da kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşenler	Miktarlar
ddH ₂ O (Ultra Saf Su)	16,15 μ L
10X Taq Buffer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)	2,5 μ L
50 mM MgCl ₂ (son hacimde 2,5 mM, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)	1,25 μ L
dNTP (2,5 mM, son hacimde 0,2 mM, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)	2 μ L
İleri primer (10 μ M, Oligomer)	1 μ L
İleri primer (10 μ M, Oligomer)	1 μ L
Taq polimeraz (5 U/ μ L, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)	0,1
Şablon DNA (~ 50 ng)	1 μ L
Toplam PCR Miksi	25 μL

Kaynak: Gillot vd., 2015; Metin, 2020

Tablo 3.9: Polimorfik lokuslar ve mikrosatellitlerin PCR döngü şartları

PCR aşaması	Polimorfik Lokuslar			Mikrosatellitler (<i>Proq16, Proq01_3,</i> <i>Proq02_2</i>)
	<i>cmd</i>	<i>proq235,</i> <i>proq631,</i> <i>proq845</i>	<i>benA</i>	
İlk den.	94 °C, 5 dk	95 °C, 5 dk	94 °C, 1dk	96 °C, 2 dk
Den.	94 °C, 30 sn	95 °C, 30 sn	94 °C, 30 sn	96 °C, 30 sn
Bağ.	55 °C, 30 sn	55 °C, 30 sn	48 °C, 30 sn	59 °C, 25 sn
Uzama	72 °C, 1 dk	72 °C, 45 sn	72 °C, 1dk	72 °C, 25 sn
Döngü sayısı	35x	28x	34x	35x
Son uzama	72 °C, 10 dk	72 °C, 5 dk	72 °C, 10 dk	72 °C, 10 dk

Kaynak: Gillot vd., 2015; Metin, 2020

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Rep-PCR ve RAPD-PCR ampliconları, Wide Mini-Sub Cell GT yatay elektroforezde (Biorad), Red Safe (Intron Biotechnology, Gyeonggi, Güney Kore) nükleik asit boyama solüsyonu içeren %0,8'lik agaroz jelde, 1X TAE (Tris-Acetate-EDTA, EK2) tamponu içerisinde, 35 V'ta 5 saat yürütülmüştür (Versalovic vd., 1994). ITS, β -tubulin diğer ve PCR ampliconları %1'lik agaroz jelde ve 85 V'ta 45 dk yürütülmüştür. Sadece proq02_2 bölgesinin PCR ampliconlarının daha iyi ayırt edilebilmesi için, 0,5X TBE (Tris-Borate-EDTA, EK2) tamponu içerisindeki %2'lik agaroz jelde, bant büyüklüklerinin ayrımı için 60 V'ta 3 saat yürütülmüştür. PCR ürünleri, DNA yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. PCR ürünlerinin boyutlarını belirleyebilmek için, rep-PCR ve RAPD-PCR ürünleri için 1 kbp'lık marker ve λ DNA/HindIII marker, diğer PCR ürünleri için 100 bp'lık marker kullanılmıştır. Jeller, Azure c300 imaging system (Azure Biosystems, Dublin, USA) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması, Dizilimlerin Belirlenmesi ve Elde Edilen Dizilimlerin Analizi

PCR ampliconları, Invitrogen PureLink PCR purifikasyon kiti (Termo Fisher Scientific) talimatlarına göre saflaştırılmış ve dizi analizine (MedsanTek, Türkiye) gönderilmiştir. Dizilimler, Chromas (versiyon 2.6.6) yazılımında görüntülenmiş ve

NCBI BLAST programı kullanılarak benzerlik analizine tabi tutulmuştur. Böylece, izolatların hangi küf türlerine ait oldukları belirlenmiştir (Altschul vd., 1990).

3.2.6. Popülasyon Yapısı Analizleri

P. roqueforti izolatlarının üç mikrosatelit bölgesine (*proq16*, *proq01_3*, *proq02_2*) ait dizilimleri, Mega X (versiyon 10.2.6) yazılımı kullanılarak hizalanmıştır (Kumar vd., 2018). Öncelikle, dizilimlerdeki alellerden yararlanılarak ön gruplandırma yapılmış ve sekans tipleri (haplotipler) belirlenmiştir. Daha sonra Structure (versiyon 2.3.4) yazılımında Bayesian metoduna göre kümeleme analizi yapılmıştır (Pritchard vd., 2000; Meece vd., 2011; Gillot vd., 2015; Dumas vd., 2020). Bu yazılımda her bir küme sayısı için on bağımsız analiz (K=1'den K=10'a kadar), 50.000 adım çalışmaya hazırlama süresi ve 500.000 MCMC tekrarı ile gerçekleştirilmiştir (Gillot vd., 2015). Ayrıca en iyi K değeri, sonuçların Structure Harvester (versiyon v0.6.94, <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) web sitesine yüklenerek belirlenmiş ve sonuçlar bu değere göre Evanno metodu kullanılarak analiz edilmiştir (Evanno vd., 2005; Earl ve vonHoldt, 2012). Popülasyon yapısını daha detaylı incelemek için mikrosatelit datasetleri, GenAlEx (versiyon 6.502) yazılımına yüklenmiş ve bir uzaklık matrisi oluşturulmuştur (Peakall ve Smouse, 2012). Elde edilen uzaklık matrisi, Neighbor-Net metodu kullanılarak Splitstree (version 4.18.3) yazılımında diyagrama dönüştürülmüştür (Huson ve Bryant, 2006). Böylece, *P. roqueforti* suşlarının tür içi çeşitliliği belirlenmiştir.

3.2.7. Filogenetik Analizler

Popülasyon analizlerine göre seçilen 20 *P. roqueforti* izolatının, 5 polimorfik lokusu (*cmd*, *benA*, *proq235*, *proq631* ve *proq845*) kullanılarak filogenetik analizler yürütülmüştür. Bu analizlerde, Clustal W kullanılarak hizalanan dizilimlerin Mega X (versiyon 10.2.6) yazılımında maksimum likelihood metodu ile evrimsel ilişkileri belirlenmiştir (Kumar vd., 2018). Üç polimorfik lokus (*proq235*, *proq631* ve *proq845*) kullanılarak, birleştirilmiş ağaç (concatenated tree) oluşturulmuştur. Uyumsuzluk uzunluk farkı (ILD) testine göre, *benA*, *cmd* ve *proq235*, *proq631* ve *proq845* arasındaki önemli uyumsuzluk nedeniyle *benA* ve *cmd* lokusları birleştirilmiş ağaçta kullanılmamıştır (Gillot vd., 2015). Ayrıca, NCBI sisteminde bulunan ve farklı

izolasyon kaynaklarından (Avrupa, Kanada, ABD, Yeni Zelanda orijinli mavi peynirler, peynir dışı izolasyon kaynakları vs.) elde edilmiş *P. roqueforti* izolatlarının dizilimleri de filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

3.2.8. İzolatların Dizilerinin NCBI GenBank'a veri girişlerinin yapılması

Dizi analizlerine gönderilen izolatların ITS, *benA*, *proq235*, *proq631* ve *proq845* bölgelerine göre dizi analizlerine ait, toplam 140 veri, NCBI GenBank sistemine BankIt aracı kullanılarak (Şekil 3.2) yüklenmiş ve her bir dizi için erişim numarası (accession number) alınmıştır.

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BankIt

Submit new sequences to GenBank

What type of sequence data do you have?

SARS-CoV-2

Ribosomal RNA (rRNA) or rRNA-ITS

Metazoan (multicellular animal) COX1

Eukaryotic nuclear mRNA **NEW**

Influenza virus

Norovirus

Dengue virus

Eukaryotic and Prokaryotic Genomes (WGS or Complete)

Transcriptome Shotgun Assembly (TSA)

Unassembled sequence reads (SRA)

Sequence data not listed above (through BankIt): genomic DNA, organelle, ncRNA, plasmids, other viruses, phages, other mRNA, synthetic constructs

Submission requirements:

- Sequence data in FASTA or alignment format
- Name(s) of the organism(s) where sequence data were isolated and any other descriptive data
- Sequence features (Examples: CDS, gene, tRNA, with nucleotide intervals and product names)

Start

Complete or view existing BankIt submissions

Need to update a GenBank record?
Request updates to accessioned records per the GenBank update page.

Şekil 3.2: NCBI GenBank veritabanına girişi ve BankIt yükleme aracının arayüzü
Kaynak: NCBI, 2024

3.2.9. Morfolojik Analizler

P. roqueforti izolatlarının morfolojik çeşitlilikleri, farklı besiyerleri kullanılarak belirlenmiştir. Patates dekstroz agar (PDA), maya ekstraktı sükröz agar (YES), malt ekstraktı agar (MEA) ve yulaf ezmesi agar (OA) besiyerleri kullanılarak izolatların koloni morfolojileri incelenmiştir (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014). İzolatlar, besiyerlerine üç nokta ekimler yapılarak 25 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerin ön yüzünde gözlemlenen renkler, Ridgway referans renk skalası kullanılarak tanımlanmıştır (Ridgway, 1912).

3.2.10. Seçilen *P. roqueforti* İzolatlarının Teknolojik ve Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çeşitli Türkiye küflü peynirlerinden izole edilip tanımlanan ve popülasyon genetiği analizleri sonucu seçilen 20 *P. roqueforti* izolatının teknolojik özellikleri belirlenmiştir. *P. roqueforti* CECT 2905 referans suşu da analizlerde kullanılmıştır. İzolatların %20'lik gliserol stoklarından bir öze miktarı alınarak, PDA besiyerine üç çizgi yöntemiyle ekim yapılmış ve petriler 25 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra izolatlar, PDA yatık agarlara inoküle edilip 25 °C'de 5 gün geliştirilmiştir. İnkübasyon sonrası yatık agarlara, %0,1 Tween 80 solüsyonundan 5 mL eklenmiş ve steril öze yardımıyla agar yüzeyinden kazınarak alınan sporlar, solüsyona aktarılmıştır. Bu işlem iki defa tekrarlanmış ve spor süspansiyonu (10 mL) steril bir tüpe aktararak hazırlanmıştır. Spor sayımı, Thoma lamında yapılmış ve her bir süspansiyon, 10⁶ spor/mL olacak şekilde ayarlanmıştır (Gillot vd., 2017a; Crequer vd., 2024). Küf izolatlarının spor süspansiyonları hazırlanarak, misel gelişimi (12 °C ve 25 °C'de), tuza dayanıklılık, proteolitik aktivite, lipolitik aktivite, uçucu bileşen ve mikotoksin (MPA ve ROKC) analizleri yapılmıştır.

3.2.10.1. Misel Gelişimi (12°C ve 25°C'de)

İzolatların misel gelişimini tespit edebilmek için, spor süspansiyonlarından 2 µL alınarak MEA besiyerinin ortasına spot ekim yapılmıştır. Petriler, 12 °C ve 25 °C'de 10 gün inkübe edilmiş ve koloni çapları 3. gün ve 10. gün mm cinsinden ölçülmüştür (Lopez-Diaz vd., 1996; Gillot vd., 2017a).

3.2.10.2. Tuza Dayanıklılık

İzolatların tuza dayanıklılığını tespit edebilmek için, %1, %3 ve %6 NaCl olmak üzere, sırasıyla, 1 L hazırlanan MEA besiyerlerine 10 g, 30 g, 60 g NaCl eklenmiştir. Spor süspansiyonlarından 2 µL alınarak, %0, %1, %3 ve %6 NaCl içeren MEA besiyerinin ortasına spot ekim yapılmıştır. Petriler, 25 °C'de 8 gün inkübe edilmiş ve koloni çapları inkübasyonun 8. gününde mm cinsinden ölçülmüştür (Lopez-Diaz vd., 1996; Pose vd., 2007).

3.2.10.3. Proteolitik Aktivite

İzolatların proteolitik aktivitelerini tespit edebilmek için, spor süspansiyonlarından 2 µL alınarak, %10 yağsız süt içeren mikolojik agar (10 g/L soya pepton, 10 g/L glikoz, 15 g/L agar) besiyerinin ortasına spot ekim yapılmıştır. Petriler, 25 °C’de 7 gün inkübe edilmiş ve inkübasyonun sonunda kolonilerin etrafındaki şeffaf zon, mm cinsinden ölçülmüştür (Lopez-Diaz vd., 1996; Doğan ve Tekiner, 2021).

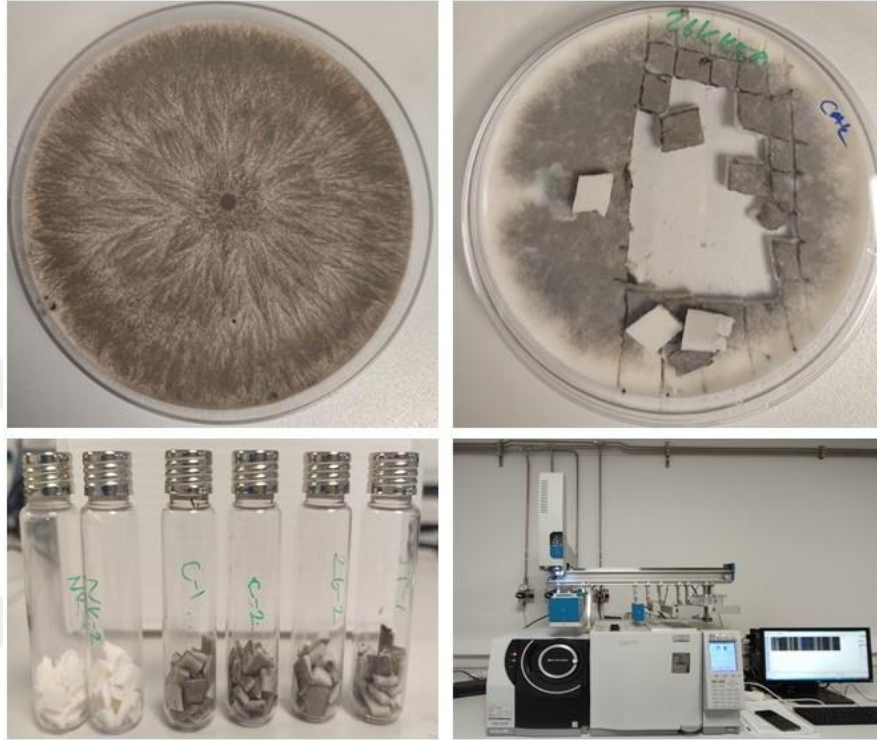
3.2.10.4. Lipolitik Aktivite

Küf izolatlarının lipolitik aktivitesini belirlemek için Tween 80 agar kullanılmıştır (Rai vd., 2014; Doğan ve Tekiner, 2021). Petriler, 25 °C’de 7 gün inkübe edilmiş ve inkübasyonun sonunda kolonilerin etrafındaki opak zon (presipite/beyaz zon) mm cinsinden ölçülmüştür (Lopez-Diaz vd., 1996; Doğan ve Tekiner, 2021).

3.2.10.5. Uçucu Bileşen Analizi

İzolatların uçucu bileşen profilleri, Pogačić vd. (2015), Gillot vd. (2017b) ve Caron vd. (2021) metotları modifiye edilerek belirlenmiştir. Uçucu bileşen analizi için peynir agar (CA) kullanılmıştır (Bennetot vd., 2023). CA (800 mL), 300 g tuzsuz krem peynir, 16 g agar ve 8 g NaCl ile hazırlanmış ve 110°C’de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. İzolatlar, CA’da 25 °C’de 21 gün geliştirilmiştir. İnkübasyon sonrası, petri üzerinde 10 mm çapında kesitler (örnek başına 3 g) alınarak, 20 mL’lik headspace viallerine aktarılmıştır (Şekil 3.3). Viallere 5’er mL etanol eklenmiş ve örnekler, vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Örnekler, GCMS-QP2020 kuadropol kütle analizörüne bağlı GC-2010 Plus sistemi (Shimadzu, Japonya) ve FLEX serisi headspace autosampler (Shimadzu, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Viallerdeki örneklerden, autosamplerda 65 °C’de 15 dk ısıtılmış ve taşıyıcı gaz (helyum) ile 270 kPa basınç altında 1 dk boyunca 35 °C’de uçucu bileşik ekstraksiyonu yapılmıştır. Sistem, 250 °C’de 0,1 dk ısıtılmış ve desorpsiyona neden olan uçucu bileşiklerden 89 kPa basınçta temizlenmiştir. Uçucu bileşikler, Stalbilwax MS kapiler kolonda (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Restek) helyum mobil fazı ile ayrıştırılmıştır. Fırın sıcaklığı, başlangıçta 35 °C’de 10 dk tutulduktan sonra 5 °C/dk arttırılarak 230 °C’ye çıkarılmıştır. Kütle spektrometresi, 29-207 m/z kütle aralığında tarama modunda (tarama zamanı 0,3 s, taramalar arası gecikme 0,03 s) çalıştırılmıştır. İyonizasyon, 70 eV’de elektron çarpıtma ile gerçekleştirilmiştir.

Uçucu bileşikler olarak bazı metil ketonlar (heptan-2-on, nonan-2-on, non-8-en-2-on, 2-hidroksipentan-3-on, pentan-2-on, undecan-2-one), asitler (asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, hekzanoik asit, oktanoik asit), sekonder alkoller (bütan-2-ol, oct-1-en-3-ol, nonan-2-ol), kükürtlü bileşikler (metanetiyoil, metilsülfanilmetan, S-metil bütanetiyoat), aldehytler (bütanal, 3-metilbütanal) ile bazı pirazin, alkan, ester, lakton, fenol, terpen bileşikleri cihaz kütüphanesinden taranarak örneklerde aranmıştır.



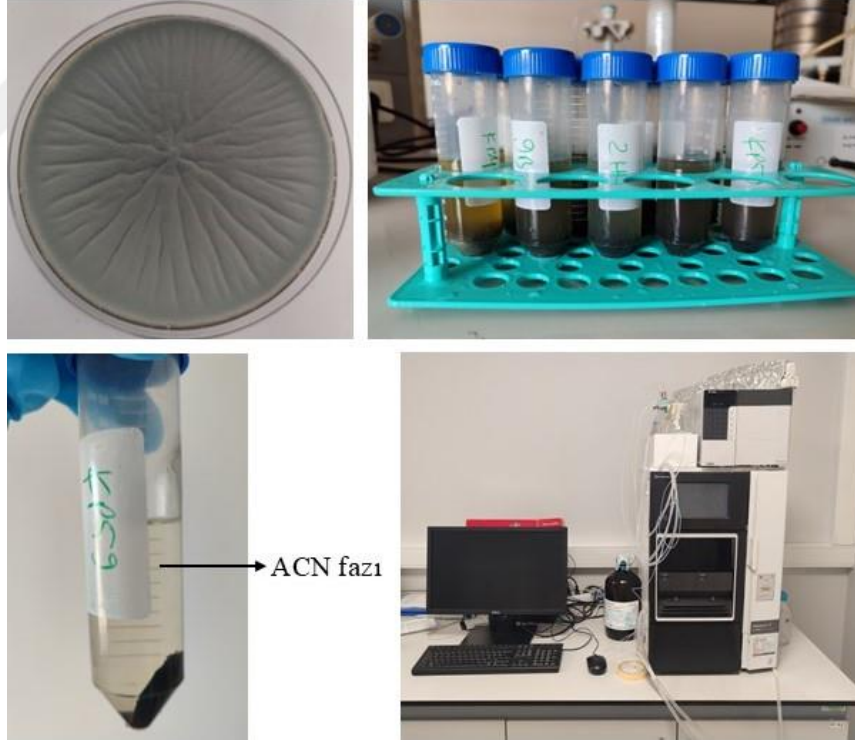
Şekil 3.3: Peynir agarda gelişen küflerin uçucu bileşen analizi için hazırlanan headspace vialleri ve GC-MS sistemi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.10.6. Mikotoksin (Rokfortin C ve Mikofenolik Asit) Analizi

P. roqueforti izolatlarının metabolit ve mikotoksin üretimleri, Bolon vd. (2004), Fontaine vd. (2015a), Gillot vd. (2017b), Caron vd. (2021) ve Crequer vd. (2024) metotlarına göre belirlenmiştir. Buna göre izolatlar, fosfat-sitrat tamponu ile pH'ı 4,5'a ayarlanan YES agarda, 25 °C'de 14 gün geliştirildikten sonra, metabolit ekstraksiyonu yapılmış ve metabolitler, HPLC sistemi kullanılarak kantitatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.4). Hedef metabolitler olarak, rokfortin C (ROKC) ve mikofenolik asit (MPA) mikotoksinleri incelenmiştir. Metabolitlerin standart çözeltileri, sırasıyla, 100 ppm ve 200 ppm olacak şekilde metanol ile hazırlanmış ve amber viallere alınmıştır.

İzolaların geliştiği YES agardan 4 g olacak şekilde kesitler alınarak, 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüplere, %0,1 formik asit içeren asetonitrilden (ACN) 25 mL eklenmiş ve karışım, VELP OV5 (VELP Scientifica, Monza-Brianza, İtalya) ile homojenize edilmiştir. Sonrasında tüpler, ultrasonik su banyosunda 2 dk tutulmuştur. Örnekler vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan faz (Şekil 3.4), 0,45 µm selüloz asetat (CA) filtreden geçirilerek 2 mL'lik viallere alınmış ve HPLC sistemine (Shimadzu, Nexera-i, LC-2040C 3D, Japonya) verilmiştir. Filtrattan 10 µL, HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Ayırmada, Agilent ZORBAX C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) kolonu ve mikofenolik asit için 215 nm'de, rokfortin C için ise 305 nm'de PDA (foto diyot dizisi) dedektörü kullanılmıştır. Kolonun başlangıç sıcaklığı 30 °C ve mobil faz akış hızı 1 mL/dk: Solvent A (EK2), 40 mM H₃PO₄ iken; solvent B ise, 40 mM H₃PO₄/ACN (55/45, v/v). Solvent B (EK2), 4 dk boyunca %55'te tutulmuştur. Ardından 4-17 dk arası %55-100'lük gradyan bir akış verilmiş, 17-25 dk arası %100'de tutulmuş ve 25-35 dk arası tekrar gradyan bir akış sağlanmıştır. Son olarak, post time 5 dk sürdürülmüştür.



Şekil 3.4: YES agarda gelişen küflerin metabolit ekstraksiyonunda faz ayrımı ve HPLC sistemi.

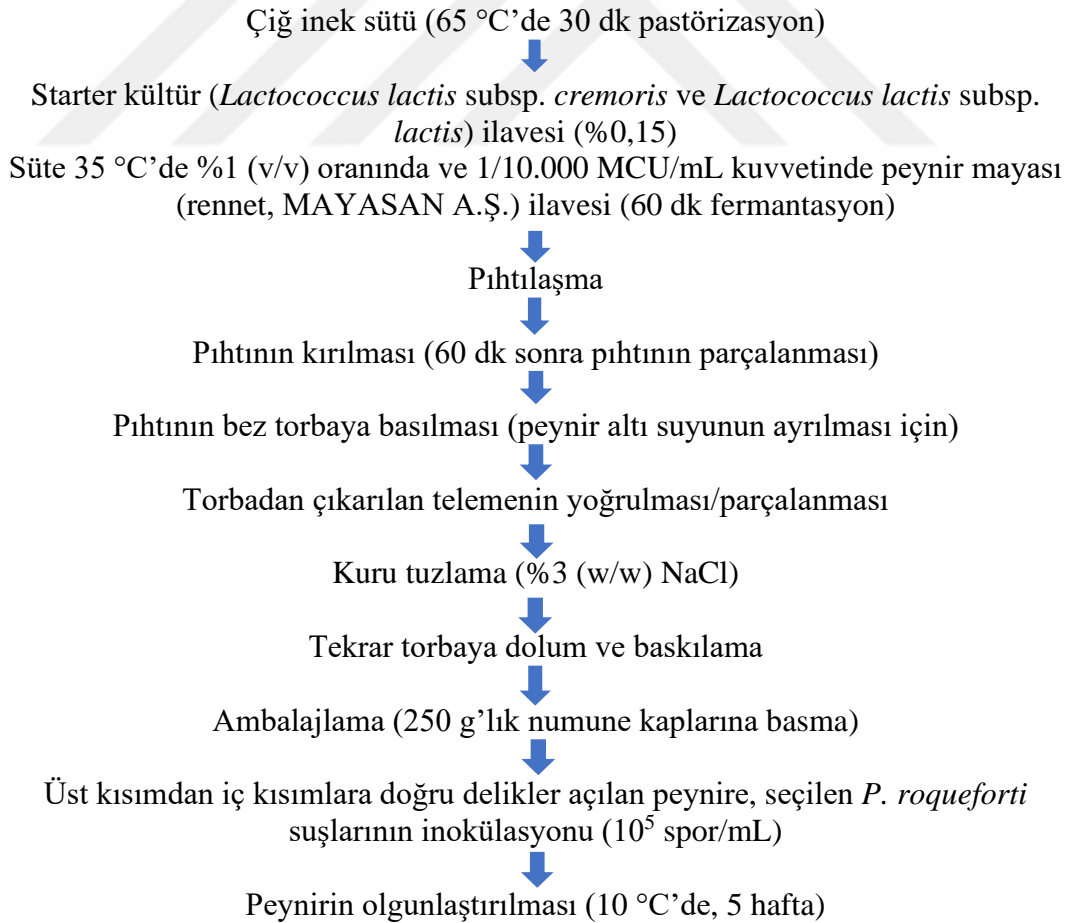
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.11. Peynir Üretiminde Kullanılan Çiğ Sütün Bazı Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Peynir üretiminde kullanılan çiğ sütte toplam mezofilik aerobik bakteri (bkz. 3.2.13.1.), toplam maya-küf (bkz. 3.2.13.2.), toplam *Lactobacillus* (bkz. 3.2.13.3.) ve *Lactococcus* (bkz. 3.2.13.4.) sayımları yapılmış; pH (bkz. 3.2.13.5.), titre edilebilir asitlik (TTA) (bkz. 3.2.13.6.), kuru madde (bkz. 3.2.13.7.) ve kül (bkz. 3.2.13.10.) tayini gerçekleştirilmiştir. Çiğ sütün yoğunluğu, laktodansimetre (Alla France, Anjou, Fransa) ile ölçülmüştür (Herrera-Chávez vd., 2022).

3.2.12. Seçilen İzolatlarla Model Peynir Üretimi

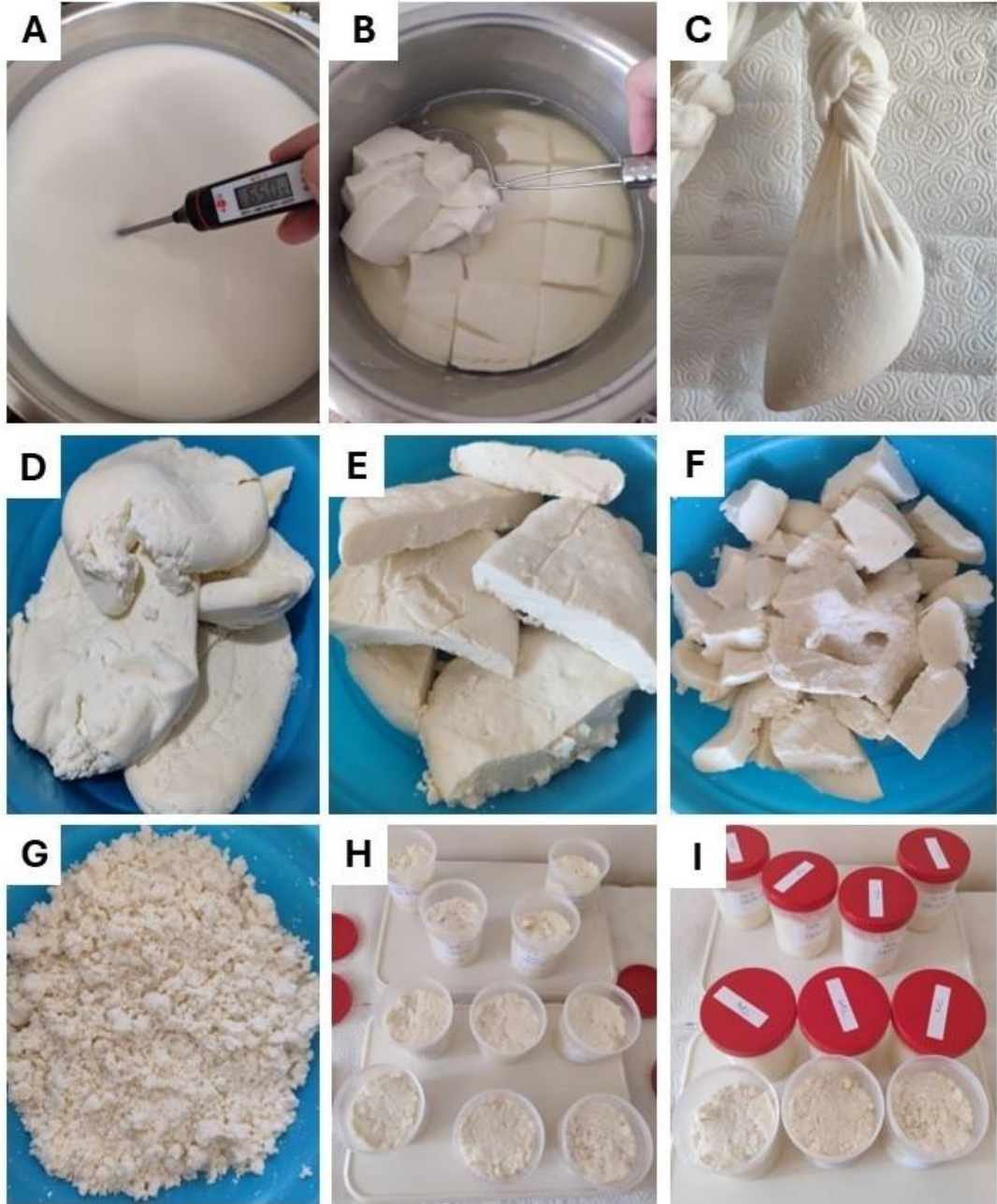
Besiyerinde geliştirilen 20 *P. roqueforti* izolatının uçucu bileşen ve mikotoksin analizleri sonucu seçilen 3 izolat ve neotip suş CECT 2905 ile model peynir üretimi Şekil 3.5'e göre yapılmıştır. Buna göre, 200'er g'lık tulum peynirleri, 2 paralel olacak şekilde üretilmiştir. Peynirler, seçilen izolatlar inoküle edildikten sonra, 10 °C'de 6 hafta olgunlaştırılmıştır.



Şekil 3.5: Tulum peynirinin üretimi

Kaynak: Hayaloglu vd., 2007; Çakır ve Çakmakçı, 2018; Ozturkoglu-Budak, 2023

Peynir üretim aşamalarına dair örnekler, Şekil 3.6’da verilmiştir. Peynir örnekleri, kodları ve üretimde kullanılan *P. roqueforti* izolatlarına (genetik özellikler ve temel bileşen analizi (PCA) ile elde edilen farklı gruplardan seçilmiş) ait bilgiler Tablo 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.6: Tulum peyniri üretim aşamaları: (A) Çiğ sütün pastörizasyonu. (B) Pıhtının kesilmesi. (C) Pıhtının bez torbaya basılması. (D-G) Elde edilen telemenin parçalanması. (H-I) Plastik numune kabına basma.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 3.10: Peynir örnekleri ve peynirlerin üretiminde kullanılan *P. roqueforti* izolatları

Kod	Özellik	<i>P. roqueforti</i> izolatı
TZ	4 °C’de 7 gün dinlendirilmiş taze peynir	-
TP1	Kontrol, küf inoküle edilmeden 10 °C’de 6 hafta olgunlaştırılmış peynir	-
TP3	Küf inoküle edildikten sonra 10 °C’de 6 hafta olgunlaştırılmış peynir	CECT 2905
TP5	Küf inoküle edildikten sonra 10 °C’de 6 hafta olgunlaştırılmış peynir	4K2
TP7	Küf inoküle edildikten sonra 10 °C’de 6 hafta olgunlaştırılmış peynir	KP44
TP9	Küf inoküle edildikten sonra 10 °C’de 6 hafta olgunlaştırılmış peynir	26KK5A

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.13. Peynirlerin Mikrobiyolojik ve Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Taze telemenin ve olgunlaştırılan peynir örneklerinin toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB), toplam maya-küf (TMK), toplam *Lactobacillus* (TLB) ve toplam *Lactococcus* (TLC) sayımları yapılmış ve pH, titre edilebilir asitlik (TTA), kuru madde (KM), protein, yağ, kül ve tuz değerleri belirlenmiştir.

Mikrobiyolojik analizler için peynir örnekleri, 3.2.1’de verildiği şekilde homojenize edilmiş ve 10^{-6} ’ya kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Sonuçlar, ilgili dilüsyon faktörü kullanılarak log kob/g olarak hesaplanmıştır.

3.2.13.1. Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB) Sayımı

Seri dilüsyonlardan, plate count agar (PCA) besiyerlerine 0,1 mL aktararak yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır (Çakır, 2018). Petriler 37 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir (Alwazeer vd., 2020).

3.2.13.2. Toplam Maya-Küf (TMK) Sayımı

Seri dilüsyonlardan, PDA besiyerlerine 0,1 mL aktararak yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 25 °C’de 5 gün inkübe edilmiştir (Çakır, 2018).

3.2.13.3. Toplam *Lactobacillus* (TLB) sayımı

Seri dilüsyonlardan, de Man Rogosa Sharpe (MRS Agar) besiyerlerine 0,1 mL aktarılarak yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 37 °C’de 48 saat, anaerobik ortamda inkübe edilmiştir (Turgut vd., 2012).

3.2.13.4. Toplam *Lactococcus* (TLC) sayımı

Seri dilüsyonlardan, M-17 Agar besiyerlerine 0,1 mL aktarılarak yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 30 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir (Akoğlu vd., 2017).

3.2.13.5. pH Değerinin Belirlenmesi

Peynir örneklerinden 10 g alınarak, bir beherde 10 mL saf su ile homojenize edilmiş ve peynirlerin pH değerleri, pH metre (HI 2211-02, Hanna Instruments, ABD) ile ölçülmüştür (Ozturkoglu-Budak vd., 2016b).

3.2.13.6. Titre Edilebilir Asitliğin Belirlenmesi

Peynir örneklerinden 10 g tartılarak, porselen havana aktarılmıştır. Örnekler, önceden 40 °C’ye getirilmiş 105 mL saf su ile havanda iyice ezilmiş ve filtre kağıdından süzölmüştür. Erlenlere, süzöntüden 25 mL alınmış ve %1 fenolftalein indikatöründen 2-3 damla eklenerek, 0,1 N NaOH ile titre edilmiştir. Sonuçlar, % laktik asit cinsinden aşağıdaki formül (3.1) ile hesaplanmıştır (Çakır, 2018).

$$\% \text{ Laktik Asit} = \frac{(V_s \times 0,009)}{m} \times 100$$

V_s = Harcanan 0,1 N NaOH miktarı (mL) (3.1)

m = Tartılan peynir örneği (g)

3.2.13.7. Kuru Madde Tayini

Desikatörde tutularak sabit tartıma getirilen cam petrilere, peynir örneklerinden 5 g tartılarak, 102 °C’de 4 saat etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler, desikatöre

alınarak soğutulmuş ve sabit tartıma getirilince tartılmıştır. Örneklerin % kuru madde (KM) miktarı, aşağıdaki formül (3.2) ile hesaplanmıştır (Şahiner ve Yüceer, 2024).

$$\% KM = \frac{(m3 - m1)}{(m2 - m1)} \times 100$$

$m1$ = Cam petri kabının ağırlığı (g) (3.2)

$m2$ = Örneğin ve cam petri kabının ağırlığı (g)

$m3$ = Kurutulan örneğin ve cam petri kabının ağırlığı (g)

3.2.13.8. Protein Tayini

Peynir örneklerinde protein tayini, Kjeldahl metoduna göre yapılmıştır (Lynch vd., 2002; Hayaloğlu vd., 2011). Homojenize edilmiş peynir örneklerinden 0,5 g alınarak Kjeldahl yakma tüplerine aktarılmıştır. Tüplere 1'er tablet Kjeldahl katalizörü ve derişik H₂SO₄'ten 10 mL eklenmiş ve tüpler, yakma ünitesine yerleştirilmiştir. Örnekler, 430 °C'de yakılmış ve yakma işlemi sonucu yeşil renk açığa çıkmıştır. Tüpler, soğuduktan sonra, destilasyon ünitesine alınmıştır. Destilasyon ünitesinde, toplama kabı olarak bir erlen içerisine %4'lük borik asitten 25 mL eklenmiş ve 0,2 mL indikatör çözeltisi damlatılmıştır. Sistemden tüp içerisine, 10 M NaOH çözeltisinden 20 mL çekilmiş ve tüp siyah renk almıştır. Erlen içerisindeki çözelti, açık mavi oluncaya kadar destilasyona devam edilmiştir (yaklaşık 50 mL). Destilasyon işleminden sonra, erlen sistemden alınarak 0,1 N HCl asit ile gül kurusu rengi olana kadar titre edilmiştir. Peynir örneklerindeki toplam azot, aşağıdaki formül (3.3) ile hesaplanmıştır. Protein oranı hesabında ise, faktör olarak 6,38 kullanılmıştır.

$$\% Azot = \frac{Vs \times N \times 0,014}{m} \times 100$$

$$\% Protein = \% Azot \times 6,38$$

Vs = Harcanan HCl çözeltisi miktarı (mL) (3.3)

N = Harcanan HCl çözeltisi normalitesi

m = Tartılan örnek miktarı (g)

3.2.13.9. Yağ Tayini

Peynir örneklerinde yağ tayini, Gerber (Van Gulik) metodu ile yapılmıştır (Ardö ve Polychroniadou, 1999; Hayaloğlu vd., 2011). Peynir örneklerinden 3 g, bütirometrenin beherciğine tartılmış ve ağzı sıkıca kapatılmıştır. Bütirometrenin üst tarafından, %90'lık H₂SO₄'ten 10 mL eklenmiştir. Bütirometre, 65 °C'de su banyosunda, peynir tamamen çözünene kadar alt üst edilerek bekletilmiştir. Daha sonra, bütirometrenin üst tarafından 1 ml amil alkol eklenmiş ve bütirometre hafifçe çalkalanmıştır. Birkaç kez alt üst edildikten sonra, bütirometre tekrar 65 °C'de su banyosunda bekletilmiş ve örneklerin iyice çözünmesi sağlanmıştır. Bütirometreler, 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santifüjlenen bütirometreler, 65 °C'deki su banyosuna tekrar alınmış ve skaladan direkt % yağ oranı belirlenmiştir.

3.2.13.10. Kül Tayini

Porselen krozelere 3 g tartılan peynir örnekleri, 550 °C'de kül fırınında yakılmıştır. Soğutulan örnekler, desikatörde sabit tartıma getirildikten sonra tartılmıştır. Kül miktarı, aşağıdaki formül (3.4) kullanılarak, % olarak belirlenmiştir (Çakır, 2018; Hayaloğlu vd., 2011).

$$\% \text{ Kül} = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \times 100$$

m_1 = Örnek miktarı (g) (3.4)

m_2 = Krozenin ağırlığı (g)

m_3 = Yakma işlemi sonrası örneğin ve krozenin ağırlığı (g)

3.2.13.11. Mohr Yöntemi ile Tuz Tayini

Porselen havanda, 5'er g peynir örneği, kaynatılmış saf su ile iyice ezilmiştir. Bu işlem, suyun yavaş yavaş eklenmesiyle birkaç kez tekrarlanmıştır. Sıvı kısım, 500 mL'lik bir balon jøjeye aktarılmıştır. Sıvı kısım oda sıcaklığına gelince, balon jöjenin hacmi 500 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Bu kısımdan 25 mL alınarak erlene aktarılmış ve üzerine %5'lik K₂CrO₄ çözeltisinden 1-2 damla eklenmiştir. Örnek, kiremit rengi olana kadar 0,1 N AgNO₃ ile titre edilmiştir. Tuz miktarı, % olarak aşağıdaki formül (3.5) ile hesaplanmıştır (Hayaloğlu vd., 2011).

$$\% Tuz = \frac{V_s \times 0,0585}{m} \times 100$$

V_s = Harcanan 0,1 N AgNO₃ çözeltisi miktarı (mL) (3.5)

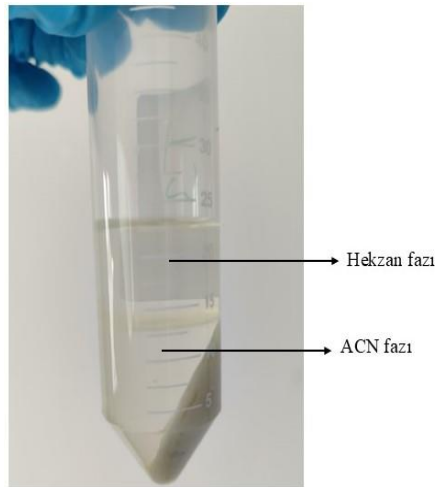
m = Tartılan örnek miktarı (g)

3.2.14. Peynirlerde Uçucu Bileşen Analizi

Peynir örneklerinden 3'er g alınarak, 20 mL'lik headspace viallerine aktarılmıştır. Analiz öncesi örnekler, -80 °C'de saklanmış ve analizden 16 saat önce 4 °C'ye alınmıştır (Caron vd., 2021). Peynirlerin uçucu bileşen analizleri, 3.2.10.5'e göre yapılmıştır.

3.2.15. Peynirlerde Rokfortin C ve Mikofenolik Asit Analizi

Peynir örneklerinden 4'er g alınarak, üzerine %0,1 formik asit içeren ACN'den 25 mL eklenmiş ve örnekler homojenize edilmiştir (Fontaine vd., 2015b). Örnekler 10 mL hekzan eklenmiş ve karışım, 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, Şekil 3.7'de verilen üst faz (hekzan fazı) atılarak, alt faz (ACN fazı), 0,45 µM CA filtreden geçirilmiştir. Filtrelenen ACN fazından 5'er mL cam tüplere alınmış, azot gazı altında 50 °C'de evapore edilmiştir. Kalan kısım, 2'şer mL metanol ile çözüldürülmüş ve bu kısım viallere alınmıştır. Peynir ekstraktlarında mikotoksinlerin belirlenmesi, 3.2.10.6'da belirtildiği gibi yapılmıştır.



Şekil 3.7: Peynir ekstraktlarında santrifüj sonrası faz ayrımı

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.16. İstatistiksel Analizler

Analizler üç paralel ile gerçekleştirilmiştir ve elde edilen veriler, varyans analizi (ANOVA) ve temel bileşen analizi (PCA) ile Minitab 18 (versiyon 18.1) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki önem dereceleri ise Tukey çoklu karşılaştırma ile %95 güven aralığında belirlenmiştir.



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

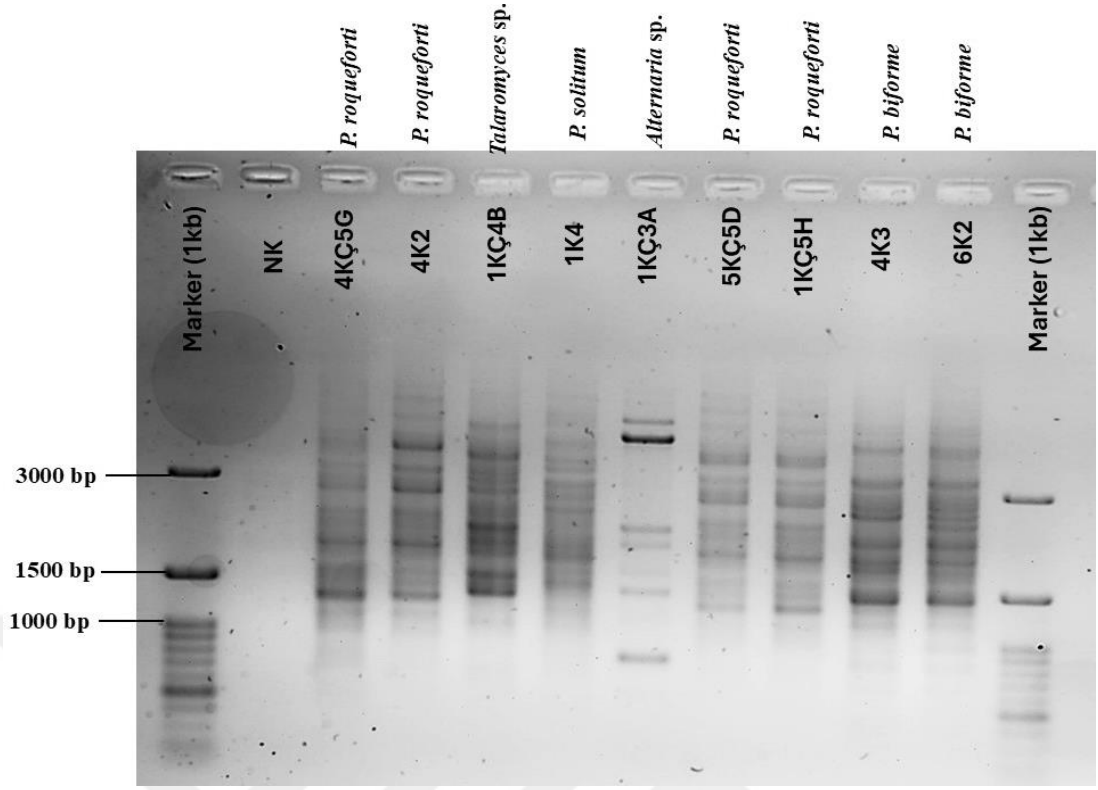
Geleneksel Türk küflü peynirlerinden elde edilen izolatların tanımlanması, *P. roqueforti* izolatlarının genetik, teknolojik ve metabolit üretme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları, aşağıda verilmiştir.

4.1. Küf İzolatlarının Tanımlanması

Peynir örneklerinden (n = 30), her bir peynirden en az iki izolat olmak üzere, 82 küf ve 4 maya, PDA üzerinde koloni morfolojilerine göre seçilerek izole edilmiştir.

4.1.1. İzolatların rep-PCR ile Analizi

Saflaştırılan 86 izolat, ön tanımlama için rep-PCR ile analiz edilmiştir. İzolatlar, daha önce Konya Küflü (KP kodlu) (Seri ve Metin, 2021) ve Rize-Ardeşen Golot (Metin, 2020) peynirlerinden izole edilmiş ve tanımlanmış 67 küf ve 11 maya izolatu ile agaroz jelde yürütülmüş ve band paternleri arasındaki farklılıklar incelenmiştir (EK3). Şekil 4.1’de bazı peynir izolatlarının rep-PCR jel görüntüsü verilmiştir. Buna göre, 86 izolat arasında 13 farklı band paterni tespit edilmiştir. Rep-PCR’a göre farklı band paternleri sergileyen izolatlar ile, tanımlama için ITS ve *benA* PCR analizlerine geçilmiştir.

