

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜFLÜ PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN KÜFLERİN MOLEKÜLER
TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

HATİCE EBRAR KIRTIL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. MUHAMMET ARICI**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜFLÜ PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN KÜFLERİN MOLEKÜLER
TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Hatice Ebrar KIRTIL tarafından hazırlanan tez çalışması 20.11.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

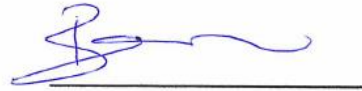
Prof. Dr. Muhammet ARICI
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Muhammet ARICI
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. M. Zeki DURAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince, ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, derin bilgisiyle ve anlayışıyla bana her daim destek olan, kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya,

Bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım, Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN, Doç. Dr. M. Zeki DURAK, Dr. Öğr. Üyesi Gökem ÖZÜLKÜ ve Arş. Gör. Ruşen METİN YILDIRIM'a,

Tez çalışmam boyunca, geç saatler, hafta sonu demeden laboratuvarında birlikte çalıştığım ve kendisinden birçok şey öğrendiğim ekip arkadaşım, doktora öğrencisi Elif ÇAKIR'a,

Yıldız Teknik Üniversitesi ve İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümlerindeki tüm hocalarıma,

Maddi-manevi her konuda, her zaman yanımda olan annem ve babam, Halime ve Enver KIRTIL başta olmak üzere, sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Kasım, 2018

Hatice Ebrar KIRTIL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	3
1.3 Hipotez.....	3
BÖLÜM 2	
LİTERATÜR TARAMASI	5
2.1 Küflü Peynirler	5
2.1.1 Dünya’da Küflü Peynir Üretimi ve Çeşitleri	6
2.1.1.1 İç Kısımları Küflendirilmiş Peynirler	7
2.1.1.2 Yüzeyi Küflendirilmiş (Yumuşak, Yarı Sert ve Sert) Peynirler	9
2.1.2 Geleneksel Küflü Peynirlerimiz.....	11
2.1.3 Küflü Peynirlerin Mikrobiyotası.....	13
2.2 Peynirlerde Küf Çeşitliliği	14
2.2.1 Küflerin Metabolizması.....	16
2.2.2 Spontan Küf Gelişimi	16
2.2.3 Ticari Kültürler	17
2.3 <i>Penicillium</i> spp. ve <i>Penicillium roqueforti</i>	18
2.4 Küflü Peynirlerde Mikotoksin Riski.....	20
2.4.1 Rokfortin C ve Biyosentezi.....	22
2.4.2 Mikofenolik Asit ve Biyosentezi.....	23
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT.....	25
3.1 Materyal	25