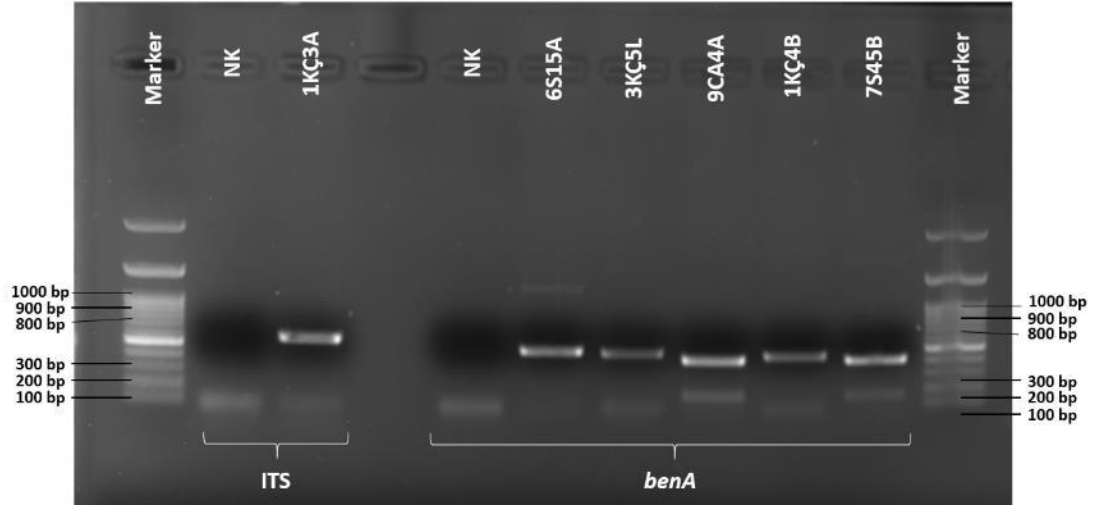


Şekil 4.1: Bazı küflü peynir izolatlarının (GTG)₅ rep-PCR jel görüntüsü. NK: Negatif kontrol; bp: baz çifti; kb: kilobaz. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.1.2. ITS ve *benA* PCR ile Dizi Analizi Sonuçları

İzolatlar, ITS ve *benA* bölgelerinin amplifikasyonu ile tanımlanmıştır. Şekil 4.2’de bazı izolatların ITS ve *benA* ampliconlarının jelde görüntüsü verilmiştir. ITS ampliconları 500-600 bp arası, *benA* ampliconları ise, 400-500 bp boyutlarındadır.



Şekil 4.2: Bazı izolatların ITS ve *benA* ampliconlarının agaroz jel görüntüsü. NK: Negatif kontrol; bp: baz çifti; kb: kilobaz. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

İzole edilen 82 küf izolatından 66'sı *P. roqueforti* (%76,6), 3'ü *P. biforme* (%3,5), 3'ü *P. crustosum* (%3,5), 2'si *P. paneum* (%2,3), 2'si *P. nordicum* (%2,3), 1'i *P. brevicompactum* (%1,2), 1'i *P. roseomaculatum* (%1,2), 1'i *Alternaria* sp. (%1,2), 1'i *Albifimbria verrucaria* (%1,2), 1'i *Cladosporium sphaerospermum* (%1,2) ve 1'i *Talaromyces* sp. (%1,2) olarak belirlenmiş ve çalışmada toplam 11 küf türü tespit edilmiştir. Dört maya izolatından ise, 2'ser *Geotrichum silvicola* (%2,3) ve *Kluyveromyces lactis* (%2,3) tanımlanmıştır. Çalışma kapsamında tanımlanan 86 izolat, Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Peynir İzolatları (n = 86) ve Tanımlama Yöntemi

Sayı	İzolat	İzolasyon Kaynağı	Tür	Tanımlama Yöntemi			NCBI ID
				ITS	<i>benA</i>	Parmak İzi Analizi	
1	1KÇ3A	Küflü Civil-1 (Erzurum)	<i>Alternaria</i> sp.	MK649970 (%99,62)			OQ194077
2	1KÇ4B		<i>Talaromyces</i> sp.		LT559088 (%94,22)		OQ565152
3	1KÇ5H		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%100)		OQ565165
4	1KÇ5F		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
5	2KÇ5B	Küflü Civil-2 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,04)		OQ565192
6	2KÇ5H		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%100)		OQ565166
7	2KÇ5I		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
8	3KÇ5A	Küflü Civil-3 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
9	3KÇ5L		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%100)		OQ565167
10	4KÇ5G	Küflü Civil-4 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
11	4KÇ5L		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,28)		OQ565191
12	5KÇ5A	Küflü Civil-5 (Kars)	<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,28)		OQ565188
13	5KÇ5B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
14	5KÇ5D		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
15	6S15A	Küflü Civil-6 (Erzurum)	<i>Penicillium bifforme</i>		MN969373 (%99,28)		OQ565158
16	6S15B		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,26)		OQ565189
17	6S15C		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
18	7S45A	Küflü Civil-7 (Erzurum)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	NR_166044 (%99,53)			OQ194078
19	7S45B		<i>Geotrichum silvicola</i>	NR_077071 (%98,46)			OQ194079
20	7S45C		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99)		OQ565190
21	7S45D		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
22	7S45E		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
23	8CO5A		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%100)		OQ565168

24	8CO5B	Küflü Civil-8 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,28)		OQ565186
25	9CA4A	Küflü Civil-9 (Erzurum)	<i>Geotrichum silvicola</i>	NR_077071 (%98,46)			OQ194080
26	9CA5B		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,26)		OQ565187
27	9CA5C		<i>Penicillium paneum</i>		AY674387 (%99,76)		OQ565163
28	9CA5D		<i>Kluyveromyces lactis</i>	NR_166044 (%99,55)			OQ194081
29	9CA5E		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,27)		OQ565184
30	10F5A	Küflü Civil-10 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
31	10F5B		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,27)		OQ565185
32	11KD5A	Küflü Civil-11 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,26)		OQ565183
33	11KD5B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
34	12KS5A	Küflü Civil-12 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
35	12KS5B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
36	13N5A	Küflü Civil-13 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
37	13N6B		<i>Penicillium brevicompactum</i>		KF499573 (%99)		OQ565153
38	13N5C		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
39	13N5D		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,23)		OQ565182
40	14S5A	Küflü Civil-14 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
41	14S5B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
42	14S5C		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,26)		OQ565169
43	15YA5A	Küflü Civil-15 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
44	15YA5B		<i>Penicillium roqueforti</i>		MN969396 (%99,25)		OQ565170
45	16KÇ5A	Küflü Civil-16 (Kars)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
46	16KÇ6B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
47	17EC4A	Küflü Civil-17 (Erzurum)	<i>Penicillium paneum</i>		AY674387 (%100)		OQ565164
48	17EC4B		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,50)		OQ565180
49	17EC5C		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,50)		OQ565181

50	18KÇ5A	Küflü Civil-18 (Kars)	<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,50)		OQ565178
51	18KÇ5B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
52	18KÇ6C		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
53	19SZ5A	Küflü Tulum- 19 (Sivas- Zara)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
54	19SZ5B		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,50)		OQ565179
55	19SZ6D		<i>Albifimbria verrucaria</i>		KU845969 (%99,39)		OQ565151
56	19SZ6E		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	AY361958 (%100)			OQ194082
57	20ÇE5A	Küflü Civil-20 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
58	20ÇE5B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
59	21LE6A	Küflü Civil-21 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,50)		OQ565177
60	21LE6B		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,50)		OQ565175
61	22EE5A	Küflü Civil-22 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,50)		OQ565174
62	22EE6B		<i>Penicillium roqueforti</i>		KM503650 (%99,50)		OQ565176
63	23SE5A	Küflü Civil-23 (Erzurum)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
64	23SE5B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
65	24ÇK6A	Küflü Tulum- 24 (Konya)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
66	24ÇK6B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
67	25SK5A	Küflü Tulum- 25 (Konya)	<i>Penicillium crustosum</i>		MN969379 (%99,76)		OQ565156
68	25SK6B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
69	25SK6C		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
70	26KK5A	Küflü Tulum- 26 (Karaman)	<i>Penicillium roqueforti</i>		MN969396 (%99,51)		OQ565173
71	26KK5B		<i>Penicillium roqueforti</i>		MN969396 (%100)		OQ565172
72	26KK6C		<i>Penicillium roseomaculatum</i>		KT588913 (%99,75)		OQ565154
73	27LK6A	Küflü Tulum- 27 (Konya)	<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
74	27LK6B		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	

75	27LK6C		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
76	28DK2A	Obruk Tulum- 28 (Divle)	<i>Penicillium biforme</i>		MN969373 (%100)		OQ565159
77	28DK2B		<i>Penicillium nordicum</i>		MK675758 (%99,50)		OQ565161
78	28DK3C		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
79	28DK3D		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	
80	28DK4E		<i>Penicillium nordicum</i>		MK675758 (%99,52)		OQ565162
81	29EK4A		Küflü Tulum- 29 (Konya)	<i>Penicillium biforme</i>		MN969373 (%99,51)	
82	29EK5B	<i>Penicillium roqueforti</i>				(GTG)5 & M13F	
83	29EK5C	<i>Penicillium roqueforti</i>			MN96939 (%100)		OQ565171
84	30DB5A	Küflü Tulum- 30 (Konya)	<i>Penicillium crustosum</i>		MN969379 (%99,75)		OQ565155
85	30DB5B		<i>Penicillium crustosum</i>		MN969379 (%99,26)		OQ565157
86	30DB5C		<i>Penicillium roqueforti</i>			(GTG)5 & M13F	

Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Çalışma kapsamında tanımlanan 82 küfün izole edildiği peynirlere göre dağılımı, Tablo 4.2’de verilmiştir. Türkiye’de küflü peynirler, genellikle sekonder starter kültür kullanılmadan üretilmektedir. Bu nedenle küfler, mikrobiyotada süttten ya da peynirin olgunlaştığı çevreden bulaşmakta ve spontan gelişmektedir. Türkiye küflü peynirlerinde, *P. roqueforti* baskın tür olarak öne çıkarken, *P. bifforme*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. polonicum*, *P. rubens*, *P. spinulosum*, *P. solitum* ve *P. verrucosum* gibi diğer *Penicillium* türleri de tanımlanmıştır (Hayaloğlu ve Kırbağ, 2007; Sağdıç vd., 2008; Çakmakçı vd., 2012; Ozturkoglu-Budak vd., 2016a; Metin, 2020; Ertas-Onmaz vd., 2021; Kirtil vd., 2021; Seri ve Metin, 2021). *Penicillium* cinsi dışında, peynirlerden *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* ve *Trichoderma* cinsi küfler de izole edilmiştir (Hayaloğlu ve Kırbağ, 2007; Ozturkoglu-Budak vd., 2016a; Seri ve Metin 2021).

Konya küflü peynirinden izole edilen *P. crustosum* ve Erzurum Küflü Civil peynirinden izole edilen *P. brevicompactum*, İtalyan ve Fransız peynirlerinden de izole edilmiş olup, peynir kontaminantı olarak değerlendirilmiştir (Garnier vd., 2017; Kure ve Skaar, 2019). Karaman Küflü Tulum peynirinden izole edilen *P. roseomaculatum* ise önceki çalışmalarda toprak, kereste, kuru üzüm gibi ortamlardan izole edilmiştir (Houbraken vd., 2014). Erzurum Küflü Civil peynirinden izole edilen *P. paneum* ise *P. roqueforti*’ye oldukça yakın bir türdür ve izolasyon kaynağı daha çok toprak, silaj, çavdar ekmeği gibi ortamlardır (Houbraken vd., 2010; Ogawa vd., 2014). Divle Obruk peynirinden izole edilen *P. nordicum* suşlarının okratoksin üreticisi olduğu ifade edilmiş olup, yine peynir kontaminantı olarak değerlendirilmiştir (Hymery vd., 2014; Leggieri vd., 2020). Sivas Zara küflü peynirinden izole edilen *Albifimbria verrucaria*, *Talaromyces* sp. ve *Alternaria* sp. Türlerinin ise bitki patojeni olduğu bildirilmiş olup (Gullino vd., 2019; Houbraken vd., 2020; DeMers, 2022), peynire depolandığı ortamdan gelen bir kontaminant olabileceği düşünülmüştür.

Tablo 4.2: Kf izolatlarının (n = 82) peynirlere göre dağılımı

Peynir eşidi	Bölge	rnek Sayısı	Kf Türü
Küflü Civil	Erzurum	19	<i>Penicillium roqueforti</i> (n=42) <i>Penicillium paneum</i> (n=2) <i>Penicillium biforme</i> (n=1) <i>Penicillium brevicompactum</i> (n=1) <i>Alternaria</i> sp. (n=1) <i>Talaromyces</i> sp. (n=1)
	Kars	3	<i>Penicillium roqueforti</i> (n=8)
KflTulum	Sivas-Zara	1	<i>Penicillium roqueforti</i> (n=2) <i>Albifimbria verrucaria</i> (n=1) <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (n=1)
	Konya	5	<i>Penicillium roqueforti</i> (n=10) <i>Penicillium crustosum</i> (n=3) <i>Penicillium biforme</i> (n=1)
	Karaman	1	<i>Penicillium roqueforti</i> (n=2) <i>Penicillium roseomaculatum</i> (n=1)
	Divle	1	<i>Penicillium roqueforti</i> (n=2) <i>Penicillium nordicum</i> (n=2) <i>Penicillium biforme</i> (n=1)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Çalışma kapsamında tanımlanan (n=66) ve önceki çalışmalarda (Metin, 2020; Seri ve Metin, 2021) izole edilen (n=54), toplam 120 *P. roqueforti*'nin izole edildikleri peynirlere göre Türkiye haritasında dağılımı Şekil 4.3'te verilmiştir.

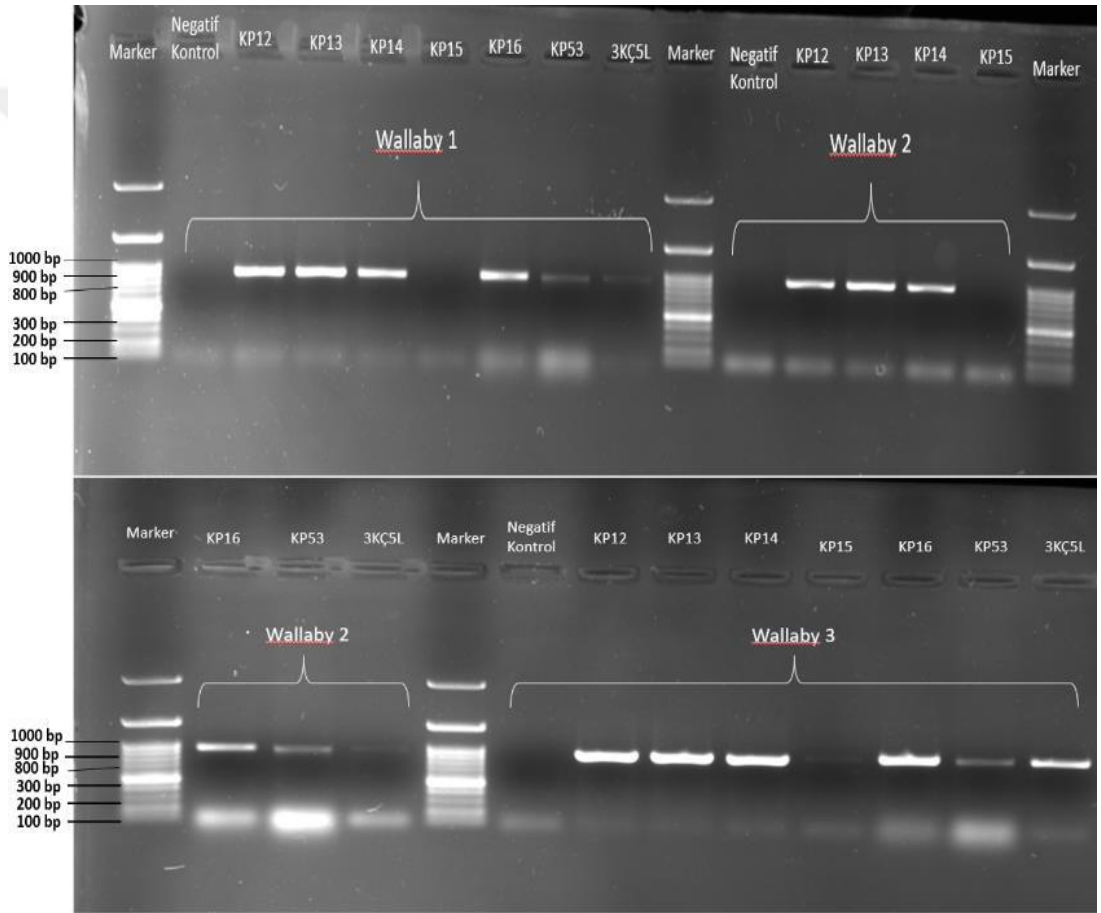


Şekil 4.3: *P. roqueforti* izolatlarının (n=120) Türkiye haritasında dağılımı

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

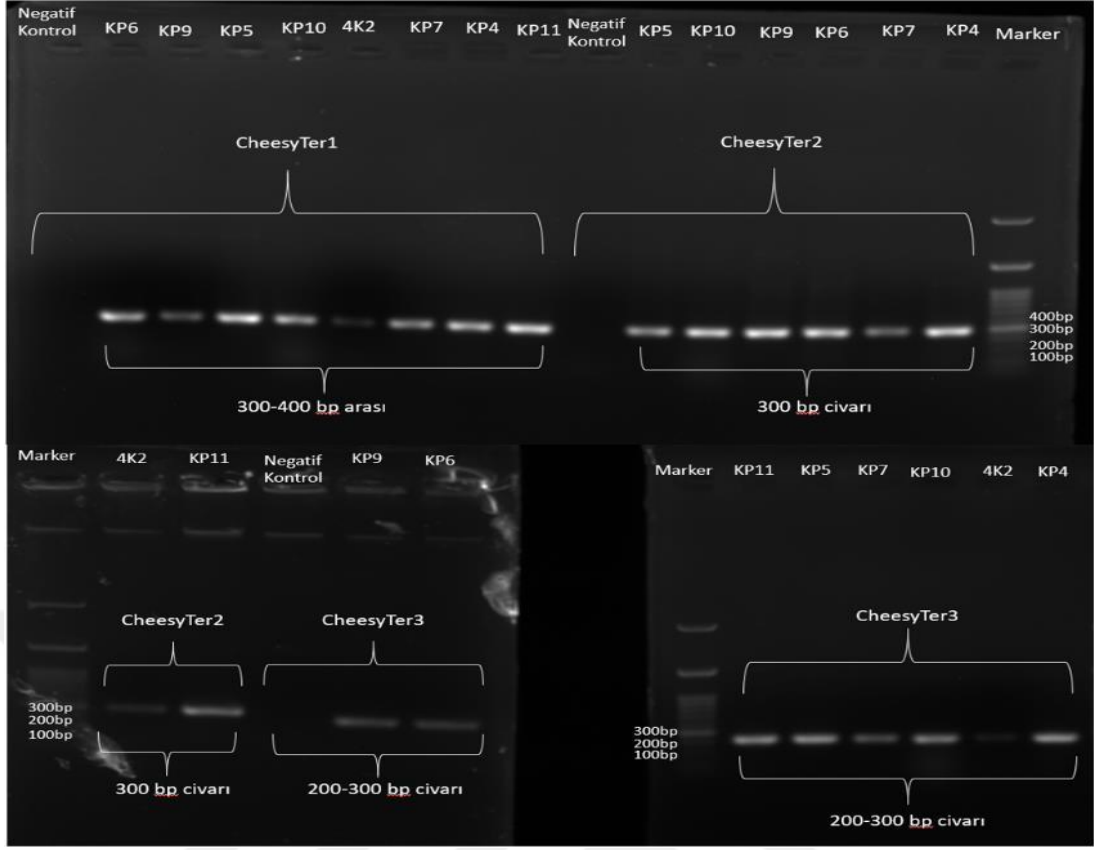
4.2. İzole Edilen Peynir Küflerinin Genetik Özellikleri

Bu çalışmada (Tablo 4.1) ve önceki çalışmalarda (Metin, 2020; Seri ve Metin, 2021) elde edilmiş 120 *P. roqueforti*, 13 *P. biforme*, 3 *P. crustosum*, 2 *P. nordicum*, 2 *P. paneum*, 1 *P. brevicompactum*, 1 *P. roseomaculatum*, 1 *Alternaria* sp., 1 *A. verrucaria*, 1 *C. cladosporioides*, 1 *C. macrocarpum*, 1 *C. sphaerospermum* ve 1 *Talaromyces* sp. olmak üzere, 148 küf izolatının *CheesyTer* ve *Wallaby* bölgelerine sahip olup olmadıkları PCR'da incelenmiştir. Bazı izolatların *Wallaby* (800-900 bp) ve *CheesyTer* (400-500 bp) ampliconlarının jel görüntüleri, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.4: Bazı küf izolatlarının *Wallaby* PCR ampliconlarının jel görüntüsü. bp: baz çifti. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.5: Bazı küf izolatlarının *CheesyTer* PCR amplikonlarının jel görüntüsü. bp: baz çifti. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Taranan 120 *P. roqueforti* izolatının hepsinde *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgeleri tespit edilmiştir. Diğer *Penicillium* türlerinden *P. bifforme*'nin 11 izolatında her iki bölge tespit edilirken, iki izolatta (1K3 ve 28DK2A) sadece *CheesyTer* bölgesi tespit edilmiştir. Üç türe ait izolatlarda, *P. solitum* (1K4)'da, *P. paneum*'un 1 izolatında (9CA5C) ve *P. roseomaculatum* (26KK6C)'da, sadece *CheesyTer* bölgesi belirlenmiştir. *P. crustosum*'un iki izolatında (25SK5A ve 30DB5B) ise, her iki bölge tespit edilmiştir. Dört izolattan (17EC4A, 28DK2B, 28DK4E ve 30DB5A) bu bölgeler için sonuç alınamamış ve bu izolatların genomunda, bu bölgelerin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. *P. brevicompactum* (13N6B)'da *Wallaby0* primeri pozitif sonuç verdiği için *Wallaby* bölgesi bulunmamaktadır ve *CheesyTer* bölgesi de tespit edilememiştir.

Dumas vd. (2020), 4 ayrı *P. roqueforti* popülasyonundan (ağaçlık alan, silaj, rokfor peyniri ve diğer küflü peynirler) sadece rokfor olmayan diğer küflü peynirlerde *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgelerinin var olduğunu göstermiştir. *Wallaby* ve *CheesyTer*

bölgelerinin varlığının, peynir ortamında bazı türler için adaptasyon avantajı sağladığı düşünülmektedir (Ropars vd., 2020a). Bulgular, *P. roqueforti*'nin, domestikasyon sürecinde bu bölgeleri, etkileşimde oldukları diğer türlerden, genomuna yatay gen transferiyle alarak peynir ortamına adaptasyon sağladığına işaret etmektedir. *P. roqueforti*'de tespit edilen bazı yatay gen transfer bölgelerinin *P. camemberti* ve *P. biforme*'den DNA transpozonları ya da retrotranspozonlar ile aktarılmış olabileceği ya da bu türlerin paylaştığı aynı ekolojik nişte ortak bir atadan gelmiş olabileceği ifade edilmiştir (Cheeseman vd., 2014; Ropars vd., 2015; Ropars vd., 2020b). Cheeseman vd. (2014), diğer *Penicillium* türlerinden *P. solitum* ve *P. nordicum*'da da Wallaby bölgesini tespit etmişlerdir.

4.3. *P. roqueforti* Peynir İzolatlarının Morfolojik ve Genetik Çeşitliliği

Çalışma kapsamında (n=66) ve önceki çalışmalarda izole edilerek tanımlanmış (Metin, 2020; Seri ve Metin, 2021) (n=54) toplam 120 *P. roqueforti* izolatının morfolojik ve genetik çeşitlilikleri incelenmiştir.

4.3.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri

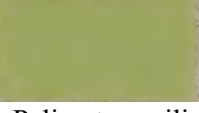











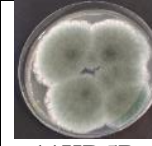





P. roqueforti izolatlarının morfolojik özellikleri PDA, MEA, YES ve OA besiyerlerinde incelenmiş ve izolatlar çoğunlukla birbirlerine benzer bulunmuştur. *P. roqueforti* 4K2 izolatı ve çalışma kapsamında tanımlanan 66 *P. roqueforti* izolatının dört besiyerinde koloni morfolojileri, EK4'te verilmiştir. İzolatlar arasında morfolojik farklılıklar, PDA besiyerinde ayırt edilebildiğinden bu besiyeri üzerinden değerlendirme yapılmıştır.















































İzolatların PDA üzerinde ön yüzeyleri incelenmiş ve kolonilerin renkleri, Ridgway (1912) skalasından göz ile kıyaslanarak gruplanmıştır (Tablo 4.3). Daha önce Seri ve Metin (2021)'in incelediği Tulum peyniri örneklerinden elde edilen 53 *P. roqueforti* izolatı, pelin otu yeşili, karaağaç yeşili ve krom yeşili olarak 3 grupta toplanmıştır. Bu izolatlardan her bir grubu temsil eden KP14, KP19 ve KP52 izolatları referans olarak seçilerek diğer 67 *P. roqueforti* izolatı gruplandırılmıştır. İzolatlar, PDA üzerinde referans renk skalasında pelin otu yeşili (absinthe green), karaağaç yeşili (elm green), krom yeşili (chromium green), imparatorluk yeşili (empire green), orman yeşili (forest green), kobalt yeşili (Rinnemans's green) ve Prusya yeşili (Prussian green) olarak 7



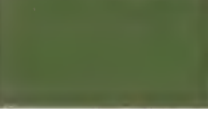
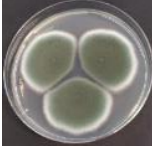


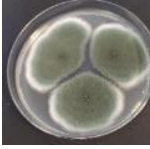



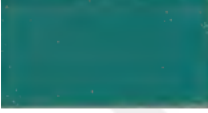


gruba ayrılmıştır. İzolatlar ayrıca, PDA üzerinde koloni kenarları toplu, dağınık şekilli, pamuklu, sınırlandırılmış gelişme, kenarlarında tırtıklı/ipliksi yapı ve dağılan yapı göstermiştir. KP14 ve 26KK5A, diğerlerinden farklı olarak düzensiz sınırlı bir üreme paterni sergilemiştir. 17EC4B ve 27LK6A kolonileri, PDA üzerinde dağılan bir yapı göstermiştir. 9CA5E ve 13N5C izolatları ise, PDA üzerinde eksüdat üretmiştir. Bu izolatlar, farklı zamanlarda tekrar inoküle edilerek morfolojik özellikleri incelenmiş, yine aynı bulgular gözlenmiştir.

Gillot vd. (2015), mavi damarlı peynirlerden ve peynir dışı ortamlardan izole ettikleri *P. roqueforti* izolatlarının morfolojik özelliklerini Czapek maya özütü agarı (CYA), gliserol nitrat agar (G25N), MEA, PDA, YES ve kreatin sukroz agar (CREA) kullanarak incelemiş ve izolatlar arasında en yüksek çeşitlilik gözlenen besiyerini PDA olarak raporlamıştır. Bu çalışmaya göre, koloniler PDA’da açık yeşil, gri, soluk sarı, zeytin yeşili ve koyu yeşil tonlarında; koloni dokusu ise kadifemsi, demet halinde ve hafif pamuksu özellikler göstermiştir. Türkiye peynirlerinden elde edilen *P. roqueforti* izolatlarının koloni morfolojileri, Gillot vd. (2015)’nin sonuçlarına benzer özellikler sergilemiştir.

Tablo 4.3: *P. roqueforti* izolatlarının PDA besiyerinde gruplandırılması

Renk	PDA (Ön)				
 Pelin otu yeşili (Absinthe green)	 KP14	 20ÇE5A			
	 KP19	 2KÇ5B	 4KÇ5G	 4KÇ5L	 5KÇ5A
	 5KÇ5B	 6S15B	 7S45E	 10F5B	 11KD5B
	 15YA5A	 15YA5B	 17EC5C	 18KÇ5C	 21LE6A

 Karaağaç yeşili (Elm green)	 21LE6B	 22EE6B	 23SE5A	 27LK6C	 28DK3D	
	 4K2	 1KÇ5H	 3KÇ5A	 19SZ5B	 24ÇK6A	
	 24ÇK6B					
 Krom yeşili (Chromium green)	 KP52	 1KÇ5F	 2KÇ5H	 3KÇ5L	 5KÇ5D	
	 7S45C	 8CO5A	 9CA5B	 10F5A	 12KS5A	
	 13N5A	 14S5A	 14S5B	 16KÇ5A	 16KÇ6B	
	 17EC4B	 18KÇ5A	 18KÇ5B	 19SZ5A	 20ÇE5B	
	 23SE5B	 25SK6C	 26KK5A	 26KK6B	 27LK6A	
	 27LK6B	 28DK3C	 30DB5C			
		 2KÇ5I	 6S15C	 8CO5B	 11KD5A	 12KS5B

 İmparatorluk yeşili (Empire green)	 25SK6B				
 Orman yeşili (Forest green)	 7S45D	 9CA5E	 13N5C	 13N5D	 14S5C
 Kobalt yeşili (Rinnemann's green)	 29EK5C				
 Prusya yeşili (Prussian green)	 22EE5A	 29EK5B			

Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.3.2. İzolatların Eşey Tipleri

P. roqueforti izolatları (n=120) içerisinde sadece 6 tanesinin *MAT1-1* genotipine, yani *MAT1-1* eşey tipine sahip olduğu, dolayısıyla *MAT1-2* eşey tipine sahip izolatların Türkiye *P. roqueforti* izolatlarının %95'ini oluşturduğu saptanmıştır.

Ropars vd. (2014), peynir ortamından ve peynir dışı ortamdan izole ettikleri 114 *P. roqueforti* izolatını cluster A (sadece peynir suşları) ve cluster B (silaj, kereste, odun, peynir, meyve yüzeyi, buzdolabı içi vb.) şeklinde kümelendirerek eşey tipini belirlemişlerdir. Buna göre, Wallaby bölgesini bulunduran ve sadece peynir izolatlarından oluşan cluster A'daki *P. roqueforti* izolatlarının %91'inin eşey tipi *MAT1-2*, bazı peynir ve diğer ortamlardan gelen *P. roqueforti* suşlarının oluşturduğu cluster B'de ise suşların %82'sinin eşey tipini *MAT1-1* olarak belirlemişlerdir. Son çalışmalarla, bu kümelendirme geliştirilerek *P. roqueforti*'nin üçü peynir ortamından gelen (Rokfor, Termignon ve mavi peynirler) ve ikisi peynir dışı ortamdan gelen (silaj, kereste, ağaçlık alan vb.) suşlarından oluşan beş ayrı popülasyonu tanımlanmıştır

(Dumas vd., 2020; Crequer vd., 2023). Ropars vd. (2015), *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgelerini bulunduran ve daha sonra Rokfor olmayan mavi peynir popülasyonunda değerlendirilen, 141 *P. roqueforti* izolatından 134'ünün (%95) eşey tipini *MAT1-2*; *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgelerini bulundurmayan Rokfor peyniri popülasyonuna dahil edilen 49 suşun 40'ının (%81,6) ise eşey tipini *MAT1-1* olarak tespit etmişlerdir. Buna göre, Türkiye küflü peynir izolatları (Tablo 4.4), Rokfor harici mavi peynir izolatları grubundakine benzer bir dağılım göstermiştir.

Zıt eşey tiplerine sahip, *MAT1-1* ve *MAT1-2* izolatlarının, Erz. Küf. Civil-13 (Nurşem), Sivas-Zara Küflü Peyniri-19, Konya Küf. Tulum-29 (Ereğli) peynirlerinde bir arada bulunduğu gözlenmiştir. Benzer olarak Ropars vd. (2012b), çeşitli ülkelerden gelen üç peynir örneğinde her iki eşey tipinden izolatın bir arada bulunduğunu belirtmişlerdir. Peynirlerde zıt eşey tipine sahip izolatların varlığı, *P. roqueforti*'nin peynir ortamında eşeyli üreme potansiyelini göstermektedir. Bu çalışmada ve Ropars vd. (2012b)'de eşeyli üreme yapıları gözlenmemiş olsa da; Ropars vd. (2014) çalışmalarında, *P. roqueforti*'nin eşeyli üreme yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Peynirde zıt eşey tiplerine sahip izolatların bir arada bulunması, Türkiye küflü peynirlerinin üretimi sırasında bu izolatları bir araya getiren uygun koşulların oluştuğunu göstermektedir.

Tablo 4.4: Çalışmada kullanılan *P. roqueforti* izolatlarının genetik özellikleri

No	İzolat	İzolasyon kaynağı	RAPD 2750 bp	<i>Wallaby/CheesyTer</i>	<i>mpaC</i> delesyonu	<i>MAT</i> aleli	Mikrosatelit alel kombinasyonu (Proq 01_3-Proq16-Proq 02_2)	Haplotip	Kaynaklar
1	KP1	Konya Küflü Tulum	-	+/+	-	2	2-6-10	HT1	Seri ve Metin, 2021
2	KP2		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
3	KP3		+	+/+	-	2	2-6-2	HT3	
4	KP4		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
5	KP5		-	+/+	-	2	2-2-8	HT4	
6	KP6		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
7	KP7		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
8	KP9		-	+/+	-	2	2-6-1	HT5	
9	KP10		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
10	KP11		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
11	KP12*		-	+/+	-	2	2-6-3	HT6	
12	KP13		-	+/+	-	2	2-6-3	HT6	
13	KP14*		-	+/+	-	2	3-2-1	HT7	
14	KP15		-	+/+	-	2	3-2-1	HT7	
15	KP16		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
16	KP17		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
17	KP18		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
18	KP19		-	+/+	-	2	2-2-7	HT8	
19	KP20*		-	+/+	-	2	2-4-12	HT9	
20	KP22		-	+/+	-	2	3-2-1	HT7	
21	KP25*		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
22	KP26		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
23	KP27*		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
24	KP28		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
25	KP30		-	+/+	-	2	2-4-11	HT11	
26	KP31*		+	+/+	-	2	2-4-11	HT11	

27	KP32		+	+/+	-	2	2-4-11	HT11	
28	KP33		-	+/+	-	2	2-3-11	HT12	
29	KP34		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
30	KP37		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
31	KP38		+	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
32	KP39		+	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
33	KP40		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
34	KP41		-	+/+	-	2	2-6-10	HT1	
35	KP42		-	+/+	-	2	2-4-16	HT13	
36	KP43		-	+/+	-	2	2-2-1	HT14	
37	KP44*		-	+/+	-	2	2-1-13	HT15	
38	KP45		-	+/+	-	2	2-2-1	HT14	
39	KP47*		-	+/+	-	1	2-4-9	HT16	
40	KP48		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
41	KP49		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
42	KP50		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
43	KP51		+	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
44	KP52		-	+/+	-	2	1-4-2	HT17	
45	KP53		-	+/+	-	2	2-2-7	HT8	
46	KP54		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
47	KP55		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
48	KP56		-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
49	KP58*		-	+/+	TE	2	6-6-12	HT18	
50	KP59*		-	+/+	-	2	6-6-12	HT18	
51	KP61		-	+/+	-	2	6-2-1	HT19	
52	KP62		-	+/+	-	2	4-2-1	HT20	
53	KP63		-	+/+	-	2	4-2-1	HT20	
54	4K2*	Rize-Ardeşen Golot Peyniri	-	+/+	TE	2	6-6-11	HT21	Metin, 2020
55	1KC5H	Erzurum Küflü Civil-1	-	+/+	-	2	2-2-8	HT4	
56	1KC5F		-	+/+	-	2	3-6-2	HT22	
57	2KC5B	Erzurum	+	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
58	2KC5H*	Küflü Civil-2	-	+/+	-	2	2-2-8	HT4	
59	2KC5I		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
60	3KC5A	Erzurum	+	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
61	3KC5L*	Küflü Civil-3	-	+/+	-	2	1-4-2	HT17	
62	4KC5G	Erzurum	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
63	4KC5L	Küflü Civil-4	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
64	5KC5A	Kars Küflü	-	+/+	-	2	2-6-1	HT5	
65	5KC5B	Civil-5	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
66	5KC5D		+	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
67	6S15B	Erzurum	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
68	6S15C	Küflü Civil-6	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
69	7S45C	Erzurum	-	+/+	-	2	6-5-4	HT23	
70	7S45D*	Küflü Civil-7	-	+/+	-	2	2-6-1	HT5	
71	7S45E		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
72	8CO5A	Erzurum	-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	Bu çalışma
73	8CO5B	Küflü Civil-8	+	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
74	9CA5B*	Erzurum	-	+/+	-	2	6-5-4	HT23	
75	9CA5E	Küflü Civil-9	-	+/+	-	2	2-6-1	HT5	
76	10F5A	Erzurum	-	+/+	-	2	2-2-2	HT10	
77	10F5B	Küflü Civil-10	+	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
78	11KD5A	Erzurum	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
79	11KD5B*	Küflü Civil-11	-	+/+	-	2	2-6-10	HT1	
80	12KS5A	Erzurum	-	+/+	-	2	2-6-10	HT1	
81	12KS5B	Küflü Civil-12	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
82	13N5A	Erzurum	-	+/+	-	1	6-5-4	HT23	
83	13N5C	Küflü Civil-13	-	+/+	-	2	2-6-1	HT5	
84	13N5D		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2	
85	14S5A		-	+/+	TE	2	2-6-9	HT2	

86	14S5B	Erzurum Küflü Civil-14	-	+/+	-	2	2-2-3	HT24
87	14S5C		-	+/+	-	2	2-6-10	HT1
88	15YA5A	Erzurum Küflü Civil-15	+	+/+	-	2	2-6-9	HT2
89	15YA5B*		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
90	16KC5A	Kars Küflü Civil-16	-	+/+	TE	2	6-6-11	HT21
91	16KC6B		-	+/+	-	2	5-4-19	HT25
92	17EC4B*	Erzurum Küflü Civil-17	-	+/+	-	2	5-5-18	HT26
93	17EC5C		-	+/+	-	2	2-6-7	HT27
94	18KC5A	Kars Küflü Civil -18	-	+/+	-	2	2-6-1	HT5
95	18KC5B		-	+/+	-	2	2-6-1	HT5
96	18KC6C		+	+/+	TE	2	6-6-11	HT21
97	19SZ5A	Sivas-Zara Küflü Tulum-19	-	+/+	-	1	6-5-5	HT28
98	19SZ5B		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
99	20CE5A	Erzurum Küflü Civil-20	-	+/+	-	2	2-6-1	HT5
100	20CE5B		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
101	21LE6A	Erzurum Küflü Civil-21	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
102	21LE6B		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
103	22EE5A*	Erzurum Küflü Civil-22	-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
104	22EE6B		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
105	23SE5A	Erzurum Küflü Civil-23	-	+/+	-	1	2-4-15	HT29
106	23SE5B		-	+/+	-	1	2-4-12	HT9
107	24CK6A	Konya Küflü Tulum-24 (köyler)	-	+/+	-	2	2-7-1	HT30
108	24CK6B		-	+/+	-	2	2-4-2	HT31
109	25SK6B	Konya Küflü Tulum-25 (köyler)	-	+/+	-	2	2-6-10	HT1
110	25SK6C		-	+/+	-	2	2-4-12	HT9
111	26KK5A*	Küflü Karaman Tulum-26	-	+/+	-	2	1-2-17	HT32
112	26KK5B		-	+/+	-	2	2-4-8	HT33
113	27LK6A	Konya Küflü Tulum-27 (köyler)	-	+/+	-	2	5-5-18	HT26
114	27LK6B		-	+/+	TE	2	6-6-11	HT21
115	27LK6C		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
116	28DK3C	Divle Obruk Tulumu-28	-	+/+	-	2	2-2-2	HT10
117	28DK3D		-	+/+	-	2	2-6-9	HT2
118	29EK5B	Konya Küflü Tulumu-29 (köyler)	-	+/+	-	2	2-6-13	HT34
119	29EK5C		-	+/+	-	1	2-5-6	HT35
120	30DB5C	Konya Küflü Tulum-30 (köyler)	-	+/+	-	2	2-6-14	HT36

Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

* Filogenetik analizler için seçilen izolatlar

bp: baz çifti; TE: Tespit edilemedi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.3.3. İzolatların Yatay Gen Transfer Bölgeleri (*Wallaby* ve *CheesyTer*)

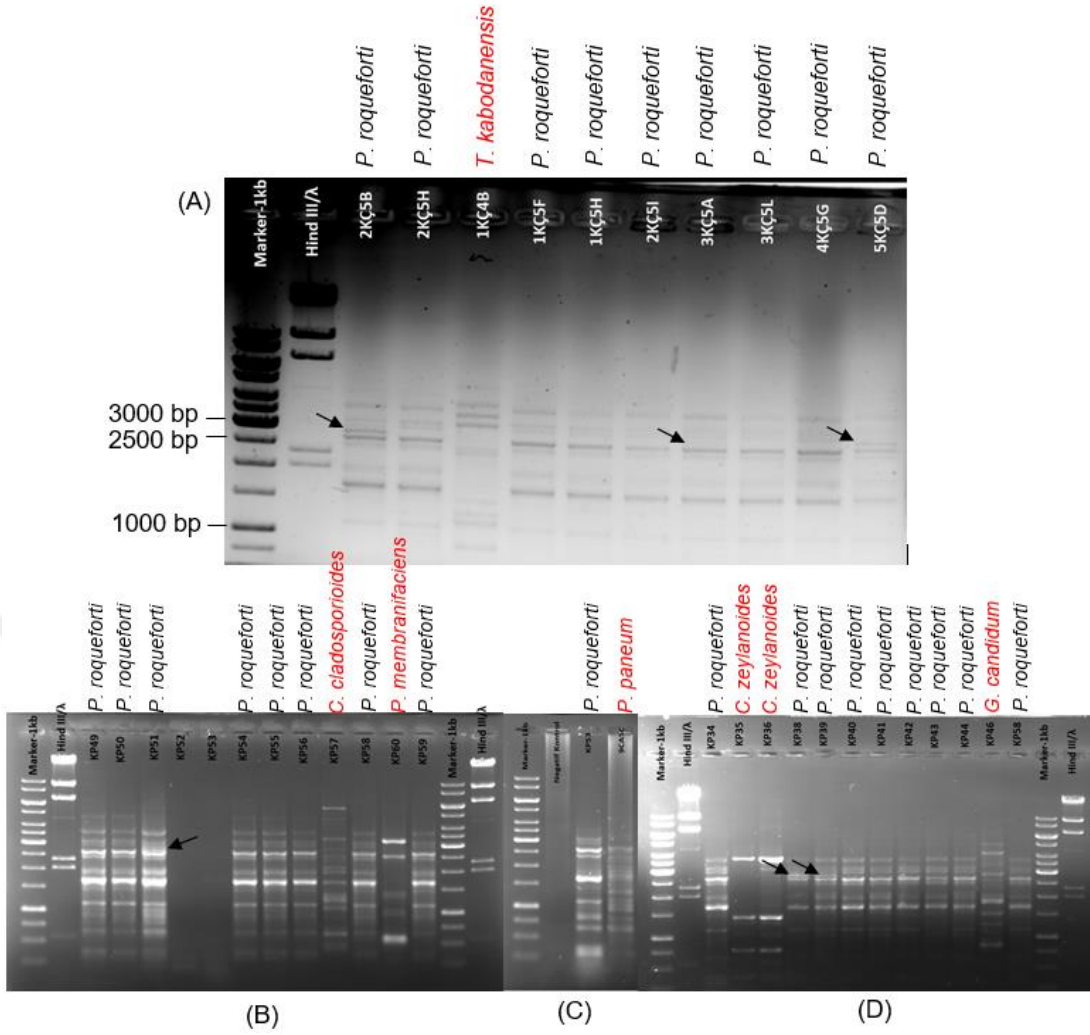
Yatay gen transfer bölgeleri, *Wallaby* ve *CheesyTer*, tüm *P. roqueforti* izolatlarında (n = 120) tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Bu açıdan Türkiye küflü peynirlerine has *P. roqueforti* izolatları, W+C+ olan *P. roqueforti* popülasyonuna (Rokfor harici mavi peynir izolatları) yakınlık göstermektedir (Ropars vd., 2014; Dumas vd., 2020; Crequer vd., 2023).

4.3.4. İzolatların *mpaC* Gen Bölgesi

P. roqueforti izolatlarının mikofenolik asit biyosentezinde önemli rol oynayan *mpaC* genindeki delesyonun varlığı, Doç. Dr. Banu Metin'in danışmanlığında "Türkiye küflü peynirlerinden elde edilen *P. roqueforti* izolatlarının mikofenolik asit biyosentez geni *mpaC*'deki delesyon varlığı yönünden incelenmesi" başlıklı TÜBİTAK 2209-A projesi kapsamında yapılmış ve çalışma sonuçları Tablo 4.4'e ve filogenetik ağaçlara eklenmiştir (Kirtıl vd., 2024). Bu projede, Rokfor harici mavi peynir izolatlarının (Gillot vd., 2017; Crequer vd., 2023) aksine çoğu Türkiye izolatı (114/120), *Wallaby* ve *CheesyTer* varlığı ile ilişkili *mpaC* gen delesyonunu göstermemiştir. Söz konusu projede, sonuç alınamayan 6 izolatın primer bağlanma yerlerindeki polimorfizmler veya *mpaC* geninin yokluğu nedeniyle, PCR ürünü vermediği öngörülmüştür. Türkiye izolatlarının *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgesini taşımasına rağmen, *mpaC* geninde 174 bp'lik delesyonun olmaması, Gillot vd. (2017a)'nin çalışmasındaki izolat gruplarından ayırmaktadır. Ancak, bu izolatlar Crequer vd. (2023)'ün çalışmasındaki Termignon izolatlarına benzemektedir.

4.3.5. İzolatların RAPD-PCR ile Parmak İzi Analizi

İzolatların RAPD-PCR ile parmak izi analizinde tür bazında ayırımın yanı sıra bazı *P. roqueforti* izolatlarının suş bazında ayırımı sağlanmıştır. Şekil 4.6'te bazı *P. roqueforti* izolatlarında gözlenen 2750 bp civarı bant, ok ile gösterilmiştir. Bu bantın görüldüğü 13 izolat Tablo 4.4'te verilmiştir. M13 primerinin farklı küf/maya türlerini birbirinden gayet net bir şekilde ayırdığı da görülmektedir (Şekil 4.6). Tüm küf ve maya izolatlarının RAPD-PCR jel görüntüleri EK5'te verilmiştir.