3.1.1	Peynir Örnekleri.....	25
3.1.2	Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar	26
3.2	Metot	28
3.2.1	Mikrobiyolojik Ön Hazırlık (Besiyerlerinin Hazırlanması)	28
3.2.2	Küflü Peynirlerden Küf İzolasyonu.....	28
3.2.3	İzole Edilen Küflerin Saflaştırılması.....	28
3.2.4	Morfolojik İnceleme	29
3.2.5	Kültür Stoklarının Oluşturulması ve Depolanması	29
3.2.6	Saf İzolatların Genotipik Tanımlanması ve Karakterizasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR)	29
3.2.6.1	Genomik DNA İzolasyonu.....	30
3.2.6.2	28S D1/D2 rRNA Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu	31
3.2.6.3	ITS1-5.8S-ITS2 rRNA Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu	31
3.2.6.4	PCR Karışımının Hazırlanması.....	31
3.2.6.5	PCR Ürünlerinin (Amplikon) Yürütülmesi ve Görüntülenmesi.....	32
3.2.6.6	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması (Clean-up).....	33
3.2.6.7	Sekans ve BLAST Analizi	34
3.2.6.8	28S D1/D2 ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA Gen Bölgelerinin Filogenetik Ağaçlarının Oluşturulması.....	34
3.2.7	Mikroskobik İnceleme	34
3.2.7.1	Işık Mikroskobunda Görüntüleme	34
3.2.7.2	Lam Kültürünün Hazırlanması.....	34
3.2.7.3	Laktofenol Pamuk Mavisi ile Boyama	35
3.2.7.4	Taramalı Elektron Mikroskobunda Görüntüleme	36
3.2.8	Tanımlanan Küflerin (<i>Penicillium roqueforti</i>) Muhtemel Mikotoksin Genlerinin Tespiti	36
3.2.8.1	Primer Dizaynı	36
3.2.8.2	PCR ile Mikotoksin Genlerinin Taranması.....	37
3.2.9	Sentetik Besiyerinde Küflerin (<i>Penicillium roqueforti</i>) Mikotoksin Üretimlerinin İncelenmesi	38
3.2.9.1	Küf Kültürlerinin Aktive Edilmesi.....	38
3.2.9.2	Mikotoksin Ekstraksiyonu	38
3.2.9.3	LC-MS/Q-TOF ile Mikotoksin Tespiti	39
BÖLÜM 4		
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA		41
4.1	İzolatların Morfolojik Özellikleri	41
4.2	Mikroskobik İnceleme	48
4.2.1	İzolatların Boyamadan ve Laktofenol Pamuk Mavisi ile Boyayarak Işık Mikroskobunda İncelenmesi	48
4.2.2	İzolatların Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) İncelenmesi	53
4.3	İzolatların Genotipik Tanımlanması.....	55
4.3.1	28S D1/D2 rRNA Dizi Analizi Sonuçları	56
4.3.2	ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (ITS) Dizi Analizi Sonuçları	60
4.3.3	İzolatların 28S D1/D2 rRNA ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA Gen Bölgeleri BLAST Sonuçlarının Karşılaştırılması	64

4.3.4	İzolatların Filogenetik İlişkisi.....	68
4.4	Tanımlanan <i>Penicillium roqueforti</i> İzolatlarının Mikotoksin Genlerinin Varlığı.....	73
4.4.1	<i>Penicillium roqueforti</i> İzolatlarında Rokfortin C Üretiminden Sorumlu <i>rds/roqA</i> Geninin Taranması	73
4.4.2	<i>Penicillium roqueforti</i> İzolatlarında Mikofenolik Asit Üretiminden Sorumlu <i>mpaC</i> Geninin Taranması.....	74
4.5	Seçilen <i>Penicillium roqueforti</i> İzolatlarında Mikotoksin (Rokfortin C ve Mikofenolik Asit) Üretim Yeneteklerinin LC-MS/Q-TOF ile Belirlenmesi ..	75
4.5.1	İzolatların Rokfortin C Üretimi.....	76
4.5.2	İzolatların Mikofenolik Asit Üretimi	78
4.5.3	Diğer Metabolitler	79
 BÖLÜM 5		
SONUÇ VE ÖNERİLER		82
KAYNAKLAR		84
EK-A		
SEKANS SONUÇLARI		92
EK-B		
HEDEF MİKOTOKSİN GENLERİNİN SEKANS SONUÇLARI		111
EK-C		
TOPLAM BİLEŞEN KROMATOGRAMLARI.....		113
ÖZGEÇMİŞ		114

SİMGE LİSTESİ

bp	Baz Çifti Uzunluğu
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Bakır Sülfat Pentahidrat
C/N	Karbon-Azot Oranı
ESI+	Pozitif Modda Elektrosprey İyonlaşma
ESI-	Negatif Modda Elektrosprey İyonlaşma
g	Gram
$[\text{H}^+]$	Hidrojen İyonu
KH_2PO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
kV	Kilovolt
L	Litre
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
NaCl	Sodyum Klorür
rpm	Dakikada Devir Sayısı
T_m	Primerin Erime Sıcaklığı
W	Watt
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Çinko Sülfat Heptahidrat
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