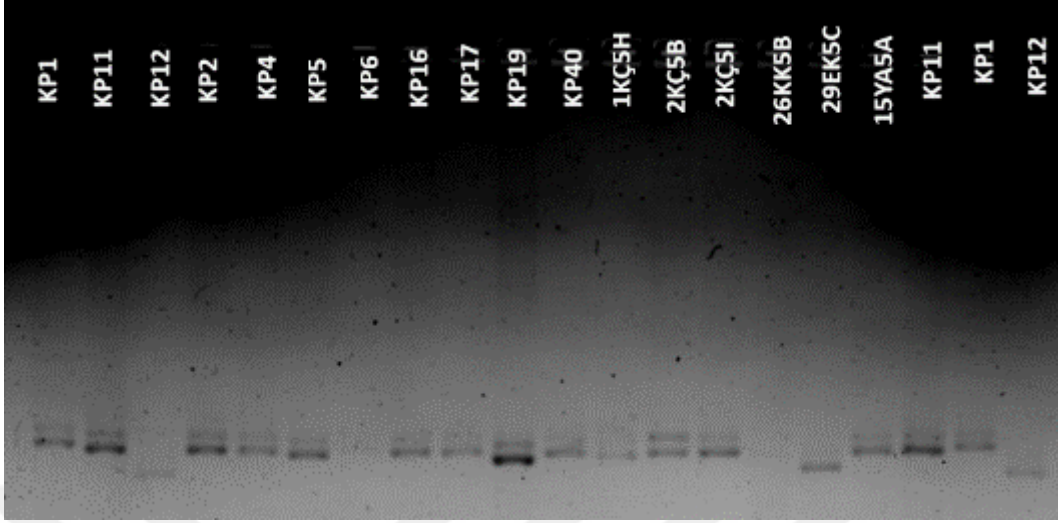
Şekil 4.6: Bazı izolatların RAPD-PCR amplikonlarının agaroz jelde görüntüsü. bp: baz çifti; kb: kilobaz. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.3.6. İzolatların Mikrosatelit Analizleri ile Gruplandırılması

Çalışma kapsamında, *P. roqueforti* suşları için polimorfik olduğu tespit edilmiş 3 mikrosatelit bölgesi (*Proq16*, *Proq01_3* ve *Proq02_2*) kullanılarak popülasyon yapısı değerlendirilmiştir. *Proq16* ve *Proq01_3* bölgeleri ile 120 izolatta PCR'da sonuç alınmış ve bu izolatlar dizi analizi sonrası hizalanmış ve aynı dizilimi verenler kendi içinde gruplandırılmıştır. *Proq02_2* bölgesinde ise, tekrarlı diziler oldukça fazla olduğundan, dizi analizinde iyi sonuç alınamamıştır. Bu bölgede suşların gruplandırılması, dizi analizi sonucu belirlenen referans suşların PCR ürünleriyle

beraber (bant büyüklükleri karşılaştırılarak) %2'lik jelde yürütülmesiyle yapılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Bazı *P. roqueforti* izolatlarının *Proq02_2* bölgesine ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

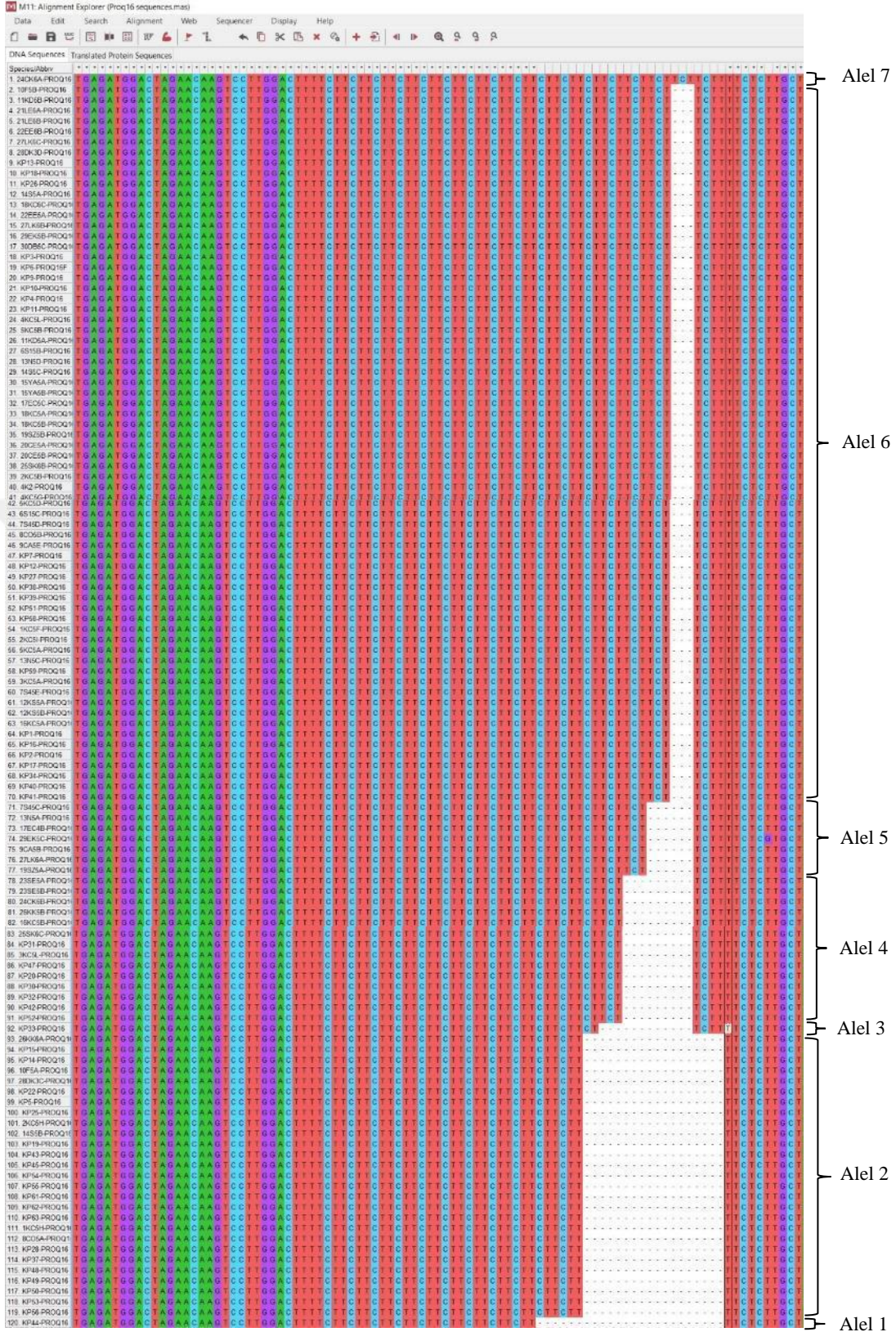
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Proq16, *Proq01_3* ve *Proq02_2* bölgelerindeki tekrar sayılarının izolatlar arasında farklılık göstermesi (değişik alellere sahip olmaları) sebebiyle, farklı gruplar oluşmuştur. *P. roqueforti* izolatlarının mikrosatelit bölgelerinde yer alan tekrar dizileri ve her bir lokusta gözlenen alel (grup) sayısı, Tablo 4.5'te verilmiştir. *Proq01_3* ve *Proq16* lokuslarının hizalanması sonrası alellerin gösterimi, sırasıyla, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.5: *P. roqueforti* izolatlarının mikrosatelit dizilimine göre alel grupları

Mikrosatelit Lokusu	Tekrar Dizilimi	Alel (Grup) Sayısı
<i>Proq01_3</i>	(AGGAAG) _n ve (AAGA) _n	6
<i>Proq16</i>	(CTT) _n	7
<i>Proq02_2</i>	(AGAGCC) _n	19

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Sekil 4.9: *P. roqueforti* izolatlarının Proq16 lokusundaki alellerinin gösterimi. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

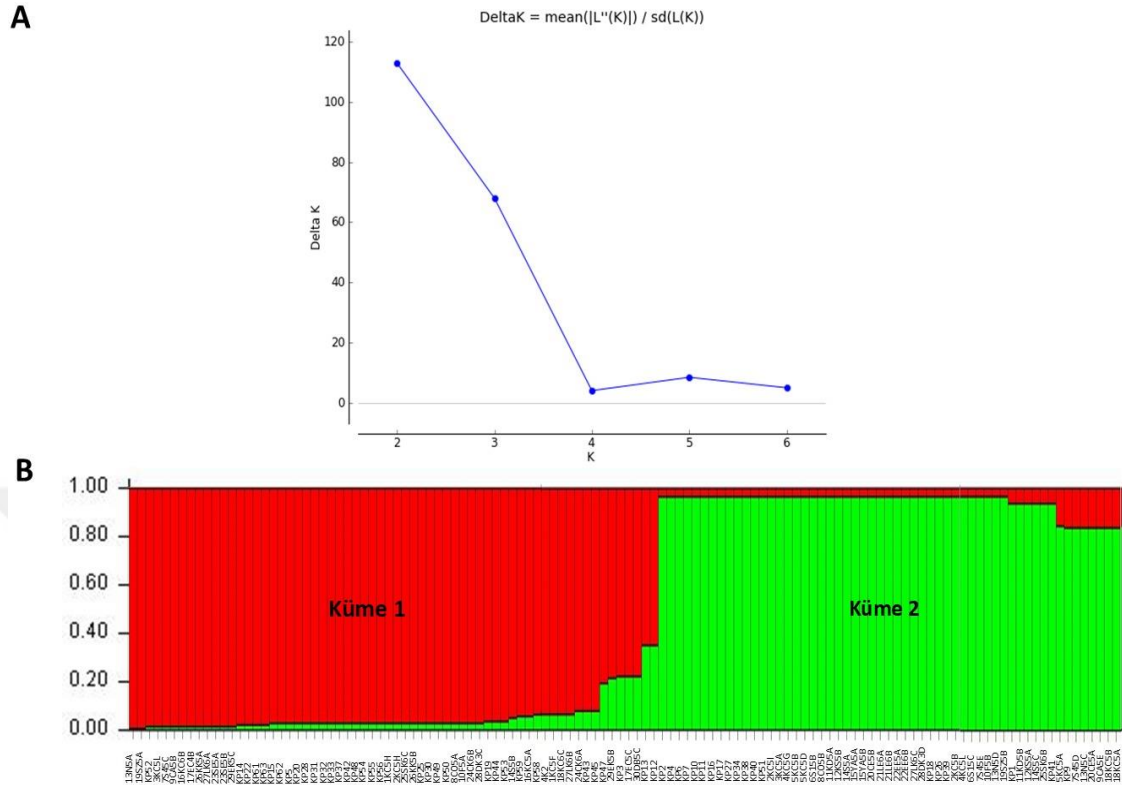
Tablo 4.4'te her bir mikrosatelit alel kombinasyonu, bir haplotipi (HT) temsil etmektedir. Mikrosatelit analizi sonucu, 120 *P. roqueforti* izolatu arasında 36 HT tespit edilmiştir (Tablo 4.4). HT2, 42 izolat ile popülasyonun %35'ini temsil etmiş ve bunu sırasıyla, HT10 (%10), HT5 (%7), HT1 (%5) ve HT21 (%3) takip etmiştir. Bu 5 HT, izolatların %60'ını oluşturmuş ve 19 HT, yalnızca bir izolat içermiştir.

Gillot vd. (2015), farklı mavi peynirlerden ve peynir dışı ortamlardan elde edilen 164 *P. roqueforti* izolatu arasında, dört mikrosatelit bölgesine göre (*proq16*, *proq17*, *proq01_3* ve *proq02_2*), 28 HT belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, 140 mavi peynir izolatında 13 HT, 24 peynir dışı ortamdan gelen izolatta ise 15 HT tespit etmişlerdir. Türkiye küflü peynir izolatlarındaki HT sayısının, Gillot vd. (2015)'in çalışmasındakinden fazla olmasının nedeni, sekonder starter kullanılmaması olabilir.

Bazı peynirlerde (n = 19), *P. roqueforti*'nin birden fazla HT'ye sahip suşu bir arada tespit edilmiştir. Örneğin Tablo 4.4'e göre, Erzurum Küflü Civil-1 peynirinde HT4 ve HT22 olmak üzere, iki farklı HT'ye sahip suşlar bulunmuştur. Erzurum Küflü Civil (7,13 ve 24) ve Konya Küflü-27 peynirlerinde, üç farklı HT'ye sahip suşlar bir arada belirlenmiştir. Bu çeşitlilik, Türkiye küflü peynirlerinde genellikle sekonder starter kullanılmayıp, peynirin olgunlaşma sürecinde ortamdan gelen küflerin peynirde spontan gelişmesinden kaynaklanmış olabilir. Böylece, çeşitli suşlar peynirde gelişmiş, hatta bazı örneklerde zıt eşey tipine sahip suşlar da bir arada gelişmiştir.

Popülasyonda farklı kümeler varsa belirlemek üzere, her bir *P. roqueforti* izolatının alel grupları Structure yazılımına girilmiştir. Yazılım parametrelerinde, 1 ile 10 arasında değişen kümelenme sayıları (K) kullanılarak on bağımsız analiz yapılmıştır. Structure Harvester yazılımında ise, optimal K değeri (K = 2) belirlenmiştir (Şekil 4.10A). Böylece alel profillerine göre, peynirlerden izole edilen *P. roqueforti* izolatlarının 2 kümede toplandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10B). *MAT1-1* eşey tipine sahip 6 izolat, 1.grupta toplanırken, Küflü Civil peyniri izolatlarının %66'sı, Küflü Tulum peyniri izolatlarının %66,7'si ve 1 Golot peyniri izolatu da 1. grupta yer almıştır. Böylece, peynir türüne dayalı bir kümelenme gözlenmemiştir. Civil ve Tulum peynirlerinin üretiminde farklı teknikler ve süt kaynakları kullanılsa da, bu peynirlerde izole edilen *P. roqueforti* çeşitliliğinde ve HT dağılımında net bir ayırım tespit edilmemiştir. Bu duruma, suşların süt ya da olgunlaşma yerleri gibi ortak kaynaklardan gelmesi neden olabilir. Ayrıca, nem ve sıcaklık gibi benzer çevresel koşullar, benzer suşların peynirde gelişmesini sağlayabilir. Bazı peynir üreticileri, daha önce ellerinde

olan küflü bir peyniri, geri besleme (back-slopping) tekniğinde olduğu gibi, ürettikleri peynire bulaştırabilir.



Şekil 4.10: *P. roqueforti* izolatlarının (n =120) popülasyon yapısı. (A) Evanno metoduna göre, Structure Harvester yazılımında belirlenen optimal K değeri (K=2). (B) İzolatların, Bayesian metodu kullanılarak Structure yazılımında kümelenmesi. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

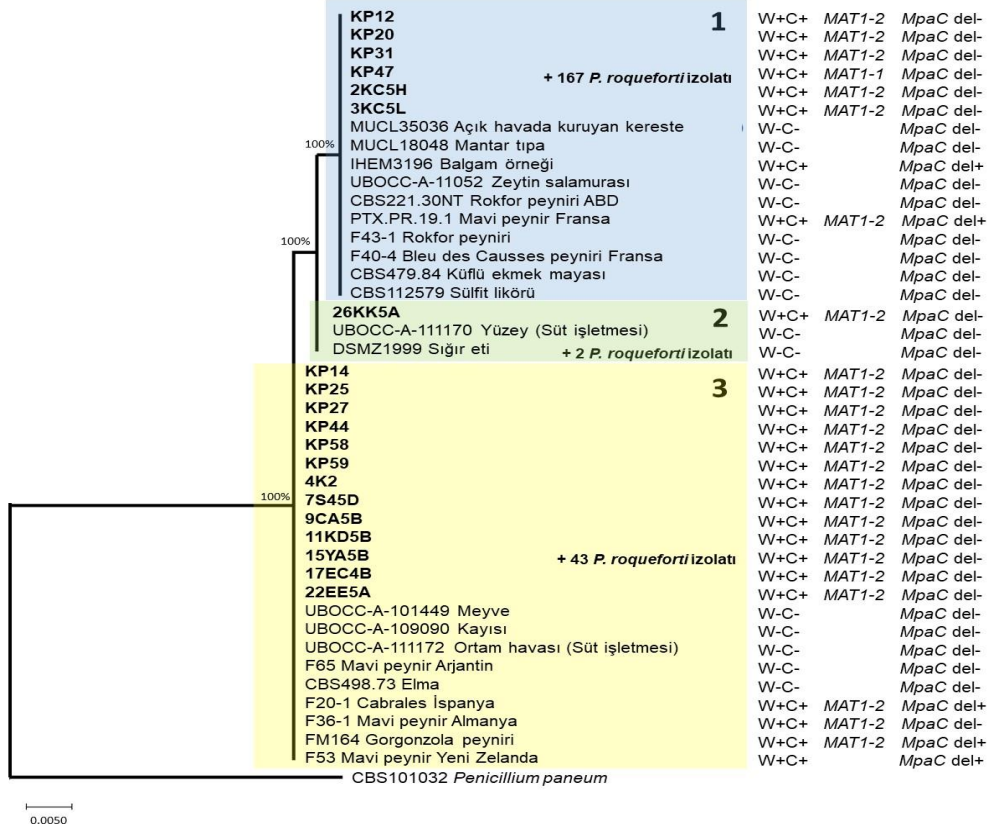
İzolatların popülasyon yapısını daha detaylı incelemek için, mikrosatelit datasetleri GenAIEx yazılımına aktarılmış ve bir uzaklık matrisi oluşturulmuştur. Bu matris, Neighbor-Net metodu kullanılarak Splitstree yazılımında Şekil 4.11’de verilen diyagrama dönüştürülmüştür. Her haplotipin bir dalı oluşturduğu bu diyagram, sınırlı rekombinasyona (örümcek ağına benzeyen bölgeler) ve belirli dallarda toplanan izolatlar olduğunu göstermektedir. HT2 ve HT10 gibi yaygın HT’lerin oluşturduğu dallarda, belirgin bir klonal yapı gözlemlenmiştir. Özellikle endüstri açısından önemli funguslarda, funguslar mitoz bölünme ile eşeysiz üreyebildikleri için, doğal popülasyonlarda klonal bir yapının olması beklenmektedir (Xu, 2006). Bu diyagrama göre, izolatlar Structure yazılımında olduğu gibi iki ayrı gruba ayrılmıştır. Farklı yörelerin peynirlerine (Erzurum, Kars, Konya, Sivas-Zara, Karaman, Divle Obruk) ait

grupta kümelenmişlerdir. Gillot vd. (2015) ise, *Penicillium roqueforti* FM164 suşunun genomunda farklı mikrosatelit bölgelerinden primer dizayn etmişler ve peynirden izole ettikleri *P. roqueforti*'leri popülasyon genetiği analizleri ile üç gruba ayırarak tür içi çeşitliliği belirlemişlerdir. Dumas vd. (2020) ise, *P. roqueforti*'nin ikisi peynir ortamından gelen (Rokfor ve Rokfor olmayan peynirler) ve ikisi peynir dışı ortamdaki gelen (silaj, kereste, ağaçlık alan vb.) suşlardan oluşan dört ayrı popülasyonu tanımlamışlardır. Crequer vd. (2023) ise bu dört popülasyona, Termignon peyniri izolatlarını da ekleyerek 5. *P. roqueforti* popülasyonunu belirlemiştir.

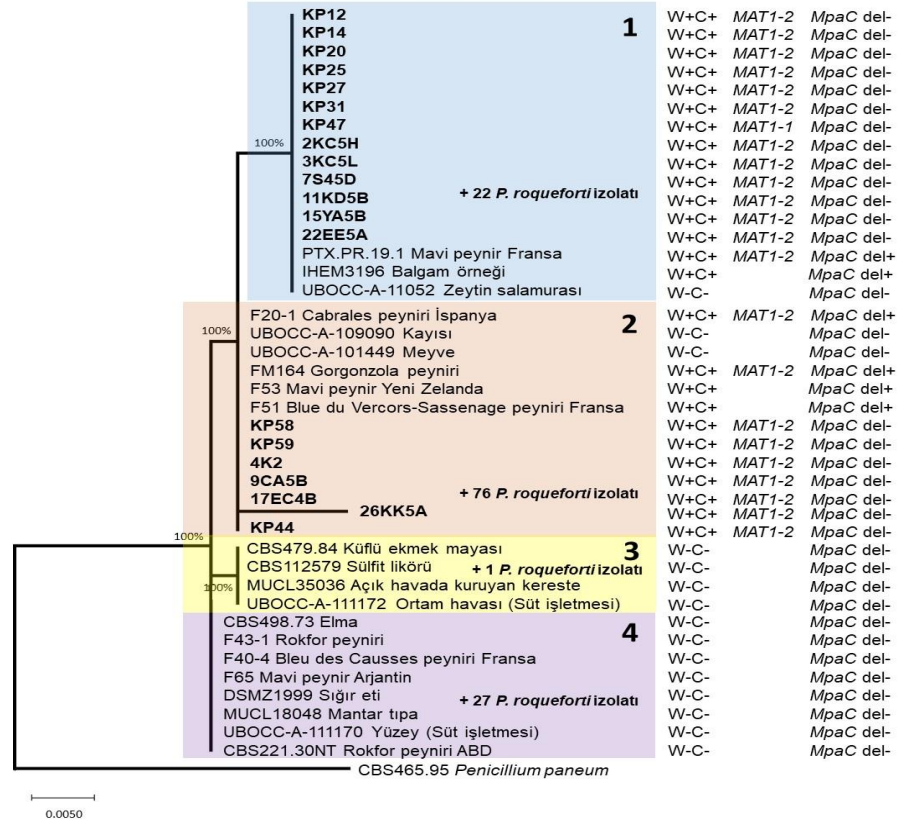
4.3.7. Filogenetik Analizler

Türkiye peynir popülasyonu *P. roqueforti* izolatlarını, global popülasyonla karşılaştırmak için öncelikle, Splitstree diyagramında (Şekil 4.11), en yaygın görülen HT'ler arasında sarı renkle belirtilen 20 izolat seçilmiştir. Ardından, fungusların tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan *benA* ve *cmd* markörleri ile *P. roqueforti* için tanımlanmış üç polimorfik markör seti (*proq235*, *proq631* ve *proq845*) kullanılarak filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, seçilen 20 izolatın ve NCBI veritabanında yer alan tüm *P. roqueforti* izolatlarının *benA* ve *cmd* dizileri kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Sonraki analizlerde kullanılmayacak ve aynı dizilere sahip izolatlar, sadece sayı ile ifade edilmiştir (Şekil 4.12). *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgelerinin varlığı, eşey genotipi ve *mpaC* delesyon durumu da, filogenetik ağaçlarda verilmiştir. Filogenetik analizlerde kullanılan global izolatların NCBI kimlikleri EK6'da ve Türkiye peynirlerinden elde edilen izolatların NCBI'e yüklenen dizi kimlikleri (NCBI ID), EK7'de verilmiştir.

A



B



Şekil 4.12: *Penicillium roqueforti* izolatlarının *benA* (A) ve *cmd* (B) dizilerini kullanarak maksimum likelihood metoduna göre filogenetik analizi. (A) *BenA* analizi için en yüksek log olasılığına (- 673.52) sahip ağaç gösterilmiştir ve son veri setinde

393 pozisyonu kapsamaktadır. Root izolat olarak *Penicillium paneum* CBS101032 (KM503670.1) kullanılmıştır. (B) *Cmd* dizileri için en yüksek log olasılığına (-791.75) sahip ağaç oluşturulmuş olup, son veri setinde 465 pozisyon içermektedir. Kök olarak *Penicillium paneum* CBS465.95 (HQ442334.1) kullanılmıştır. W + C+/W- C-: *Wallaby* ve *CheesyTer* lokusları var/yok. *MAT1-1/MAT1-2*: Eşey genotipi. *MpaC* del+/*MpaC* del-: *MpaC* geninde delesyon var/yok. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

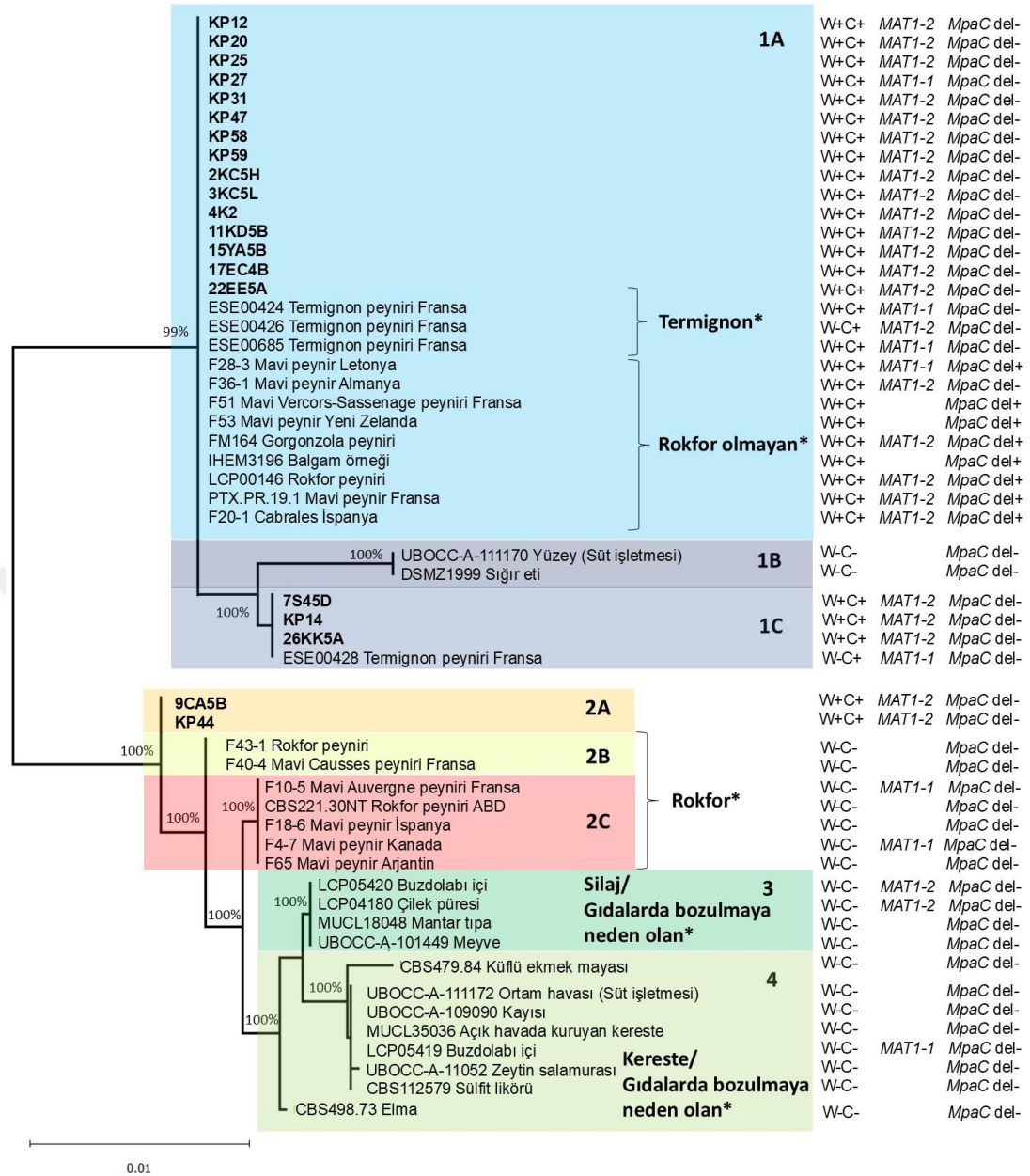
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Seçilen 20 *P. roqueforti* izolatının *benA* dizilerini (393 bp) ve NCBI veritabanındaki dizileri (n = 275) kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç, *P. roqueforti* izolatlarını üç ana gruba ayırmaktadır (Şekil 4.12A). Bir grup (yeşil ile işaretlenmiş 2. klad), 26KK5A izolatı dışında, peynir harici ortamdan gelen izolatlardan oluşmaktadır. 26KK5A izolatı ise, peynir dışı bir ortamdan Karaman Tulum peynirine bulaşmış olabilir. Mavi ile işaretlenmiş 1. klad ve sarı ile işaretlenmiş 3. klad, hem peynir hem de peynir dışı ortamdan gelen izolatları içermektedir (Şekil 4.12A). 26KK5A izolatı dışındaki Türkiye peynir izolatları, 1. ve 3. kladda yer almıştır. İzolatlar arasında en yaygın iki HT olan HT2 ve HT10, 3. kladda bulunmuştur. *Cmd* dizileri (465 bp) kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta, NCBI veritabanından alınan izolatlar (n = 196), dört gruba ayrılmıştır (Şekil 4.12B). Üç grup (1., 2. ve 4. klad), hem peynir hem de peynir dışı ortamlardan gelen izolatları içerirken, 3. kladda yalnızca peynir harici ortamdan gelen izolatlar yer almıştır. Özellikle 26KK5A, 2. klad içerisinde, ancak uzun bir dal ile diğerlerinden farklılaşmış bir konumda bulunmuştur.

Proq235, *proq631* ve *proq845* markörleri, *benA* ve *cmd*'ye kıyasla daha yüksek polimorfizm göstermiştir ve peynir harici ortamdan gelen izolatları belirgin şekilde ayırmıştır. Birleşmiş dizilerin (2947 bp) filogenetik analizinde, her biri alt gruplara sahip iki ana grup oluşmuştur (Şekil 4.13). Türkiye peynir izolatları, peynir çeşidiyle (Tulum veya Civil) bir ilişki olmaksızın, üç klada (1A, 1C ve 2A) ayrılmıştır. Crequer vd. (2023) tarafından yapılan tüm genom analizi, *P. roqueforti* izolatlarını 5 popülasyona ayırmıştır: Rokfor harici mavi peynir izolatları, Termignon peyniri izolatları, Rokfor peyniri izolatları ve peynir harici ortamdan gelen iki popülasyon (silaj ve kereste, gıdalarda bozulmaya neden olan). Şekil 4.13'teki yıldız ile işaretlenen gruplar, Crequer vd. (2023) tarafından tanımlanan gruplar ile örtüşmektedir. Fakat,

Termignon izolatları ayrı bir klad oluşturmamıştır. Analiz edilen 4 Termignon izolatından 3'ü Rokfor harici peynir izolatları grubunda (1A) yer almıştır. Bu durum, kullanılan yöntemler arasındaki farkla (mikrosatellitler, tüm genom tek nükleotid polimorfizmi vb.) açıklanabilir. Tüm 1A kladında yer alan izolatların, yatay gen transfer bölgelerini (*Wallaby* ve *CheesyTer*) taşıdığı ve *MAT1-2* eşey genotipine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar, *mpaC* delesyonunu taşımayan Termignon izolatlarına benzerlik göstermiş ve bu delesyonun mevcut olduğu, neredeyse (F36-1 hariç) tüm Rokfor harici mavi peynir izolatlarından ayrılmıştır.

Üç Türkiye peynir izolatı, Şekil 4.13'te bir Termignon peynir izolatıyla birlikte 1C kladında yer alırken, yakın kladı olan 1B kladı, diğer 1. klad alt gruplarından farklı izolasyon kaynağına sahip iki W-C- peynir olmayan izolatı içermektedir. 1A ve 1C kladlarındaki Türk izolatlarının Termignon peynir grubuna mı karşılık geldiği, yoksa farklı gruplar mı oluşturduğu yürütülen analizle belirlenememiştir, bunun için daha kapsamlı bir karşılaştırma ile daha fazla incelenme yapılması gerekmektedir. Şekil 4.13'teki ikinci ana grupta, 2B ve 2C kladları, Rokfor grubunu oluştururken, 3. ve 4. kladlar peynir harici gruplara, yani silaj/gıdalarda bozulmaya neden olan ve kereste/gıdalarda bozulmaya neden olan gruplarına karşılık gelmiştir. 9CA5B ve KP44 izolatları, Rokfor ve gıdalarda bozulmaya neden olan izolat gruplarından farklı olarak (W+ C+) ayrı bir klad (2A) oluşturmuştur. Rokfor izolatları ise W-C-'dir. Bu izolatlar, diğer gruplardan farklı olarak ayrı bir kladda yer almıştır.



Şekil 4.13: *Proq235*, *proq631* ve *proq845* lokuslarının birleştirilmiş veri setini kullanarak *Penicillium roqueforti* izolatlarının maksimum likelihood metodu kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik analizi. En yüksek log olasılığına (- 4829.14) sahip ağaç gösterilmiş olup, son veri setinde toplam 2947 pozisyon içermektedir. W + C+/W-C-: *Wallaby* ve *CheesyTer* lokusları var/yok. *MAT1-1/MAT1-2*: Eşey genotipi. *MpaC* del+/*MpaC* del-: *MpaC* geninde delesyon var/yok. Yıldızlar, Crequer vd. (2023) tarafından tanımlanan grupları göstermektedir. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

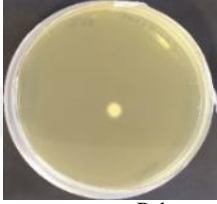



Önceki analizlerde seçilen 20 izolatın teknolojik ve metabolik özellikleri belirlenmiştir.

4.4. Seçilen *P. roqueforti* İzolatlarının Teknolojik ve Metabolik Özellikleri

4.4.1. İzolatların Misel Gelişimi

Önceki analizlerde seçilen 20 *P. roqueforti* izolatının MEA besiyerinde üç paralel ekim yapılmış ve 12 °C ve 25 °C’de inkübe edilen izolatların koloni çapları 3. günde ve 10.günde mm cinsinden ölçülmüştür. İzolatların MEA besiyerinde koloni çaplarının ölçümleri Tablo 4.6’da verilmiştir. İzolatların besiyerlerinde gelişimlerine örnek olarak, CECT 2905 suşunun 12 °C ve 25 °C’de gelişimi gösterilmiştir.

Tablo 4.6: İzolatların 12 °C ve 25 °C’de MEA’da koloni çapları

İzolat	Koloni çapı (mm)			
	12 °C		25 °C	
	3. gün	10.gün	3. gün	10.gün
CECT 2905	 9,4±0,4 ^{Babc}	 59±1,8 ^{Aa}	 29,4±1,7 ^{Ba}	 79,7±4,8 ^{Aabc}
2KÇ5H	9,3±0,4 ^{Babcd}	49,2±1,2 ^{Ad}	22±0,3 ^{Bcd}	82,7±1,2 ^{Aab}
3KÇ5L	9,7±0,4 ^{Bab}	56,8±2,3 ^{Aab}	22,1±0,2 ^{Bc}	76,3±1,8 ^{Ac}
4K2	8,7±0,3 ^{Bcdef}	41,7±0,8 ^{Af}	19±0,5 ^{Bgh}	79,5±0,5 ^{Aabc}
7S45D	8,8±0,3 ^{Bbcde}	44,8±0,8 ^{Ae}	21,7±0,4 ^{Bcd}	72,7±0,8 ^{Ade}
9CA5B	7,8±0,4 ^{Bfgh}	37,8±0,8 ^{Agh}	18,3±0,4 ^{Bhi}	80,3±0,5 ^{Aab}
11KD5B	8,1±0,3 ^{Befg}	55,8±1,2 ^{Abc}	20,8±0,4 ^{Bdef}	79,5±2,4 ^{Aabc}
15YA5B	9,3±0,4 ^{Babcd}	58,8±1,8 ^{Aa}	20±0,8 ^{Befg}	80,7±3,3 ^{Aab}
17EC4B	10,2±0,4 ^{Ba}	48,8±1,6 ^{Ad}	24,9±0,8 ^{Bb}	83±1,4 ^{Aa}
22EE5A	8,7±0,5 ^{Bcdef}	56,7±2 ^{Aab}	21±0,3 ^{Bcde}	82,3±0,5 ^{Aab}
26KK5A	8,4±0,4 ^{Bdefg}	33,8±1 ^{Ai}	17,3±0,4 ^{Bi}	35,5±2,3 ^{Ah}
KP12	8,7±0,6 ^{Bcdef}	45±1,4 ^{Ae}	19±0,4 ^{Bgh}	70,3±1,8 ^{Ae}
KP14	6,3±0,5 ^{Bi}	35,3±0,8 ^{Ahi}	14,6±0,6 ^{Bj}	53±2,1 ^{Ag}
KP20	7±0 ^{Bhi}	39,7±1 ^{Afg}	17,7±0,8 ^{Bi}	65±0,9 ^{Af}
KP25	8,7±0,3 ^{Bcdef}	46±0,9 ^{Ae}	19,9±0,2 ^{Befg}	81±0,6 ^{Aab}
KP27	7,6±0,4 ^{Bgh}	57±0,9 ^{Aab}	19,5±0,5 ^{Bfgh}	79±1,3 ^{Abc}
KP31	8,4±0,4 ^{Bdefg}	46±0,9 ^{Ae}	20,1±0,2 ^{Befg}	61,5±1 ^{Af}
KP44	9,7±0,4 ^{Bab}	54±0,9 ^{Ac}	24,2±0,3 ^{Bb}	83,3±1,4 ^{Aa}
KP47	9,2±0,7 ^{Bbcd}	55,5±0,8 ^{Abc}	19,1±0,4 ^{Bgh}	80±1,3 ^{Aabc}
KP58	8,4±0,5 ^{Bdefg}	40,2±0,4 ^{Afg}	19,4±0,7 ^{Bgh}	81±1,1 ^{Aab}
KP59	7,6±0,8 ^{Bgh}	41,2±1,2 ^{Af}	19,5±0,6 ^{Bfgh}	80,8±1,3 ^{Aab}

Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir. Koloni çapları, ortalama çap (mm) ± standart sapma olarak ölçülmüştür. A-B: aynı satırdaki farklı büyük harfler, a-h: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu ($p<0,05$) göstermektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

İzolatların 12 °C’de ve 25 °C’de gelişimleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde, izolatlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar ($p<0,05$) bulunmuştur (Tablo 4.6). Koloni çapları 12 °C’de 3. günde, 6,3-10,2 mm, 10. gün sonunda ise 33,8-57 mm olarak belirlenmiştir. 25 °C’de ise, koloni çapları 3. gün 17,3-24,9 mm ve 10. günün sonunda 35,5-83,3 mm aralıklarında ölçülmüştür. KP44 ve 17EC4B izolatları, 12 °C’de diğerlerinden daha iyi gelişmiş, 26KK5A izolatı ise sınırlı bir üreme paterni sergilemiştir. 17EC4B ve KP44 izolatlarının 25 °C’de gelişimleri birbirlerine yakın olurken, 26KK5A izolatı diğerlerine göre daha küçük koloni oluşturmuştur. Özellikle KP44, CECT 2905 suşuna yakın bir gelişme profili göstermiştir. Lopez-Diaz vd. (1996), 11 *P. roqueforti* suşunun MEA besiyerinde 10 gün inkübasyon sonrası koloni çaplarını, 10 °C’de 25-53 mm ve 25 °C’de 77-100 mm aralığında tespit etmişlerdir. Pose vd. (2007), 21 *P. roqueforti* izolatının MEA’da 10 °C’de inkübasyonun 6. gününde koloni çaplarını 20-30 mm, 25 °C’de ise 50-60 mm aralıklarında ölçmüşlerdir. Peynirin olgunlaşma aşamasında *P. roqueforti* izolatlarının, özellikle olgunlaşma sıcaklığı olan 10-12 °C’de gelişme hızları oldukça önemlidir. Tablo 4.6’ya göre, olgunlaşma sıcaklığında gelişimleri yüksek olarak değerlendirilen suşlar, KP27, KP44, KP47, 3KÇ5L, 11KD5B, 15YA5B ve 22EE5A’dır.





4.4.2. İzolatların Tuza Dayanıklılığı

İzolatların tuza dayanıklılığı, %0, %1, %3 ve %6 NaCl içeren MEA besiyerinde tespit edilmiştir. Petriler, 25 °C’de 8 gün inkübe edilmiş ve koloni çapları inkübasyonun 8. gününde mm cinsinden ölçülmüştür. İzolatların besiyerlerinde gelişimlerine örnek olarak, Tablo 4.7’de CECT 2905 izolatının farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişimi gösterilmiştir. Besiyerinde değişen NaCl konsantrasyonlarında, izolatların gelişimleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar ($p<0,05$) bulunmuştur (Tablo 4.7). NaCl içermeyen ve %1 NaCl içeren besiyerlerinde benzer gelişme paterni gözlenmiştir (sırasıyla koloni çapları, 29-77,2 mm ve 36-68,5 mm aralıklarında). Hatta %1 NaCl’nin, bazı izolatlarda (KP12, KP14, KP31, KP44, 3KÇ5L, 7S45D, 9CA5B ve 26KK5A) gelişmeyi desteklediği tespit edilmiştir. NaCl oranı arttıkça koloni çapları

azalmıştır (%3'te 34-68,5 mm ve %6'da 19,5-49,7 mm). Peynirdeki tuz oranını temsil eden, %3 ve %6 NaCl ilaveli besiyerlerinde KP25, KP44, KP47, 2KÇ5H, 3KÇ5L, 11KD5B, 15YA5B ve 22EE5A izolatları, diğer izolatlara göre daha iyi bir gelişme profili sergilemiştir. 26KK5A izolatu, diğer izolatlara kıyasla oldukça sınırlı bir gelişme paterni göstermiştir (%6 NaCl içeren besiyerinde koloni çapı, 19,5 mm). Türkiye mavi peynir izolatları genel olarak, NaCl oranı arttıkça, CECT 2905 referans suşundan daha sınırlı bir gelişme sergilemiştir. CECT 2905 izolatu, rokfor peynirinden izole edilmiş yabancı (wild type) bir suştur (Fernandez-Bodega vd., 2009).

Lopez-Diaz vd. (1996), %1 NaCl içeren besiyerinin, Valdeon peyniri (İspanya)'dan elde ettikleri *P. roqueforti* izolatlarının ve ticari suşların gelişimlerini sitümüle ettiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada besiyerine %3 ve özellikle %6 NaCl ilavesiyle, koloni çapları 0-53 mm aralığına kadar küçülmüştür. Pose vd. (2007), çeşitli mavi peynirlerden izole ettikleri *P. roqueforti* suşlarının gelişimini, %1 NaCl ilavesinin desteklediğini ve %6 NaCl içeren ortamda izolatların koloni çaplarının %50 küçüldüğünü tespit etmişlerdir.

Tablo 4.7: İzolatların %0, %1, %3 ve %6 NaCl içeren MEA'da gelişimi

İzolat	Koloni çapı (mm)			
	%0	%1	%3	%6
CECT 2905	 77±5,4 ^{Aa}	 74,7±4,9 ^{Aa}	 68,5±1 ^{Ba}	 31,5±2,4 ^{Cgh}
2KÇ5H	75±0,6 ^{Aab}	66,2±1,5 ^{Abc}	59,8±0,4 ^{Bb}	43,3±0,5 ^{Cb}
3KÇ5L	66,3±1,9 ^{Ad}	68,5±0,5 ^{Ab}	68,2±1,2 ^{Ba}	49,3±0,8 ^{Ca}
4K2	51,2±0,8 ^{Af}	52±0,6 ^{Af}	43,7±1 ^{Bhi}	28,3±0,5 ^{Cijk}
7S45D	46±0,9 ^{Agh}	48,5±1,5 ^{Afg}	46,5±2 ^{Bg}	30,2±0,4 ^{Chij}
9CA5B	49±0,9 ^{Afg}	51,5±1,9 ^{Af}	48±0,6 ^{Bfg}	33,7±0,5 ^{Cfg}
11KD5B	68,2±2 ^{Ad}	64,5±2,7 ^{AcD}	52±1,9 ^{Be}	43±0,9 ^{Cb}
15YA5B	69,3±1,8 ^{AcD}	65,8±0,8 ^{Abc}	56,3±1,4 ^{Bcd}	41,3±0,8 ^{Cbc}
17EC4B	58,8±1,2 ^{Ae}	51±0,9 ^{Af}	44,2±0,8 ^{Bh}	25,2±0,4 ^{Cl}
22EE5A	72±0,6 ^{Abc}	66,2±1 ^{Abc}	55,8±0,8 ^{Bcd}	39,7±1,5 ^{Ccd}
26KK5A	29±0,6 ^{Aj}	36±1,1 ^{Ai}	37,5±1,8 ^{Bj}	19,5±0,5 ^{Cm}
KP12	58,7±1,2 ^{Ae}	61±0,9 ^{Ade}	54,3±0,6 ^{Bd}	39,8±0,4 ^{Ccd}
KP14	30,8±0,8 ^{Aj}	42,8±1,5 ^{Ah}	38,3±0,5 ^{Bj}	27,2±1,2 ^{Ckl}
KP20	43,5±1,9 ^{Ah}	38,8±0,8 ^{Ai}	34±1,1 ^{Bk}	27,5±0,5 ^{Ck}
KP25	69,7±0,8 ^{AcD}	67,5±1 ^{Abc}	66,7±0,5 ^{Ba}	49,7±0,5 ^{Ca}
KP27	68,2±2 ^{Ad}	57,5±3,1 ^{Ae}	55,7±0,5 ^{Bd}	38±0,6 ^{Cde}
KP31	39,7±0,5 ^{Ai}	45,5±0,5 ^{Agh}	41,5±0,5 ^{Bi}	30,5±0,5 ^{Chi}

KP44	77,2±0,4 ^{Aa}	67,2±2,1 ^{Abc}	50±0,9 ^{Bef}	35,8±0,8 ^{Cef}
KP47	67±1,1 ^{Ad}	65,7±1,4 ^{Abc}	58±0,6 ^{Bbc}	43±2,5 ^{Cb}
KP58	51±0,9 ^{Af}	51,5±1 ^{Af}	42,2±0,8 ^{Bhi}	27±0,6 ^{Ckl}
KP59	51,2±0,8 ^{Af}	51,7±0,8 ^{Af}	42,2±0,4 ^{Bhi}	28,2±0,8 ^{Cjk}

Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir. Koloni çapları, ortalama çap (mm) ± standart sapma olarak ölçülmüştür. A-B: aynı satırdaki farklı büyük harfler, a-l: Aynı sütündeki farklı küçük harfler, sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu (p<0,05) göstermektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.4.3. İzolatların Proteolitik ve Lipolitik Özellikleri

Proteolitik aktivite analizi için, izolatların %10 yağsız süt içeren mikolojik agarda 25 °C'de 7 gün inkübasyonu sonunda kolonilerin etrafındaki şeffaf zon mm cinsinden ölçülmüştür. Örnek olarak, Tablo 4.8'de 3 izolatın görüntüsü verilmiştir. Sonuç alınan izolatlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar (p<0,05) bulunmuştur. Tablo 4.8'e göre, 11 izolat şeffaf zon oluştururken, 10 izolatta (KP12, KP25, KP27, KP44, KP47, KP58, 2KÇ5H, 3KÇ5L, 9CA5B ve 17EC4B) ve referans suş CECT 2905'te bu zon gözlenmemiştir. İzolatlar arasında şeffaf zon kalınlığı, 0-4,7 mm aralığında değişmiştir. En kalın şeffaf zon oluşturan KP59, agarda 4,7 mm ile en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatır. Şeffaf zon gözlemlenmeyen izolatlarda, proteolitik aktivite intrasellüler enzimlerle gerçekleşmiş ya da çok düşük olabilir. Ayrıca Larsen vd. (1998), Fernandez-Bodega vd. (2009) ve Ferreira vd. (2012), çalışma kapsamında kullanılan agar difüzyon testlerinin düşük oranlardaki proteolitik aktiviteyi tespit etmek için, yetersiz kaldığını belirtmişler ve daha hassas ölçümler için azokazein testi, kapiler elektroforez ve SDS-PAGE gibi teknikleri önermişlerdir. Larsen vd. (1998) agar difüzyon testine göre kazein agarda, 30 *P. roqueforti* izolatları arasından 26'sının 6-14 mm arasında şeffaf zon oluşturduğunu, 4 izolatın ise şeffaf zon oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Fernandez-Bodega vd. (2009), *P. roqueforti* CECT 2905 referans suşunun, proteolitik aktivitesinin oldukça düşük olduğunu ve kazein agarda şeffaf zon oluşumunun gözlemlenmediğini vurgulamışlardır. Aynı çalışmada, Valdeon peynirinden izole edilen 3 *P. roqueforti* suşunun yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ozturkoglu-Budak vd. (2016c), Divle Tulum peynirinden izole edilen *P. roqueforti* suşunun yağsız sütlü agarda, proteolitik aktivitesinin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Doğan ve Tekiner (2021) ise, 17 *P.roqueforti* izolatından 14'ünün %10 yağsız süt içeren MEA


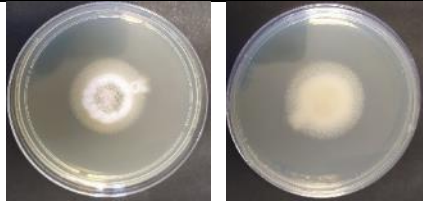
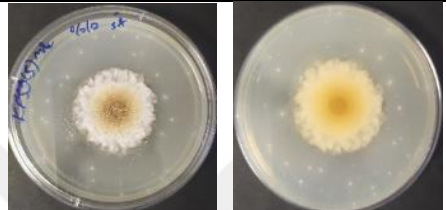
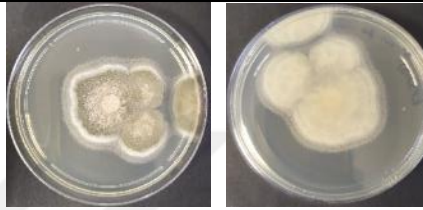

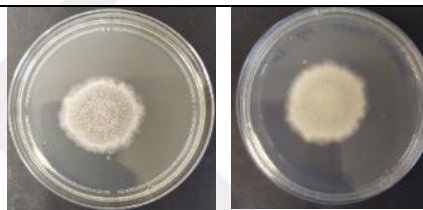
besiyerinde 1-8,2 mm aralığında şeffaf zon oluşturduğunu, 3'ünün ise oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Dumas vd. (2020), tanımladıkları 4 *P. roqueforti* popülasyonuna ait izolatların proteolitik aktivitelerini yarım yağlı sütlü agarda tespit etmişler ve popülasyonlar arası farklılıklar belirlemişlerdir. Bu çalışmada izolatların agarda 25 °C'de 7 gün inkübasyon sonucu oluşturduğu şeffaf zon çapları, sırasıyla, Rokfor harici mavi peynir izolatlarında (n = 15) 0-10 mm, Rokfor izolatlarında (n = 17) 0-12 mm, peynir dışı ortam izolatlarında (silaj, n = 10) 0-8 mm ve diğer peynir dışı ortam izolatlarında (kereste, n = 7) 4-10 mm olarak ölçülmüştür. Bu değerler, 28 gün boyunca ölçülmeye devam edilmiş ve *P. roqueforti* popülasyonları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. Özellikle proteolitik aktivitenin ölçüldüğü 7., 14. ve 21. günlerde, peynir popülasyonlarındaki izolatlar, peynir dışı ortamdan gelen izolatlara göre daha hızlı proteolitik aktivite göstermiştir. Rokfor peyniri izolatlarının, diğer mavi peynir izolatlarından daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Proteolitik aktivite, kültür üreticileri tarafından peynir üretiminde bir seçim kriteri olarak vurgulanmaktadır (Dumas vd., 2020; Anonim, 2024b). Örneğin, Rokfor ve Auvergne peynirlerinde yüksek proteolitik aktiviteye sahip *P. roqueforti* suşları kullanılırken, diğer mavi peynirlerin üretiminde düşük proteolitik aktiviteye sahip suşlar tercih edilmektedir (Anonim, 2024b).

Küf izolatlarının lipolitik aktivitesini belirlemek için Tween 80 agarda 25 °C'de 7 gün inkübasyonun sonunda kolonilerin etrafındaki opak zon (presipite/beyaz zon) kalınlığı mm cinsinden ölçülmüştür. Örnek olarak, Tablo 4.8'de 3 izolatın görüntüsü verilmiştir. Sonuç alınan izolatlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar ($p < 0,05$) bulunmuştur. Tablo 4.8'e göre, 16 izolat ve referans suş CECT 2905 opak zon oluştururken, 5 izolatta (KP12, KP25, 2KÇ5H, 3KÇ5L ve 26KK5A) bu zon gözlenmemiştir. Tablo 4.8'de, izolatlar arasında opak zon kalınlığı 0-5,7 mm aralığında değişmiştir. Oluşturduğu en kalın opak zon (5,7 mm) ile 7S45D, en yüksek lipolitik aktiviteye sahip izolattır. Larsen ve Jensen (1999), zeytinyağı agarda 30 *P. roqueforti* izolatından 20'sinde lipaz aktivitesi tespit etmişler, tribütirin agarda ise tüm izolatların esteraz aktivitesini ölçmüşlerdir (5-13,8 mm). Fernandez-Bodega vd. (2009), *P. roqueforti* CECT 2905 referans suşunun, ticari suşların ve Valdeon peynir izolatlarının, 1 izolat dışında lipolitik aktivitelerinin belirgin şekilde yüksek olduğunu ve zeytinyağı agarda opak zon oluşturduklarını tespit etmişlerdir. Ferreira vd. (2012), Cabrales peynirinden izole ettikleri 13 *P. roqueforti* izolatının yüksek lipolitik aktivite

gösterdiğini belirlemişlerdir. Ozturkoglu-Budak vd. (2016c), Divle Tulum peynirinden izole edilen *P. roqueforti* suşunun lipaz agarda yüksek lipolitik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Doğan ve Tekiner (2021), 10 *P. roqueforti* izolatının Tween 80 agarda opak zon oluşturmadığını ve 7 izolatın agarda oluşturduğu opak zonun ise 0,5-7 mm aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Dumas vd. (2020), tanımladıkları 4 *P. roqueforti* popülasyonuna ait izolatların lipolitik aktivitelerini tribütirin agarda tespit etmişler ve popülasyonlar arası farklılıklar belirlemişlerdir. Bu çalışmada izolatların agarda oluşturduğu opak zon çapları, sırasıyla, Rokfor harici mavi peynir izolatlarında (n = 15) 3,5-11 mm, Rokfor izolatlarında (n = 17) 0-6 mm, peynir dışı ortamdan izolatlarda (silaj, n = 10) 3-4,5 mm ve diğer peynir dışı ortamdan izolatlarda (kereste, n = 7) 3,5-5,5 mm olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, proteolitik aktivitede olduğu gibi 7., 14. ve 21. günlerde, peynir popülasyonlarındaki izolatlar, peynir dışı ortamdan gelen izolatlara göre daha hızlı lipolitik aktivite göstermiştir. Diğer mavi peynir izolatlarının, Rokfor peyniri izolatlarından daha yüksek lipolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *P. roqueforti* izolatlarının lipolitik aktivitesi de, peynir üretiminde kullanılacak kültür seçiminde önemlidir (Dumas vd., 2020; Anonim, 2024b). Vercors ve Auvergne peynirlerinde, yüksek lipolitik aktiviteye sahip *P. roqueforti* suşları kullanılırken, diğer mavi peynirlerin üretiminde düşük lipolitik aktiviteye sahip suşlar kullanılmaktadır. Rokfor üretiminde, hem yüksek hem de düşük lipolitik aktiviteye sahip suşlar starter kültür olarak satılmaktadır (Anonim, 2024b).

Ferahat vd. (1990), mavi peynir üretimi için en uygun sekonder starter kültürün, orta proteolitik aktivite ve yüksek lipolitik aktiviteye sahip *P. roqueforti* izolatlarından seçilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Bir *P. roqueforti* izolatının proteolitik aktivitesi, kazeinin kullanımı, peynirin proteoliz derecesi, su bağlama kapasitesi, tekstürü ve lezzeti, lipolitik aktivitesi ise serbest yağ asitleri ve aroma bileşikleri hakkında fikir verir (Larsen vd., 1998; Larsen ve Jensen, 1999; Ferreira vd., 2012). Ayrıca, *P. roqueforti* izolatları arasında farklı proteolitik ve lipolitik aktiviteler, mavi peynirlerin olgunlaşmasını ve kalitesini etkileyerek farklılıklara neden olabilir (Ferahat vd., 1990; Fernandez-Bodega, 2009). İzolatların yüksek proteolitik aktivitesi, peynir tekstüründe yumuşamaya neden olabilir (Pose vd., 2007). Ancak, üretilecek peynir çeşidine göre farklı proteolitik ve lipolitik özelliklere sahip suşlar, starter kültür olarak satışa sunulmaktadır (Anonim, 2024b).

Tablo 4.8: Seçilen izolatların proteolitik ve lipolitik aktiviteleri sonucu oluşturduğu zonlar

İzolat	Zon (mm)	
	Proteolitik aktivite (Mikolojik agar + % 10 yağsız süt)	Lipolitik aktivite (Tween 80 agar)
CECT 2905	 TE	 4,3±0,8 ^{bcd}
KP59	 4,7±0,5 ^a	 3,5±0,5 ^{cde}
26KK5A	 2,5±0,5 ^c	 TE
2KÇ5H	TE	TE
3KÇ5L	TE	TE
4K2	2,2±0,4 ^{cd}	3,5±0,5 ^{cde}
7S45D	2,2±0,4 ^{cd}	5,7±1,4 ^a
9CA5B	TE	3,2±0,4 ^{de}
11KD5B	3,7±0,5 ^b	3,3±0,5 ^{de}
15YA5B	4,5±0,5 ^a	4±0,6 ^{bcd}
17EC4B	TE	3,8±0,8 ^{bcd}
22EE5A	1,5±0,5 ^d	3,8±0,8 ^{bcd}
KP12	TE	TE
KP14	1,9±0,2 ^{cd}	4,2±0,4 ^{bcd}
KP20	2,2±0,4 ^{cd}	2,5±0,5 ^{ef}
KP25	TE	TE
KP27	TE	5±0,6 ^{ab}
KP31	2,3±0,5 ^c	4,7±0,5 ^{abc}
KP44	TE	1,7±0,8 ^{fg}
KP47	TE	0,8±0,3 ^{gh}
KP58	TE	5±0,6 ^{ab}

Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir. Zonlar, ortalama çap (mm) ± standart sapma olarak ölçülmüştür.

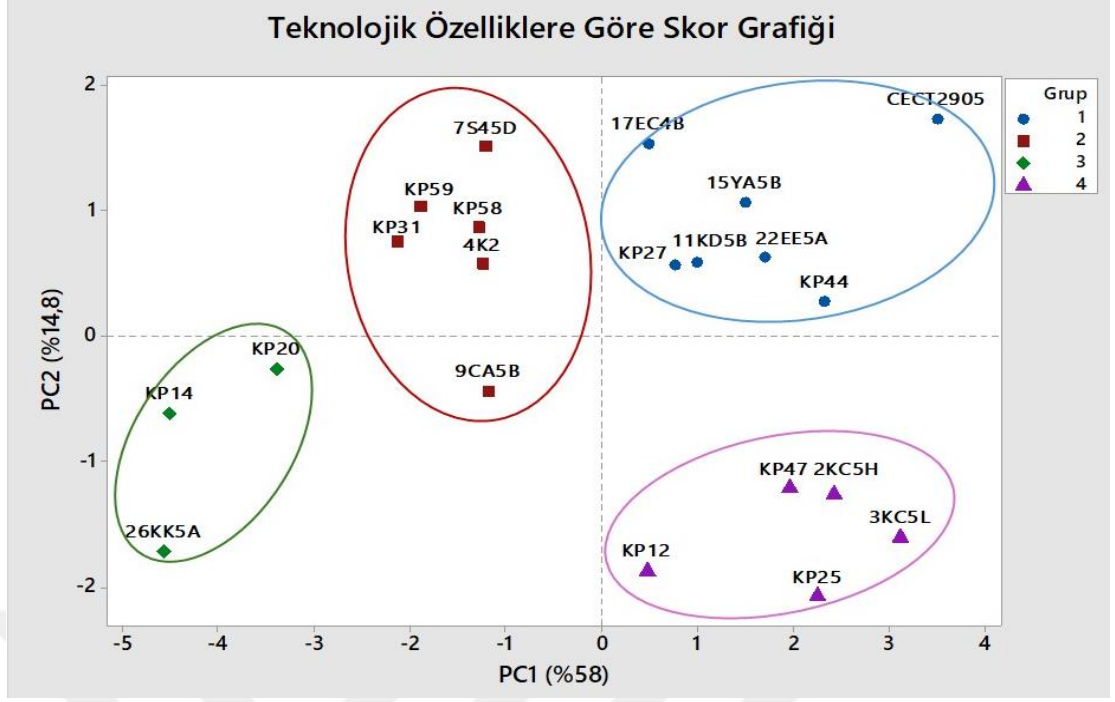
TE: Tespit edilemedi; a-h: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ($p<0,05$) göstermektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Doğan ve Tekiner (2021), *P. roqueforti*'nin proteolizi ve lipolizi arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Türkiye *P. roqueforti* izolatlarının lipolitik ve proteolitik aktiviteleri arasında korelasyon tespit edilmemiştir. İzolatlar arasında, hem proteolitik ve lipolitik aktiviteleri yüksek (15YA5B gibi), hem de her iki aktivitesi de düşük (KP12, KP25, 2KÇ5H ve 3KÇ5L) olanlar bulunmaktadır. Türkiye izolatları genel olarak, misel gelişimi, tuza dayanıklılık, lipolitik ve proteolitik aktiviteleri açısından peynirden izole edilen global izolatlara yakın bulunmuştur.

4.4.4. *P. roqueforti* İzolatlarının Teknolojik zelliklerine Göre Gruplandırılması

Teknolojik zellikleri (misel gelişimi, tuza dayanıklılık, lipolitik ve proteolitik aktivite) belirlenen 20 izolatı gruplandırmak ve dağılımlarını değerlendirebilmek için temel bileşen analizi (PCA) yapılmıştır. *P. roqueforti* izolatları, izole edildikleri peynir çeşidine göre gruplandırılmamıştır. Bu nedenle izolatlar, dört teknolojik özelliğin sonuçlarına göre K-ortalama kümeleme analizi ile gruplandırılmış ve elde edilen skor grafiği Şekil 4.14'te verilmiştir. İzolatlar, Şekil 4.14'te teknolojik özelliklere göre 4 gruba ayrılmıştır. Buna göre, 1. grupta CECT 2905 referans suşu ile KP27, KP44, 11KD5B, 15YA5B, 17EC4B ve 22EE5A izolatları yer almıştır. KP31, KP58, KP59, 4K2, 7S45D ve 9CA5B izolatları 2.grupta; KP14, KP20 ve 26KK5A izolatları 3.grupta; KP12, KP25, KP47, 2KÇ5H ve 3KÇ5L izolatları ise 4. grupta toplanmıştır.



Şekil 4.14: Teknolojik özelliklerine göre peynir izolatlarının (n=20) ve CECT 2905 neotip suşunun temel bileşen analizinin (PCA) bir çıktısı olan skor grafiğinde gruplandırılması. Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Çalışma kapsamında tespit edilen genetik farklılıkların yanı sıra, *P. roqueforti* izolatları arasında, teknolojik özellikler de değişmektedir. Bu özelliklerden 12 °C ve 25 °C’de misel gelişimi ile, izolatların iki farklı gelişme sıcaklığına adaptasyonu incelenmiş ve farklı özellik gösteren izolatlar tespit edilmiştir. Özellikle 12 °C, olgunlaşma sürecinde peynirlerin bekletildiği mahzen, iklimlendirme kabini vb. ortamların sıcaklığını temsil etmektedir. Peynir çeşidine göre bu sıcaklık 4-15 °C arası değişmektedir (Lopez-Diaz vd., 1996; Cantor vd., 2017). Peynir üretiminde tuzlama aşaması, hem peynire lezzet kazandırmak hem de raf ömrünü artırmak için önemli bir yer tutar ve kuru tuzlama ya da salamura şeklinde yapılır (Pose vd., 2007; López González vd., 2024). Bu nedenle, olgunlaşma sürecinde *P. roqueforti* suşlarının peynirde gelişebilmesi için, belli konsantrasyonlarda tuza dayanıklı olması gerekmektedir. Çalışma kapsamında, izolatların %1, %3 ve %5 oranlarında tuza dayanıklılığı da tespit edilmiş ve izolatlar arasında farklılıklar bulunmuştur. *P. roqueforti*, proteolitik ve lipolitik aktiviteleriyle küflü peynire özel duyu özellikleri (koku, lezzet, tekstür ve mavi-yeşil bir görünüm) kazandırır. Böylece tüketicilerin

peynirde duyuşal tercihlerini karşılamak için, farklı teknolojik özelliklere sahip suşlar kullanılarak farklı küflü peynirler üretilebilir (Lopez-Diaz vd., 2023; Martin ve Cotter, 2023).

Hem teknolojik özellikler, hem de genetik analizler sonucu farklı gruplarda yer alan KP44 (1. grup), 4K2 (2. grup) ve 26KK5A (3. grup) izolatları, sonraki analizler için seçilmiştir. Bu izolatlar, farklı metabolik özellikler de göstermiştir. Örneğin; KP44 izolatu 12 °C’de 3. ve 10. günde besiyerinde yüksek ve hızlı gelişme kabiliyetine, tuza dayanıklılığa, düşük proteolitik ve düşük lipolitik aktiviteye sahiptir. 4K2 izolatu, KP44’e göre besiyerinde daha düşük gelişme kabiliyeti ve düşük tuza dayanıklılık, orta proteolitik aktivite ve yüksek lipolitik aktivite göstermektedir. 26KK5A ise besiyerinde oldukça düşük ve yavaş gelişme kabiliyeti göstermekte iken, KP44 ve 4K2’ye göre yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir.

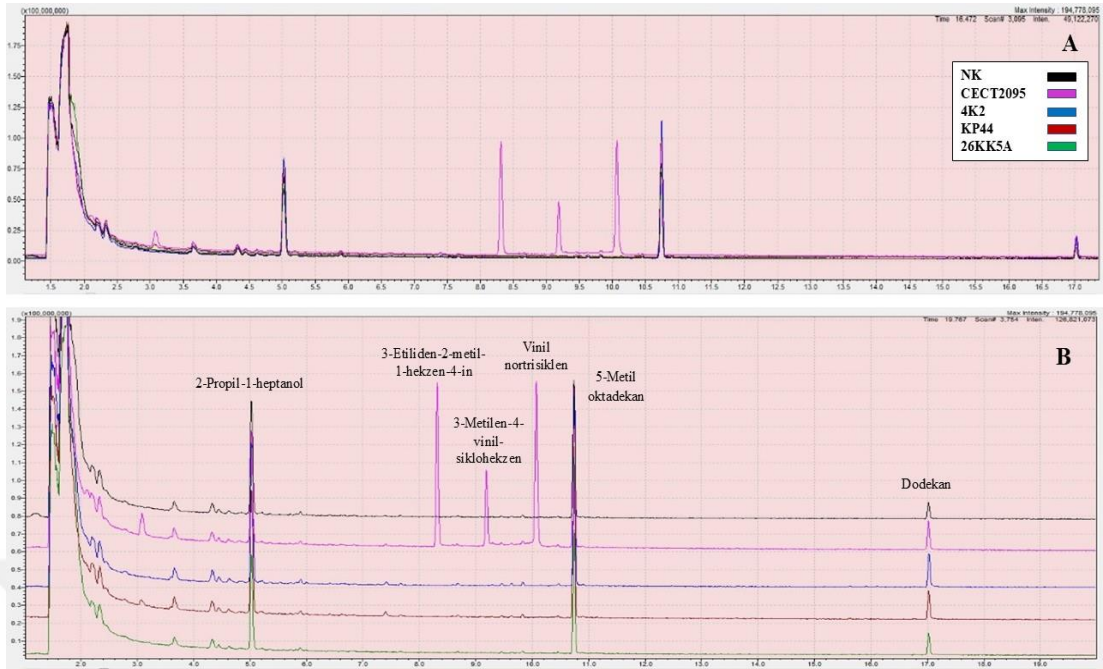
4.4.5. İzolatların Uçucu Bileşen Profili

Teknolojik özellikleri incelenen 20 *P. roqueforti* izolatu ve CECT 2905 referans suşunun GC-MS analizi sonucunda elde edilen pikler, cihaz kütüphanesinden toplam 27 bileşik ile eşleşmiştir (%70’in üzerinde benzerlik oranına sahip potansiyel eşleşmeler baz alınmıştır). Analiz sonucu tespit edilen bileşiklerin formülleri, benzerlik oranları, moleköl ağırlıkları ve alıkonma zamanları, Tablo 4.9’da verilmiştir. Buna göre ekstraktlarda, uçucu bileşikler arasında asitler, kükürtlü bileşikler, alkoller, aldehitler, alkanlar, esterler ve diğere bileşikler (eter vb.) gibi farklı kimyasal gruplar tespit edilmiştir. Şekil 4.15’te, *P. roqueforti* CECT 2905, KP44, 4K2 ve 26KK5A izolatlarına ait peynir agar ekstraktlarının toplam iyon kromatogramı (TIC) verilmiştir. *P. roqueforti* CECT 2905 referans suşu, diğere 20 peynir izolatından farklı bir uçucu bileşen profili sergilemiştir. Bu suşun CA ekstraktında, 1-metoksi-3-metil-bütan, 3-etiliden-2-metil-1-hekzen-4-in, 3-metilen-4-vinil-siklohekzen ve vinil nortrisiklen tespit edilmiştir (Tablo 4.9, Şekil 4.15). Diğere 20 *P. roqueforti* izolatının CA ekstraktlarında, uçucu bileşen profili oldukça birbirine yakın bulunmuş ve küçük farklılıklar belirlenmiştir. Üç izolatın ekstraktında (KP31, KP47 ve 4K2), diğerelerinden daha fazla uçucu bileşik tespit edilmiştir. Diğere izolatlardan farklı olarak, KP44 ve 15YA5B izolatları asetik asit üretirken, KP47 izolatu 4-metil pentanoik asit, 4K2 izolatu 1,1-dietoksi hekzan üretmiştir.

Tablo 4.9: Peynir agarda (CA) negatif kontrol ve *P. roqueforti* izolatları ekstraktlarında tespit edilen uçucu bileşikler

Kimyasal grup	Bileşik Adı ve Formülü	M _A (g/mol)	Benzerlik (%)	RT (s)	İzolatlar																					
					NK	CECT2905	KP31	KP44	11KD5B	2KÇ5H	KP59	15YA5B	KP58	KP14	22EE5A	KP20	9CA5B	KP27	KP47	4K2	KP12	26KK5A	KP25	7S45D	17EC4B	3KÇ5L
Asitler	Hidroksi-asetik asit (Glikolik asit) (C ₂ H ₄ O ₃)	76	82	2,205								+														
	Asetik asit, hidrazit (C ₂ H ₆ N ₂ O)	74	81	3,073																						
	N-amino32-hidroksiopropanamid at,propanoik asit (C ₃ H ₈ N ₂ O ₂)	104	83	4,436		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	
	4-metil pentanoik asit (C ₆ H ₁₂ O ₂)	116	78	4,454																						
	2-Piridinpropanoik asit (C ₁₁ H ₁₃ NO)	207	85	7,672	+		+										+				+					
Kükürtlü bileşikler	1-Propiltiyö-2-propanol (C ₆ H ₁₄ OS)	134	66	1,736	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Hidrazinkarbotiyoa mid, Tiyosemikarbazit (CH ₅ N ₃ S)	91	74	4,318		+		+			+		+			+									+	
	Metil-benzen (Toluen) (C ₇ H ₈)	92	80	4,328	+		+		+	+		+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Alkoller	2-Propil-1-heptanol (C ₁₀ H ₂₂ O)	158	86	5,020	+	+	+		+	+		+			+					+	+		+		+	
Aldehitler	Nonanal (n-Nonanal) (C ₉ H ₁₈ O)	142	85	5,015	+																					

Alkanlar	1-Metoksi-3-metil-bütan (C ₆ H ₁₄ O)	102	83	3,084		+																				
	1,1-dietoksi-hekzan (C ₁₀ H ₂₂ O ₂)	174	73	5,899															+							
	5-Metil-oktadekan (C ₁₉ H ₄₀)	268	88	10,739	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Dekan (n-Dekan) (C ₁₀ H ₂₂)	142	89	10,742							+		+													
	Dodekan (n-Dodekan) (C ₁₂ H ₂₆)	170	93	17,017	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Esterler	Hidrazinkarboksilik asit, etil ester (Etil karbazat) (C ₃ H ₈ N ₂ O ₂)	104	84	3,648	+			+										+							+	
Diğer bileşikler	1,2-Dietildiboran-D10 (C ₄ H ₄ D ₁₀ B ₂)	84	72	1,501	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	3-Etoksi-propanal (C ₅ H ₁₀ O ₂)	102	82	2,190		+			+	+				+												
	n-propil karbitol (C ₇ H ₁₆ O ₃)	148	84	2,204				+	+		+	+			+			+		+		+	+	+	+	
	2-hidroksimetil-3-metil-oksiran (C ₄ H ₈ O ₂)	88	84	2,336							+	+	+	+					+	+						
	Dietilenglikol mono-n-propil eter (C ₇ H ₁₆ O ₃)	148	85	2,341	+	+		+	+						+		+	+					+	+		+
	Vinil 2-(etoksi)etil eter (C ₆ H ₁₂ O ₂)	116	82	3,657	+		+		+	+	+	+	+	+	+							+		+	+	
	Karbonik dihidrazit (CH ₆ N ₄ O)	90	78	4,317			+												+	+						
	3-Etiliden-2-metil-1-hekzen-4-in (C ₉ H ₁₂)	120	85	8,136			+																			
	3-Metilen-4-vinil-siklohekzen (C ₉ H ₁₂)	120	82	9,185			+																			
	Vinil nortrisiklen (C ₉ H ₁₂)	120	85	10,070			+																			



Şekil 4.15: Peynir agarda gelişen *P. roqueforti* CECT 2905, 4K2, KP44 ve 26KK5A izolatlarının uçucu bileşenlerinin toplam iyon kromatogramı (TIC). NK: Negatif Kontrol

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Gillot vd. (2017b), peynirden ve peynir dışı ortamdan izole ettikleri ve peynir agarda geliştirdikleri 55 *P. roqueforti* suşunda, GC-MS analizi sonucu 52 uçucu bileşen (16 keton, 8 asit (yağ asitleri de dahil), 7 kükürlü bileşik, 6 alkol, 5 aldehit, 4 pirazin, 2 alkan, 1 ester, 1 lakton, 1 fenol ve 1 terpen) tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, peynir dışı ortamdan izole edilen *P. roqueforti* suşlarının, peynir izolatlarına göre daha geniş bir uçucu bileşen profiline sahip olduğu belirtilmiştir. Peynirden izole edilen F51 suşu, propiyonik asit, 2-metil propanoik asit ve 3-metilbütanoik asit ile karakterize edilirken, peynirden izole edilen FM164 ve peynir dışı ortamdan izole edilen suşlarda ise (LCP00148 ve LCP02492) metil ketonlar (heptan-2-on, nonan-2-on, non-8-en-2-on, pentan-2-on), sekonder alkoller (bütan-2-ol) ve 2,3-dimetil-5-pirazin bileşikleri öne çıkmıştır. Ayrıca, peynir dışı ortamdan izole edilen diğer suşların (CBS 479.84 ve CBS 498.73) uçucu bileşen profilinde, bütan-2-on, β -mirsen, 4-metil-2,3-dihidropiran-6-on, *p*-krezol, 4-metilpentan-2-on, 2,5-dimetilpirazin, 2,3,5-trimetilpirazin ve benzaldehit de yer almıştır. Tablo 2.2'ye (bkz. 2.2.5) göre, *P. roqueforti* popülasyonlarından Popülasyon 4'te (Rokfor ve Termignon harici diğer peynirler) uçucu bileşen çeşitliliği oldukça düşük iken, diğer 4 popülasyondaki suşlar, yüksek uçucu bileşik çeşitliliğine

sahiptir (Coton vd., 2020; Dumas vd., 2020; Crequer vd., 2023; 2024). Crequer vd. (2024), mavi peynirlerden izole edilen suşların, diğer popülasyonlardan izole edilen suşlara göre, domestikasyon prosesinden dolayı, metabolik çeşitliliklerini zamanla kaybettiklerini ve daha düşük metabolit profillerine sahip olduklarını vurgulamıştır. Türkiye peynirlerinden izole edilen 20 izolatta ise daha az uçucu bileşen tespit edilmiştir. İzolatlarda birbirlerinden farklı olarak; KP44'te asetik asit hidrazit, 15YA5B'de hidroksi-asetik asit, KP47'de 4-metil pentanoik asit ve 4K2'de 1,1-dietoksi-hekzan belirlenmiştir. Bu izolatların uçucu bileşen profilinde, Popülasyon 4 izolatlarında olduğu gibi, az sayıda uçucu bileşik tespit edilmiştir. Ayrıca, bu analizde kullanılan metot, tespit edilen uçucu bileşen sayısını sınırlandırmış olabilir. Ayrıca daha iyi sonuçlar için, analiz parametreleri değiştirilerek, kullanılan GC-MS metodu geliştirilebilir.

4.4.5. İzolatların Rokfortin C (ROKC) ve Mikofenolik Asit (MPA) Üretimi

P. roqueforti izolatlarının YES agarda ROKC ve MPA üretimlerini belirlemek için, mikotoksin standartları kullanılarak öncelikle, analiz metodu kurulmuş ve bu metodun performansı değerlendirilmiştir. İki mikotoksin için hesaplanan lineerite (doğrusallık) verileri; lineerite aralığı ve eşitliği ve kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları (R^2) Tablo 4.10'da verilmiştir. Ayrıca, bu mikotoksinlerin tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) de belirlenmiştir (Tablo 4.10). Her iki standart da altı farklı konsantrasyonda hazırlanarak cihaza verilmiş ve iki mikotoksin için de altı farklı noktadan oluşan kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları, metot validasyonu için kabul edilebilir bulunmuştur ($R^2 = 0,999$). LOD ve LOQ değerleri ise, standartların cihaza on tekrarlı verilmesi sonucu Excel'de hesaplanmıştır.

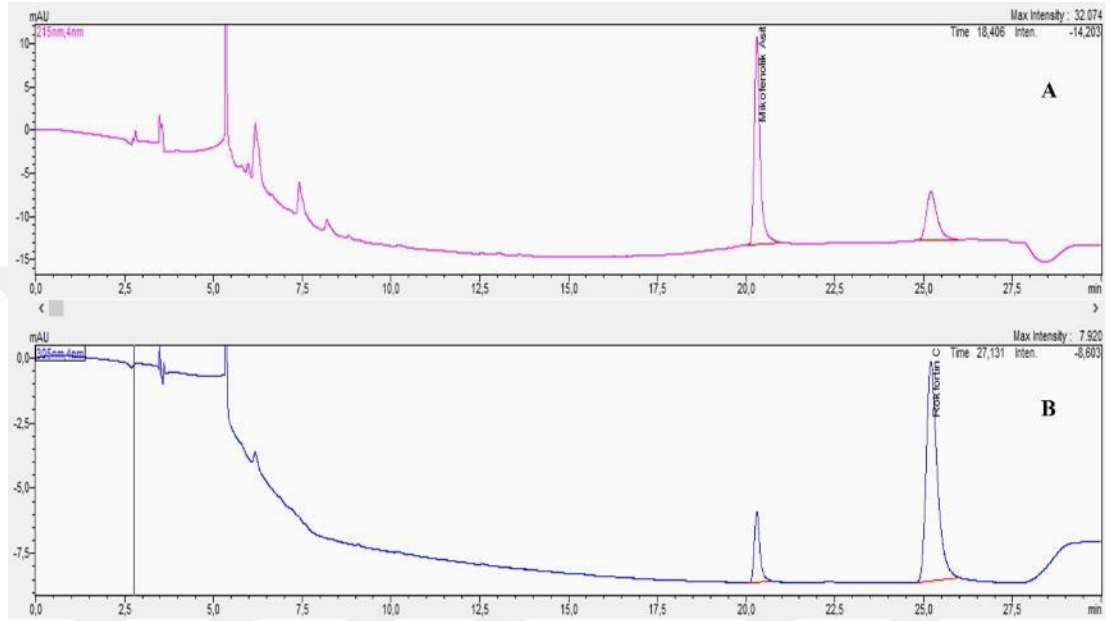
Tablo 4.10: MPA ve ROKC için lineerite verileri, LOD ve LOQ değerleri

Mikotoksin	Lineerite aralığı (µg/mL)	Lineerite eşitliği	R^2	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
MPA	0.4-8	$y = 68584x - 1317.36$	0.999	0.58	1.95
ROKC	0.2-4	$y = 91486.1x - 5005.21$	0.999	0.11	0.36

MPA: Mikofenolik asit; ROKC: Rokfortin C; R^2 : Korelasyon katsayısının karesi; LOD: Deteksiyon limiti; LOQ: Kantitasyon limiti.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için, ROKC (2 µg/mL) ve MPA (4 µg/mL) standartları HPLC cihazına enjekte edilmiş ve bu standartların miksinin HPLC-PDA kromatogramları Şekil 4.16’da verilmiştir. Her iki mikotoksin için de, en yüksek pik verdikleri optimum dalga boyları (MPA için 215 nm, ROKC için 305 nm) kullanılmıştır. Buna göre, MPA’nın alıkonma zamanı 20,3 dk ve ROKC’nin 25,2 dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16: MPA (4 µg/mL) ve ROKC (2 µg/mL) standart mikslarına ait HPLC-PDA kromatogramları. (A) 215 nm’de MPA ve ROKC standartlarının miksinde ait kromatogram, (B) 305 nm’de MPA ve ROKC standartlarının miksinde ait kromatogram.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

P. roqueforti izolatlarının YES agar ekstraktlarına ait MPA ve ROKC sonuçları, ortalama değer ve standart sapma olarak Tablo 4.11’de verilmiştir. *P. roqueforti* 26KK5A izolatının YES agar ekstraktına ait HPLC-PDA kromatogramları, örnek olarak Şekil 4.17’de verilmiştir. İzolatlar arasında bu iki mikotoksinin miktarı değişkenlik göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p < 0,05$) bulunmuştur. *P. roqueforti* izolatlarının MPA ve ROKC üretimi, sırasıyla, 3,5-745,4 µg/kg ve 43,8-1059,9 µg/kg aralıklarında tespit edilmiştir. Tablo 4.12’de gösterildiği üzere, KP44 izolatında 745,4 µg/kg ile en yüksek miktarda MPA üretimi tespit edilmiştir. Bu izolatı MPA üretimi bakımından, CECT 2905 tip suşu (664,5 µg/kg) ve 3KÇ5L izolatı (357,5 µg/kg) takip etmiştir. En düşük miktarda MPA’yı (3,5 µg/kg), 11KD5B izolatı

üretmiştir. KP27 ve 7S45D izolatları da, sırasıyla, 5,6 µg/kg ve 6,6 µg/kg olmak üzere diğer izolatlardan düşük miktarlarda MPA üretmiştir. En yüksek miktarda ROKC'yi, 1059,9 µg/kg ile 26KK5A izolatu üretmiştir. ROKC üretiminde, CECT 2905 tip suşu 963,5 µg/kg ve KP47 izolatu 545,9 µg/kg ile 26KK5A'yı takip etmiştir. 3KÇ5L izolatında MPA tespit edilememiştir. 17EC4B (43,8 µg/kg) ve KP44 (48,6 µg/kg) izolatları da, diğer izolatlardan düşük miktarda ROKC üretmiştir.

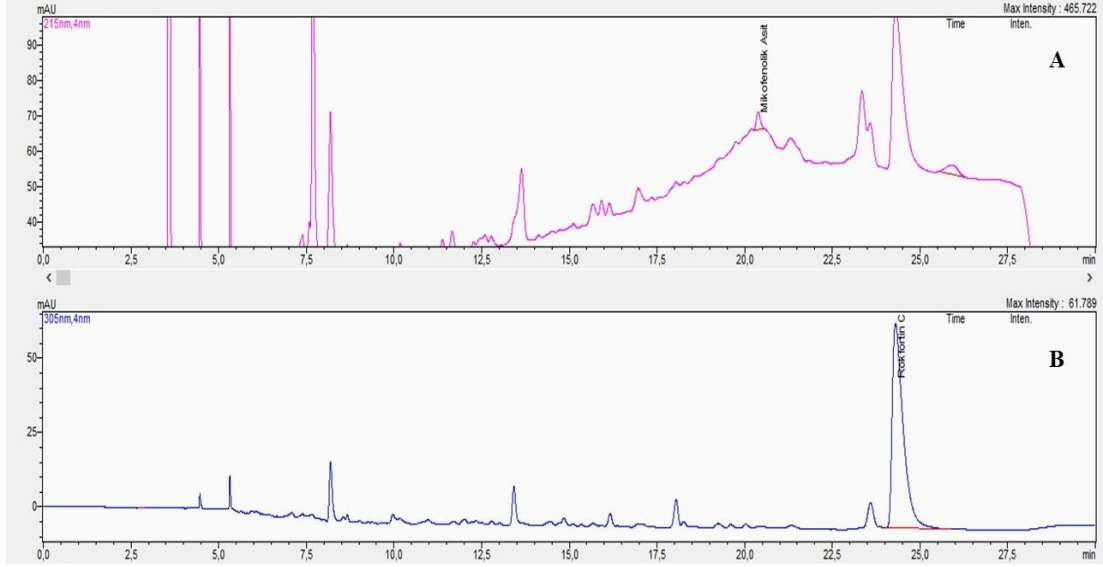
Tablo 4.11: *P. roqueforti* izolatlarının YES agarda mikofenolik asit ve rokfortin C üretimi

İzolatlar	MPA (µg/kg)	ROKC (µg/kg)
NK	TE	TE
CECT 2905	664,5±25,2 ^b	963,5±1 ^b
2KÇ5H	44,6±0,6 ^g	122,3±0,1 ^l
3KÇ5L	357,5±12,1 ^c	TE
4K2	28,5±0 ^g	153,1±0 ^k
7S45D	6,6±0,3 ^g	116,2±6 ^{lm}
9CA5B	147,7±0,5 ^{ef}	218,6±1,8 ^g
11KD5B	3,5±0,1 ^g	185,1±3,9 ⁱ
15YA5B	8,5±0,7 ^g	105,9±0,4 ⁿ
17EC4B	272,7±2,3 ^d	43,8±0 ^p
22EE5A	16,9±0,7 ^g	75,3±1,1 ^o
26KK5A	35,5±1,2 ^g	1059,9±3 ^a
KP12	14,3±0,7 ^g	247,4±0,1 ^f
KP14	30,6±0,7 ^g	411,8±1,9 ^d
KP20	115,2±3,2 ^f	101,5±0,3 ⁿ
KP25	16,7±0,1 ^g	110,6±0,1 ^{mm}
KP27	5,6±0,5 ^g	174,7±0,3 ^j
KP31	172±1,9 ^e	413,1±0,3 ^d
KP44	745,4±28,4 ^a	48,6±0,4 ^p
KP47	9,6±0,4 ^g	545,9±0,9 ^c
KP58	34,2±0,3 ^g	195,7±0,4 ^h
KP59	32,6±0,7 ^g	327,2±0,7 ^e

Rakam ve harf ile verilen kodlar, izolat isimlerini ifade etmektedir. YES: Maya ekstraktı sükröz agar; MPA: Mikofenolik asit; ROKC: Rokfortin C; NK: Negatif kontrol; TE: Tespit edilemedi

MPA için LOD: 0,59 µg/kg, LOQ: 1,95 µg/kg; ROKC için LOD: 0,11 µg/kg, LOQ: 0,36 µg/kg
a-o: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu (p<0,05) göstermektedir,

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.17: *P. roqueforti* 26KK5A izolatının YES agar ekstraktına ait HPLC-PDA kromatogramları. (A) 215 nm'deki kromatogramda MPA'nın belirlenmesi, (B) 305 nm'deki kromatogramda ROKC'nin belirlenmesi.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

MPA ve ROKC'nin tespitinde, TLC, HPLC, LC-MS, LC-MS/MS ve LC-QTOF/MS metotları kullanılmaktadır (Erdoğan ve Sert, 2004; Cakmakci vd., 2015; Gillot vd., 2017a; 2017b; Ozturkoglu-Budak vd., 2023; Caron vd., 2024; Crequer vd., 2024). Erdoğan ve Sert (2004), Küflü Tulum peynirlerinden izole ettikleri 12 *P. roqueforti* izolatını YES sıvı besiyerinde 5 °C'de, 12 °C'de ve 25 °C'de 10 gün geliştirdikten sonra, rokfortin miktarını incelemişlerdir. Buna göre, 5 izolatın en çok 25 °C'de rokfortin ürettiğini raporlamışlardır. Sumarah vd. (2005) ve O'Brien vd. (2006) silajdan ve keresteden izole ettikleri *P. roqueforti* suşlarının CYA ve YES agar besiyerlerinde MPA ve ROKC ürettiklerini (LOD ve LOQ değerleri üzerinde) vurgulamışlardır. Cakmakci vd. (2015), Küflü Civil peynirinden izole ettikleri 140 *P. roqueforti* izolatının, YES agarda 25°C'de 7 gün inkübasyon sonrası ürettikleri MPA miktarını 0,1-23,1 mg/kg ve ROKC miktarını 0,2-47 mg/kg aralıklarında belirlemişlerdir. Fontaine vd. (2015a), Avrupa'nın çeşitli yerlerinden aldıkları mavi peynirlerden izole edilmiş 96 *P. roqueforti* suşunun 25°C'de 7 gün inkübasyonu sonrası sırasıyla, MPA ve ROKC miktarını CA'da 698-3497,9 ng/g ve 3623,2-9980,8 ng/g; YES agarda 5476-14957,8 ng/g ve 6691,4-27592,6 ng/g olarak belirlemişlerdir. Gillot vd. (2017a), 55 *P. roqueforti* izolatından Rokfor peyniri ve peynir dışı ortamdan izole edilenlerin YES-C (YES-mısır ekstraktı) agarda (25°C'de 7 gün inkübasyon

sonrası) MPA üretimi, LOD ve LOQ değerlerinin üstünde, diğer mavi peynir izolatlarında ise, MPA üretimini bu değerlerin altında tespit etmişlerdir. Diğer mavi peynir izolatlarında MPA üretiminin oldukça düşük kalmasının, bu izolatların *mpaC* geninde 174 bp'lik delesyon bulunmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Sonraki çalışmalarda bu izolatlar, Tablo 2.2'de verilen Popülasyon 4 içerisinde yer almıştır (Coton vd., 2020; Dumas vd., 2020; Crequer vd., 2023; 2024). Gillot vd. (2017b), bu izolatların YES agarda (25°C'de 7 gün inkübasyon sonrası) MPA üretimini 4-57 ng/g aralığında belirlemişlerdir. ROKC miktarları ise, 18-237 ng/g aralığında değişmiştir. Ozturkoglu-Budak vd. (2023) ise, Divle-Obruk peynirinden izole ettikleri bir *P. roqueforti*'nin YES agarda 25°C'de 7 gün inkübasyon sonrası MPA üretimini tespit edememişler, ROKC miktarını ise 29,99 µg/kg olarak bulmuşlardır. Caron vd. (2024), *P. roqueforti* izolatlarının genomlarında, pleotropik (bir genin birden fazla fenotipik özellikte etkili olması) kantitatif özellik lokuslarını (QTL) tanımlamışlardır. Bu çalışmaya göre QTL lokusları, koloni rengi, lipoliz ve proteolizin yanı sıra, MPA ve ROKC gibi ikincil metabolitlerin üretimiyle ilişkilendirilmiştir. Buna göre, MPA ve ROKC'nin üretimi için QTL'ler belirlenmiş ve bu lokusların her iki metabolitin biyosentez gen kümeleriyle örtüştüğü tespit edilmiştir. Rokfor peyniri dışındaki izolatlardaki alellerin, bu metabolitlerin daha düşük üretim seviyeleriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, bu lokuslardan birinde bulunan *pczI* geninin ikincil metabolitlerin sentezinde regülatör olduğu bilinmektedir. Bu genin aşırı ifadesi, ROKC üretimini azaltırken, MPA üretimini artırmıştır. Bu durum, peynir ortamına adapte olmuş *P. roqueforti* soylarında daha düşük ikincil metabolit üretim seviyeleri için, pozitif seçilime uğradığı yönünde değerlendirilmiştir. Crequer vd. (2024), *P. roqueforti*'nin üç peynir popülasyonundan (Rokfor, Rokfor harici ve Termignon) ve iki peynir dışı ortamdaki gelen popülasyondan (kereste ve silaj) toplam 44 izolatın metabolit profillerini (YES agarda 25 °C'de 10 gün inkübasyon sonrası) incelemiş ve popülasyonlar arasında metabolit üretiminin değiştiğini tespit etmişlerdir. Peynir dışı ortamdaki gelen izolatlar, pek çok yağ asidi, terpenoid ve mikotoksini (PR toksin, izofumigaklavinler, eremofortinler, festuklavin ve mikofenolik asit) üretmiştir. Ancak, Rokfor peyniri ve Rokfor harici mavi peynir izolatları düşük metabolit çeşitliliği ve düşük mikotoksin üretimi göstermiştir. İzolatların %43'ünde, MPA üretimi tespit edilememiş veya düşük düzeyde kalmıştır (maksimum 118 ng/g). Özellikle Rokfor harici peynir popülasyonu, domestikasyonu en belirgin olan popülasyondur ve *mpaC* geni delesyonu nedeniyle MPA üretimi oldukça düşük miktarda kalmıştır. Termignon

popülasyonu ise, peynir ve peynir harici popülasyonların arasında bir metabolit profili sergilemiştir. ROKC üretimi ise peynir popülasyonlarında, peynir dışı popülasyonlara göre daha yüksek miktarlarda bulunmuştur. Bu sebeple, ROKC'nin peynirde ekolojik bir rolünün olabileceği değerlendirilmiştir (Crequer vd., 2024). Peynir dışı ortamlardan gelen iki izolatta (UBOCC-A-118017 ve UBOCC-A-118018) ROKC biyosentezinde anahtar gen olan *rds*'nin 5' bölgesindeki bir delesyon, başlangıç kodon eksikliğine yol açmış; ayrıca, bir Rokfor izolatındaki (LCP02939) bir delesyon çerçeve kaymasına neden olmuştur. Bu üç izolat da ROKC üretememiştir. ROKC gen kümesinde meydana gelen mutasyonların, belirli bir popülasyonla bağlantılı olmadığı ve bu varyasyonların, birden fazla popülasyonla paylaşıldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre, peynir popülasyonlarının düşük toksin üretme özelliğinin, bu yeteneğin dejenerasyonu ve/veya düşük toksin üreten bireylerin seçilmesi yoluyla kaybedilmesi ile bağlantılı olabileceği hipotezi öne sürülebilir. Peynir popülasyonlarındaki kullanılmayan özelliklerin (karbonhidrat kullanımı ve eşeyli üremenin kaybı vb.) dejenerasyonunun, doğal seçim baskısının azalması sonucu (zayıflamış/gevşek seçim) olduğu değerlendirilmiştir. Peynir dışı popülasyonlardaki yüksek metabolit çeşitliliğinin korunmasının, bu metabolitlerin biyolojik aktivitelerinin (antimikrobiyel etkiler vb.) farklı ekolojik nişlerde önemli olmasından kaynaklanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir (Crequer vd., 2024). Böylece, çevre koşullarına adaptasyon sonucu *P. roqueforti* grupları, farklı metabolit profili sergilemiş ve domestikasyon prosesi ile de hipotoksijenik popülasyonlar ortaya çıkmıştır.