BLAST	Temel Yerel Hizalama Aracı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetat
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
IDF	Uluslararası Sütçülük Federasyonu
ITS	Internal Transcribed Spacer Gen Bölgesi
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LC-MS/ Q-TOF	Sıvı Kromatografisi- Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi
LFPM	Laktofenol Pamuk Mavisi
LSU	Large Subunit Gen Bölgesi
MEA	Malt Ekstrakt Agar
PAS	Peynir Altı Suyu
PCI	Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patato Dekstroz Agar
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
sp.	Tür
spp.	Türler
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA Buffer
TE	Tris-EDTA Buffer
UV	Ultraviyole Işınları
YESA	Yeast Ekstrakt Sükroz Agar

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 Genel hatlarıyla küflü peynir üretimi.....	5
Şekil 2. 2 Roquefort mahzeni (a), Roquefort peyniri (b), Danablu (c), Cabrales (d), Gorgonzola (e), Stilton (f).....	8
Şekil 2. 3 Norveç tipi Gamalost peyniri.....	9
Şekil 2. 4 Camembert ve Brie peynirleri.....	10
Şekil 2. 5 Çamurumsu yüzey peynirler; <i>Geotrichum candidum</i> , peynir yüzeyi (a), Limburger (b), Taleggio (c).....	11
Şekil 2. 6 Civil peyniri.....	12
Şekil 2. 7 Gök peynir.....	13
Şekil 2. 8 Diğer yöresel peynirlerimiz; Sürk (a), Küflü Tulum (b), Küflü Küp/Çömlek (c), Tomas (d), Divle Obruk (e).....	13
Şekil 2. 9 <i>Penicillium roqueforti</i> ve Roquefort peyniri (a), <i>Penicillium camemberti</i> ve Camembert peyniri (b).....	14
Şekil 2. 10 Peynirde spontan küf gelişimi.....	17
Şekil 2. 11 Bazı ticari küf starterleri.....	18
Şekil 2. 12 Dallanma özelliği gösteren farklı <i>Penicillium</i> türlerinin hif yapıları.....	19
Şekil 2. 13 Rokfortin grubu ve Rokfortin C'nin biyosentez yolu (a), <i>P.chrysogenum</i> ve <i>P.roqueforti</i> 'de bulunan Rokfortin gen kümesi ve Rokfortin C molekülü (b).....	23
Şekil 2. 14 Mikofenolik asitin biyosentez yolu (a), <i>P.roqueforti</i> 'de bulunan mikofenolik asit gen kümesi (b).....	24
Şekil 3. 1 Konya Küflü (1, 4) ve Erzurum Küflü Civil (15) Peyniri Örnekleri.....	25
Şekil 3. 2 Fungal genomda 18S, 5.8S ve 28S rRNA gen bölgelerinin şematik gösterimi.....	29
Şekil 3. 3 Lam kültürünün hazırlanması.....	35
Şekil 3. 4 Mikotoksin ekstraksiyon aşamaları.....	39
Şekil 4. 1 1Y5D (1:PDA ön, 2:PDA arka, 3:MEA ön, 4: MEA arka) ve 4Y5B (5:PDA ön, 6:PDA arka, 7:MEA ön, 8: MEA arka) kodlu izolatların PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri (<i>Penicillium roqueforti</i>).....	43
Şekil 4. 2 12F (9:PDA ön, 10:PDA arka, 11:MEA ön, 12: MEA arka) ve 17Y5D (13:PDA ön, 14:PDA arka, 15:MEA ön, 16: MEA) arka kodlu izolatların PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri (<i>Penicillium roqueforti</i>).....	44