Türkiye peynirlerinden izole edilen 20 *P. roqueforti* izolatının YES agarda 25 °C'de 14 gün inkübasyonu sonrası, genel olarak tüm izolatlarda değişen miktarlarda MPA ve ROKC üretimi tespit edilmiştir. İzolatların bu mikotoksinleri üretim düzeyleri yüksek olmamakla birlikte, literatürdeki düzeylerle benzer şekildedir. Bu izolatlar YES agarda MPA ve ROKC üretimi miktarları açısından, Rokfor ve Termignon popülasyonlarına yakınlık göstermiştir. Diğer mavi peynir popülasyonunda, MPA üretimi oldukça düşük düzeydedir. Sadece, 3KÇ5L izolatının ROKC üretimi tespit edilememiştir. Bunun nedeninin, Crequer vd. (2024)'ün raporladığı gibi *rds* geninde veya ROKC ile ilişkili başka bir gende bir değişiklikten kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

KP44, 4K2 ve 26KK5A suşları, uçucu bileşen üretimi açısından birbirine yakın bulunmuştur. 26KK5A izolatı, ROKC'yi; KP44 izolatı ise MPA'yı diğer izolatlardan

daha yüksek miktarda üretmiştir. PCA analizine göre 1., 2. ve 3. gruplardan seçilen üç izolat ve CECT 2905 neotip suşu ile peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen peynirlerde bazı fizikokimyasal, mikrobiyolojik analizler, uçucu bileşen ve mikotoksin (roafortin C ve mikofenolik asit) analizleri yapılmıştır.

4.5. Peynirlerin Özellikleri

4.5.1. Çiğ Sütün ve Peynirlerin Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri

Peynir üretiminde kullanılan çiğ sütün fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları, Tablo 4.12’de, peynir örneklerinin ise Tablo 4.13’te verilmiştir. Peynirlerin altı haftalık olgunlaşma süreci sonrası görünüşleri, Şekil 4.18’de verilmiştir.

Tablo 4.12: Peynir üretiminde kullanılan çiğ sütün fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları

Özellik	Ortalama değer ± standart sapma
pH	6,70±0,01
TTA (%)	0,21±0,01
KM (%)	13,27±0,02
Kül (%)	0,69±0,01
Yoğunluk (g/mL)	1,029±0,001
TMAB (log kob/mL)	6,53±0,10
TMK (log kob/mL)	TE
TLB (log kob/mL)	5,76±0,01
TLC (log kob/mL)	6,41±0,08

TTA: Titre edilebilir asitlik (%); KM: Kuru madde (%); TMK: Toplam Maya-Küf Sayımı; TMAB: Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Sayımı; TMK: Toplam Maya-Küf Sayımı, TLB: Toplam *Lactobacillus* Sayımı, kob: Koloni oluşturan birim; TLC: Toplam *Lactococcus* Sayımı; TE: Tespit edilemedi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.13: Peynir örneklerinin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları

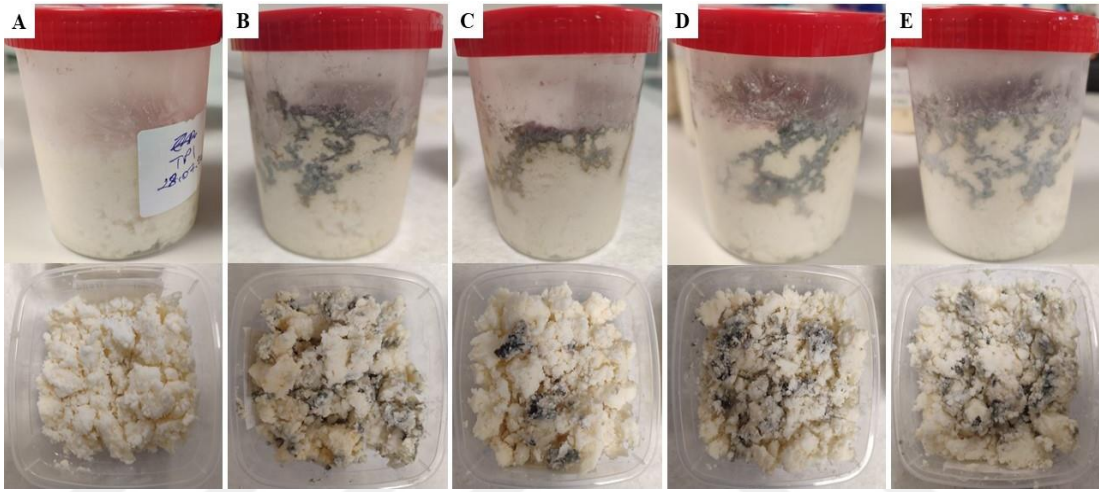
Numune	pH	TTA	Protein	Yağ	Tuz	Kül	KM	TMAB	TMK	TLB	TLC
TZ	5,35±0,02 ^f	0,14±0,01 ^a	18,76±0,10 ^a	29,40±0,93 ^{ab}	3,05±0,5 ^a	5,05±0,06 ^{ab}	55,75±1,41 ^a	8,50±0,01 ^{ab}	5,54±0,06 ^e	8,14±0,04 ^b	8,09±0,15 ^{ab}
TP1	5,90±0,01 ^e	0,13±0,01 ^{ab}	13,85±0,10 ^c	27,75±1,94 ^{abc}	2,61±0,06 ^a	4,60±0,06 ^b	55,08±1,53 ^a	8,38±0,10 ^{ab}	6,16±0,01 ^d	8,37±0,11 ^a	7,96±0,08 ^{bc}
TP3	6,68±0,04 ^d	0,14±0,01 ^a	12,76±0,10 ^d	30,50±2,14 ^a	2,97±0,17 ^a	5,36±0,21 ^a	55,70±0,42 ^a	8,30±0,02 ^b	7,84±0,02 ^c	7,19±0,01 ^c	7,83±0,09 ^c
TP5	6,89±0,02 ^c	0,09±0,02 ^{bc}	14,82±0,10 ^b	21,75±1,52 ^d	2,61±0,17 ^a	4,89±0,18 ^{ab}	50,20±1,70 ^b	8,57±0,17 ^a	7,94±0,09 ^{bc}	6,87±0,09 ^d	8,28±0,11 ^a
TP7	7,18±0,02 ^b	0,08±0,01 ^c	13,55±0,10 ^c	25±1,75 ^{bcd}	2,44±0,17 ^a	5,03±0,12 ^{ab}	47,23±0,20 ^b	8,56±0,11 ^a	8,13±0,04 ^a	6,83±0,02 ^d	8,25±0,07 ^a
TP9	7,36±0,01 ^a	0,09±0,01 ^{bc}	12,94±0,10 ^d	23,25±1,63 ^{cd}	2,50±0,14 ^a	4,82±0,01 ^{ab}	48,75±0,02 ^b	8,38±0,07 ^{ab}	8,02±0,01 ^{ab}	6,68±0,02 ^d	8,12±0,06 ^{ab}

TZ: Taze peynir (4 °C'de 7 gün dinlendirilmiş), TP1-TP9 peynirleri 6 hafta 10°C'de olgunlaştırılmıştır. TP1: Küf inoküle edilmeyen; TP3: CECT 2905 kodlu izolat inoküle edilen; TP5: 4K2 kodlu izolat inoküle edilen; TP7: KP44 kodlu izolat inoküle edilen; TP9: 26KK5A kodlu izolat inoküle edilen peynir; TTA: Titre edilebilir asitlik (%); Protein: (%); Yağ: (%); Tuz: (%); Kül: (%); KM: Kuru madde (%); TMAB: Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Sayımı (log kob/g); TMK: Toplam Maya-Küf Sayımı (log kob/g); TLB: Toplam *Lactobacillus* Sayımı (log kob/g); TLC: Toplam *Lactococcus* Sayımı (log kob/g); Ort±s.s.: Ortalama değer ± standart sapma.

a-f: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçlar arasında önemli bir fark olduğunu ($p<0,05$) göstermektedir. Tuz ve kül değerlerinde anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Şekil 4.18’de gösterildiği üzere *P. roqueforti* izotlarından KP44 ve 26KK5A, peynirde homojen bir gelişim göstermiştir. 4K2 izolatu ise, bunlara nazaran peynirde daha az gelişmiştir. KP44 ve 26KK5A, Rokfor peyniri suşu olan CECT 2905’e yakın bir gelişim profili sergilemiş ve miseller peynirde damarlı görünümü oluşturmuştur. *P. roqueforti* 26KK5A izolatu, morfolojik inceleme ve misel gelişimi analizlerinde petride sınırlı bir gelişme paterni sergilese de, peynir ortamında iyi gelişmiştir. Ancak 4K2 izolatu, diğer izolatlarla göre peynirde daha az damarlı yapı oluşturmuş ve zayıf gelişmiştir.



Şekil 4.18: Olgunlaşma süresi sonunda, *P. roqueforti* izolatlarının peynirlerde oluşturduğu damarlı yapılar ve peynirlerin görünüşleri. (A) TP1: Küf inoküle edilmeyen, (B) TP3: CECT 2905 kodlu tip suş inoküle edilen, (C) TP5: 4K2 kodlu izolat inoküle edilen, (D)TP7: KP44 kodlu izolat inoküle edilen, (E) TP9: 26KK5A kodlu izolat inoküle edilen peynir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.13’te belirtildiği üzere, peynir örneklerinin pH, toplam titre edilebilir asitlik (TTA), protein, yağ, kuru madde (KM), toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı (TMAB), toplam maya-küf sayımı (TMK), toplam *Lactobacillus* sayımı (TLB) ve toplam *Lactococcus* sayımı (TLC) değerleri sonuçlarında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0,05$). Ancak tuz ve kül değerlerinde anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$).

Peynirlerin pH değerleri 5,35-7,36 arasında değişmiştir. Taze peynir (TZ), 5,35 ile en düşük pH değerine sahipken; 26KK5A kodlu izolat ile olgunlaştırılan peynir (TP9), 7,36 ile en yüksek pH değerindedir. Olgunlaşma sürecinde küflerin proteolitik

aktivitelerinin etkisiyle, olgunlaştırılan peynirlerin pH değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. En yüksek pH değeri, peynir üretiminde kullanılan izolatlardan en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan 26KK5A izolatı ile üretilen T9 peynirinde tespit edilmiştir. Genellikle düşük olan %TTA değerleri, %0,08-0,14 aralığında, en düşük %TTA değerindeki (%0,08) peynir, KP44 kodlu izolat ile olgunlaştırılan peynir (TP7); en yüksek değer (%0,14), TZ ve CECT 2905 tip suşu ile olgunlaştırılan peynir (TP3) olarak bulunmuştur. Peynirlerin % protein ve % yağ oranları, sırasıyla, %12,76-18,76 ve %21,75-30,50 aralıklarında tespit edilmiştir. TZ, en yüksek protein oranına (%18,76) sahiptir ve diğer numunelerde bu oran daha düşük seyretmiştir. Protein miktarındaki bu düşüş, olgunlaşan peynirlerdeki proteolizin sonucu olabilir. TP3, %30,50 ile en yüksek yağ miktarına sahip peynirdir ve peynirlerin yağ miktarları birbirine yakın bulunmuştur. Numunelerde %tuz, %kül ve %KM oranları, sırasıyla, %2,44-3,05, %4,60-5,36 ve %47,23-55,75 aralıklarında değişmiştir. Bu değerler, TZ numunesinde yüksek iken, olgunlaştırılan beş numunenin değerlerinde küçük düşüşler belirlenmiştir. Mikrobiyolojik analizlerde TMAB, TMK, TLB ve TLC değerleri, sırasıyla, 8,30-8,57 log kob/g, 5,54-8,13 log kob/g, 6,68-8,37 log kob/g ve 7,83-8,28 log kob/g aralıklarında değişmiştir. Peynirlerin TMAB sayıları, birbirine yakın seyretmiş, ancak TMK sayıları, peynirlere küf inokülasyonu ile artmıştır. Küf ile olgunlaşmış peynirlerde TLB sayıları azalırken; TLC sayıları, süte starter kültür ilavesi ile birlikte tüm peynirlerde birbirine yakındır.

Özgören ve Seçkin (2012), Erzurum, Isparta, Kayseri, Konya ve Mersin illerinden temin ettikleri küflü peynir örneklerinin (n=100) kalite özelliklerini değerlendirmişlerdir. Buna göre, örneklerin ortalama pH (5,37), asitlik (%0,91), yağ (%16,26), tuz (%4,97) ve KM (%53,28) değerlerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, geleneksel yöntemlerle evlerde üretilen ve üretim yönteminin yöreye göre değiştiği küflü peynirlerde farklı kalite özellikleri belirlenmiştir. Cakmakci vd. (2014), lor peyniri ilave ederek Küflü Civil peyniri yaptıkları çalışmada, örneklere bazı kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapmışlardır. Olgunlaşma süresi boyunca peynir örneklerinde (180 gün), ortalama pH (4,59-6,48), asitlik (%0,42-0,72), protein (%32,24-36,55), yağ (%1,69-1,72), tuz (%6,09-7,21) ve KM (%41,60-46,97) değerlerini tespit etmişlerdir. Mikrobiyolojik analizlerde ise, TMAB sayısı 7,33-8,30 log kob/g, TMK sayısı 7,60-7,93 log kob/g, TLB sayısı 5,78-7,80 log kob/g ve TLC sayısı 6,47-8,49 log kob/g aralıklarında değişmiştir. Bu çalışmada, Lor peyniri

ilavesinin Küflü Civil peynirinin kimyasal kompozisyonunu etkilediği sonucuna varmışlardır. Ayrıca, olgunlaşma sürecinin başında peynirlerde mikrobiyal yükün fazla olduğunu, ancak olgunlaşmanın sonuna doğru, yaklaşık 1-2 log kob/g azaldığını tespit etmişlerdir. Divle-Obruk peynirinde yapılan bir çalışmada, üç farklı mandırada üretilen peynir örneklerinde, 120 gün olgunlaştırma süresi boyunca pH (4,54-5,14), KM (%50,78-56,25), yağ (%16,5-19,50), tuz (%2,90-3,80) ve toplam protein (%4,17-4,87) değerleri belirlenmiştir (Ozturkoğlu-Budak, 2016b). Arslaner ve Salık (2020), Bayburt Civil peynirlerinde yaptıkları çalışmada, 20 peynir örneğinde pH (5,36-6,07), asitlik (%0,21-1,25), protein (%20,9-35,54), yağ (%0,5-26), kül (%3,48-16), tuz (%1,51-15,43), KM (%41,92-57,85), TMAB (5,94-8,83 log kob/g) ve TMK (4,37-10,14 log kob/g) değerlerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, coğrafi işaret potansiyeli taşıyan Bayburt Civil peynirinin kimyasal kompozisyon ve mikrobiyal yük açısından standart kaliteye sahip olmadığını ortaya koymuştur. Çakmakçı ve Salık (2021), Erzurum Küflü Civil peynirinin pH (5,60-6,51), asitlik (%0,72-1,70), protein (%35,0-36,95), yağ (%1,72-6,0), tuz (%5,0-7,21), kül (%5,68) ve KM (%46,97-65,0) değerlerini raporlamıştır. Ayrıca, son yıllardaki Küflü Civil peynirinin kontrollü küflendirilmesi amacıyla, üzerinde araştırma yapılan *P. roqueforti* suşlarının çeşitli çalışmalarda kullanıldığını vurgulamışlardır. Çakmakçı ve Salık (2021), Divle-Obruk peynirinde ise, pH (5,14-5,49), asitlik (%1,07-2,72), protein (%25,90-31,07), yağ (%19,50-25,92), tuz (%2,46-3,99), kül (%4,96) ve KM (%56,25-60,13) değerlerini belirtmiştir. Antakya Küflü Sürk'ünde ise, pH (4,76-4,94), asitlik (%1,14-1,44), protein (%19,02-20,10), yağ (%8,99-9,50), tuz (%6,80-8,35), kül (%6,20-7,96) ve KM (%42,30-52,91) tespit edilmiştir. Çakır ve Çakmakçı (2024), özelliklerini daha önce belirledikleri *P. roqueforti* 41 suşu ile Küflü Erzincan Tulum peyniri üretmişler ve peynirleri, 120 gün olgunlaştırmışlardır. Peynirlerin olgunlaşma süresi boyunca, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerini incelemişlerdir. Analizler sonucu, pH (4,76-5,71), asitlik (%0,99-1,77), protein (%18,27-27,56), yağ (%29,00-43,00), kül (%4,15-6,42), tuz (%2,81-4,80), KM (%53,19-77,64), TMAB (7,49-8,61 log kob/g), TMK (5,08-7,79 log kob/g), TLB (7,18-8,39 log kob/g) ve TLC (7,39-8,62 log kob/g) değerlerini tespit etmişlerdir. Demirci (2024), Konya'da yerel satıcılardan temin ettiği küflü peynirlerin (n = 10) kimyasal özelliklerini, pH (5,17-6,69), asitlik (%1,37-2,81) ve yağ (%6,0-27,5) değerlerini inceleyerek belirlemiştir. Küflü peynirlerde yapılmış çalışmalar incelendiğinde, peynirlerin üretildiği sütte, peynir türüne, üretim tekniğine ve peynirin üretildiği ortam şartlarına göre kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri

değişmiştir. Türkiye’de üretilen küflü peynirler için, aynı çeşit peynir olsa bile, bir standardizasyon söz konusu değildir. Çalışma kapsamında üretilen model küflü peynirlerin çalışılan kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçlarının, literatürde verilen değerlerin arasında olduğu tespit edilmiştir.

4.5.2. Peynirlerin Uçucu Bileşen Profili

Peynir örneklerinin (TZ, TP1, TP3, TP5, TP7 ve TP9) GC-MS analizi sonucunda elde edilen pikler, cihaz kütüphanesinden toplam 31 bileşik ile eşleşmiştir (%70’in üzerinde benzerlik oranına sahip potansiyel eşleşmeler baz alınmıştır). Analiz sonucu peynir örneklerinde tespit edilen bileşiklerin formülü, benzerlik oranı, molekül ağırlığı ve alıkonma zamanı, Tablo 4.14’te verilmiştir. Buna göre ekstraktlarda, uçucu bileşikler arasında asitler, alkoller, aldehitler, ketonlar, esterler, laktonlar, alkanlar ve diğer bileşikler gibi farklı kimyasal gruplar tespit edilmiştir. Şekil 4.19’da, peynir örneklerine ait toplam iyon kromatogramı (TIC) verilmiştir. *P. roqueforti* CECT 2905 referans suşu ile olgunlaşan peynir (TP3), diğer örneklerden farkı bir uçucu bileşen profili sergilemiştir. Bu peynirin bileşen profilinde, 2-metil-1-propanol (izobutil alkol), metanamin (N-metil- boran), asetik asit (hidrazit), oksiran (bütil-1,2-epoksiheksan), 2-hekzanon, 4-hidroksi-siklohekzanon ve 6-tridekanon tespit edilmiştir. CECT 2905 suşu, CA besiyerinde de diğer izolatlardan farklı bir uçucu bileşen profili sergilemiştir. Bu suş, Rokfor peynirinden izole edilmiştir ve Crequer vd. (2024), Rokfor popülasyonu izolatların diğer peynir popülasyonlarından farklı bir metabolit profili sergilediğini belirtmiştir. Taze peynirde (TZ), diğer peynirlerden farklı olarak 1,1'bibisiklo-(2.2.2)oktil-4-karboksilik asit, 2,3-bütandion, propanoik asit etil ester, 1,2-propandiol (propilen glikol), 1-(2-furanil)-etanon, benzaldehit (fenilmetanal) ve 2,2,4-trimetil-1,3-dioksolan tespit edilmiştir. En az uçucu bileşiğin tespit edildiği peynir, 4K2 izolatu ile olgunlaştırılan TP5’tir. Bu peynirde, diğer numunelerden farklı olarak formik asit ve karbamik asit bulunmuştur. KP44 izolatu ile olgunlaştırılan TP7 peyniri, TP3’ten sonra en farklı uçucu bileşen profilini sergilemiştir. Bu peynirde tespit edilen farklı bileşikler, metoksi-eten, pentanal, propan, 2-bütenil-hidrazin, 2-undekanon, karbonik dihidrazit ve 2-izobütil-4,4-dimetil-1,3-dioksandır. 26KK5A izolatu ile olgunlaştırılan TP9 peynirinde ise, karbamik asit metil ester ve 2-heptanon öne çıkmıştır. Peynirlerde az sayıda uçucu bileşen tespit edilse de, farklı *P. roqueforti* izolatlarıyla üretilen peynirlerde farklı bileşikler belirlenmiştir.

Tablo 4.14: Peynir örneklerine göre tespit edilen uçucu bileşikler

Kimyasal grup	Bileşik Adı ve Formülü	Peynir Örnekleri								
		M _A (g/mol)	Benzerlik (%)	RT	TZ	T1	T3 (CECT 2905)	T5 (4K2)	T7 (KP44)	T9 (26KK5A)
Asitler	Formik asit (CH ₂ O ₂)	46	76	1.623				+		
	Karbamik asit (C ₃ H ₇ NO ₂)	89	79	1.663				+		
	1,1'bibisiklo-(2,2,2)oktil-4-karboksilik asit (C ₁₇ H ₂₆ O ₂)	262	95	2.042	+					
	2-Piridinpropanoik asit (C ₁₁ H ₁₃ NO)	207	89	2.203		+	+	+	+	+
	Asetik asit. Hidrazit (C ₂ H ₆ N ₂ O)	74	82	2.224			+			
	N-amino32-hidroksipropanamid at propanoik asit (C ₃ H ₈ N ₂ O ₂)	104	81	10.423		+	+	+		
Alkoller	2-Metil-1-propanol (izobutil alkol) (C ₄ H ₁₀ O)	74	72	1.536			+			
	1,2-Propandiol (Propilen glikol) (C ₃ H ₈ O ₂)	76	98	4.009	+					
	1-Propanol-1-D1 (C ₃ H ₇ DO)	60	84	3.791		+		+		+
Aldehitler	Metoksi-asetaldehit (C ₃ H ₆ O ₂)	74	70	1.663		+				
	Pentanal (C ₅ H ₁₀ O)	86	82	2.728					+	
	Benzaldehit (Fenilmetanal) (C ₇ H ₆ O)	106	93	11.375	+					
Ketonlar	2,3-Bütandion (C ₄ H ₆ O ₂)	86	97	2.377	+					
	2-Hekzanon (Hekzan-2-on) (C ₆ H ₁₂ O)	100	83	4.801			+			
	4-Hidroksi-sikloheksanon (C ₆ H ₁₀ O ₂)	114	79	7.347			+			
	2-Undekanon (C ₁₁ H ₂₂ O)	170	89	7.360					+	
	2-Heptanon (C ₇ H ₁₄ O)	114	86	7.371						+
	1-(2-furanil)-etanon (C ₆ H ₆ O ₂)	110	93	9.063	+					
	6-Tridekanon (C ₁₃ H ₂₆ O)	198	83	13.605			+			
Esterler	Propanoik asit, etil ester (C ₅ H ₁₀ O ₂)	102	90	3.480	+					

	Karbamik asit, metil ester (C ₃ H ₇ NO ₂)	75	76	1.647						+
Laktonlar	2,4-Dimetil-1,3- dioksalan (C ₅ H ₁₀ O ₂)	102	93	3.167	+					
Alkanlar	Propan (C ₅ H ₁₀ O)	86	86	3.056					+	
Diğer bileşikler	1,2-Dietildiboran- D10 (C ₄ H ₄ D ₁₀ B ₂)	84	72	1.526		+	+	+	+	+
	Metoksi-eten (C ₃ H ₆ O)	58	83	1.748					+	
	Metanamin, N- metil- boran (C ₂ H ₁₀ BN)	59	81	1.752			+			
	Oksiran, bütül-1,2- epoksiheksan (C ₆ H ₁₂ O)	100	79	3.036			+			
	2-Bütenil-hidrazin (C ₄ H ₁₀ N ₂)	86	81	3.791					+	
	Karbonik dihidrazit (CH ₆ N ₄ O)	90	82	7.379					+	
	2,2,4-Trimetil-1,3- dioksolan (C ₆ H ₁₂ O ₂)	116	90	11.987	+					
	2-İzobütül-4,4- dimetil-1,3-dioksan (C ₁₀ H ₂₀ O ₂)	172	81	13.616					+	

TZ: Taze peynir, TP1-TP9 peynirleri 6 hafta 10°C'de olgunlaştırılmıştır. TP1: Küf inoküle edilmeyen; TP3: CECT 2905 kodlu izolat inoküle edilen; TP5: 4K2 kodlu izolat inoküle edilen; TP7: KP44 kodlu izolat inoküle edilen; TP9: 26KK5A kodlu izolat inoküle edilen peynir. M_A: Bileşiğin molekül ağırlığı (g/mol), RT: Alıkonma zamanı (s)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.19: Peynir örneklerinin toplam iyon kromatogramı (TIC). TZ: Taze peynir, TP1-TP9 peynirleri 6 hafta 10°C'de olgunlaştırılmıştır. TP1: Küf inoküle edilmeyen; TP3: CECT 2905 kodlu izolat inoküle edilen; TP5: 4K2 kodlu izolat inoküle edilen; TP7: KP44 kodlu izolat inoküle edilen; TP9: 26KK5A kodlu izolat inoküle edilen peynir.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

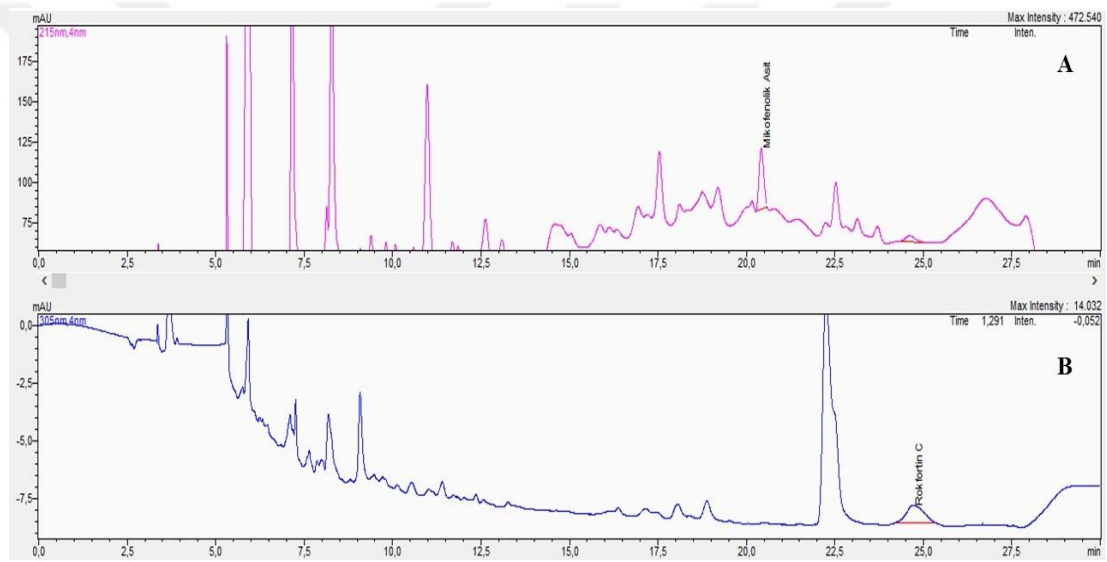
Peynirde uçucu bileşenlerin tespitinde gaz kromatografisine entegre sistemler (GC, GC-MS ve GC-MS/MS) ve yöntemler (headspace, SPME, okfaktometri vb.) kullanılmaktadır (Hayaloglu vd., 2008; Cakmakci vd., 2012b; Salvatore vd. 2015; Ozturkoglu-Budak, 2016b; Gurkan vd., 2018; Atik vd., 2021; Caron vd., 2021). Hayaloglu vd. (2008)'nin Konya'dan temin ettiği küflü peynirlerin (n = 29) uçucu bileşen profilini çoğunlukla ketonlar, alkoller, terpenler ve kükürtlü bileşikler oluştururken; aldehitler ve laktonlar az sayıdadır. Öne çıkan bileşikler, etil asetat, etil propanoat, etil bütanoat, etil hekzanoat, etil oktanoat, 2-propanon, 2-bütanon, 2-pentanon, 2-hekzanon, 2-heptanon, 2-nonanon, 2-dekanon, 2-undekanon, diasetil, 3-metil bütanal, benzaldehit, etanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-bütanol, 1-pentanol, 2-bütanol, 2-pentanol, 2-heptanol, 2-nonanol, dimetil sülfid, *p*-simen, *p*-metil anisol, benzen, toluen ve stiren olarak belirlenmiştir. Cakmakci vd. (2012b), Küflü Civil peynirlerinde (n = 41), esterler, asitler, ketonlar, aldehitler, alkoller, terpenler, kükürtlü bileşikler ve diğer bileşikler olmak üzere, toplam 95 uçucu bileşik

tespit etmişlerdir. Uçucu bileşen profilinde, metil asetat, metil bütanoat, metil dekanat, 3-metil bütanoik asit, asetik asit, hekzanoik asit, 2-pentanon, 2-heptanon, 2-nonanon, 3-metil-1-bütanal, 2-pentanol, 3-metil-1-bütanol, 2-heptanol, 2-nonanol, α -pinen, indan, β -mirsen, metanetiyoil, dimetil sülfid, benzen ve tolüen öne çıkmıştır. Salvatore vd. (2015), ürettikleri üç çeşit küflü peynirin uçucu bileşen profilinde, 2-propanon, 2-pentanon, 2-hekzanon, 2-oktanon, 8-nonen-2-on, 2-undekanon gibi ketonlar, bütirik asit, hekzanoik asit, oktanoik asit gibi asitler, etil hekzanoat, etil oktanoat gibi esterler, 2-propanol, 2-pentanol, 2-heptanol gibi alkoller, stiren gibi hidrokarbonlar ve 3-metilbütanal gibi aldehitler belirlemişlerdir. Ozturkoglu-Budak (2016b)'a göre, farklı üç mandırada üretilen Divle-Obruk peynirlerinin uçucu bileşen profilinde, asitler, alkoller, ketonlar, esterler ve terpenler tespit edilmiştir. Peynirler arasında küçük farklılıklar bulunmuştur. Olgunlaşma sürecinin başında alkoller çoğunlukta iken, olgunlaşma süresi ilerledikçe relatif olarak asitlerin ve ketonların miktarı artmıştır. Bütanoik asit, asetik asit, valerik asit, etil-bütanoat, 2-bütanol, 2-bütanon, 2-heptanon, α -pinen ve tolüen, Divle-Obruk peynirinin karakteristik aromasını oluşturan bileşiklerdir. Gurkan vd. (2018), üç farklı *P. roqueforti* kullanarak ürettikleri Küflü Civil peynirlerinde, 3-metil-bütanol, 2-nonanol, metil dodekanoat, bütanoik asit ve dekanonik asit başta olmak üzere, toplam 85 uçucu bileşik tespit etmişlerdir. Atik vd. (2021), Anamur'dan temin edilen 96 Tulum peynirinin uçucu bileşen profilinde, karboksilik asitler, alkoller, esterler, ketonlar, aldehitler, terpenler ve hidrokarbonlar tespit etmişlerdir. Tulum peynirlerinde en çok miktarda tespit edilen bileşikler, asetik asit, 2,3-bütandiyl, etil asetat ve α -pinen olmuştur. Caron vd. (2021), 4 farklı *P. roqueforti* popülasyonundan (2 peynir ve 2 peynir harici popülasyon) izolatları kullanarak Rokfor peyniri yapmışlar ve mavi peynirlerde aroma kalitesini belirleyen 40 bileşiği (11 asit, 12 keton, 10 ester, 6 alkol ve 1 aldehit) aramışlardır. Bu bileşikler arasında, 3-metil-bütanal, 3-metil-bütanol, 3-metil-bütanoik asit, asetik asit, propanoik asit, pentanoik asit, hekzanoik asit, oktanoik asit, 2-pentanon, 2-heptanon ve heptanol öne çıkmıştır. Bu bileşikler, daha çok peynir popülasyonları ile üretilen peynirlerde tespit edilmiş ve tüm peynirlerin uçucu bileşen profilleri arasında belirgin farklılıklar bulunmuştur. Türkiye popülasyonu *P. roqueforti*'ler ile üretilen peynirlerin uçucu bileşen profilinde, literatüre göre çok daha az sayıda bileşik belirlenmiştir. Ancak tespit edilen profiller, literatürdeki çalışmalarla büyük oranda örtüşmüştür. Tez çalışması kapsamında üretilen peynirler, 6 hafta (40 gün) olgunlaştırılmış olup, literatürdeki çalışmalar daha çok 90-180 gün arası olgunlaştırılan peynirleri

kapsamaktadır. Bu nedenle, peynir örneklerinde daha az sayıda uçucu bileşik belirlenmiş olabilir. Ayrıca, GC-MS analizinde daha iyi sonuçlar elde etmek için, headspace yöntemi yerine farklı bir ekstraksiyon yöntemi kullanılabilir ve metod parametreleri değiştirilebilir.

4.5.3. Peynirlerde Rokfortin C (ROKC) ve Mikofenolik Asit (MPA) Varlığı

MPA ve ROKC standartlarının hesaplanan lineerite (doğrusallık) verileri, LOD ve LOQ değerleri, 4.4.5'te verilmiştir. Örnek olarak, TP5 peynirinin HPLC-PDA kromatogramları Şekil 4.20'de verilmiştir. Buna göre, MPA (A) ve ROKC (B) metabolitleri kromatogramlar üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.20: TP5 peynir örneği ekstraktına ait HPLC-PDA kromatogramları. (A) 215 nm'deki kromatogramda MPA'nın belirlenmesi, (B) 305 nm'deki kromatogramda ROKC'nin belirlenmesi.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Peynir örneklerine ait MPA ve ROKC sonuçları, ortalama değer ve standart sapma olarak Tablo 4.15'te verilmiştir. Peynir arasında bu iki mikotoksinin miktarı tespit edilen örneklerde, az da olsa istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p < 0,05$) bulunmuştur. MPA üretimi tüm peynirlerde düşük düzeyde olup; TZ, TP1 ve TP9 peynirlerinde, ölçüm limitinin altında ($< LOQ$) tespit edilmiştir. TP3, TP5 ve TP7 peynirlerinde MPA miktarı, sırasıyla, 29,5 $\mu\text{g/kg}$, 20,7 $\mu\text{g/kg}$ ve 19,3 $\mu\text{g/kg}$ olarak belirlenmiştir. ROKC miktarı da, tüm peynirlerde oldukça düşük düzeyde kalmış olup; TZ, TP1 ve TP7 peynirlerinde tespit edilememiştir. TP3, TP5 ve TP9

peynirlerinde ise ROKC miktarları, 0,7 µg/kg, 0,8 µg/kg ve 0,5 µg/kg olarak belirlenmiştir. CECT 2905 suşunun MPA ve ROKC üretimi besiyerinde, sırasıyla, 664,5 µg/kg ve 963,5 µg/kg; bu suş ile üretilen peynirde (TP3), 29,5 µg/kg ve 0,7 µg/kg olarak tespit edilmiştir. 4K2 izolatının MPA ve ROKC üretimi besiyerinde, sırasıyla, 28,5 µg/kg ve 153,1 µg/kg; bu izolat ile üretilen peynirde (TP5), 20,7 µg/kg ve 0,8 µg/kg olarak belirlenmiştir. KP44 izolatının MPA ve ROKC üretimi besiyerinde, sırasıyla, 745,4 µg/kg ve 48,6 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Bu izolat ile üretilen peynirde (TP7) MPA miktarı, 19,3 µg/kg olarak belirlenmiş; ROKC miktarı ise tespit edilememiştir. 26KK5A izolatının MPA ve ROKC üretimi besiyerinde, sırasıyla, 35,5 µg/kg ve 1059,9 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Bu suş ile üretilen peynirde (TP9) MPA miktarı, ölçüm limitinin altında (<LOQ) kalmış ve ROKC miktarı, 0,5 µg/kg olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.15: Peynir örneklerinde mikofenolik asit ve rokfortin C miktarı

Örnekler	MPA (µg/kg)	ROKC (µg/kg)
TZ	<LOQ	TE
TP1 (Kontrol)	<LOQ	TE
TP3 (CECT2905)	29,5±1,4 ^a	0,7±0 ^a
TP5 (4K2)	20,7±0,3 ^b	0,8±0,3 ^a
TP7 (KP44)	19,3±0,2 ^b	TE
TP9 (26KK5A)	<LOQ	0,5±0 ^b

MPA: Mikofenolik asit; ROKC: Rokfortin C; TZ: Taze peynir, TP1-TP9 peynirleri 6 hafta 10°C'de olgunlaştırılmıştır. TP1: Küf inoküle edilmeyen; TP3: CECT 2905 kodlu izolat inoküle edilen; TP5: 4K2 kodlu izolat inoküle edilen; TP7: KP44 kodlu izolat inoküle edilen; TP9: 26KK5A kodlu izolat inoküle edilen peynir; TE: Tespit edilemedi.

MPA için LOD: 0,58 µg/kg, LOQ: 1,95 µg/kg; ROKC için LOD: 0,11 µg/kg, LOQ: 0,36 µg/kg a-b: Aynı sütundaki farklı küçük harfler, sonuçlar arasında önemli bir fark olduğunu (p<0,05) göstermektedir,

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Küflü peynirlerde MPA ve ROKC miktarının araştırıldığı, pek çok çalışma bulunmaktadır. Bunların çoğu Avrupa tipi mavi peynirler üzerine yapılmışken; son yıllarda Türk peynirleri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Finoli vd., 2001; Pose vd., 2007; Hymery vd., 2014; Fontaine vd., 2015; Reinholds vd., 2020; Ertas-Onmaz vd., 2021; Maragos, 2022; Ozturkoglu-Budak vd., 2023; Çakır ve Çakmakçı, 2024). Finoli vd. (2001), Gorgonzola, Danablu, Rokfor, Edilpilkase ve Stilton peynirlerinde ROKC miktarını, 0,05-1,47 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Pose vd. (2007), Arjantin ve Avrupa ülkelerinden temin ettikleri 21 mavi peynirden 12'sinde ROKC tespit edememişler, kalan 9'unda ise ROKC'yi 0,2-3,6 µg/g aralığında

bulmuşlardır. Fontaine vd. (2015), Avrupa'nın farklı bölgelerinden temin ettikleri 86 mavi peynirden 84'ünde ROKC miktarını 11-14125 µg/kg bulmuşlardır. İki peynirde ROKC miktarı, ölçüm limitinin altında kalmıştır. MPA miktarı, 86 peynirden 42'sinde tespit limitinin altında kalmış, 44'ünde ise 15-6190 µg/kg aralığında tespit edilmiştir. Reinholds vd. (2020), 9 Avrupa ülkesinden temin ettikleri 46 mavi peynirde ROKC miktarını 3,2-5454 µg/kg aralığında belirlemişlerdir. Bu peynirlerden 16'sında MPA tespit edememişler, 30'unda ise MPA miktarını 5,8-599 µg/kg aralığında bulmuşlardır. Ertas-Onmaz vd. (2021), Türkiye'nin 12 ilinden temin ettikleri 120 küflü peynir örneğinde MPA ve ROKC miktarı, tespit limitinin altında kalmıştır. Maragos (2022), Gorgonzola, Cambozola, Rokfor, Danablu ve Stilton peynirleri olmak üzere, toplam 46 peynir örneğinde ROKC miktarını, 936-2446 µg/kg olarak belirlemiştir. Ozturkoglu-Budak vd. (2023), ürettikleri 4 çeşit Divle-Obruk peynirinden 2'sinde ROKC ve 3'ünde MPA tespit edememişler, iki peynirde ROKC miktarını, 9,15 µg/kg ve 14,12 µg/kg olarak bulmuşlardır. Bir peynirde MPA miktarını, 10,79 µg/kg olarak belirlemişlerdir. Çakır ve Çakmakçı (2024), ürettikleri Küflü Erzincan Tulum peynirlerinde ROKC ve MPA miktarlarını, 0,01-0,06 mg/kg aralığında bulmuşlardır. Küflü peynirlerde MPA ve ROKC miktarlarına bakıldığında, oldukça düşük düzeyler tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında yapılan peynirlerde de aynı durum söz konusudur. Peynir üretiminde kullanılan *P. roqueforti* izolatları (CECT 2905, 4K2, KP44 ve 4K2), besiyerinde MPA'yı ve ROKC'yi daha yüksek oranlarda üretirken, peynir ortamında bu toksinlerin üretimi oldukça düşük düzeyde kalmıştır. Mikotoksin üretimini, biyotik faktörlerin yanı sıra, ortam şartları (sıcaklık, bağıl nem, süre), substrat yapısı, kimyasal kompozisyon (C/N oranı, NaCl içeriği vb.), pH, su aktivitesi, redoks potansiyeli, diğer mikroorganizmalarla interaksiyonlar vb. abiyotik faktörlerin etkilediği vurgulanmıştır (Hymery vd., 2014; Fontaine vd., 2015).

ROKC seviyeleri, mavi peynirlerde değişkenlik gösterebilmektedir. Fontaine vd. (2015b)'nin Fransız mavi peynirlerinde (n=83) yaptığı bir çalışmada, ROKC konsantrasyonu 858±1670 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Hymery vd. (2018)'nin çalışmasında, Fontaine vd. (2015b)'nin peynirlerde tespit ettiği ROKC miktarı ve peynirlerin tüketimi baz alınmış ve ROKC'ye 21 günlük maruziyet durumunda, ROKC'nin Caco-2 hücreleri üzerinde önemli toksik etkiler oluşturmadığı ve toksisitesinin oldukça düşük olduğu bildirilmiştir. Fontaine vd. (2015b)'nin Fransız mavi peynirlerinde (n=83) yaptığı çalışmada, MPA konsantrasyonu 841±1271 µg/kg

olarak tespit edilmiş ve peynirler arasında bu oran değişmiştir. Hymery vd. (2018)'nin çalışmasında, Fontaine vd. (2015b)'nin peynirlerde tespit ettiği MPA miktarları değerlendirilmiş ve MPA'ya 21 günlük maruziyet durumunda, 780 µM MPA'nın Caco-2 hücreleri üzerinde bağırsak bariyeri fonksiyonunda azalmaya neden olduğu, ancak bu azalmanın bakteriyel geçişe neden olmadığı ifade edilmiştir. Bu çalışma, mavi damarlı peynirlerde bulunan ortalama ROKC ve MPA konsantrasyonlarına maruz kalmanın, test edilen koşullar altında önemli toksik etkilere neden olmadığını vurgulamıştır. Türkiye peynir popülasyonu *P. roqueforti* izolatlarının YES agarda ürettiği MPA miktarı, 3,5-745,4 µg/kg aralığında bulunmuştur. Bu izolatlarla üretilen peynirlerde MPA miktarı ise, <29,5 µg/kg düzeyinde tespit edilmiştir. Bu değerler, Hymery vd. (2018)'nin çalışmasında tespit edilen Caco-2 hücreleri üzerinde etkisi olan MPA konsantrasyonundan (780 µM) oldukça düşüktür. Fontaine vd. (2016), MPA ve ROKC bileşiklerinin, Avrupa Birliği tarafından gıdalarda düzenlemeye tabi tutularak limitleri belirlenen aflatoksin, okratoksin A ve patulin gibi mikotoksinlere kıyasla, düşük sitotoksositeye sahip olduğunu belirtmiştir. Bu doğrultuda, MPA ve ROKC'nin gıda güvenliği açısından görece daha az risk taşıdığı ifade edilmiştir.

Peynir üretiminde sekonder starter kültür olarak kullanılacak *P. roqueforti* izolatının seçiminde, yalnızca izolatların besiyerinde gösterdiği teknolojik özellikler, uçucu bileşen profilleri ve mikotoksin üretimleri değil, aynı zamanda bu izolatlarla üretilen peynirlerin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri, peynirlerin tespit edilen uçucu bileşen profilleri ve mikotoksin seviyeleri de dikkate alınmalıdır. Bu çalışmada değerlendirilen üç izolat arasında KP44, hem 12 °C'de besiyerinde hem de peynirin olgunlaşma sürecinde homojen ve iyi bir gelişim sergilemiştir. Ayrıca, KP44 ile üretilen peynir, en yüksek toplam maya-küf (TMK) sayısına sahiptir. KP44, CECT 2905 neotip suşuna yakın bir gelişme profili sergilemiştir. Tuza dayanıklılık açısından incelendiğinde, KP44, %6'ya kadar tuz konsantrasyonlarında 4K2 ve 26KK5A izolatlarına kıyasla daha iyi gelişim göstermiştir. Bununla birlikte, KP44'ün besiyerinde diğer izolatlara göre daha yüksek düzeyde MPA ürettiği belirlenmiş olsa da, peynirde MPA üretimi oldukça düşük düzeyde kalmış ve ROKC üretimi tespit edilmemiştir. Bu durum, MPA ve ROKC metabolitlerinden kaynaklanabilecek potansiyel riski önemli ölçüde azaltmaktadır. Diğer yandan, 26KK5A izolatı, KP44 ve 4K2'ye kıyasla besiyerinde daha yüksek proteolitik aktivite göstermiş ve bu izolattan üretilen peynirde ise, daha yüksek pH ve düşük protein içeriği tespit edilmiştir. Bu

durum, peynirin hızla olgunlaşmasına, daha yumuşak bir dokuya sahip olmasına ve daha çabuk bozulmasına neden olabilir. Ayrıca bu izolat, peynirde 4K2'ye göre iyi gelişmiş, ancak besiyerinde diğer izolatlara göre oldukça sınırlı büyüme göstermiştir. KP44 izolatı, diğer izolatlara göre besiyerinde orta düzey proteolitik ve lipolitik aktivite göstermiştir. 4K2 izolatı, KP44 ve 26KK5A izolatlarına göre daha yüksek lipolitik aktiviteye sahip olmasına rağmen, peynirde istenilen düzeyde gelişme gösterememiştir. KP44 ile üretilen peynir ise, KP44 ve 26KK5A izolatları ile üretilen peynirlere göre daha yüksek protein ve yağ içeriğine sahiptir. Tüm bu veriler ışığında, KP44 izolatı, güçlü gelişim kabiliyeti, dengeli proteolitik ve lipolitik aktivitesi, peynirde düşük mikotoksin (MPA ve ROKC) üretim riski ile öne çıkmıştır.



BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu bölümde, araştırmada Türkiye küflü peynirlerine has bazı küflerin morfolojik, genetik, teknolojik ve metabolit üretme özelliklerine; bu izolatların peynir üretiminde kullanımlarına yönelik elde edilen sonuçlara ve önerilere yer verilmiştir.

- Çalışma kapsamında Konya küflü peyniri (n =5), Erzurum Küflü Civil peyniri (n = 19), Kars Küflü Civil peyniri (n = 3), Divle-Obruk peyniri (n = 1), Karaman Küflü Tulum peyniri (n = 1) ve Sivas Zara Küflü Tulum peyniri (n = 1) olmak üzere yerel pazarlardan ve köylerden 30 adet küflü peynirden 82 küf ve 4 maya izole edilmiştir.
- İzolatlar, ilk olarak rep-PCR sonucu gruplandırılmıştır. Buna göre, tür bazında izolatların bant paternlerinde farklılıklar tespit edilmiş, ancak tür içi değişiklik gözlenmemiştir.
- Ön morfolojik inceleme ile ve rep-PCR gruplandırmasından seçilen izolatlar, ITS bölgesi ve *benA* geni amplifikasyonu ile sekanslanmıştır. Elde edilen küf izolatları (n =86), *P. roqueforti* (%76,6), *P. biforme* (%3,5), *P. crustosum* (%3,5), *P. paneum* (%2,3), *P. nordicum* (%2,3), *Geotrichum silvicola* (%2,3), *Kluyveromyces lactis* (%2,3), *P. brevicompactum* (%1,2), *P. roseomaculatum* (%1,2), *Alternaria* sp. (%1,2), *Albifimbria verrucaria* (%1,2), *Cladosporium sphaerospermum* (%1,2) ve *Talaromyces* sp. (%1,2) olarak tanımlanmıştır.
- Daha önce Konya Küflü (KP kodlu) (Seri ve Metin, 2021) ve Rize-Ardeşen Golot (Metin, 2020) peynirlerinden izole edilmiş ve tanımlanmış 67 küf ve 11 maya izolatu da çalışma kapsamında kullanılmıştır.
- *Penicillium* cinsi küflerin (n = 149), yatay gen transfer bölgelerine (*CheesyTer* ve *Wallaby*) sahip olup olmadıkları, PCR ile incelenmiştir. Taranan 120 *P. roqueforti* izolatu'nun hepsinde *Wallaby* ve *CheesyTer* bölgeleri tespit edilmiştir. Diğer *Penicillium* türlerinden 11 *P. biforme* izolatu'nda her iki bölge, iki tanesinde ise sadece *CheesyTer* bölgesi belirlenmiştir. *P. solitum*, *P. paneum* ve *P.*

roseomaculatum türlerine ait 1'er izolatta, sadece *CheesyTer* bölgesi belirlenmiştir. İki *P. crustosum* izolatında her iki bölge tespit edilmiştir. *P. brevicompactum* ve *P. nordicum* izolatlarında, bu bölgeler tespit edilmemiştir.

- *P. roqueforti* izolatları (n = 120) içerisinde, 6 tanesinin *MAT1-1* eşey tipine, 114 izolatın *MAT1-2* eşey tipine sahip olduğu saptanmıştır. Bazı peynir örneklerinde (Erz. Küf. Civil-13, Sivas-Zara Küflü Peyniri-19 ve Konya Küf. Tulum-29), zıt eşey tiplerine sahip *P. roqueforti* izolatlarının bir arada bulunduğu tespit edilmiştir.
- *P. roqueforti* izolatlarının morfolojik özellikleri, PDA, MEA, YES ve OA besiyerlerinde incelenmiştir. İzolatların, en ayırt edici besiyeri olan PDA'da koloni rengi ve şekilleri gözetilerek 7 morfotip oluşturduğu saptanmıştır.
- *P. roqueforti* izolatları, M13F primeri kullanılarak yapılan RAPD-PCR ile parmak izi analizine göre iki gruba ayrılmıştır.
- *P. roqueforti* izolatlarının genetik çeşitliliğini belirlemek üzere, ilk olarak, izolatlarda üç mikrosatelit bölgesi (*Proq16*, *Proq01_3*, *Proq02_2*) taranmış ve bu bölgelere göre, izolatların 36 haplotip oluşturduğu belirlenmiştir. Structure programı ile izolatların iki alt popülasyon oluşturduğu fakat, peynir türlerine göre bir ayırım olmadığı saptanmıştır.
- Farklı haplotiplerin aynı peynirde tespit edilmesi, spontan küflenmeye ve farklı genetik özelliklere sahip *P. roqueforti* izolatlarının ortamda geliştiğine işaret etmektedir.
- Farklı haplotiplerden seçilen 20 izolat ile yapılan filogenetik analizlerde, beş polimorfik lokus (*benA cmd*, *Proq235*, *Proq631*, *Proq845*) kullanılmıştır. Bu lokuslardan *Proq235*, *Proq631* ve *Proq845* ile birleştirilmiş ağaç oluşturulmuş ve buna göre 20 izolat, 3 gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan 2'si, Rokfor harici mavi peynir ve Termignon peynir popülasyonlarındaki izolatlarla aynı grupta yer almıştır. İki izolat (9CA5B ve KP44), diğer gruplardan farklı olarak ayrı bir grupta toplanmıştır. Bu 20 izolatta, *mpaC* delesyonu (genin kısmen silinmesi) tespit edilmemiştir. Rokfor harici mavi peynirlerde genel olarak *mpaC* delesyonu bulunurken, Termignon ve Rokfor peyniri izolatlarında *mpaC* delesyonu bulunmamaktadır.
- Genetik analizler sonucu seçilen 20 *P. roqueforti* izolatının ve 1 neotip suşun, gelişme hızı, tuza dayanıklılık, lipolitik aktivite ve proteolitik aktivite gibi teknolojik özellikleri ile uçucu bileşen profili ve mikotoksin üretimi (MPA ve

ROKC) gibi metabolik özellikleri incelenmiştir. Sonuçlar, istatistiksel analizlerle değerlendirilmiş ve izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ($p < 0,05$) bulunmuştur. Yapılan PCA analizine göre izolatlar, teknolojik özellikler bakımından dört grupta toplanmıştır.

- *P. roqueforti* izolatlarının peynir agarda uçucu bileşen profili, birbirine oldukça yakın bulunmuş ve net bir ayırım yapılamamıştır. Uçucu bileşenler arasında, asitler, kükürtlü bileşikler, alkoller, aldehitler, alkanlar, esterler ve eter gibi diğer bileşikler yer almıştır. Üç izolatta (KP31, KP47 ve 4K2), diğerlerinden daha fazla uçucu bileşik tespit edilmiştir. Diğer izolatlardan farklı olarak, bazı izolatlar asetik asit 4-metil pentanoik asit ve 1,1-etoksi hekzan üretmiştir.
- İzolatların mikotoksin analizlerinde, MPA ve ROKC miktarları, sırasıyla, 3,5-745,4 µg/kg ve 43,8-1059,9 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Bir izolatta ise (3KÇ5L), ROKC tespit edilememiştir.
- *P. roqueforti* izolatlarından farklı genetik, teknolojik ve metabolik özelliklerine göre seçilen 4K2, KP44 ve 26KK5A izolatları ve CECT 2905 neotip suşu, model peynir üretiminde (Tulum peyniri) kullanılmıştır. Peynir üretimi için izolatlar, hem farklı haplotiplerden, hem de *Proq* bölgelerinin birleştirilmiş filogenetik ağacına göre farklı gruplardan seçilmiştir. 4K2 izolatı, HT21 haplotipine sahip olup, Rokfor harici mavi peynir ve Termignon peynir popülasyonlarındaki izolatlarla aynı grupta yer almıştır. KP44 izolatı, HT15 haplotipine sahip olup; peynir ve peynir dışı ortamdaki gelen izolat gruplarından farklı olarak, ayrı bir grupta yer almıştır. 26KK5A izolatı, HT32 haplotipine sahiptir ve bir Termignon peynir izolatı ile aynı gruptadır. Bu izolatlar, farklı genetik özelliklerinin yanı sıra, besiyerinde yüksek ve hızlı/düşük ve yavaş gelişme kabiliyetlerine, farklı konsantrasyonlarda tuza dayanıklılıklarına, orta ve düşük düzeylerde proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olmalarına ve MPA/ROKC üretim düzeylerine göre seçilmiştir. KP44 izolatı, besiyerinde iyi gelişim ile öne çıkarken; 26KK5A izolatı, besiyerinde sınırlı bir gelişim göstermiştir. 26KK5A izolatının, 4K2 ve KP44 izolatlarına göre besiyerinde daha yüksek proteolitik aktiviteye; 4K2 izolatının ise, KP44 ve 26KK5A izolatlarına göre daha yüksek lipolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. KP44 ise, besiyerinde düşük proteolitik ve lipolitik aktivite sergilemiştir. Teknolojik özelliklere göre yapılan PCA analizinde, KP44 izolatı 1. grupta, 4K2 izolatı 2. grupta ve 26KK5A izolatı 3. grupta yer almıştır. İzolatların uçucu bileşen profilinde, KP44 izolatı, diğer üç izolattan farklı olarak asetik asit

ve hidrazinkarbotiyoamid; 4K2 izolatu ise 1,1-dietoksiheksan, 2-hidroksimetil-3-metil-oksiran ve karbonik dihidrazit üretmiştir. Lipolitik aktivitesi diğer iki izolattan daha yüksek olan 4K2 izolatu, az da olsa uçucu bileşik çeşitliliği sergilemiştir. İzolatlar arasında KP44, besiyerinde en yüksek oranda MPA'yı (745,4 µg/kg); 26KK5A izolatu ise, en yüksek oranda ROKC'yi (1059,9 µg/kg) üretmiştir. 4K2 izolatının MPA ve ROKC üretimi besiyerinde, sırasıyla, 28,5 µg/kg ve 153,1 µg/kg olup; bu iki metaboliti de düşük miktarda üreten izolatlardandır. Besiyerinde KP44 izolatının ROKC üretimi, 48,6 µg/kg ve 26KK5A izolatının MPA üretimi, 35,5 µg/kg olarak düşük miktarlarda kalmıştır.

- İzolatlardan KP44 ve 26KK5A, CECT 2905 neotip suşuna benzer şekilde peynirde iyi gelişim göstererek belirgin yeşil damarlı bir görünüm oluşturmuştur. Ancak, 4K2 izolatu, bu iki izolatla karşılaştırıldığında peynirde iyi gelişim gösterememiştir.
- Küf ile olgunlaştırılan peynirlerin pH değerleri artmış ve en yüksek proteolitik aktiviteye sahip 26KK5A izolatıyla üretilen peynirde (TP9) en yüksek seviyeye (7,36) ulaşmıştır. Küf ile olgunlaştırılan peynirlerde, TTA değeri düşmüştür. Protein değerleri, taze peynirde %18,76 iken, olgunlaştırma sürecinde %12,94-14,82 aralığında bulunmuştur. Yağ oranları ise, taze peynirde %29,40 iken, olgunlaşma süreci sonunda peynirlerde %21,75-30,50 aralığında tespit edilmiştir. En düşük yağ oranı (%21,75), lipolitik aktivitesi yüksek olan 4K2 izolatu ile üretilen T5 peynirinde belirlenmiştir. Peynirlerde kuru madde (KM) oranı, 4K2, KP44 ve 26KK5A peynirlerinde protein ve yağ oranlarındaki azalmaya bağlı olarak, %47,23-50,20 seviyesine düşmüştür. Peynirlerin TMAB sayıları, birbirine yakın, ancak TMK sayıları, peynirlere küf inokülasyonu ile artmıştır. En yüksek TMK sayısı (8,13 log kob/g), besiyerinde en iyi ve hızlı gelişen KP44 izolatu ile üretilen TP7 peynirinde belirlenmiştir. Küf ile olgunlaşmış peynirlerde TLB sayıları azalırken; TLC sayıları, süte starter kültür ilavesi ile birlikte tüm peynirlerde birbirine yakındır. Ancak, tuz ve kül değerlerinde anlamlı farklılık bulunmamıştır (p>0,05).
- Peynirlerin uçucu bileşen profili; asitler, alkoller, aldehitler, ketonlar, esterler, laktonlar, alkanlar ve diğer bileşiklerden oluşmuştur. Literatüre kıyasla, peynirlerde az sayıda uçucu bileşik tespit edilebilmiştir. KP44 izolatu ile olgunlaştırılan peynir, CECT 2905 ile üretilen peynirden sonra en farklı uçucu bileşen profilini sergilemiştir. Bu peynirde tespit edilen farklı bileşikler, metoksi-

eten, pentanal, propan, 2-bütenil-hidrazin, 2-undekanon, karbonik dihidrazit ve 2-izobütül-4,4-dimetil-1,3-dioksandır. 26KK5A izolatu ile olgunlaştırılan peynirde ise, karbamik asit metil esteri ve 2-heptanon belirlenmiştir. En az uçucu bileşimin tespit edildiği peynir, 4K2 izolatu ile olgunlaştırılan peynirdir ve bu peynirde, diğer numunelerden farklı olarak formik asit ve karbamik asit saptanmıştır.

- Peynirlerde MPA ve ROKC miktarları, oldukça düşük seviyelerde bulunmuştur. MPA miktarı, üç numunede (taze peynir, küf inoküle edilmeden olgunlaştırılmış peynir ve 26KK5A ile üretilen peynir) ölçüm limitinin altında (<LOQ) kalmıştır. Diğer numunelerde (CECT 2905, 4K2 ve KP44 ile üretilen peynirler) MPA miktarı, sırasıyla, 29,5 µg/kg, 20,7 µg/kg ve 19,3 µg/kg olarak saptanmıştır. ROKC miktarı da, tüm peynirlerde oldukça düşük düzeyde kalmış ve üç numunede (taze peynir, küf inoküle edilmeden olgunlaştırılmış peynir ve KP44 ile üretilen peynir) tespit edilememiştir. CECT 2905, 4K2 ve 26KK5A izolatları ile üretilen peynirlerde ise ROKC miktarları, sırasıyla, 0,7 µg/kg, 0,8 µg/kg ve 0,5 µg/kg olarak belirlenmiştir. Peynir üretiminde kullanılan CECT 2905 neotip suşu ile 4K2, KP44 ve 26KK5A izolatlarının MPA ve ROKC üretim miktarlarının peynirlerde, besiyerine göre daha düşük düzeyde kaldığı görülmüştür.

Bu çalışma bilindiği kadarıyla, geleneksel Türkiye küflü peynirlerinden izole edilen *P. roqueforti* izolatlarının genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısının incelendiği ve genetik, teknolojik ve metabolik özelliklerinin birlikte değerlendirildiği ilk çalışmadır. Türkiye’de küflü peynirler, genellikle spontan fermentasyon ile üretilmekte ve daha çok mahalli olarak tanınmaktadır. Bu durum, küflü peynirlerin üretiminde bir standardizasyonun bulunmadığını göstermektedir. Çalışmada kullanılan geleneksel peynirlerde, *P. roqueforti* türü baskın olup biyokoruyucu rol üstlenmiştir. Ancak, bu peynirlerden potansiyel mikotoksijenik küf türleri de (*P. brevicompactum*, *P. nordicum*, *Alternaria* spp. vb.) izole edilmiştir. Bu durum, küflü peynirlerin başta mikotoksinler olmak üzere, halk sağlığı açısından ciddi risk taşıyabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle küflü peynirlerin hijyen ve sanitasyon kurullarına uygun olarak, kontrollü koşullarda (starter kültür kullanımı, sıcaklık, bağıl nem, ortam havası gibi faktörlerin kontrolüyle) üretilmesi gerekmektedir.

Sonuçlara göre, peynirin üretildiği çevresel koşulların yanı sıra, peynirin substrat yapısının ve kimyasal kompozisyonunun, *P. roqueforti* izolatlarının gelişim ve metabolik özelliklerini etkilediği tespit edilmiştir. KP44 izolatu, hem besiyerinde hem

de peynirde hızlı ve iyi gelişim ile öne çıkmıştır. 26KK5A izolatının peynirde, besiyerinden daha iyi geliştiği tespit edilmiştir. Bu iki izolat, peynirde 4K2'den daha iyi gelişim göstermiştir. KP44 izolatı, 4K2 ve 26KK5A izolatlarına göre besiyerinde daha düşük proteolitik ve lipolitik aktivite sergilemiştir. Peynirler arasında en yüksek pH, proteolitik aktivitesi yüksek olan 26KK5A izolatı ile üretilen peynirde; en düşük yağ değerinin ise lipolitik aktivitesi yüksek olan 4K2 izolatı ile üretilen peynirde tespit edilmiştir. Bu izolatların MPA ve ROKC üretimleri, peynirde besiyerine göre daha düşük seviyelerde kalmıştır. Peynir üretiminde kullanılan 4K2, KP44 ve 26KK5A izolatları arasında, KP44 izolatı; besiyerinde ve peynirde yüksek gelişim kabiliyeti, dengeli proteolitik ve lipolitik aktivitesi, peynirde düşük mikotoksin (MPA ve ROKC) üretimi nedeniyle, peynirin olgunlaştırılmasında kullanılmak üzere önerilmektedir.

P. roqueforti suşlarının seçimi, üretilecek küflü peynir çeşidine (Tulum, Civil, kalıp ya da Rokfor tipi; yağlı, yağsız peynir vb.) ve peynirde arzu edilen özelliklere göre (örneğin, tekstürel ve duyuşal kriterler) karar verilebilir. Gelecek çalışmalarda, peynir üretiminde sekonder starter olarak seçilecek izolatların peynirin lipolizine ve proteolizine katkısı, tekstürel, reolojik ve duyuşal özelliklerine etkileri detaylı bir şekilde, peynirin olgunlaşma süresi boyunca (180 güne kadar) incelenmelidir. Proteoliz ürünlerinin peptid profili analiz edilerek, biyoaktif peptitlerin (antihipertansif, antimikrobiyal veya antioksidan özellik gösteren peptitler vb.) varlığı değerlendirilebilir. Olgunlaşma süresi boyunca, lipoliz sonucu oluşan uçucu bileşik profilindeki değişiklikler izlenebilir ve bu bileşiklerin peynirin nihai aroma profiline etkileri incelenebilir. Metabolomik analizler ile, peynirde üretilen tüm ikincil metabolitlerin profili çıkarılarak, peynirin fonksiyonel gıda potansiyeli değerlendirilebilir. Peynirin sertlik, elastikiyet, yapışkanlık ve kırılabilirlik gibi fiziksel parametreleri reolojik testlerle belirlenmeli ve tüketici beğenisine uygunluğu incelenmelidir. Duyusal analizler ile tat, aroma, renk ve yapı bakımından, peynirlerde tercih edilen profiller oluşturulmalıdır. Teknolojik özellikler ile PCA analizinde belirlenen ve çalışma kapsamında kullanılmayan 4. grupta yer alan izolatlar da, peynir üretiminde değerlendirilmelidir. Ayrıca, MPA ve ROKC dışındaki mikotoksinler başta olmak üzere, bu izolatların peynirde üretebileceği diğer metabolitlerin (andrastin A gibi) araştırılması gerekmektedir. İzolatların mikotoksin gen kümeleri analiz edilerek, diğer mikotoksinleri genetik açıdan üretebilme potansiyelleri değerlendirilebilir. Yerli izolatların endüstriyel üretime uygunluğunun belirlenmesi için geniş ölçekli deneme

üretimleri yapılmalı ve stabilite testleri gerçekleştirilmelidir. Böylece, peynir üretiminde kullanılacak, farklı özelliklere sahip yerli sekonder starter kültürler geliştirilebilir.



KAYNAKÇA

- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. *Foods*, 9(4):518.
- Akoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H., & Sarı, K. (2017). Mengen Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(2), 453-459.
- Ali, H., Ries, M. I., Nijland, J. G., Lankhorst, P. P., Hankemeier, T., Bovenberg, R. A., Vreeken, R. J., & Driessen, A. J. (2013). A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PloS one*, 8(6), e65328.
- Allison, A. C., & Eugui, E. M. (2005). Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*, 80(2 Suppl), S181–S190.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3), 403–410.
- Alwazeer, D., Tan, K., & Örs, B. (2020). Reducing atmosphere packaging as a novel alternative technique for extending shelf life of fresh cheese. *Journal of food science and technology*, 57(8), 3013–3023.
- Aninat, C., Hayashi, Y., André, F., & Delaforge, M. (2001). Molecular requirements for inhibition of cytochrome p450 activities by roquefortine. *Chemical research in toxicology*, 14(9), 1259–1265.
- Andersson J. O. (2009). Gene transfer and diversification of microbial eukaryotes. *Annual review of microbiology*, 63, 177–193.
- Anonim, (2015). Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ no: 2015/6). <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=20523&MevzuatTur=9&MevzuatTertip=5> [25.11.2024]
- Anonim, (2024a). Geographical indications and quality schemes explained. https://agriculture.ec.europa.eu/farming/geographical-indications-and-quality-schemes/geographical-indications-and-quality-schemes-explained_en Erişim Tarihi: [25.11.2024]

- Anonim, (2024b). Satışa sunulan *P. roqueforti* kültürlerinin özellikleri (Laboratoire Interprofessionnel de Production, LIP). <https://www.lip-sas.fr/index.php/nos-produits/penicillium-roquefortii/18-penicillium-roquefortii>) Erişim Tarihi: [15.01.2024]
- Ardö, Y., and Polychroniadou, A. (1999). Laboratory Manual for Chemical Analysis of Cheese. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Ardö, Y. (2011). Blue mold cheese. Editörler: Fuquay, J.W., Fox, P.F. ve McSweeney, P.L.H., Encyclopedia of dairy sciences. 2nd Edn. Vol. 1., San Diego, CA: Academic Press.
- Arnold, D. L., Scott, P. M., McGuire, P. F., Harwig, J., & Nera, E. A. (1978). Acute toxicity studies on roquefortine and PR toxin, metabolites of *Penicillium roqueforti*, in the mouse. *Food and cosmetic toxicology*, 16(4), 369–371.
- Arslan, M. E., & Kadı, A. (2020). Farklı Mandıralarda Üretilen Küflü (Göğermiş) Civil Peynirin Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 49(1), 15–25.
- Arslaner, A., & Salık, M. A. (2020). Bayburt Civil peynirinin bazı kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri ile mineral ve ağır metal içerikleri. *Gıda*, 45(3), 433-447.
- Atanasova-Penichon, V., Legoahec, L., Bernillon, S., Deborde, C., Maucourt, M., Verdal-Bonnin, M. N., Pinson-Gadais, L., Ponts, N., Moing, A., & Richard-Forget, F. (2018). Mycotoxin Biosynthesis and Central Metabolism Are Two Interlinked Pathways in *Fusarium graminearum*, as Demonstrated by the Extensive Metabolic Changes Induced by Caffeic Acid Exposure. *Applied and environmental microbiology*, 84(8), e01705-17.
- Atik, D.S., Akın, N., Akal, H.C., Koçak, C. (2021). The determination of volatile profile during the ripening period of traditional Tulum cheese from Turkey, produced in Anamur in the Central Taurus region and ripened in goatskin, *International Dairy Journal*, 117, 104991.
- Avalos, J., & Limón, M. C. (2022). Fungal Secondary Metabolism. *Encyclopedia*, 2(1), 1-13.

- Avşar, Y.K., Karagül-Yüceer, Y., & Hayaloğlu, A.A. (2011). Peynirde Aroma. Hayaloğlu, A.A. & Özer, B. (Ed.), *Peynir Biliminin Temelleri*, 263-301.
- Bagshaw A. T. M. (2017). Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. *Genome biology and evolution*, 9(9), 2428–2443.
- Bennetot, B., Vernadet, J.-P., Perkins, V., Hautefeuille, S., de la Vega, R., Ricardo C., O'Donnell, S., Snirc, A., Grondin, C., Lessard, M.-H., Peron, A.-C., Labrie, S., Landaud, S., Giraud, T., Ropars, J. (2023). Domestication of different varieties in the cheese-making fungus *Geotrichum candidum*. *Peer Community Journal*, 3, e45.
- Birky, JR. C. (1999). An even broader perspective on sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology*. 12(6), 1013–1016.
- Boran, O. S., Sulejmani, E., & Hayaloglu, A. A. (2023). Acceleration of proteolysis, flavour development and enhanced bioactivity in a model cheese using Kuflu cheese slurry: An optimisation study. *Food chemistry*, 41: 2135495.
- Böhm, J., Hoff, B., O'Gorman, C. M., Wolfers, S., Klix, V., Binger, D., Zadra, I., Kürnsteiner, H., Pöggeler, S., Dyer, P. S., & Kück, U. (2013). Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1476–1481.
- Bodinaku, I., Shaffer, J., Connors, A. B., Steenwyk, J. L., Biango-Daniels, M. N., Kastman, E. K., Rokas, A., Robbat, A., & Wolfe, B. E. (2019). Rapid Phenotypic and Metabolomic Domestication of Wild *Penicillium* Molds on Cheese. *mBio*, 10(5), e02445-19.
- Bolon, M., Jeanpierre, L., El Barkil, M., Chelbi, K., Sauviat, M., & Boulieu, R. (2004). HPLC determination of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma with hybrid material. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 36(3), 649–651.
- Brakhage A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews. Microbiology*, 11(1), 21–32.

- Brown, D.W., Butchko, R.A.E., & Proctor, R.H., (2011). Identification of genes and gene clusters involved in mycotoxin synthesis. Editörler: De Saeger, S., Woodhead Publishing, 2nd edition, Cambridge, UK, s. 333-348.
- Bruggeman, J., Debets, A. J., Wijngaarden, P. J., deVisser, J. A., & Hoekstra, R. F. (2003). Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 164(2), 479–485.
- Cakir, Y., Cakmakci, S. & Hayaloglu, A.A. (2016). The effect of addition of black cummin (*Nigella sativa* L.) and ripening period on proteolysis, sensory properties and volatile profiles of Erzincan Tulum (Şavak) cheese made from raw Akkaraman sheep's milk. *Small Ruminant Research*, 134, 65-73.
- Cakmakci, S., Cetin, B., Gurses, M., Dagdemir, E., & Hayaloglu, A.A. (2012a). Morphological, molecular, and mycotoxigenic identification of dominant filamentous fungi from moldy Civil cheese. *J. Food Prot.* 75 (11), 2045–2049.
- Cakmakci, S., Gundogdu, E., Hayaloglu, A.A., Dagdemir, E., Gurses, M., Cetin, B. and Tahmas-Kahyaoglu, D. (2012b), Chemical and microbiological status and volatile profiles of mouldy Civil cheese, a Turkish mould-ripened variety. *Int J Food Sci Technol*, 47, 2405-2412.
- Cakmakci, S., Hayaloglu, A.A., Dagdemir, E., Cetin, B., Gurses, M., & Tahmas-Kahyaoglu, D. (2014). Effects of *Penicillium roqueforti* and whey cheese on gross composition, microbiology and proteolysis of mould-ripened Civil cheese during ripening. *Int J Dairy Technol*, 67, 594-603.
- Cakmakci, S., Gurses, M., Hayaloglu, A. A., Cetin, B., Sekerci, P., & Dagdemir, E. (2015). Mycotoxin production capability of *Penicillium roqueforti* in strains isolated from mould-ripened traditional Turkish civil cheese. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 32(2), 245–249.
- Cantor, M.D., van den Tempel, T., Hansen, T.K., & Ardö, Y. (2017). Blue cheese. Editörler: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Londra: Academic Press, s. 929-954.

- Caron, T., Piver, M. L., Péron, A. C., Lieben, P., Lavigne, R., Brunel, S., Roueyre, D., Place, M., Bonnarme, P., Giraud, T., Branca, A., Landaud, S., & Chassard, C. (2021). Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *International journal of food microbiology*, 354, 109174.
- Caron, M.L.E., Crequer, E., Le Piver, M. vd. (2024). Generation of diversity in the blue cheese mold *Penicillium roqueforti* and identification of pleiotropic QTL for key cheese-making phenotypes, *bioRxiv* 2024.02.22.581506.
- Chavez, R., Vaca, I., & Garcia-Estrada, C. (2023). Secondary Metabolites Produced by the Blue-Cheese Ripening Mold *Penicillium roqueforti*; Biosynthesis and Regulation Mechanisms. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 9(4), 459.
- Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Abraham, A.L., Ceppi, M., Conseiller, E., Debuchy, R., Malagnac, F., Goarin, A., Silar, P., Lacoste, S., Sallet, E., Bensimon, A., Giraud, T., Brygoo, Y., 2014. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese-making fungi. *Nat. Commun.* 5, 2876.
- Cleere, M. M., Novodvorska, M., Geib, E., Whittaker, J., Dalton, H., Salih, N., Hewitt, S., Kokolski, M., Brock, M., & Dyer, P. S. (2024). New colours for old in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *NPJ science of food*, 8(1), 3.
- Coskun, H. (2021). Peynir Teknolojisi. 1.baskı, Sidaş Ltd. Şti. İzmir.
- Coton E., Coton M., Hymery N., Mounier J., & Jany J.L. (2020). *Penicillium roqueforti*: An overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biol. Rev.* 34, 59–73.
- Crequer, E., Ropars, J., Jany, J.L., Caron, T., Coton, M., Snirc, A., Vernadet, J.P., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. (2023). A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche. *Evol. Appl.* 16(8), 1438–1457.
- Crequer, E., Coton, E., Cueff, G., Christiansen, J.V., Frisvad, J.C., Rodriguez de la Vega, R., Giraud, T., Jany, J.L., & Coton, M. (2024). Different metabolite profiles across *Penicillium roqueforti* populations associated with ecological niche specialisation and domestication. *bioRxiv*, 2024.01.12.575369.

- Çakır, Y. (2018). *Seçilmiş Penicillium roqueforti suşu kullanılarak üretilen Erzincan tulum peynirinde depolama süresince toksin içeriği ile olgunlaşma, mikrobiyolojik ve duyu kalitenin tespiti*. (Doktora tezi). Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Çakır, Y. ve Çakmakçı, S. (2018). Some microbiological, physicochemical and ripening properties of Erzincan Tulum cheese produced with added black cumin (*Nigella sativa* L.). *Journal of food science and technology*, 55(4), 1435–1443.
- Çakır, Y. ve Çakmakçı, S. (2024). Determination of mycotoxin content, microbiological and physicochemical properties and sensory quality during ripening of Erzincan Tulum cheese produced with strain *Penicillium roqueforti* 41. *Food Bioscience*, 61, 104938.
- Çakmakçı, S. (2011). Türkiye Peynirleri. Peynir Biliminin Temelleri, Editörler: Hayaloğlu, A.A. ve Özer, B., 1.Baskı, Sidas Medya LTD.ŞTİ., İzmir.
- Çakmakçı, S. ve Salık, M. A. (2021). Türkiye'nin Coğrafi İşaretli Peynirleri. *Akademik Gıda*, 19(3), 325-342.
- Dai, G., Shen, Q., Zhang, Y., & Bian, X. (2022). Biosynthesis of Fungal Natural Products Involving Two Separate Pathway Crosstalk. *Journal of Fungi*, 8(3), 320.
- Del-Cid, A., Gil-Durán, C., Vaca, I., Rojas-Aedo, J. F., García-Rico, R. O., Levicán, G., & Chávez, R. (2016). Identification and Functional Analysis of the Mycophenolic Acid Gene Cluster of *Penicillium roqueforti*. *PloS one*, 11(1), e0147047.
- Demers J.E., & Jiménez-Gasco Mdel M. (2016). Evolution of Nine Microsatellite Loci in the Fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Mol. Evol.*, 82(1): 27-37.
- DeMers, M. (2022). *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. *Microbiology* (Reading, England), 168(3), 001153.
- Demirci, T. (2024). Highlighting the Microbial Community of Kuflu Cheese, an Artisanal Turkish Mold-Ripened Variety, by High-Throughput Sequencing. *Food science of animal resources*, 44(2), 390–407.

- De Respinis, S., Caminada, A., Pianta, E., Buetti-Dinh, A., Riva Scettrini, P., Petrini, L., Tonolla, M., & Petrini, O. (2023). Fungal communities on alpine cheese rinds in Southern Switzerland. *Botanical studies*, 64(1), 6.
- De Santis, D. & Fidaleo, M. (2022). Effect of aging pit on volatile compounds and sensory attributes of traditional Italian Fossa cheese. *LWT*, 153, 112507.
- Doğan M. & Tekiner İ.H. (2021). Evaluating starter culture potential of wild *Penicillium roqueforti* strains from moldy cheeses of artisanal origin, *Food Bioscience*, 43, 101253.
- Dumas, E., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R.C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A., & Giraud, T. (2020). Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Molecular Ecology*, 29(14), 2639-2660.
- Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Le Tacon, F., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., & Selosse, M. A. (2017). Fungi as a Source of Food. *Microbiology spectrum*, 5(3), 10.1128/microbiolspec.FUNK-0030-2016.
- Earl, D.A., & vonHoldt, B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour.* 4: 359–361.
- Ellstrand, N. C., & Rieseberg, L. H. (2016). When gene flow really matters: gene flow in applied evolutionary biology. *Evolutionary applications*, 9(7), 833–836.
- Ergün, Ö., Bostan, K. ve Sağun. (1992). Van Otlu Peynirlerinde Mikrobiyolojik Kalite ve Küf Florası. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1-2): 53-59.
- Erdoğan, A., Gürses, M., & Sert, S. (2003). Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum cheeses produced in Turkey, *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 83–85.
- Erdoğan, A. ve Sert, S. (2004). Mycotoxin-forming ability of two *Penicillium roqueforti* strains in blue moldy tulum cheese ripened at various temperatures. *Journal of food protection*, 67(3), 533–535.
- Ertas-Onmaz, N., Gungor, C., Al, S., Dishan, A., Hizlisoy, H., Yildirim, Y., Kasap Tekinsen, F., Disli, H.B., Barel, M., & Karadal, F. (2021). Mycotoxigenic and

- phylogenetic perspective to the yeasts and filamentous moulds in mould-matured Turkish cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 357, 109385.
- Esen, Y., & Çetin B. (2021). Bacterial and yeast microbial diversity of the ripened traditional middle east surk cheese. *Int. Dairy Journal*, 117, 105004.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Farahat, S.M., Rabie, A.M., & Farag, A.A. (1990). Evaluation of the proteolytic and lipolytic activity of different *Penicillium roqueforti* strains. *Food Chemistry*, 36(3), 169-180.
- Fernandez-Bodega, M. A., Mauriz, E., Gomez, A., & Martín, J. F. (2009). Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes-Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *International journal of food microbiology*, 136(1), 18–25.
- Fernandez-Bodega, A., Alvarez-Alvarez, R., Liras, P., & Martin, J. F. (2017). Silencing of a second dimethylallyltryptophan synthase of *Penicillium roqueforti* reveals a novel clavine alkaloid gene cluster. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(15), 6111–6121.
- Ferreira, C.O., Álvarez-Martín, P., Flórez, A.B., Díaz, M., Mayo, B. (2012). Biochemical and technological properties of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* strains isolated from Cabrales, a Spanish traditional, blue-veined, starter-free cheese. *Italian Journal of Food Science*, 24(2): 115-124.
- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A., & Dragoni, I. (2001). Roquefortine C occurrence in blue cheese. *Journal of food protection*, 64(2), 246–251.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. ve McSweeney, P.L.H. (2017). Fundamentals of cheese science, 2nd edition, Springer, New York.
- Fontaine, K., Hymery, N., Lacroix, M.Z., Puel, S., Puel, O., Rigalma, K., Gaydou, V., Coton, E. ve Mounier, J. (2015a). Influence of intraspecific variability and abiotic factors mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *Int. J. of Food Microbiol.*, 215, 187-193.

- Fontaine, K., Passero, E., Vallone, L., Hymery, N., Coton, M., Jany, J.L., Mounier, J., ve Coton, E. (2015b). Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. *Food Control*, *47*, 634-640.
- Fontaine, K., Mounier, J., Coton, E. & Hymery, N. (2016). Individual and combined effects of roquefortine C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells. *World Mycotoxin Journal*. *1*, 1-11.
- Frisvad, J. C. ve Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in mycology*, *49*(1): 1-174.
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, *166*(6), 1397–1410.e16.
- García-Estrada, C., Ullán, R. V., Albillos, S. M., Fernández-Bodega, M. Á., Durek, P., von Döhren, H., & Martín, J. F. (2011). A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chemistry & biology*, *18*(11), 1499–1512.
- García-Estrada, C., & Martín, J.F. (2016). Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *100*, 8303-8313.
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, *5*(3): 42.
- Gibbons, J. G., Salichos, L., Slot, J. C., Rinker, D. C., McGary, K. L., King, J. G., Klich, M. A., Tabb, D. L., McDonald, W. H., & Rokas, A. (2012). The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Current biology : CB*, *22*(15), 1403–1409.
- Gibbons, J. G., & Rinker, D. C. (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Current opinion in genetics & development*, *35*, 1–8.

- Gillot, G., Jany, J. L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., & Coton, E. (2015). Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity. *PloS one*, *10*(6), e0129849.
- Gillot, G., Jany, J. L., Poirier, E., Maillard, M. B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E., & Coton, M. (2017a). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International journal of food microbiology*, *241*, 141–150.
- Gillot, G., Jany, J. L., Dominguez-Santos, R., Poirier, E., Debaets, S., Hidalgo, P. I., Ullán, R. V., Coton, E., & Coton, M. (2017b). Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. *Food microbiology*, *62*, 239–250.
- Giraud, T., Refrégier, G., Le Gac, M., de Vienne, D. M., & Hood, M. E. (2008). Speciation in fungi. *Fungal genetics and biology : FG & B*, *45*(6), 791–802.
- Giraud F., Giraud T., Aguilera G., Fournier E., Samson R., Cruaud C. vd. (2010). Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *Int J Food Microbiol.*, *137*(2-3): 204-13.
- Giraud, T., Koskella, B., & Laine, A. L. (2017). Introduction: microbial local adaptation: insights from natural populations, genomics and experimental evolution. *Molecular ecology*, *26*(7), 1703–1710.
- Gladieux, P., Ropars, J., Badouin, H., Branca, A., Aguilera, G., de Vienne, D. M., Rodríguez de la Vega, R. C., Branco, S., & Giraud, T. (2014). Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Molecular ecology*, *23*(4), 753–773.
- Glass, N. L. ve Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(4), 1323-1330.
- Griffiths, A.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., Miller, J.H. (2004). Introduction to Genetic Analysis. W. H. Freeman; 8th edition, sf.800.

- Guevara-Suarez, M., García, D., Cano-Lira, J. F., Guarro, J. ve Gené, J. (2020). Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium-like fungi in *Aspergillaceae*. *Fungal systematics and evolution*, 5, 39–75.
- Gullino, M.L., Gilardi, G. & Garibaldi, A. (2019). Ready-to-eat salad crops: A plant pathogen's heaven. *Plant Disease*, 103, 2153-2170.
- Gurkan, H., Yilmaztekin, M., Cakmakci, S., & Hayaloglu, A.A. (2018). Volatile compounds and biogenic amines during the ripening of mold-ripened Civil cheese manufactured using three different strains of *Penicillium roqueforti*. *J Food Saf.* 38, e12568.
- Gürsoy, O., & Kesenkaş, H. (2011). Peynir Mikrobiyolojisi. Peynir Biliminin Temelleri, Ed.: Hayaloğlu, A.A. ve Özer, B., 1.baskı, Sidas Medya Ltd. Şti, İzmir.
- Hammerl, R., Frank, O., Schmittnägél, T., Ehrmann, M. A., & Hofmann, T. (2019a). Functional Metabolome Analysis of *Penicillium roqueforti* by Means of Differential Off-Line LC-NMR. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(18), 5135–5146.
- Hammerl, R., Frank, O., Dietz, M., Hirschmann, J., & Hofmann, T. (2019). Tyrosine Induced Metabolome Alterations of *Penicillium roqueforti* and Quantitation of Secondary Key Metabolites in Blue-Mold Cheese. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(31), 8500–8509.
- Hansen, B. G., Genee, H. J., Kaas, C. S., Nielsen, J. B., Regueira, T. B., Mortensen, U. H., Frisvad, J. C., & Patil, K. R. (2011). A new class of IMP dehydrogenase with a role in self-resistance of mycophenolic acid producing fungi. *BMC microbiology*, 11, 202.
- Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation, *Mycological Research*, 95(6), 641-655.
- Hayaloglu, A.A., Kirbag, S. (2007). Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 115 (3): 376–380.
- Hayaloglu, A.A., Çakmakçı S., Brechany K.C., Deegan K.C. & McSweeney P.L.H., (2007). Microbiology, biochemistry and volatile composition of Tulum

- cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *Journal of Dairy Science*, 90(3): 1102-1121.
- Hayaloglu, A.A., Brechany, E.Y., Deegan, K.C., McSweeney, P.L.H. (2008). Characterization of the chemistry, biochemistry and volatile profile of Kuflu cheese, a mould-ripened variety, *LWT - Food Science and Technology*, 41(7): 1323-1334.
- Hayaloğlu, A.A., Topçu, A. & Koca, N. (2011). Peynir Analizleri. Hayaloğlu, A.A. & Özer, B. (Ed.), *Peynir Biliminin Temelleri*, 489-562.
- Herrera-Chávez, B., Trujillo, A. J., Calero, P., Falconí, M. I., & Sanchez-Macías, D. (2022). Effects of colostrum in milk on the effectiveness of the pasteurization process and cheese milk quality. *Journal of Applied Animal Research*, 50, 246e253.
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2010). Sex in *Penicillium* series Roqueforti. *IMA fungus*, 1(2), 171
- Houbraken, J., Visagie, C.M., Meijer, M., Frisvad, J.C., vd. (2014). A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section Aspergilloides, *Studies in Mycology*, 78, 373-451.
- Houbraken, J., Wang, L., Lee, H. B. , & Frisvad, J. C. (2016). New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia*, 36, 299–314.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in mycology*, 95, 5–169.
- Huson, D. H. & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23(2), 254–267.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J., Barbier, G., & Coton, E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 437-456.

- Hymery, N., Mounier, J., & Coton, E. (2018). Effect of *Penicillium roqueforti* mycotoxins on Caco-2 cells: Acute and chronic exposure. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 48, 188–194.
- IDF, (2023). *The World Dairy Situation Report 2023* .
<https://milksa.co.za/sites/default/files/2024-01/2023%20World%20Dairy%20Situation%20Report.pdf> [25.11.2024]
- Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Ceremuga, M., Gorniak, L., Stela, M., & Bijak, M. (2021). The Existing Methods and Novel Approaches in Mycotoxins' Detection. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), 3981.
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R.C., & Ferlini, C. (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics* 8, 37.
- Keeling P. J. (2009). Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. *Current opinion in genetics & development*, 19(6), 613–619.
- Kılıç, S. (2011). Peynir Starter Kültürleri. Peynir Biliminin Temelleri, Ed.: Hayaloğlu, A.A. ve Özer, B., 1.baskı, Sidas Medya Ltd. Şti, İzmir.
- Kırtıl, H.E. (2018). Küflü peynirlerden izole edilen küflerin moleküler tanımlanması ve karakterizasyonu. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, *Yüksek lisans tezi*, İstanbul, 131 s.
- Kırtıl, H. E., Metin, B., & Arıcı, M. (2020). Peynir Küfü Olarak *Penicillium roqueforti*'nin Taksonomisi, Morfolojik, Genetik ve Metabolik Özellikleri. *Gıda*, 45(6), 1188-1200.
- Kırtıl, H. E., Metin, B., & Arıcı, M. (2021). Identification of filamentous fungi in Turkish mold-ripened cheeses and screening of mycotoxin genes of *Penicillium roqueforti* isolates. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(4): 657–662.
- Kırtıl, H. E., Orakci, A., Arici, M. & Metin, B. (2024). Genetic diversity and population structure of *Penicillium roqueforti* isolates from Turkish blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 421, 110801.
- Kosalková, K., Domínguez-Santos, R., Coton, M., Coton, E., García-Estrada, C., Liras, P., & Martín, J. F. (2015). A natural short pathway synthesizes

- roquefortine C but not meleagrín in three different *Penicillium roqueforti* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(18), 7601–7612.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Kure, C.F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14-19.
- Larsen, M. D., Kristiansen, K. R., & Hansen, T. K. (1998). Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. *International journal of food microbiology*, 43(3), 215–221.
- Larsen, M. D., & Jensen, K. (1999). The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. *International journal of food microbiology*, 46(2), 159–166.
- Leggieri, M., Pietri, A., & Battilani, P. (2020). Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in Grana Cheese. *Microorganisms*. 8(1), 69.
- Li, H., Booth, T., & Chooi, Y.-H. (2020). Fungal Polyketide-Nonribosomal Peptide Synthetases and Their Associated Natural Products. In H.-W. Liu, & T. P. Begley (Eds.), *Comprehensive Natural Products III: Chemistry and Biology* (3 ed., Vol. 1, pp. 415-444).
- Lin, H.S., & Chang, S.B. (2013). PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Methods Mol. Biol.*, 1006, 25-55.
- Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397–401.
- Lopez-Diaz T., Santos J., Otero A., García M. & Moreno B. (1996). Some technological properties of *Penicillium roqueforti* strains isolated from a home-made blue Cheese. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23, 5-8.
- Lopez-Diaz T.M., Alegría Á., Rodríguez-Calleja J.M., Combarros-Fuertes P., Fresno J.M., Santos J.A., Flórez A.B., & Mayo B. (2023). Blue Cheeses:

- Microbiology and Its Role in the Sensory Characteristics. *Dairy*. 4(3), 410-422.
- Lopez Gonzalez, N., Abarquero, D., Combarros-Fuertes, P., Prieto, B., Fresno, J.M., & Tornadijo, M.E. (2024). Influence of salting on physicochemical and sensory parameters of blue-veined cheeses. *Dairy*. 5(1), 93-105.
- Lynch, J. M., Barbano, D. M., & Fleming, J. R. (2002). Determination of the total nitrogen content of hard, semihard, and processed cheese by the Kjeldahl method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 85(2), 445–455.
- Madesis, P., Ganopoulos, I., & Tsaftaris, A. (2013). Microsatellites: evolution and contribution. *Methods Mol. Biol.* 1006, 1-13.
- Mahmoudian, F., Sharifirad, A., Yakhchali, B., Ansari, S., & Fatemi, S. S. (2021). Production of Mycophenolic Acid by a Newly Isolated Indigenous *Penicillium glabrum*. *Current microbiology*, 78(6), 2420–2428.
- Malekinejad, H., Aghazadeh-Attari, J., Rezaabakhsh, A., Sattari, M., & Ghasemsoltani-Momtaz, B. (2015). Neurotoxicity of mycotoxins produced in vitro by *Penicillium roqueforti* isolated from maize and grass silage. *Human & Experimental Toxicology*. 34(10):997-1005.
- Maragos C. M. (2022). Roquefortine C in blue-veined and soft-ripened Cheeses in the USA. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*, 15(1), 1–9.
- Martin, J.F., & Coton M. (2017). Blue Cheese: Microbiota and Fungal Metabolites. Editörler: Frias, J. ve Martinez-Villaluenga, C., Penas, E., *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, 1.Baskı, Academic Press.
- Martin, J.G.P., & Cotter, P.D. (2023). Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity? *Heliyon*. 9(4), e15110.
- McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G., & Fox, P.F. (2017). Diversity and classification of cheese varieties: An overview. Editörler: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Londra: Academic Press, sf. 781-808.
- Meece, J.K., Anderson, J.L., Fisher, M.C., Henk, D.A., Sloss, B.L., & Reed, K.D. (2011). Population genetic structure of clinical and environmental isolates of

- Blastomyces dermatitidis*, based on 27 polymorphic microsatellite markers. *Appl Environ Microbiol.*,77(15):5123-31.
- Metin, B. (2018). Filamentous Fungi in Cheese Production. *Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology*, Editörler: Öztürkoğlu Budak, Ş., Akal, H.C. 1.Baskı, IGI Global, sf. 257-275.
- Metin, B. (2020). Filamentous Fungi Associated with the Golot Cheese of the Rize-Ardesen Highlands in Turkey. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 19, 435-441.
- Metin, B. (2023). *Penicillium roqueforti* Secondary Metabolites: Biosynthetic Pathways, Gene Clusters, and Bioactivities, *Fermentation*. 9(9), 836.
- Mioso, R., Toledo Marante, F. J., & Herrera Bravo de Laguna, I. (2015). *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. *Journal of applied microbiology*, 118(4), 781–791.
- Miot-Sertier, C., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *Journal of applied microbiology*, 102(2), 555–562.
- NCBI, (2024). NCBI GenBank veritabanına girişi ve BankIt yükleme aracının arayüzü. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/> [19.12.2024]
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3) 5:83–590.
- Nielsen, K. F., Sumarah, M. W., Frisvad, J. C., & Miller, J. D. (2006). Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(10), 3756–3763.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J. L., Wincker, P., Casaregola, S., & Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16333–16338.
- O'Brien, M., Nielsen, K. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T., & Frisvad, J. C. (2006). Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from

- baled grass silage in Ireland. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(24), 9268–9276.
- Ogawa, Y., Hirose, D., Akiyama, A. Ichinoe, M. (2014). Examination of the taxonomic position of *Penicillium* strains used in blue cheese production based on the partial sequence of β -tubulin. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 55(3),157-61.
- Ozturkoglu-Budak, S. (2016). Dynamics of complex microbiota and enzymes in Divle Cave cheese and their biochemical consequences. Doktora tezi, Utrech Üniversitesi, Hollanda.
- Ozturkoglu-Budak, S., Figge, M.R., Houbraken, J., & Vries, R.P. (2016a). The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 58, 50–53.
- Ozturkoglu-Budak, S., Gursoy, A., Aykas, D. P., Koçak, C., Dönmez, S., de Vries, R. P. & Bron, P. A. (2016b). Volatile compound profiling of Turkish Divle Cave cheese during production and ripening. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5120–5131.
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A., & de Vries, R. P. (2016c). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 17–27.
- Ozturkoglu-Budak, S., Akal, H.C., & Ozturk, H., I. (2023). Multi-mycotoxin production of cheese-derived fungal strains in vitro and in cheese models. *World Mycotoxin Journal*, 1-12.
- Özgören, E., & Seçkin, A. K. (2012). Türkiye’de Ticari Ölçekte Üretilen Bazı Küflü Peynirlerin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 10(2), 55-62.
- Özşensoy, Y., & Kurar, E., (2012). Markör Sistemleri ve Genetik Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanımları. *Journal of Cell and Molecular Biology* , 10, 11-19.
- Peakall, R., & Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.