Şekil 4. 3	4Y5D (17:PDA ön, 18:PDA arka, 19:MEA ön, 20: MEA arka; <i>Penicillium crustosum</i>) ve 31A (21:PDA ön, 22:PDA arka, 23:MEA ön, 24: MEA arka; <i>Penicillium commune</i>) kodlu izolatların PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri.....	45
Şekil 4. 4	13B (25:PDA ön, 26:PDA arka, 27:MEA ön, 28: MEA arka; <i>Penicillium corylophilum</i>) ve 30C (29:PDA ön, 30:PDA arka, 31:MEA ön, 32: MEA arka; <i>Penicillium spinulosum</i>) kodlu izolatların PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri.....	46
Şekil 4. 5	13Y6E (33:PDA ön, 34:PDA arka, 35:MEA ön, 36: MEA arka) kodlu izolatın PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri (<i>Penicillium chrysogenum</i>).....	47
Şekil 4. 6	1Y5D kodlu izolatın lam kültüründe görüntüsü (1: 20x, 2: 40x, 3-4: 100x; 5: 100x-LFPM ile boyama; <i>Penicillium roqueforti</i>).....	49
Şekil 4. 7	12F (6: 40x, 7: 100x) ve 17Y5D (8: 40x, 9: 100x) kodlu izolatlara ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; <i>Penicillium roqueforti</i>).....	50
Şekil 4. 8	4Y5D (10: 40x, 11: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; <i>Penicillium crustosum</i>).....	50
Şekil 4. 9	31A (12: 40x, 13: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; <i>Penicillium commune</i>).....	51
Şekil 4. 10	13Y6E (14: 40x, 15: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; <i>Penicillium chrysogenum</i>).....	51
Şekil 4. 11	13B (16: 40x, 17: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; <i>Penicillium corylophilum</i>).....	52
Şekil 4. 12	30C (18: 40x, 19: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; <i>Penicillium spinulosum</i>).....	52
Şekil 4. 13	12F, 1Y5D, 4Y5B ve 17Y5D kodlu izolatların SEM görüntüleri (<i>P.roqueforti</i>).....	53
Şekil 4. 14	4Y5D (<i>P.crustosum</i>), 31A (<i>P.commune</i>) ve 13Y6E (<i>P.chrysogenum</i>) kodlu izolatların SEM görüntüleri.....	54
Şekil 4. 15	13B (<i>P.corylophilum</i>) ve 30C (<i>P.spinulosum</i>) kodlu izolatların SEM görüntüleri.....	55
Şekil 4. 16	28S rRNA gen bölgesi PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü; M: DNA marker (100 bp-1kbp), 1: 1Y5D, 2: 2Y5F, 3: 4Y5A, 4: 5B, 5: 6Y5C, 6: 7Y5E, 7: 8Y5B, 8: 9Y5B, 9:10D, 10: 12F, 11: Negatif kontrol.....	56
Şekil 4. 17	İzolatların 28S rRNA bölgesine göre dağılımı.....	59
Şekil 4. 18	ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgesi (ITS) PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü; M: DNA marker (100 bp-1kbp), 1: Negatif kontrol, 2: 4Y5A, 3: 5B, 4: 6Y5C, 5:7Y5E,6:8Y5B.....	60
Şekil 4. 19	İzolatların ITS bölgesine göre dağılımı.....	63
Şekil 4. 20	İzole Edilen <i>Penicillium</i> türlerinin Neighbour-joining metoduna göre 28S D1/D2 gen bölgesi (LSU) filogenetik ilişkisi (2000 bootstrap, 540 bp).....	71
Şekil 4. 21	İzole edilen <i>Penicillium</i> türlerinin Neighbour-joining metoduna göre ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (ITS) gen bölgesi filogenetik ilişkisi (2000 bootstrap, 360 bp).....	72