- Pérez-Fuentes, N., Alvariño, R., Alfonso, A., González-Jartín, J., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2024). In vitro assessment of emerging mycotoxins co-occurring in cheese: a potential health hazard. *Archives of toxicology*, 98(12), 4173–4186.
- Perrone, G., & Susca, A. (2017). *Penicillium* species and their associated mycotoxins. Editörler: Moretti, A. ve Susca, A. *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*. Humana Press Springer Protocols, 1.baskı, New York.
- Petyaev, I. M., & Bashmakov, Y. K. (2012). Could cheese be the missing piece in the French paradox puzzle?. *Medical Hypotheses*, 79(6), 746–749.
- Pogačić, T., Maillard, M. B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Yee, A. L., Valence, F., & Thierry, A. (2015). A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiology*, 46, 145–153.
- Pose, G., Ludemann, V., Gómez, A., & Segura, J. (2007). Comparison of growth characteristics and roquefortin C production of *Penicillium roqueforti* from blue-veined cheese. *Mycotoxin Research*, 23, 122–126.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Redondo, C., Cubero, J. & Melgarejo, P. (2009). Characterization of *Penicillium* Species by Ribosomal DNA Sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR Analysis. *Mycopathologia*, 168 (1), 11.
- Regueira, T. B., Kildegaard, K. R., Hansen, B. G., Mortensen, U. H., Hertweck, C., & Nielsen, J. (2011). Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3035–3043.
- Reinholds, I., Rusko, J., Pugajeva, I., Berzina, Z., Jansons, M., Kirilina-Gutmane, O., Tihomirova, K., & Bartkevics, V. (2020). The Occurrence and Dietary Exposure Assessment of Mycotoxins, Biogenic Amines, and Heavy Metals in Mould-Ripened Blue Cheeses. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(1), 93.
- Ridgway, R. (1912). *Color standards and color nomenclature*. The author, Washington, D.C.

- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet (London, England)*, 339(8808), 1523–1526.
- Rojas-Aedo, J. F., Gil-Durán, C., Goity, A., Vaca, I., Levicán, G., Larrondo, L. F., & Chávez, R. (2018). The developmental regulator Pcz1 affects the production of secondary metabolites in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *Microbiological Research*, 212-213, 67–74.
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012a). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International journal of food microbiology*, 155(3), 199–210.
- Ropars, J., Dupont, J., Fontanillas, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Malagnac, F., Coton, M., Giraud, T., & Lopez-Villavicencio, M., (2012b). Sex in cheese: evidence for sexuality in the fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS One* 7 (11): e49665.
- Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., Jany, J.L., Coton, E., & Giraud, T. (2014). Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evolutionary Applications*, 7 (4): 433–441.
- Ropars, J., de la Vega, R.C.R., Lopez-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, E., Dumas, E., Lacoste, S., Debuchy, R., Dupont, J., Branca, A., & Giraud, T., (2015). Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Current Biology*, 25(19): 2562-2569.
- Ropars, J., López-Villavicencio, M., Snirc, A., Lacoste, S., & Giraud, T. (2017). Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*. *PloS one*, 12(3), e0171387.
- Ropars, J., Caron, T., Lo, Y. C., Bennetot, B., & Giraud, T. (2020a). La domestication des champignons *Penicillium* du fromage [The domestication of *Penicillium* cheese fungi]. *Comptes Rendus Biologies*, 343(2), 155–176.
- Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R. C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., & Giraud, T. (2020b). Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus *Penicillium camemberti* and Its

Diversification into Two Varieties. *Current Biology : CB*, 30(22): 4441–4453.e4.

Sagdic, O., Ozcelik, S., Simsek, B., & Ozdemir, C. (2008). Geleneksel yöntemle üretilen küflü peynirlerin mikrobiyolojik nitelikleri ve küf florası. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs, Erzurum, sf. 709–712.

Salvatore E., Addis M., Pes, M., Fiori M., & Pirisi A. (2015). Evaluation of lipolysis and volatile compounds produced by three *Penicillium roqueforti* commercial cultures in a blue-type cheese made from ovine milk. *Italian Journal of Food Science*. 27, 437-442.

Sarıtaş, S. (2023). Coğrafi İşaretleri Açısından Balıkesir İli Üzerine Bir Değerlendirme. *Kültür Araştırmaları Dergisi*, 19, 308-325.

Schneweis, I., Meyer, K., Hörmansdorfer, S., & Bauer, J. (2000). Mycophenolic acid in silage. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3639–3641.

Scott, P.M., Merrien, MA. & Polonsky, J. (1976). Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*. *Experientia*, 32, 140–142.

Seri, M., & Metin, B. (2021). Mycobiota of Konya mold-ripened (Kuflu) Tulum cheese and the diversity of *Penicillium roqueforti* isolates. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 68(4), 349-354.

Siebert, A., Cholewiński, G., Trzonkowski, P., & Rachon, J. (2020). Immunosuppressive properties of amino acid and peptide derivatives of mycophenolic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 189, 112091.

Sionek, B., Szydłowska, A., Küçükgöz, K., & Kołożyn-Krajewska, D. (2023). Traditional and New Microorganisms in Lactic Acid Fermentation of Food. *Fermentation*, 9(12), 1019.

Shapiro, B.J. (2018). What Microbial Population Genomics Has Taught Us About Speciation. In: Polz, M., Rajora, O. (ed.) *Population Genomics: Microorganisms*. Population Genomics. Springer, Cham.

Spinnler, H.E. (2017). Surface mold-ripened cheeses. Editörler: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Londra: Academic Press, sf. 911-928.

- Stroe, M. C., Gao, J., Pitz, M., & Fischer, R. (2024). Complexity of fungal polyketide biosynthesis and function. *Molecular Microbiology*, *121*(1), 18–25.
- Sumarah, M. W., Miller, J. D., & Blackwell, B. A. (2005). Isolation and metabolite production by *Penicillium roqueforti*, *P. paneum* and *P. crustosum* isolated in Canada. *Mycopathologia*, *159*(4), 571–577.
- Syvanen M. (2012). Evolutionary implications of horizontal gene transfer. *Annual Review of Genetics*, *46*, 341–358.
- Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, *175*(2), 149–163.
- Şahiner, Ö., & Yuceer, Y. (2024). Kırklareli eski kaşar peynirinin uçucu bileşen profili, fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri. *Gıda*, *49*(2): 193-204.
- Şengül, M. (2006). Microbiological characterization of Civil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous Lactobacilli. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*, 613–618.
- Şengün, İ.Y., Karapınar, M., Yaman, D.B., & Yenice, E. (2006). Isparta ili ve yöresine ait geleneksel küflü çömlük peynirinin mikroflorası üzerine bir araştırma. Türkiye 9. Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı Sayfa: 461-464, Bolu.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, *17*(16), 6463–6471.
- Taylor, J. W., Geiser, D. M., Burt, A., & Koufopanou, V. (1999a). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(1), 126–146.
- Taylor, J., Jacobson, D., & Fisher, M. (1999b). THE EVOLUTION OF ASEQUAL FUNGI: Reproduction, Speciation and Classification. *Annual Review of Phytopathology*, *37*, 197–246.
- TEPGE, (2023). Süt ve Süt Ürünleri Durum ve Tahmin Raporu 2023. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Durum-Tahmin%20Raporlar%C4%B1/2023%20Durum-Tahmin%20Raporlar%C4%B1/S%C3%BCt%20ve%20S%C3%BCT%20>

[C3%9Cr%C3%BCnleri%20Durum%20Tahmin%20Raporu%202023-372%20TEPGE.pdf](#) [24.11.2024]

TPE, (2024a). Türk Patent ve Marka Kurumu Veritabanı. <https://ci.turkpatent.gov.tr/veri-tabani> [25.11.2024]

TPE, (2024b). Coğrafi işaret nedir? <https://ci.turkpatent.gov.tr/sayfa/co%C4%9Frafii%C5%9Faret-nedir> [25.11.2024]

Turgut, T., Erdoğan, A., & Atasever, M. (2012). Karın kaymağı peynirinden izole edilen laktobasillerin tanımlanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2), 209 - 213.

Tusso, S., Nieuwenhuis, B.P.S., Weissensteiner, B. vd. (2021). Experimental evolution of adaptive divergence under varying degrees of gene flow. *Nat Ecology and Evolution*, 5, 338–349.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, & Rozen, S. G., (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40, e115.

Ünsal, A. (2017). Süt Uyuyunca: Türkiye Peynirleri. 8.baskı, Yapı Kredi Yayınları, İstanbul.

Versalovic, J., Schneider, M., Bruijn, F.J. & Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cell Biology*, 5, 25–40.

Viggiano, A. (2020). Exploring the metabolic potential of *Penicillium rubens*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–371.

Wang, W., Liang, X., Li, Y., Wang, P., & Keller, N. P. (2023). Genetic Regulation of Mycotoxin Biosynthesis. *Journal of Fungi*, 9(1), 21.

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 38, 315-322.
- Wolff, P. B. (2020). *Genomics-driven discovery, characterization, and engineering of fungal secondary metabolites*. Technical University of Denmark.
- Wu, S., Chen, W., Lu, S., Zhang, H., & Yin, L. (2022). Metabolic Engineering of Shikimic Acid Biosynthesis Pathway for the Production of Shikimic Acid and Its Branched Products in Microorganisms: Advances and Prospects. *Molecules*, 27(15), 4779.
- Xia, Y., Yuan, R., Weng, S., Wang, G., Xiong, Z., Zhang, H., Song, X., Liu, W., & Ai, L. (2020). Proteolysis, lipolysis, texture and sensory properties of cheese ripened by *Monascus fumeus*. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 137, 109657.
- Xu, J., (2006). Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(2), 75–89.
- Yavuz, M., Kasavi, C., & Toksoy Öner, E. (2021). Developments in effective use of volatile organic compound analysis to assess flavour formation during cheese ripening. *Journal of Dairy Research*. 88, 461–467.
- Yildiz, M., Turgut, T., Cetin, B., & Kesmen, Z. (2021). Microbiological characteristics and identification of yeast microbiota of traditional mouldy civil Cheese. *International Dairy Journal*, 116, 104955.
- You, C., Li, F., Zhang, X., Ma, L., Zhang, Y. Z., Zhang, W., & Li, S. (2021). Structural basis for substrate specificity of the peroxisomal acyl-CoA hydrolase MpaH' involved in mycophenolic acid biosynthesis. *The FEBS Journal*, 288(19), 5768–5780.
- Yun, C. S., Motoyama, T., & Osada, H. (2015). Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. *Nature communications*, 6, 8758.
- Yurt, M.N.Z., Ersoy Omeroglu, E., Tasbasi, B.B., Acar, E.E., Altunbas, O., Ozalp, V.C., & Sudagidan, M. (2023). Bacterial and fungal microbiota of mould-

ripened cheese produced in Konya. *International Journal of Dairy Technology*, 76, 627-637.

Zhang, W., Cao, S., Qiu, L., Qi, F., Li, Z., Yang, Y., Huang, S., Bai, F., Liu, C., Wan, X., & Li, S. (2015). Functional characterization of MpaG', the O-methyltransferase involved in the biosynthesis of mycophenolic acid. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 16(4), 565–569.

Zhang, W., Du, L., Qu, Z., Zhang, X., Li, F., Li, Z., Qi, F., Wang, X., Jiang, Y., Men, P., Sun, J., Cao, S., Geng, C., Qi, F., Wan, X., Liu, C., & Li, S. (2019). Compartmentalized biosynthesis of mycophenolic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(27), 13305–13310.

Url-1 <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Roquefort.jpg>> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

Url-2 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Danish_Blue_cheese.jpg> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

Url-3 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blue_Stilton_02.jpg> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

Url-4 <<https://www.flickr.com/photos/38911797@N07/3798776531>> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

Url-5 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Camembert_de_Normandie_%28AOP%29_11.jpg> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

Url-6 <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brie2.JPG>> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

Url-7 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cambozola_cheese.jpg> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

Url-8 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:WikiCheese_-_Tomme_de_Savoie_-_20150619_-_002.jpg> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

Url-9 <<https://www.flickr.com/photos/quickfix/8412959346>> Erişim Tarihi: [01.01.2025]

- Url-10 <<https://freerangestock.com/photos/125348/tomme-de-savoie-cheese-.html>>
Erişim Tarihi: [01.01.2025]
- Url-11 <<https://obrukpeyniri.com/>> Erişim Tarihi: [01.01.2025]
- Url-12 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acetate_pathway.svg> Erişim
Tarihi: [05.01.2025]
- Url-13 <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malonyl-
CoA_ACP_transacylase_reaction.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malonyl-CoA_ACP_transacylase_reaction.svg)> Erişim Tarihi: [05.01.2025]
- Url-14 <<https://picryl.com/media/isoprene-structure-489531>> Erişim Tarihi:
[05.01.2025]
- Url-15 <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PolyIsopreneCorrected.png>>
Erişim Tarihi: [05.01.2025]

EKLER

EK1

BESİYERLERİ, KİMYASALLAR VE DİĞER SARF MALZEMELER

Sarf Malzeme	Tedarik Edilen Firma
Agar	Biolife Italiana, Milan, İtalya
Agaroz	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
AgNO ₃	Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Almanya
Amil Alkol	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Asetik Asit	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Asetonitril	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Bactopepton	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
Borik Asit	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Bromkresol Yeşili	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Bromofenol Mavisi	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
dNTP Set (100 mM, dATP, dCTP, dGTP ve dTTP)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
Dream Taq Polimeraz Miksi (10x Dream Buffer ile)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Etanol	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Fenolftalein (%1'lik)	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Formik Asit	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Glikoz	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Gliserol	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Headspace Vialleri (20 mL)	La-pha-pack GmbH, Langerwehe, Almanya
H ₃ PO ₄ (orto-fosforik asit)	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
H ₂ SO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
K ₂ CrO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Kjeldahl Katalizörü	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Malt Ekstraktı	Biolife Italiana, Milan, İtalya
Marker (λ DNA/HindIII)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
Marker (GeneRuler 100 bp ve 1 kbp)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD

Maya Ekstraktı	Neogen, Michigan, ABD
Metanol	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Metil Kırmızısı	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Mikofenolik Asit (HPLC Standardı)	LGC-Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Almanya
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
MRS Broth	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
M-17 Broth	Biolife Italiana, Milan, İtalya
NaCl	Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Almanya
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
NaOH	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
PCA	Biolife Italiana, Milan, İtalya
PDA	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Pepton (soya)	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Primerler (100 µM, 784 baz)	Sentromer DNA Teknolojileri, Miami, ABD
Proteinaz K	Termo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
PureLink Genomik DNA Mini Kit	Termo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
PureLink PCR purifikasyon kiti	Termo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
CA Filtre (0,45 µm)	Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Almanya
RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu	Intron Biotechnology, Kyonggi-do, Güney Kore
Ringer Çözeltisi	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Rokfortin C (HPLC Standardı)	LGC- TRC, Toronto, Kanada
SDS	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Sikloheksimid	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Sitrik Asit	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Sodyum Sitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Steril Numune Labı (250 g)	Medkimsan, Kayseri, Türkiye
Sükroz	Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Almanya
Şırınga (10 mL)	Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Almanya
Taq polimeraz (10X Taq Buffer ve 50 mM MgCl ₂ ile)	Invitrogen, Termo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
Tris	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Tuzsuz Krem Peynir (Milkten, Yağ Yağlı)	Panagro Tarım Hayvancılık Gıda San. ve Tic. A.Ş., Konya, Türkiye

Tween 80	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
UHT Yağsız Süt (%0,1 Yağ)	Pınar Süt Mamülleri Sanayi A.Ş., Eskişehir, Türkiye
Yulaf Ezmesi Agar	Neogen, Michigan, ABD
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya



EK2

BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Agaroz Jel Hazırlama (%0,8, %1 ve %2)

Tartılan 0,8 g ve 1 g agaroz, 100 mL 1X TAE tamponunda ısıtılarak çözündürülmüştür (%0,8'lik ve %1'lik). Tartılan 2 g agaroz, 100 mL 0,5X TBE tamponunda hazırlanmıştır (%2'lik). Hazırlanan agaroz jele, traylere dökülmeden önce, RedSafe nükleik asit boyama solüsyonundan 5 µL ilave edilmiştir.

AgNO₃ Çözeltisi (0,1 N)

4,25 g AgNO₃, 100 mL saf suda çözündürülerek hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.

De Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) (1 L)

Üzerinde yazan talimata göre, 51 g MRS broth, 15 g agar ve 0,1 g sikloheksimid, 1 L saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır (121°C'de 15 dk). Dökme sıcaklığına gelince, petrilere paylaştırılmış ve katılaştırılmıştır.

Dilüsyon Sıvısı Hazırlama (1/4 Kuvvetinde Ringer Çözeltisi)

1 adet ringer tableti, 500 mL saf suda çözündürülmüş, cam tüplere çözüldüğü 9'ar mL konulmuş ve otoklavlanmıştır (121°C'de 15 dk).

dNTP Hazırlama (2,5 mM)

Her biri 100 mM olan dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'den bir mikrosantrifüj tüpüne, sırasıyla, 12,5 µL alınarak, üzerine 450 µL ultra saf su eklenmiş ve tüp iyice karıştırılmıştır.

Fosfat-Sitrat Tampon Çözeltisi (pH 4,5)

0,1 M sitrik asitten 55,9 mL ve 0,2 M Na₂HPO₄.2H₂O'den 44,1 mL alınarak hazırlanmıştır. 0,1 M sitrik asit çözeltisi hazırlamak için, 2,1 g sitrik asit 50 mL saf suda çözündürülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. 0,2 M Na₂HPO₄.2H₂O çözeltisi için ise, 3,6 g Na₂HPO₄.2H₂O tartılarak 50 mL saf suda çözündürülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Gliserol Stok Hazırlama (%20)

YPD sıvı besiyerlerinden 900 µL alınarak cryo tüplerine aktarılmış ve otoklav ile steril edilmiş %50'lik gliserolden 600 µL eklenerek hacim 1,5 mL'ye tamamlanmıştır.

HCl Çözeltisi (0,1 N ve 1 N)

İçine saf su eklenmiş balon jöjeye (yaklaşık 40 mL), 0,1 N HCl için %37'lik HCl'den 0,82 mL, 1 N HCl için ise 8,2 mL konularak hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

İz Element Solüsyonu

0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mL saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır (121°C'de 15 dk).

Jel Yükleme Boyası Hazırlama (6X)

%50'lik gliserolden 6 mL, bromofenol mavisinden 25 mg alınarak, 4 mL ultra saf suda çözündürülmüş ve çözeltinin hacmi ultra saf su ile bir tüpte 10 mL'e tamamlanmıştır.

K_2CrO_4 Çözeltisi (%5)

5 g K_2CrO_4 , 100 mL saf suda çözündürülmüştür.

Kjeldahl İndikatör Çözeltisi

0,01 g metil kırmızısı ve 0,15 g bromkresol yeşili, %70'lik 100 mL etanolde çözündürülmüştür.

Malt Ekstrakt Agar (MEA)

30 g malt ekstraktı, 3 g pepton (soya) ve 15 g agar, 1 L saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır (115°C'de 10 dk). Katı besiyerleri otoklav sonrası, yaklaşık 45 °C'ye gelince, petri kaplarına dökülmüş ve katılaştırılmıştır.

Marker Hazırlama (100 bp, 1kbp ve λ DNA/HindIII)

100 bp'lık ve 1 kbp'lık markerların (GeneRuler, 50 µg) her birinden ayrı ayrı 1 µL alınarak, mikrosantrifüj tüpünde 1 µL TriTrack yükleme boyası (6X) ile karıştırılmış ve 4 µL ultra saf su eklenerek, hacmi 6 µL'ye tamamlanmıştır. λ DNA/HindIII marker, 1 µL λ DNA/HindIII (0,5 µg/µL), 1 µL DNA yükleme boyası (6X) ve 4 µL ultra saf su eklenerek 6 µL olarak hazırlanmıştır.

Maya Ekstraktı-Pepton-Dekstroz (YPD) Sıvı Besiyeri (1 L)

10 g maya ekstraktı, 20 g pepton ve 20 g glikoz/dekstroz, 1 L saf suda çözündürülmüş ve 121°C’de 15 dk otoklavlanmıştır.

Maya Ekstraktı Sükroz (YES) Agar (1 L)

150 g sükroz, 20 g maya ekstraktı, 0,5 g MgSO₄.7H₂O ve iz element solüsyonundan 1 mL alınarak saf suda çözündürülmüştür (121°C’de 15 dk otoklav ile sterilizasyon sonrası pH 6,5). Otoklav sonrası YES agarın pH’ı, fosfat-sitrat tamponu ile 4,5’a ayarlanmıştır.

Mikofenolik Asit (MPA) ve Rokfortin C (ROKC) Standart Çözeltileri

Mikofenolik asit standardı (200 ppm): 10 mg MPA, metanol ile çözündürülmüş ve 50 mL’lik balon jodede hacmi tamamlanarak hazırlanmıştır.

Rokfortin C standardı (100 ppm): 1 mg ROKC metanolde çözündürülerek, 10 mL’lik balon jodede hacmi tamamlanmıştır.

Mobil Fazların Hazırlanması (HPLC için)

Mobil Faz A (40 mM H₃PO₄): 1 L’lik mobil faz şişesine stok H₃PO₄ (%85’lik) çözeltisinden 3,92 mL alınarak saf su ile hacmi tamamlanmıştır.

Mobil Faz B (40 mM H₃PO₄/ACN, 55/45, v/v): 1 L’lik mobil faz şişesine 40 mM H₃PO₄ çözeltisinden 550 mL, asetonitril (ACN)’den 450 mL alınarak karıştırılmıştır. Mobil fazlardan gaz giderme (degassing) işlemi için, hazırlanan mobil fazlar, şişeleri ters çevrilerek 4-5 defa kuvvetlice çalkalanmıştır.

M-17 Agar (1 L)

Üzerinde yazan talimata göre, 42 g M-17 broth, 15 g agar ve 0,1 g sikloheksimid, 1 L saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır (121°C’de 15 dk). Dökme sıcaklığına gelince, petrilere paylaştırılmış ve katılaştırılmıştır.

NaOH Çözeltisi (0,1 N ve 10 N)

0,1 N çözelti için, 4 g NaOH tartılarak 400 mL saf suda çözündürülmüş ve balon jodede hacmi 1 L’ye saf su ile tamamlanmıştır. 10 N için ise, 400 g NaOH tartılmış ve aynı şekilde 1 L çözelti hazırlanmıştır.

Plate Count Agar (PCA) (1 L)

Üzerinde yazan talimata göre, 23,5 g PCA, 1 L saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır (121°C’de 15 dk). Dökme sıcaklığına gelince, petrilere paylaştırılmış ve katılaştırılmıştır.

Patates Dekstroz Agar (PDA) (1 L)

Üzerinde yazan talimata göre, 39 g PDA, 1 L saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır (121°C’de 15 dk). Küflerin izolasyonunda ilk aşamada, otoklav sonrası, filtreden geçirilmiş %10’luk tartarik asitten 14 mL ilave edilerek kullanılmıştır. PDA yatık agar ise, PDA hazırlandıktan sonra cam tüplere 7 mL paylaştırılarak otoklavda steril edilmiş, sterilizasyon sonrası tüplerdeki PDA sıvı iken bir aparat üzerine hafifçe yatırılarak katılaşması sağlanmıştır.

Peynir Agar (1 L)

300 g krem peynir, 16 g agar ve 8 g NaCl, 800 mL saf suda çözündürülmüş ve otoklavda 110°C’de 15 dk steril edilmiştir.

Sodyum Sitrat Çözeltisi (%2)

2 g sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 100 mL saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır.

Sütlü Mikolojik Agar (1L)

10 g pepton (soya), 10 g glikoz ve 15 g agar 900 mL’ye kadar saf suda çözündürülmüş ve 121°C’de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Otoklav sonrası besiyerine, %10 oranında olacak şekilde, 100 mL yağsız süt eklenmiştir.

Stok Primerlerin ve Çalışma Primerlerinin Hazırlanması

100 μM stok primerler, talimatlarında belirtilen oranda ultra saf su eklenerek hazırlanmıştır. Çalışma primerleri de 10 μM ’ye, stok primerlerden 10 μL alınarak, 90 μL ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tampon Çözeltisi (50X ve 1X)

0,5 M EDTA’dan 100 mL, 242 g Tris ve 57,1 mL asetik asit bir balon jojeye aktarılmış ve bir miktar ultra saf suda çözündürülerek hacmi 1 L’ye tamamlanmıştır (50X TAE tamponu). 0,5 M EDTA için, 18,6 g EDTA tartılmış ve 100 mL saf suda

çözündürülerek, 0,1 N NaOH ile pH 8'e ayarlanmıştır. 1X TAE tamponu ise, 50X TAE'den 20 mL alınmış ve bir balon jodede hacmi 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Tris-Borat-EDTA (TBE) Tampon Çözeltisi (5X ve 0,5X)

5X TBE tamponu için, 54 g Tris, 27,5 g borik asit ve 0,5 M EDTA çözeltisinden 20 mL alınarak bir balon jodede hacim 1 L'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır. 0,5X TBE tamponu ise, 5X TBE'den 100 mL alınmış ve bir balon jodede hacmi 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Tris-HCl-EDTA-NaCl (TEN) Tampon Çözeltisi (1X)

1M Tris-HCl (pH 8.0)'den 5 mL, 0,5 M EDTA (pH 8.0)'dan 5 mL ve 1 M NaCl'den 7,5 mL alınarak bir balon jodede hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 1M Tris-HCl çözeltisi için, 12,1 g Tris 100 mL ultra saf suda çözündürülmüş ve 1 N HCl çözeltisi ile pH 8'e ayarlanmıştır. 1 M NaCl çözeltisi ise, 5,85 g NaCl'nin 100 mL ultra saf suda çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Tween 80 Agar (1L)

10 g bactopecton, 5 g NaCl, 0,1 g CaCl₂ ve 15 g agar, 900 mL saf suda çözündürülmüştür. Ayrı olarak, 100 mL %10 Tween 80 çözeltisi de hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Otoklav sonrası 50-55 °C'ye soğutulan besiyerine %10 Tween 80 eklenmiştir

Tween 80 Çözeltisi (%0,1)

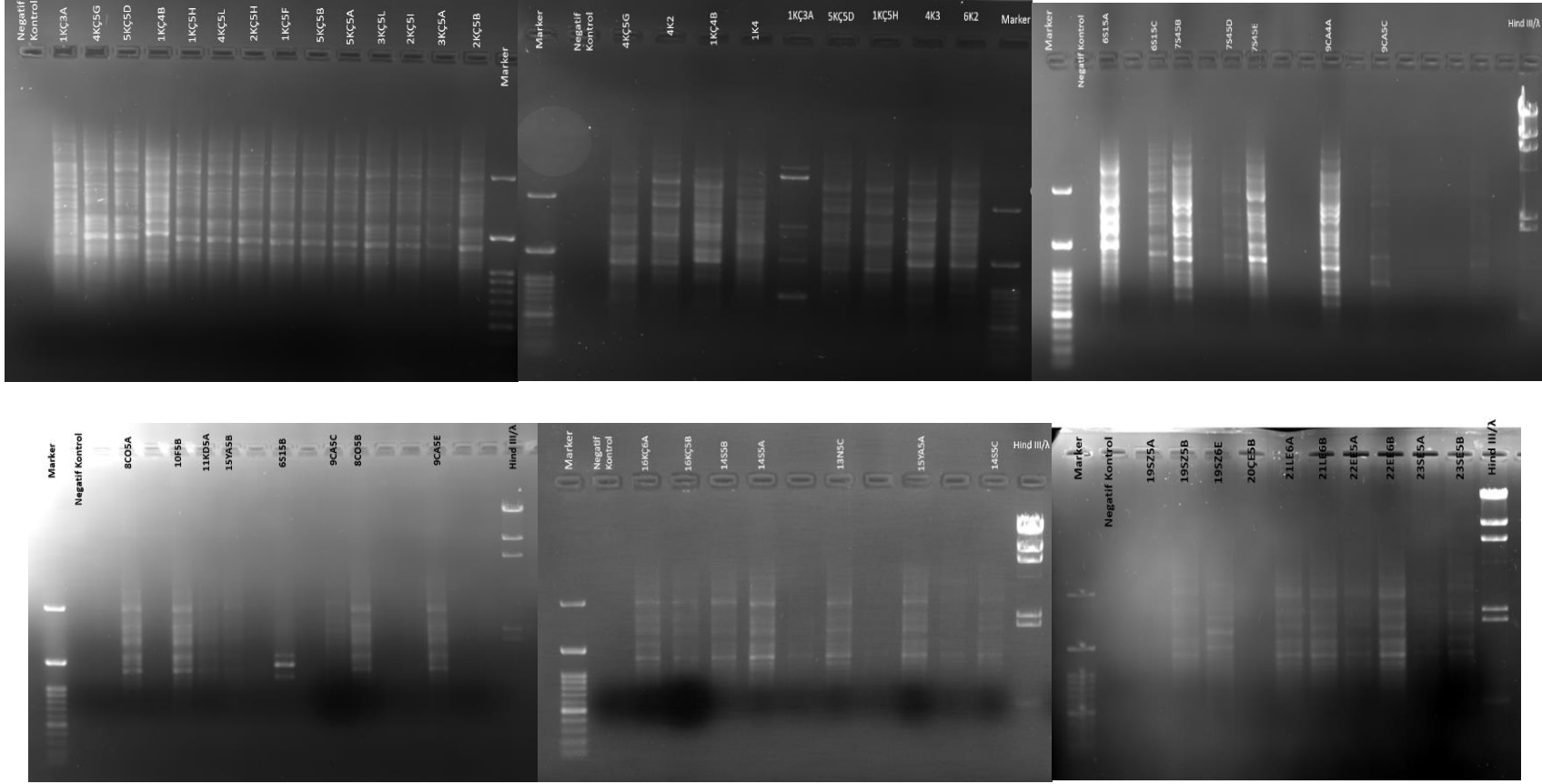
100 µL Tween 80, 100 mL saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır (121°C'de 15 dk).

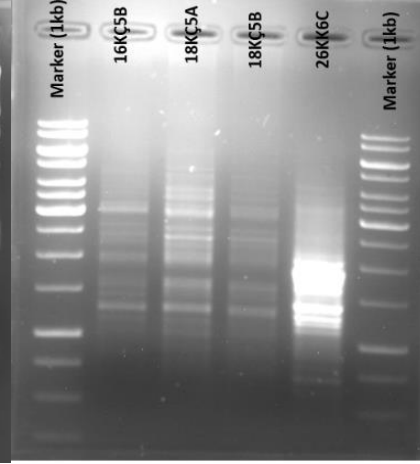
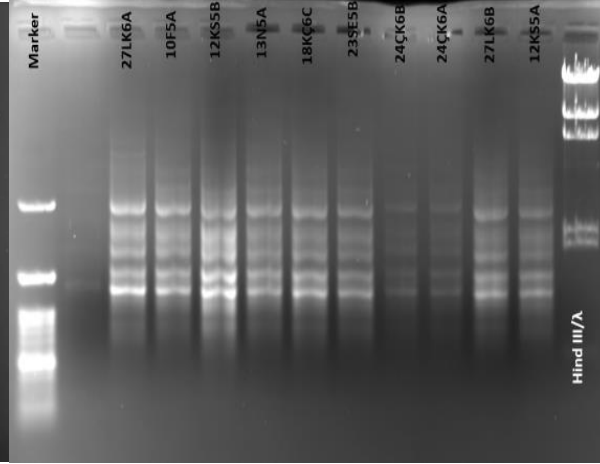
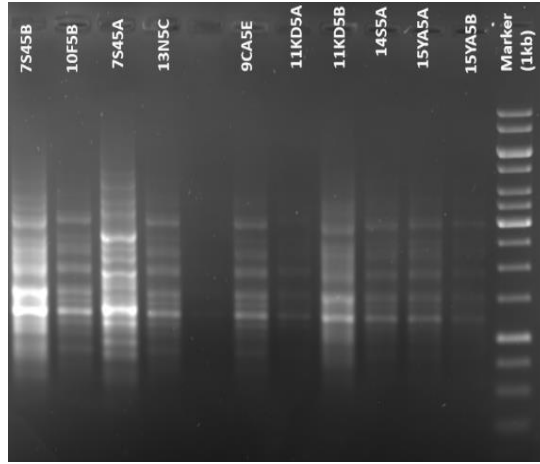
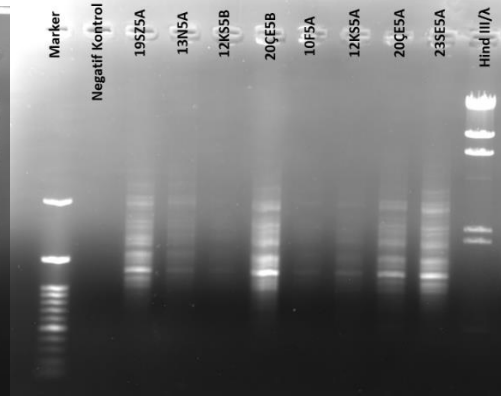
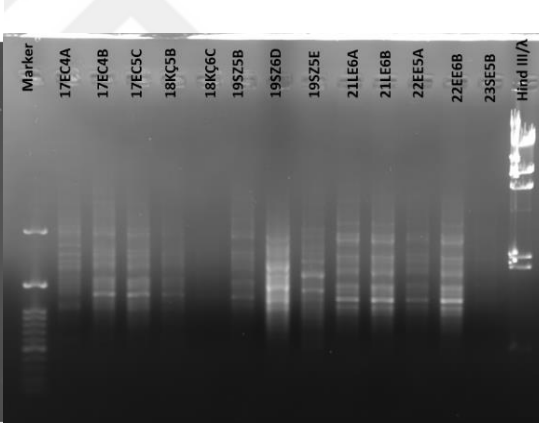
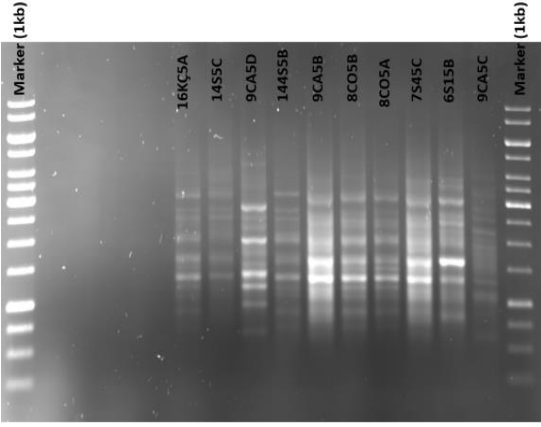
Yulaf Ezmesi (OA) Agar (1L)

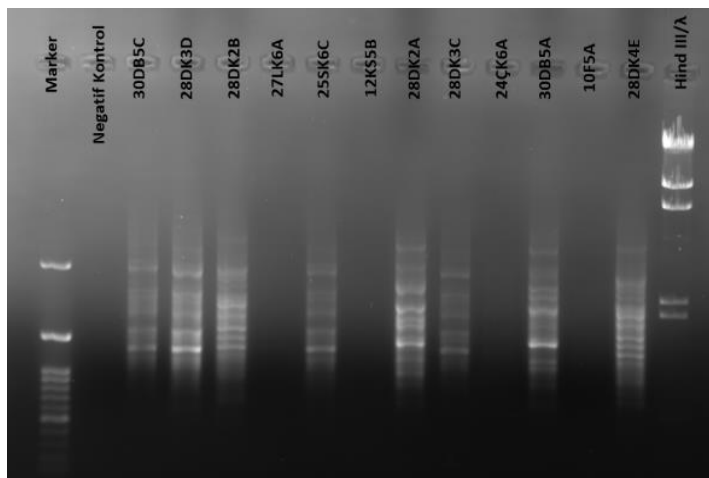
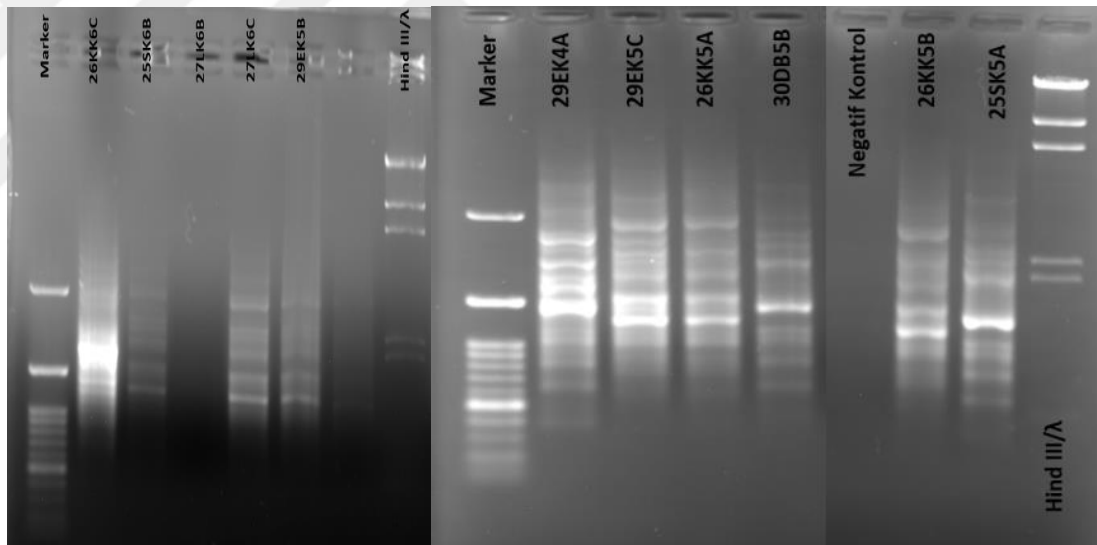
Üzerinde yazan talimata göre, 72,5 g OA, 1 L saf suda çözündürülmüş ve otoklavlanmıştır (121°C'de 15 dk).

EK3

TÜM İZOLATLARIN REP-PCR (GTG5) AMPLİKONLARININ %0,8'LİK AGARUZ JELDE GÖRÜNTÜLERİ



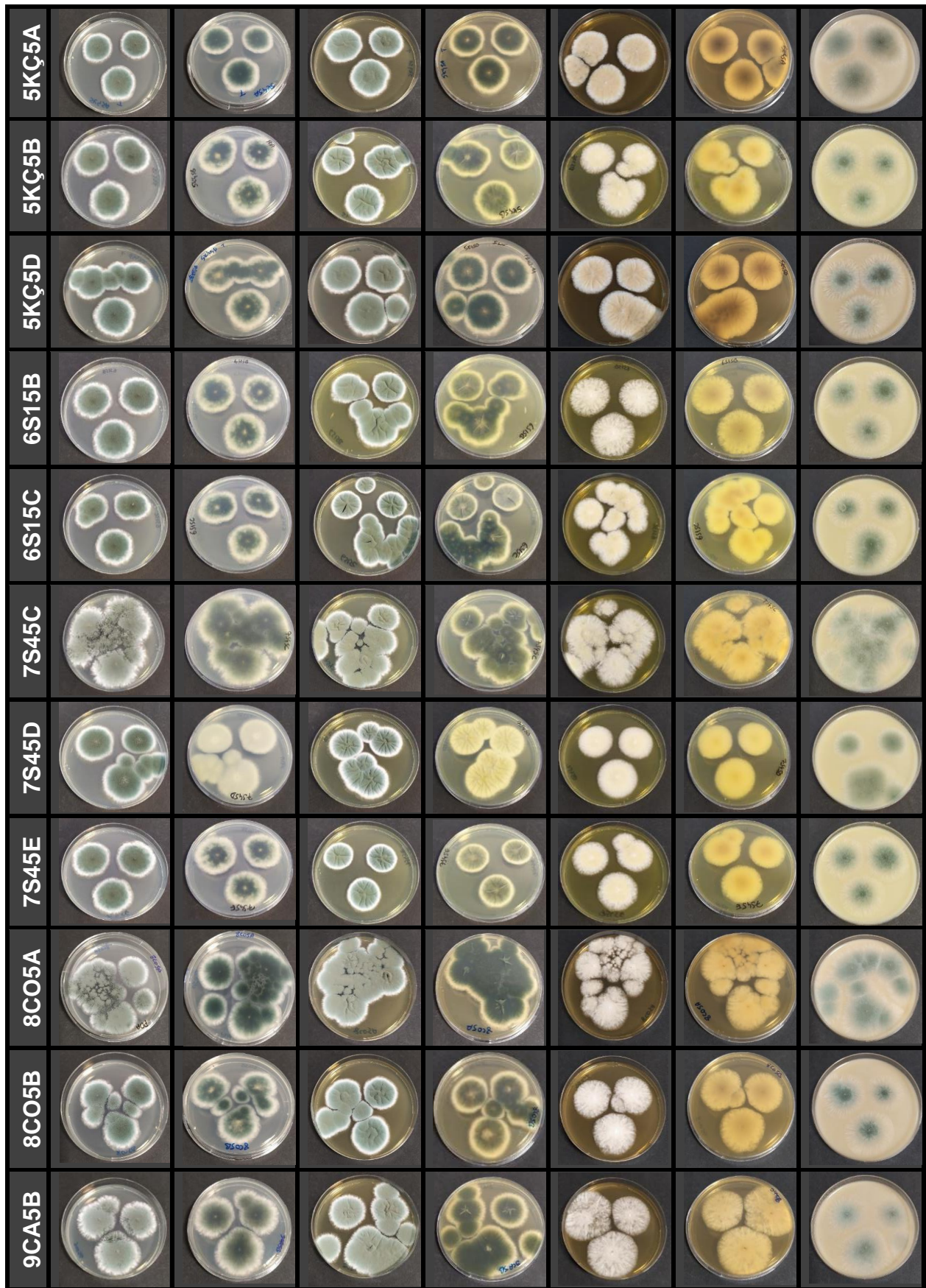


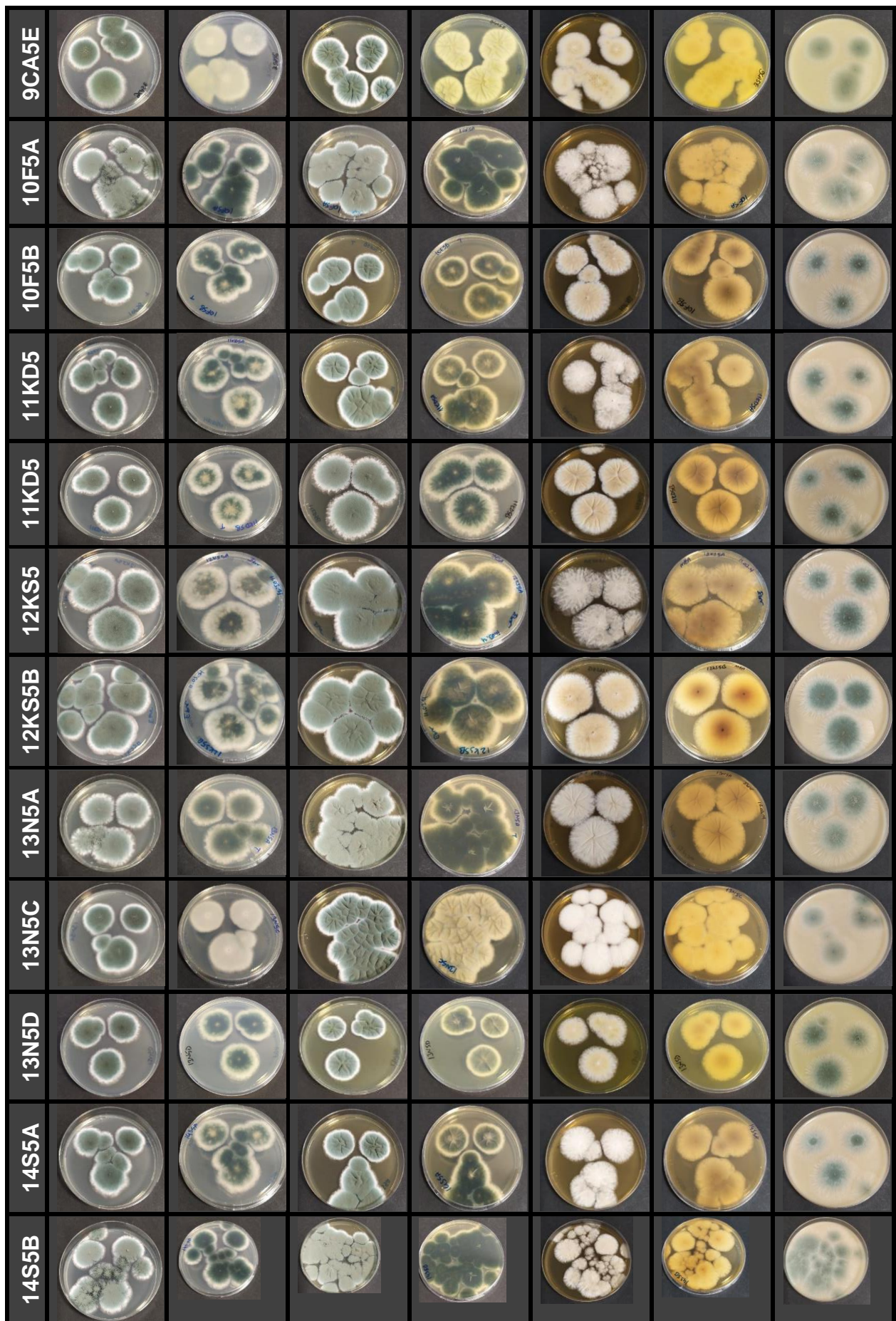


EK4

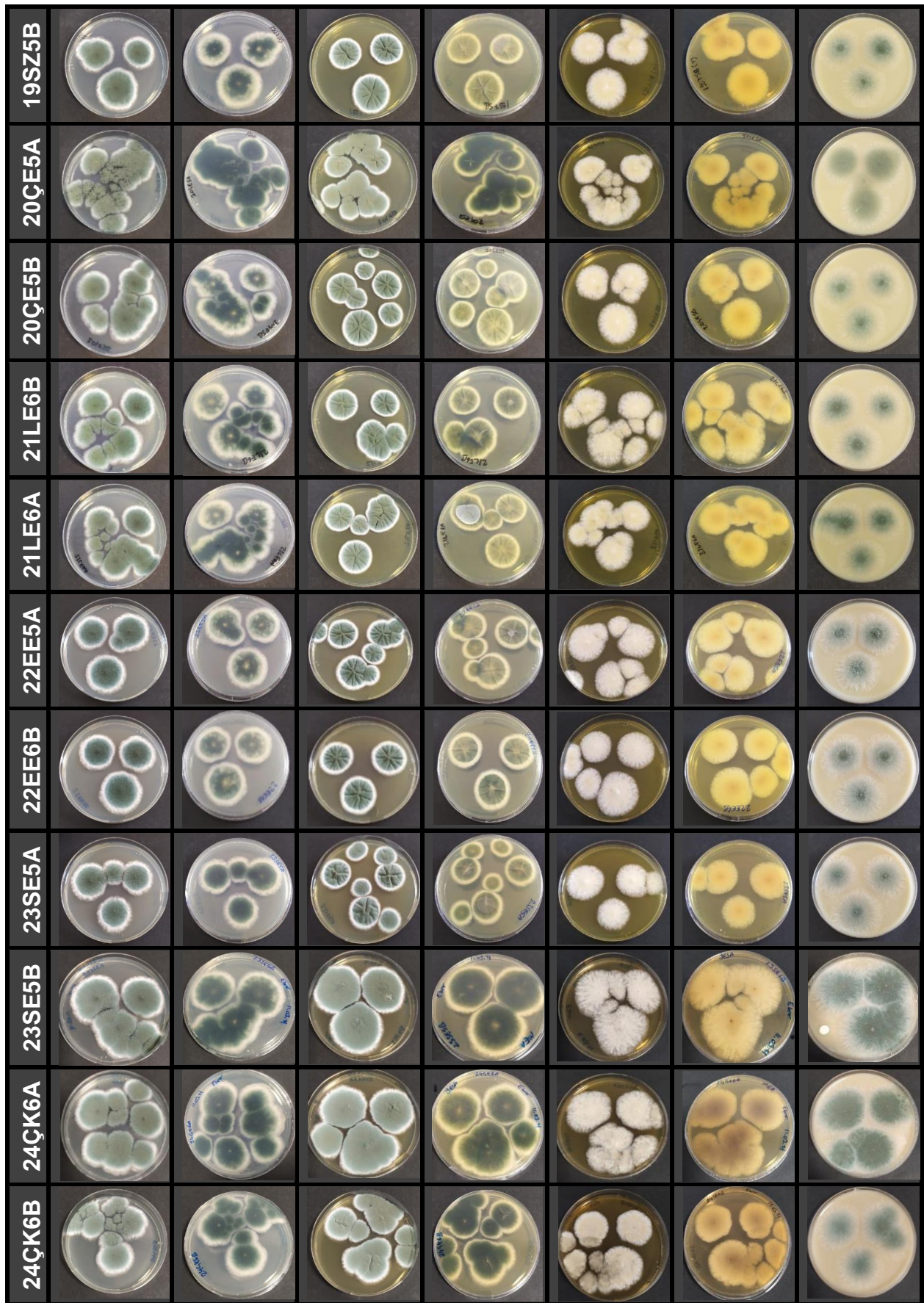
67 *P. ROQUEFORTI* İZOLATININ FARKLI BESİYERLERİNDE KOLONİ MORFOLOJİLERİ

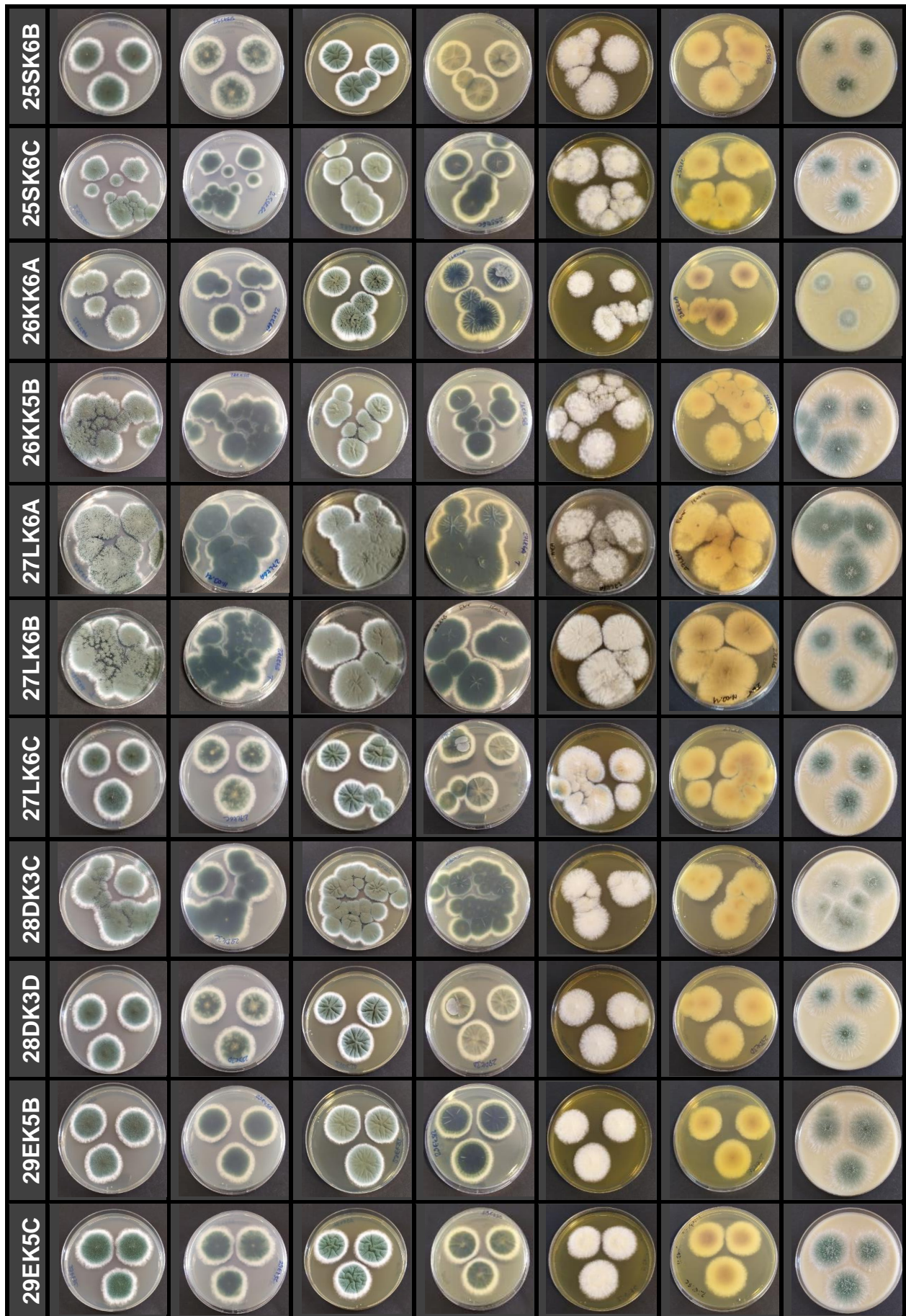








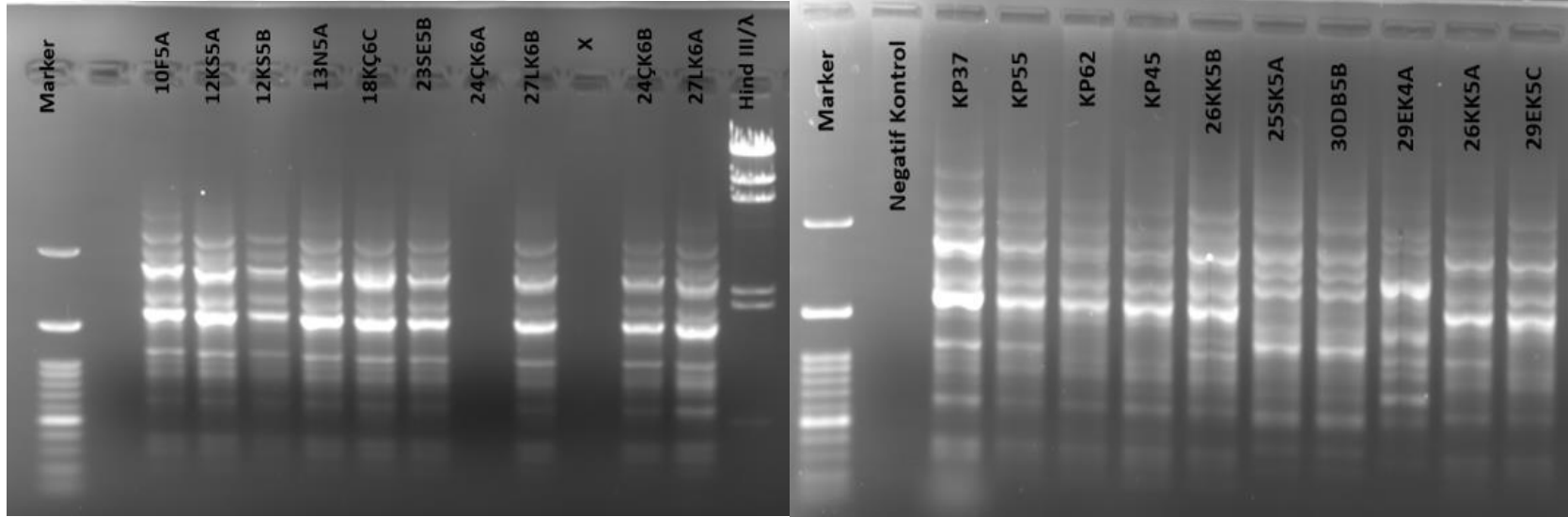


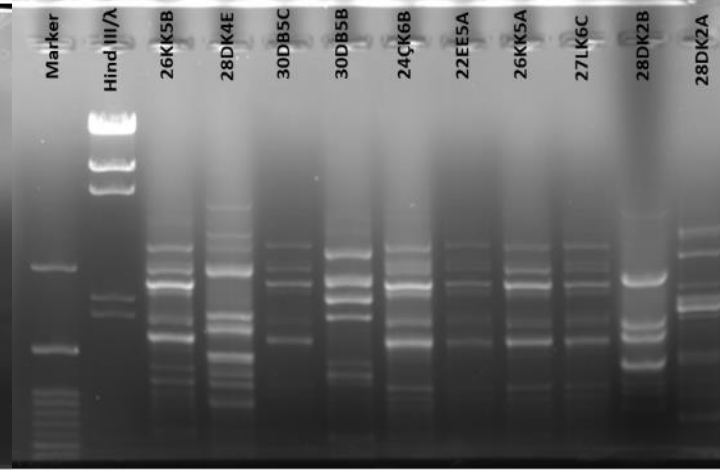
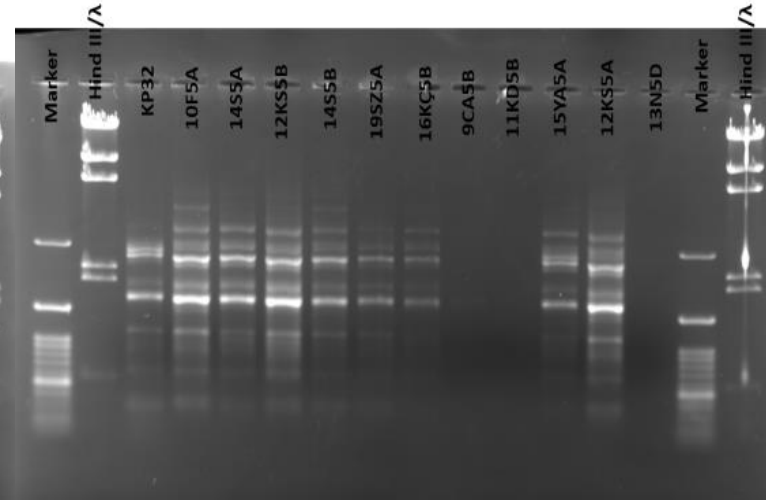
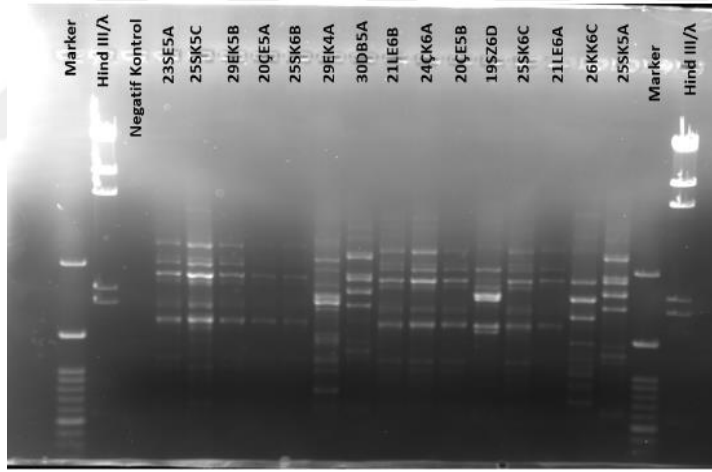
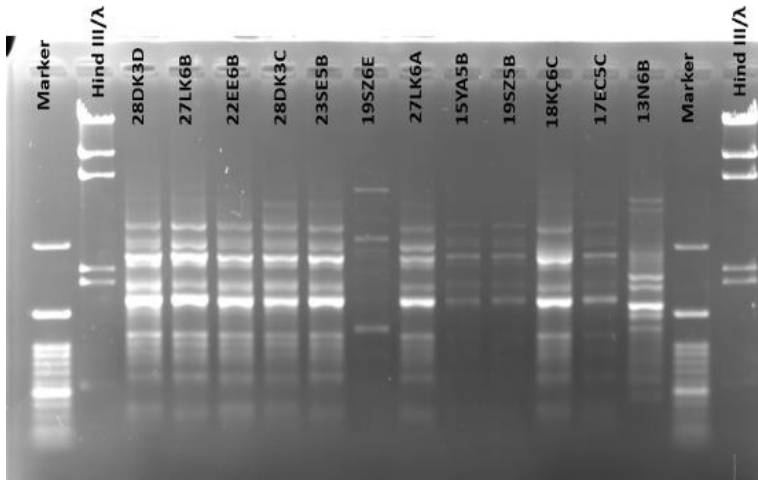


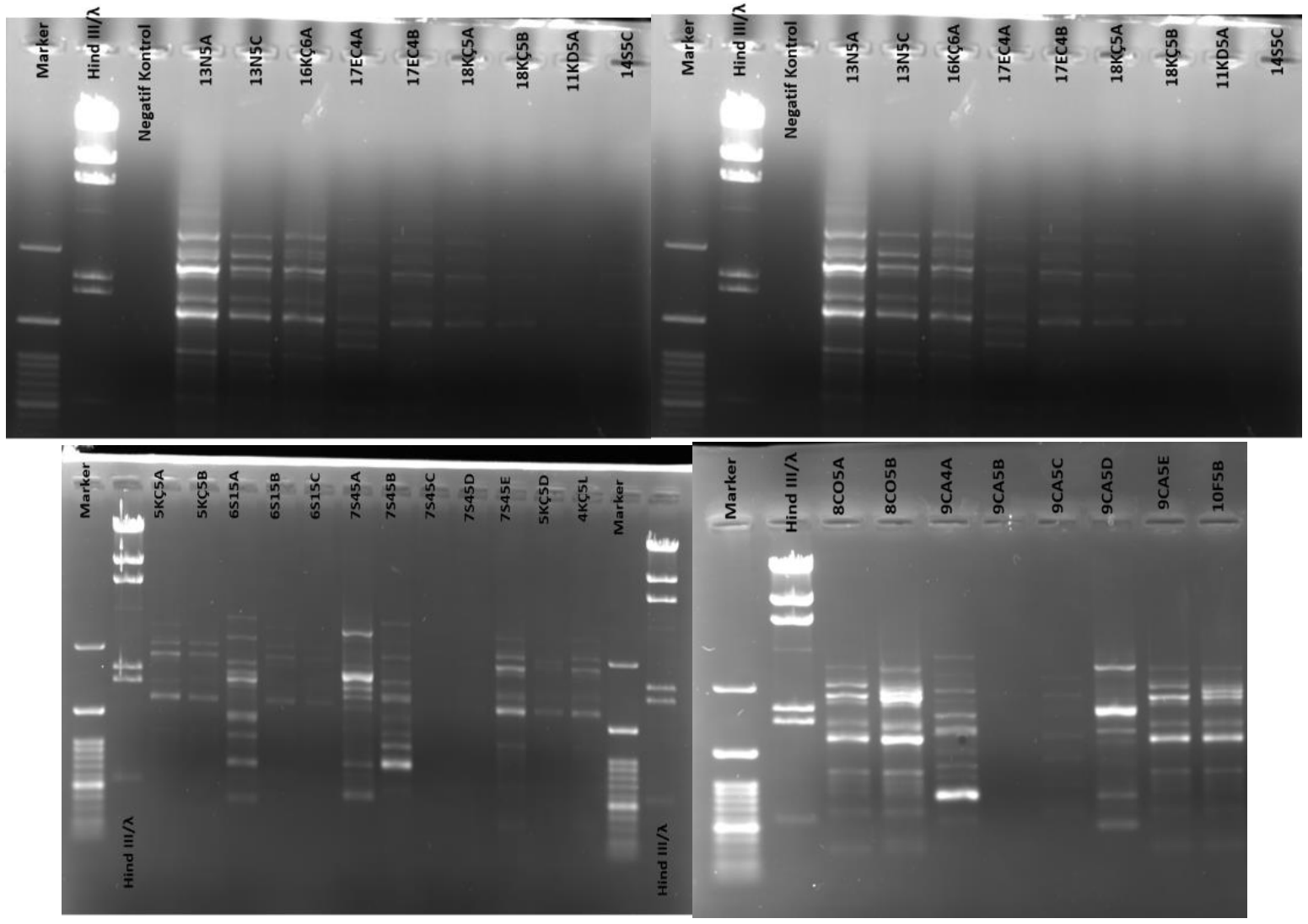


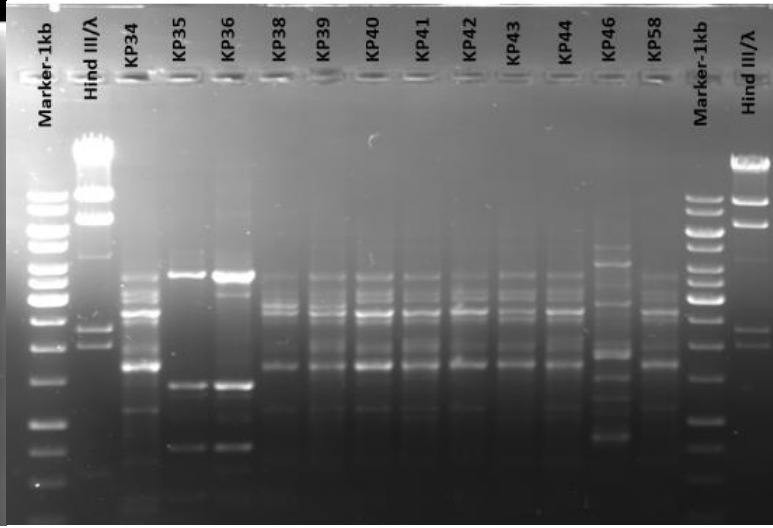
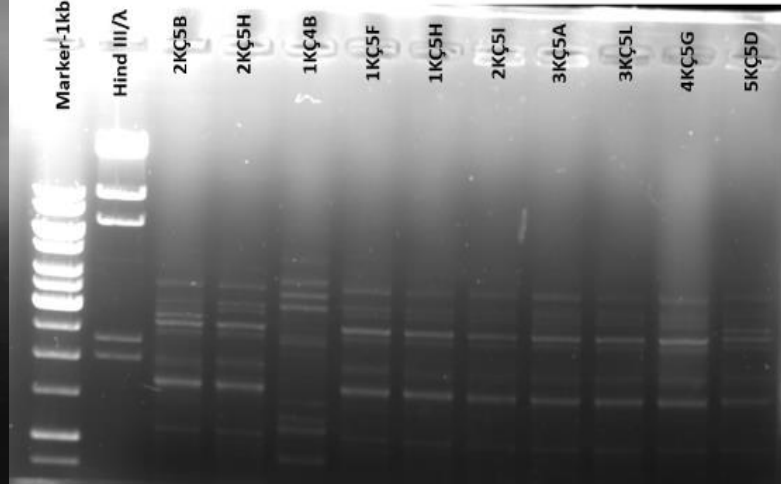
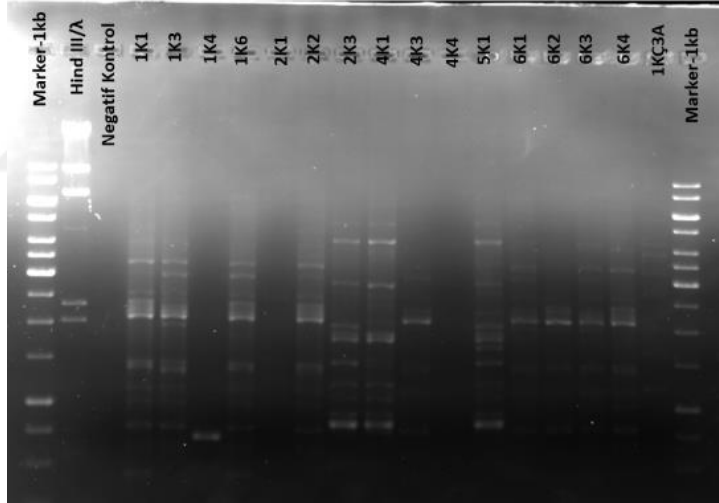
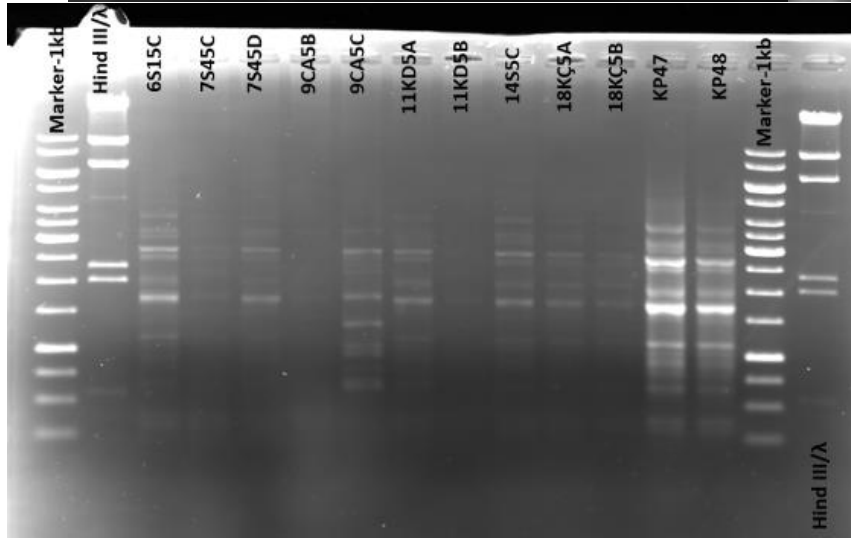
EK5

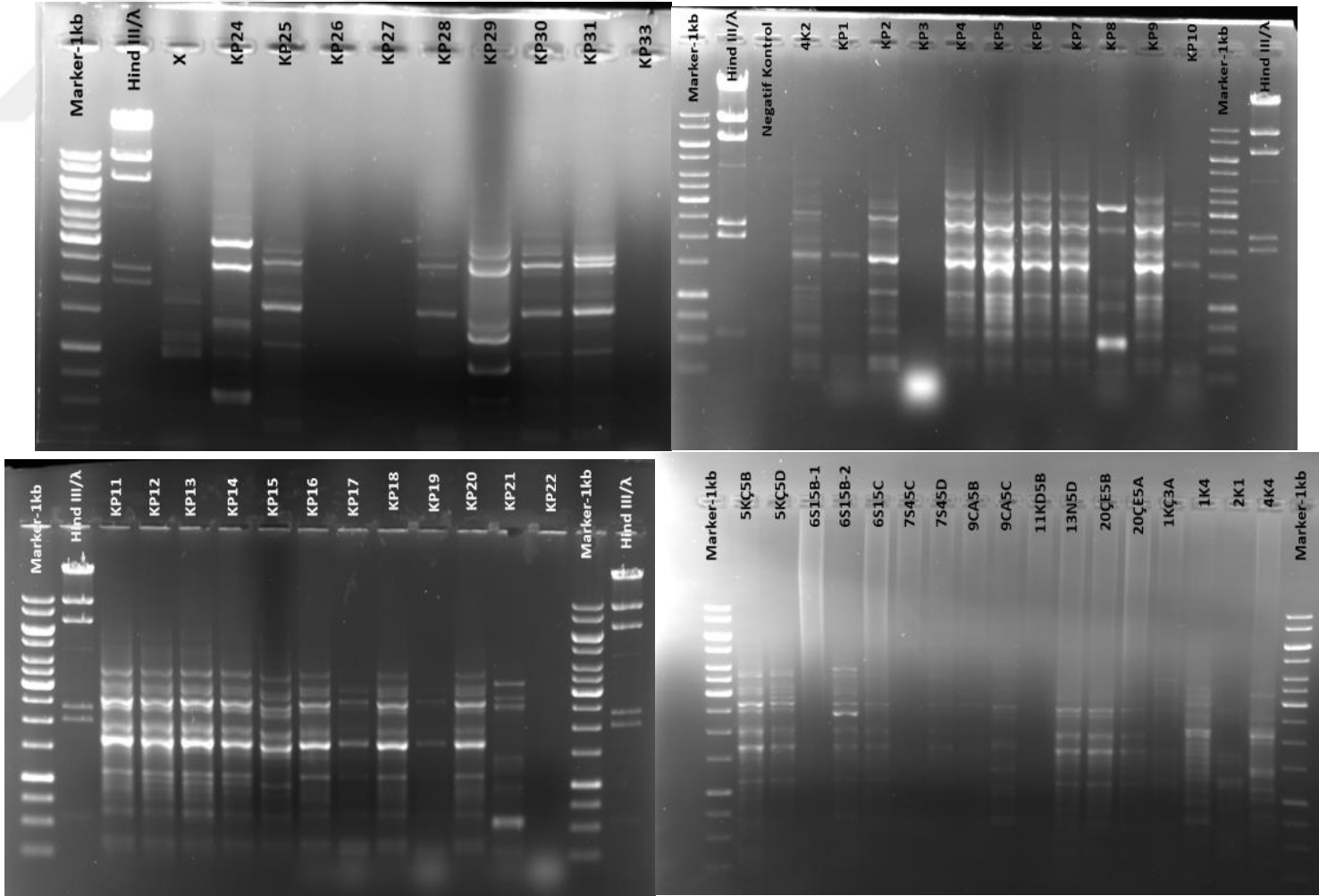
TÜM İZOLATLARIN RAPD-PCR (M13) AMPLİKONLARININ %0,8'LİK AGAROZ JELDE GÖRÜNTÜLERİ

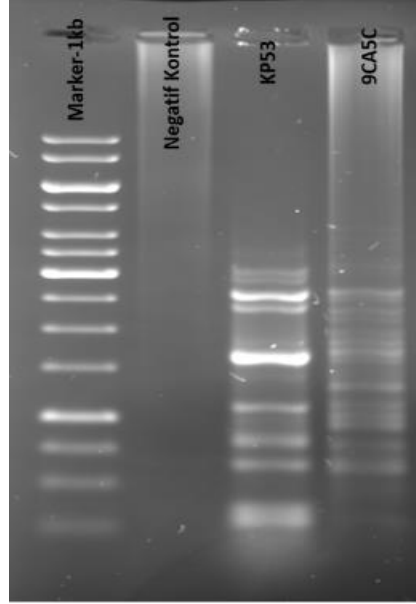
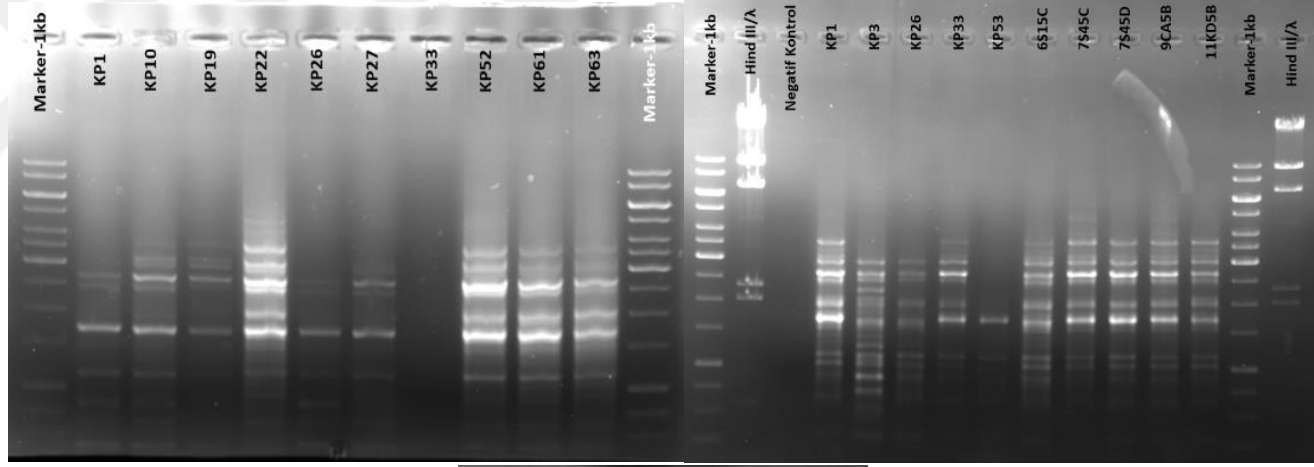












EK6**FİLOGENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN, MAVİ PEYNİRLERDEN VE PEYNİR DIŞI ORTAMLARDAN ELDE EDİLEN *P. ROQUEFORTI* İZOLATLARI İÇİN NCBI DİZİ ID'LERİ LİSTESİ**

İzolat	İzolasyon Kaynağı	NCBI dizi ID'leri (mevcut ise)					Genom Dizisi
		<i>benA</i>	<i>cmd</i>	<i>Proq235</i>	<i>Proq631</i>	<i>Proq845</i>	
CBS221.30NT	Rokfor Peyniri (ABD)	KM503650	HQ442332	KM503673	KM503703	KM503733	
CBS479.84	Küflü Ekmek Mayası	KM503658	KM503774	KM503674	KM503704	KM503734	
CBS498.73	Elma	KM503587	HQ442333	KM503675	KM503705	KM503735	
CBS112579	Sülfid Likörü	KM503656	KM503772	KM503672	KM503702	KM503732	
DSMZ1999	Sığır Eti	KM503521	KM503804	KM503676	KM503706	KM503736	
F4-7	Mavi Peynir (Kanada)			KM503684	KM503714	KM503744	
F10-5	Bleu d'Auvergne Peyniri (Fransa)			KM503677	KM503707	KM503737	
F18-6	Mavi Peynir (İspanya)			KM503678	KM503708	KM503738	
F20-1	Cabrales (İspanya)	KM503534	KM503819	KM503679	KM503709	KM503739	
F28-3	Mavi Peynir (Letonya)			KM503680	KM503710	KM503740	
F36-1	Mavi Peynir (Almanya)	KM503548		KM503681	KM503711	KM503741	
F40-4	Blue des Causses Peyniri (Fransa)	KM503635	KM503777	KM503682	KM503712	KM503742	
F43-1	Rokfor Peyniri	KM503636	KM503780	KM503683	KM503713	KM503743	
F51	Blue du Vercors-Sassenage Peyniri (Fransa)	KM503858	KM503858	KM503685	KM503715	KM503745	
F53	Mavi Peynir (Yeni Zelanda)	KM503597	KM503859	KM503686	KM503716	KM503746	
F65	Mavi Peynir (Arjantin)	KM503589	KM503806	KM503687	KM503717	KM503747	
FM164	Gorgonzola Peyniri	KM503581	KM503848	KM503688	KM503718	KM503748	
IHEM3196	Balgam Örneği	KM503653	KM503909	KM503689	KM503719	KM503749	

LCP00146	Rokfor Peyniri			KM503690	KM503720	KM503750	
LCP04180	Çilek Püresi			KM503691	KM503721	KM503751	
LCP05419	Buzdolabı İç Yüzeyi			KM503692	KM503722	KM503752	
LCP05420	Buzdolabı İç Yüzeyi			KM503693	KM503723	KM503753	
MUCL18048	Mantar Tıpa	KM503654	KM503802	KM503694	KM503724	KM503754	
MUCL35036	Açık Havada Kuruyan Kereste	KM503655	KM503771	KM503695	KM503725	KM503755	
PTX.PR.19.1	Mavi Peynir (Fransa)	KM503640	KM503899	KM503696	KM503726	KM503756	
UBOCC-A-101449	Meyve	KM503582	KM503849	KM503697	KM503727	KM503757	
UBOCC-A-109090	Kayıısı	KM503583	KM503850	KM503698	KM503728	KM503758	
UBOCC-A-110052	Zeytin Salamurası	KM503651	KM503907	KM503699	KM503729	KM503759	
UBOCC-A-111170	Yüzey (Süt İşletmesi)	KM503520	KM503800	KM503700	KM503730	KM503760	
UBOCC-A-111172	Ortam Havası (Süt İşletmesi)	KM503585	KM503770	KM503701	KM503731	KM503761	
ESE00424	Termignon peyniri (Fransa)						SRX19330453
ESE00426	Termignon peyniri (Fransa)						SRX19330454
ESE00428	Termignon peyniri (Fransa)						SRX19330434
ESE00685	Termignon peyniri (Fransa)						SRX19330435

Kaynak: Gillot vd., 2015; Crequer vd., 2023

EK7

**TÜRKİYE KÜFLÜ PEYNİRLERİNDEN ELDE EDİLEN *PENICILLIUM ROQUEFORTI* İZOLATLARININ
GENBANK ERİŞİM NUMARALARI (NCBI ID)**

Sayı	İzolat	İzolasyon Kaynağı	NCBI ID				
			<i>benA</i>	<i>cmd</i>	<i>Proq235</i>	<i>Proq631</i>	<i>Proq845</i>
1	KP12	Konya Küflü Tulum	OR777849	OQ565201	OQ565220	OQ565240	OQ565260
2	KP14	Konya Küflü Tulum	OR777850	OQ565202	OQ565221	OQ565241	OQ565261
3	KP20	Konya Küflü Tulum	OR777851	OQ565211	OQ565231	OQ565251	OQ565271
4	KP25	Konya Küflü Tulum	OR777852	OQ565203	OQ565222	OQ565242	OQ565262
5	KP27	Konya Küflü Tulum	OR777853	OQ565204	OQ565223	OQ565243	OQ565263
6	KP31	Konya Küflü Tulum	OR777854	OQ565205	OQ565224	OQ565244	OQ565264
7	KP44	Konya Küflü Tulum	OR777855	OQ565212	OQ565232	OQ565252	OQ565272
8	KP47	Konya Küflü Tulum	OR777856	OQ565206	OQ565225	OQ565245	OQ565265
9	KP58	Konya Küflü Tulum	OR777857	OQ565207	OQ565226	OQ565246	OQ565266
10	KP59	Konya Küflü Tulum	OR777858	OQ565208	OQ565227	OQ565247	OQ565267
11	4K2	Konya Küflü Tulum	OR777859	OQ565194	OQ565215	OQ565235	OQ565255
12	2KC5H	Küflü Civil-2 (Erzurum)	OQ565166	OQ565193	OQ565213	OQ565233	OQ565253
13	3KC5L	Küflü Civil-3 (Erzurum)	OQ565167	OQ565196	OQ565214	OQ565234	OQ565254
14	7S45D	Küflü Civil-7 (Erzurum)	OR777860	OQ565197	OQ565216	OQ565236	OQ565256
15	9CA5B	Küflü Civil-9 (Erzurum)	OQ565187	OQ565209	OQ565228	OQ565248	OQ565268
16	11KD5B	Küflü Civil-11 (Erzurum)	OQ565170	OQ565198	OQ565217	OQ565237	OQ565257
17	15YA5B	Küflü Civil-15 (Erzurum)	OQ565170	OQ565199	OQ565218	OQ565238	OQ565258
18	17EC4B	Küflü Civil-17 (Erzurum)	OQ565180	OQ565210	OQ565229	OQ565249	OQ565269
19	22EE5A	Küflü Civil-22 (Erzurum)	OQ565174	OQ565174	OQ565219	OQ565239	OQ565259
20	26KK5A	Küflü Tulum-26 (Karaman)	OQ565173	OQ565195	OQ565230	OQ565250	OQ565270

ÖZGEÇMİŞ

Hatice Ebrar Kırtıl

A. EĞİTİM

Doktora: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 2025 (Tam burslu).

Yüksek Lisans: Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 2018.

Lisans: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, 2015 (Tam burslu).

B. AKADEMİK DENEYİM

2017-halen Araştırma Görevlisi, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

C. PROJELERİ

1- Bursiyer: Hatice Ebrar Kırtıl, TÜBİTAK 1001- Türkiye Küflü Peynirlerine Has Küflerin Genetik Özelliklerinin ve *Penicillium roqueforti* Suşlarının Morfolojik ve Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi, Proje no: 119O314, Yürütücü: Doç. Dr. Banu Metin (2019-2022, tamamlandı).

2- Yürütücü: Hatice Ebrar Kırtıl, TÜBİTAK 1002-B- Türkiye Küflü Peynir Popülasyonu *Penicillium roqueforti* İzolatlarının Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Proje no: 124O163, Danışman: Doç. Dr. Banu Metin ve Prof. Dr. Muhammet Arıcı (2024, tamamlandı).

D. YAYINLARI

Makaleler:

Kırtıl, H. E., Orakci, A., Arıcı, M. & Metin, B. (2024). Genetic diversity and population structure of *Penicillium roqueforti* isolates from Turkish blue

- cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 421, 110801. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110801>
- Kirtil, H. E., Cebi, N., Yildirim, R. M., Metin, B. & Arici, M. (2024). A rapid spectroscopic method for the identification of the filamentous fungi isolated from Turkish traditional mold-ripened cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 217-218, 106884. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106884>
- Cakir, E., Kirtil, H. E. & Arici, M., (2024). The effect of different essential oils on antioxidant and shelf life of traditional fermented grain beverage Turkish boza. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* , 30(1), 128-130.
- Buyukduman E., Kirtil H.E. & Metin B. (2022). Molecular identification and technological properties of acetic acid bacteria isolated from Malatya apricot and home-made fruit vinegars. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 50, 81-88. <https://doi.org/10.48022/mbl.2109.09017>
- Kirtil, H.E., Metin, B. & Arici, M. (2021). Identification of filamentous fungi in Turkish mold-ripened cheeses and screening of mycotoxin genes of *Penicillium roqueforti* isolates. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(4), 657–662. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2021.10.4.657-662>
- Pehlivanoğlu, H., Önder, E. & Kirtil, H. E. (2021). İstanbul piyasasında satılan soğuk pres yağların kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 31(3), 644-654. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.780205>
- Kirtil, H. E., Metin, B. & Arıcı, M. (2020). Peynir küfü olarak *Penicillium roqueforti*'nin taksonomisi, morfolojik, genetik ve metabolik özellikleri. *Gıda*, 45(6), 1188-1200. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20091>
- Güneş, Z., Kirtil, H. E., Küçükata, Y. Ş. & Toprak, B. (2020). Şeker pancarı ve yan ürünlerinden biyoyakıt (etanol) üretimi ve biyoetanolün endüstriyel kullanımının değerlendirilmesi. *İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(2), 16-24.

Bildiriler:

- Kirtil, H. E., & Metin, B. (2024). Characterization of *Penicillium roqueforti* isolates from Turkish traditional blue cheeses technological properties and volatile compounds. Microbiology Society Annual Conference 2024 (8-11 Nisan), Edinburgh, İskoçya (Poster Bildiri).
- Metin, B. & Kirtil, H. E. (2023). Türkiye küflü peynirlerinin küf biyotası ve bu peynirlerden elde edilen *P. roqueforti* izolatlarının popülasyon yapısı ile genetik çeşitliliği. 13. Gıda Mühendisliği Kongresi (2-4 Kasım), Ankara, Türkiye (Sözlü Bildiri).
- Kirtil, H. E. & Metin, B. (2023). Geleneksel Küflü Peynirlerden İzole Edilmiş *Penicillium roqueforti* Suşlarının Teknolojik ve Metabolik Özellikleri ile Uçucu Bileşen Profili. 13. Gıda Mühendisliği Kongresi (2-4 Kasım), Ankara, Türkiye (Poster Bildiri).
- Kirtil, H. E. & Metin, B. (2023). Genetic diversity and population structure of *Penicillium roqueforti* isolates from Turkish blue cheeses. 16th European Conference on Fungal Genetics (5-8 Mart), Innsbruck, Avusturya (Poster Bildiri).
- Kirtil, H. E., Arıcı, M. & Metin, B. (2023). Geleneksel küflü peynirlerden izole edilmiş *Penicillium roqueforti*'lerin teknolojik ve metabolik özellikleri ile uçucu bileşen profili. Türkiye 1. Gıda Mikrobiyolojisi Kongresi (13-16 Eylül), Erzurum, Türkiye (Poster Bildiri).
- Kirtil, H. E., Arıcı, M. & Metin, B. (2023). Technological and metabolic properties and volatile compounds of *Penicillium roqueforti* isolated from Turkish traditional blue cheeses. BioTürkiye 2023 (28-30 Eylül), İstanbul, Türkiye (Poster Bildiri).
- Metin, B. & Kirtil, H. E. (2023). Türkiye küflü peynirlerinin mikrobiyotası bu peynirlerden izole edilen *P. roqueforti* popülasyonunun yapısı ve genetik çeşitliliği. III. Ulusal Sütçülük Kongresi (5-6 Ekim), Ankara, Türkiye (Sözlü Bildiri).

- Kirtil, H. E., & Metin, B. (2023). Population diversity of *Penicillium roqueforti* isolates of Turkish mold-ripened cheeses. Microbiology Society Annual Conference 2023 (17-20 Nisan), Birmingham, İngiltere (Poster Bildiri).
- Kirtil, H. E., & Metin, B. (2023). Metabolic characteristics and aroma compounds of *Penicillium roqueforti* isolates from Turkish blue cheeses. FEMS 2023 (9-13 Temmuz), Hamburg, Almanya (Poster Bildiri).
- Kirtil, H. E., & Metin, B. (2022). Genetic diversity and the population structure of *Penicillium roqueforti* isolates from Turkish mold-ripened cheeses. 7th International Food Safety Congress (3-4 Kasım), İstanbul, Türkiye (Poster Bildiri).
- Kirtil, H. E., & Metin, B. (2021). Filamentous fungi isolated from Turkish mold-ripened cheeses and the diversity of *Penicillium roqueforti* isolates. World Microbe Forum (20-24 Haziran), Online (E-poster Bildiri).
- Kirtil, H. E., Cebi, N., Metin Yildirim, R., Metin, B., & Arici, M. (2021). Identification of *Penicillium* spp. in Turkish mold-ripened cheeses by FT-IR spectroscopy. IDF International Cheese Science and Technology Symposium (7-11 Haziran), Online (E-poster Bildiri).
- Kirtil, H. E., Arici, M., & Metin, B. (2021). Filamentous fungi of Turkish mold-ripened cheeses and genetic characteristics of *Penicillium roqueforti* strains. IDF International Cheese Science and Technology Symposium (7-11 Haziran), Online (Sözlü Bildiri).
- Kirtil, H. E. & Metin, B. (2021). Identification of fungal species from Turkish mold-ripened cheeses and the morphological and genetic diversity of *Penicillium roqueforti* isolates. International Conference on Raw Materials to Processed Foods (3-4 Haziran), Online (Sözlü Bildiri).
- Metin, B. & Kirtil, H. E. (2020) Diversity of *Penicillium roqueforti* isolates from Turkish mold-ripened cheeses. 15th European Conference on Fungal Genetics (17-20 Şubat), Roma, İtalya (Poster Bildiri).
- Güneş, Z. S., Kirtil, H. E., Küçükata, Y. Ş. & Toprak, B. (2020). Şeker pancarı ve yan ürünlerinden biyoyakıt etanol üretimi. 1. İZÜ Fen Bilimleri Lisansüstü Öğrenci Kongresi (13-14 Haziran), Online (Sözlü Bildiri).

Kırtıl, H. E., Çakır, E., Durak, M. Z. & Arıcı, M. (2018). Comparison of molecular identification of moulds isolated from Turkish traditional mould-ripened cheeses by using 5.8S rRNA and 28S rRNA gene regions. I. International Agricultural Science Congress (9-12 Mayıs), Van, Türkiye (Poster Bildiri).

Pehlivanoğlu, H., Kırtıl, H. E. & Önder, E. (2018). İstanbul'da satışa sunulan soğuk pres yağların bazı fizikokimyasal özellikleri. International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (22-23 Kasım), Ankara, Türkiye (Poster Bildiri).

Çakır, E., Kırtıl, H. E., Durak, M. Z. & Arıcı, M. (2017). Some properties of essential oil added Turkish traditional beverage boza. I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants (10-12 Mayıs), Konya, Türkiye (Poster Bildiri).

Kitap Bölümü:

Küçükata, Y.Ş., Kırtıl, H.E., Ermiş, E. (2024). Freeze-Drying of Probiotics for the Incorporation in Functional Foods. In Freeze Drying of Food Products (eds R.B. Waghmare, M. Kumar and P.S. Panesar). <https://doi.org/10.1002/9781119982098.ch6>

E. BURSLAR VE ÖDÜLLER

Microbiology Society UK Konferans Katılım Bursu, İskoçya, Nisan 2024.

Türkiye 1. Gıda Mikrobiyolojisi Kongresi Poster Mansiyon Ödülü, Erzurum, Eylül 2023.

Microbiology Society UK Konferans Katılım Bursu, İngiltere, Nisan 2023.

TÜBİTAK 2224-A Yurt Dışı Bilimsel Etkinliklere Katılımı Destekleme Programı Bursu, Almanya, Temmuz 2023.

FEMS Konferans Katılım Bursu (FEMS Grant), Almanya, Temmuz 2023.

FEMS Konferans Katılım Bursu (FEMS Grant), Avusturya, Mart 2023.

Tübitak 1001 Projesi Bursiyeri, 2019-2021.

Lisans, Bölüm İkinciliği, 2015.