Şekil 4. 22	Mikotoksin genleri PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü; M: DNA marker (100 bp-1kbp), 1: <i>roqA</i> negatif kontrol, 2: 1Y5D, 3: 12F, 4: 5Y5A, 5: 29D, 6: <i>mpaC</i> negatif kontrol, 7: 1Y5D, 8: 12F, 9: 5Y5A, 10: 29D.....	73
Şekil 4. 23	Soldan sağa DNA marker (100 bp-1kbp), <i>roqA</i> negatif kontrol, 1Y5D, 2Y5F, 3Y5A, 4Y5A, 4Y5B, 5Y5A, 6Y5B, 6Y5C, 6Y5E, 7Y5E, 8Y5B, 9Y5B, 10Y5C, 11Y5B, 12F, 14Y5B, 16Y4B, 17Y5C, 17Y5D, 23C ve 29D.....	74
Şekil 4. 24	Soldan sağa DNA marker (100 bp-1kbp), <i>mpaC</i> negatif kontrol, 1Y5D, 2Y5F, 3Y5A, 4Y5A, 4Y5B, 5Y5A, 6Y5B, 6Y5C, 6Y5E, 7Y5E, 8Y5B, 9Y5B, 10Y5C, 11Y5B, 12F, 14Y5B, 16Y4B, 17Y5C, 17Y5D, 23C ve 29D.....	75
Şekil 4. 25	4Y5B kodlu izolata ait ekstraktta tespit edilen Rokfortin C'nin bileşen kromatogramı ve kütle spektrumu.....	77
Şekil 4. 26	12F kodlu izolata ait ekstraktta tespit edilen Rokfortin C'nin bileşen kromatogramı ve kütle spektrumu.....	77
Şekil 4. 27	17Y5D kodlu izolata ait ekstraktta tespit edilen Rokfortin C'nin bileşen kromatogramı ve kütle spektrumu.....	78

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Ülkeler bazında peynir üretimi.....	6
Çizelge 2. 2 Avrupa tipi küfle olgunlaştırılmış peynirlerin sınıflandırılması.....	7
Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasallar, cihaz ve ekipmanlar.....	26
Çizelge 3. 2 PCR amplifikasyonu için hazırlanan karışım.....	31
Çizelge 3. 3 PCR amplifikasyonu için primerlere göre termal döngü şartları.....	32
Çizelge 3. 4 Mikotoksin üretimindeki anahtar genler ve fonksiyonları.....	37
Çizelge 3. 5 Dizayn edilen primerler ve özellikleri.....	38
Çizelge 4. 1 Morfolojik incelemeler sonucu genotipik tanımlama için seçilen izolatlar.....	48
Çizelge 4. 2 İzolatların 28S rRNA dizi analizlerine göre BLAST sonuçları.....	57
Çizelge 4. 3 İzolatların ITS1-5.8S-ITS-2 rRNA (ITS) dizi analizlerine göre BLAST sonuçları.....	61
Çizelge 4. 4 Tanımlama için seçilen 40 izolatın 28S rRNA ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgeleri BLAST sonuçları.....	66
Çizelge 4. 5 Filogenetik ağaçta kullanılan referans suşlar (28S Bölgesi).....	68
Çizelge 4. 6 Filogenetik ağaçta kullanılan referans suşlar (5.8S ITS Bölgesi).....	69
Çizelge 4. 7 1Y5D ve 12F kodlu izolatların <i>roqA</i> dizi analizine göre BLAST sonuçları..	74
Çizelge 4. 8 İzolatların <i>mpaC</i> geni dizi analizine göre BLAST sonuçları.....	75
Çizelge 4. 9 Seçilen <i>Penicillium roqueforti</i> izolatlarında hedef toksinlerin varlığı.....	76
Çizelge 4. 10 LC-MS/QTOF cihazının kütüphanesinden eşleşen metabolitler.....	80

KÜFLÜ PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN KÜFLERİN MOLEKÜLER TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Hatice Ebrar KIRTIL

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Küflü peynir, geleneksel peynir çeşitlerimizdendir. Bu peynirler, doğal olarak küflendirilerek veya küflerin peynirlere ilavesiyle üretilir. Küfler, olgunlaşma sırasında yüzeyde ve peynirin içinde gelişir. Özel lezzet ve aromaları nedeniyle, bu peynirlere özgü küf türlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu önemlidir.

Bu çalışmada, geleneksel küflü peynirlerden izole edilen küflerin morfolojik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, *Penicillium roqueforti* suşlarının tespit edilmesi, bu suşlardan seçilenlerin muhtemel mikotoksin (roafortin C ve mikofenolik asit) genlerinin tespiti ve bu mikotoksinleri üretme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Konya Küflü Tulum, Divle-Obruk Küflü Tulum, Erzurum Küflü Civil olmak üzere 17 geleneksel küflü peynirden küf izolasyonu yapılmış ve muhtelif peynirlerden (Konya Küflü, Divle-Obruk, Kars yöresi Çeçil, Elazığ-Bingöl yöresi Tomas, Hatay yöresi Sürk ve Akdeniz yöresi Tulum) önceden izole edilmiş olan küf izolatlarıyla birlikte, toplam 140 izolat, saflaştırılmıştır. İzolatların morfolojik (koloni morfolojileri ve mikroskopik) özellikleri incelenmiştir. Farklı morfolojik özellikleri olan izolatların genotipik (28S D1/D2 ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgeleri) tanımlamaları yapılmıştır. Küf çeşitliliği, *P. roqueforti*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. spinulosum*, *P. corylophilum* ve *P. chrysogenum* olmak üzere 6 farklı türden (*Penicillium* spp.) oluşmuştur. 28S (LSU) ve ITS bölgelerine ait iki filogenetik ağaç karşılaştırılmıştır. 28S bölgesinde *P.roqueforti*/*P.paneum*/ *Penicillium* sp. ve ITS bölgesinde *P.psychrosexualis*/ *P.roqueforti*/

P.carneum türleri iyi ayırlamamıştır. Ancak ITS bölgesindeki tanımlamalarda daha iyi sonuç alınmıştır. Bu bölgeye göre *Penicillium roqueforti* olarak tanımlanan 21 izolatın hepsinde, rokfortin C ve mikofenolik asit üretiminden sorumlu *roqA/rds* ve *mpaC* genleri saptanmıştır. Seçilen 4 *P.roqueforti* suşundan 3'ünün LC-MS/Q-TOF analizine göre, rokfortin C ürettiği, ancak hiçbir izolatın ekstraktında mikofenolik asit belirlenmemiştir. 1Y5D kodlu izolatın ekstraktında, her iki mikotoksin de tespit edilmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Küflü peynir, küf çeşitliliği, *P.roqueforti*, rokfortin C, mikofenolik asit



ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MOULDS ISOLATED FROM MOULDY CHEESES

Hatice Ebrar KIRTIL

Department of Food Engineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Mouldy cheese is one of our traditional cheeses. These cheeses are produced by spontaneous growth of moulds or intentional added to the cheese. Naturally occurring moulds grow on the surface and inside of the cheese during ripening. Thus, it is important that genotypic identification and characterization of mould species due to their special flavors, smells and tastes.

In this study, it is aimed to identify the moulds isolated from traditional mouldy cheeses with morphological and molecular methods, to specify *Penicillium roqueforti* strains, to determine the probable mycotoxin (roquefortine C and mycophenolic acid) genes and related mycotoxin production potential of selected strains.

Moulds isolated from 17 mouldy cheeses including Konya Kuflu Tulum, Divle-Obruk Kuflu Tulum, Erzurum Kuflu Civil and moulds previously isolated from various cheeses (Konya Kuflu, Divle-Obruk, Cecil from Kars region, Tomas from Elazığ-Bingöl region, Surk from Hatay region and Tulum from Mediterranean region), total 140 isolates, were purified. Morphological (colony morphologies and microscopic) features of the isolates were investigated. The isolates with different colony morphologies were identified genotypically (28S D1 / D2 ve ITS1-5.8S-ITS2 domains). Mould diversity was composed of 6 different species (*Penicillium* spp.), containing *P. roqueforti*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. spinulosum*, *P. corylophilum* and *P. chrysogenum*. 28S (LSU)

ve 5.8S (ITS) regions were compared by forming two phylogenetic trees. *P.roqueforti*/*P.paneum*/ *Penicillium* sp. were not able to be distinguished by sequencing LSU region. Although ITS region would not separate *P.roqueforti*/ *P.carneum*/ *P.psychrosexualis* species, it is thought that ITS identification is more efficient than LSU for mould identification. In all of the 21 isolates as *P. roqueforti* according to ITS region were determined *roqA/rds* and *mpaC* genes responsible for production of roquefortine C and mycophenolic acid. As for the LC-MS/ Q-TOF analysis of 3 of the 4 selected strains of *P. roqueforti*, it was found that roquefortine C produced, but mycophenolic acid was not determined in any extracts of them. In the extract of 1Y5D-coded isolate, both mycotoxins were not detected.

Keywords: Mouldy cheese, mold diversity, *P.roqueforti*, roquefortine C, mycophenolic acid



1.1 Literatür Özeti

Peynir, sütün peynir mayası kullanılarak pıhtılaştırılması ile elde edilen telemenin, tekniğine uygun olarak işlenmesiyle üretilen, üretim aşamalarındaki farklılıklara göre taze veya olgunlaştırılmış olarak tanımlanabilen, çeşidine özgü karakteristik özellikler gösteren bir süt ürünüdür [1].

Sütte bulunan protein, yağ ve vitaminlerin tümü peynirde konsantre olarak bulunduğundan, sağlığa yararlı bir gıda maddesi olan peynirin, beslenmemizde önemi oldukça büyüktür. Tarihin ilk dönemlerinden beri önemini kaybetmemiş olan peynir, farklı tat ve aromalara sahip olması nedeniyle sofraların vazgeçilmezidir. Farklı süt türleri (inek, koyun, keçi, manda sütleri vb.), farklı starter kültür kombinasyonları, farklı üretim şekilleri, aroma maddeleri vb. bileşenler kullanılarak dünyada binlerce çeşit peynir üretimi yapılmaktadır. Her biri, farklı fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikler göstermektedir [2, 3, 4]. Bunlarla birlikte peynirlerin, üretildikleri coğrafi bölge özellikleri, olgunlaştırılma durumu, bazı peynir çeşitlerinin lezzet ve tekstürce birbirine benzemesi veya aynı olduğu halde farklı adlarla anılması gibi nedenler net bir sınıflandırmayı zorlaştırmaktadır. Türkiye’de ise, 9’u tescilli (Diyarbakır Örgü, Edirne Beyaz, Erzurum Civil, Erzurum Küflü Civil, Erzincan Tulum, Ezine, Karaman Divle Obruğu Tulum, Malkara Eski Kaşar ve Yozgat Çanak), 193 çeşit peynirin üretildiği ve bu sayının daha da fazla olduğu düşünülmektedir. Bu peynir çeşitlerimizden biri de küflü peynirlerdir; Karaman-Divle Obruğu Tulum ve Erzurum Küflü Civil peynirleri coğrafi işaret almıştır [5,6,7,8].

Küflü peynirler, peynirin olgunlaştırma sürecinde spontan olarak küflendirilmeye bırakılmasıyla veya peynire küf inokülasyonu yapılarak kontrollü şartlarda olgunlaştırılmasıyla elde edilir [1]. Seçkin mutfak (haute cuisine) kültürünün bir parçası olarak dünyada yaygın bir şekilde tüketilen, European Commision tarafından coğrafi işaret olarak tescillenmiş küflü peynirlerin üretiminde, Fransa, İtalya, Hollanda, İspanya gibi Avrupa ülkeleri başı çekmektedir. Mavi damarlı peynirlerden Rokfor, Danablu, Cabrales, Gorgonzola ve Stilton; yüzeyi beyaz küflü peynirlerden ise Camembert ve Brie en çok bilinen çeşitlerdendir [4,9]. Ülkemizde ise, özellikle Erzurum Küflü Civil ve Konya Küflü (Gök) peynirleri yaygın olarak tüketilmektedir [7].

Ülkemizde çeşitli yörelerde mahalli olarak üretilen ve özel lezzet, koku ve tatlara sahip olan bu peynirlerin endüstriyel olarak üretilip daha geniş kitlelere ulaştırılabilmesi ve sağlık açısından değerlendirilebilmesi oldukça önemlidir. Dünyada tüketimi yaygın olan küflü peynirlerde mikotoksin içeriğinin araştırıldığı çalışmalarda halk sağlığı için tehlikenin boyutları ortaya konmuştur. Ancak ülkemizde, küflü peynirlerde yapılmış çalışmalar sınırlıdır. Bu peynirlerin küf çeşitliliği üzerine yapılan çalışmaların çoğu, sadece morfolojik incelemeleri içermektedir [10, 11, 12].

Son yıllarda peynir mikrobiyotası, moleküler tekniklerle tanımlanmaktadır [13,14]. Kültüre dayalı klasik yöntemlere göre daha hızlı, hassas ve seçici olan bu tekniklerden, özellikle polimeraz zincir reaksiyonu (konvansiyonel PCR) ve çeşitleri kullanılmaktadır. Literatürde, küflerin tanımlanması çoğunlukla, 5.8S ITS (ITS1/ITS2) bölgeleri, 28S D1/D2 rDNA gen bölgelerinin amplifikasyonu ile yapılmıştır [15, 16, 17]. Peynirlerde küf çeşitliliğinde, *Penicillium roqueforti* başta olmak üzere, *Penicillium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* türleri tespit edilmiştir [18, 19]. Ayrıca, peynir küflerinin genetik açıdan incelenmesi, mikotoksin üretimleri konusunda ipuçları sunar. Küf izolatlarının mikotoksin üretme kapasitelerinin belirlenmesi ve peynirlerde mikotoksin tespiti, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir [20, 21, 22].

1.2 Tezin Amacı

Küflü peynir mikrobiyotasında, küf çeşitliliğinin büyük bölümünü *Penicillium* türleri oluşturur. Bu türler arasında özellikle *Penicillium roqueforti* güvenilir olarak kabul edilir (GRAS). Ancak olgunlaştırma sürecinde peynirde, ortamdaki gelen mikotoksijenik küfler de gelişebilir. Peynirlerde bu küf türlerinin belirlenmesi, rastgele ve uygunsuz ortamlarda üretilen küflü peynirlerin halk sağlığı açısından potansiyel risk taşıdığına işaret etmektedir. Ülkemizde çeşitli yörelerde mahalli olarak üretilen, özel lezzet, koku ve tatlara sahip olan küflü peynirlerin, endüstriyel olarak üretilip daha geniş kitlelere ulaştırılabilmesi ve sağlık açısından değerlendirilebilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle yapılan tez çalışmasında, geleneksel küflü peynirlerimizden küf izolasyonu yapılması, bu izolatların saflaştırılarak morfolojilerinin incelenmesi, farklı kolonilere sahip olanlarla moleküler tanımlamaya gidilmesi ve peynir üretiminde kullanılabilecek seçilen *Penicillium roqueforti* suşlarının mikotoksin genlerinin ve üretimlerinin tespiti amaçlanmıştır. Bu bağlamda çalışma kapsamında;

1. Farklı yörelerde üretilen ve küflü olarak tüketilen peynirlerden (Konya Küflü, Divle-Obruk, Erzurum-Kars yöresi Civil (Çeçil), Elazığ-Bingöl yöresi Tomas, Hatay yöresi Sürk ve Akdeniz yöresi Tulum) izole edilen küflerin, moleküler yöntemlerle tanımlanması (PCR) ve özellikle, *Penicillium roqueforti* tespitine odaklanması,
2. Seçilen *Penicillium roqueforti* suşlarının mikotoksin (roafortin C ve mikofenolik asit) genlerinin araştırılması (PCR),
3. Seçilen *Penicillium roqueforti* suşlarının, sentetik katı besiyerinde (Yeast Extract Sucrose Agar-YESA) mikotoksin üretimlerinin (roafortin C ve mikofenolik asit), LC MS/QTOF ile incelenmesi hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Geleneksel küflü peynirlerimiz, çoğunlukla mahalli olarak tanınmakta; üretildikleri bölgenin doğa ve iklim koşullarına, kültürel değerlerine, damak zevklerindeki farklılıklara göre değişmektedir. Ham peynirin, kontrollü şartlarda küflendirilmeye bırakılması ya da küf (sekonder starter) enjekte edilerek olgunlaştırılmasıyla elde edilen küflü peynirler, ülkemizde kontrolsüz şartlarda üretilmektedir. Uygun olmayan ortam

şartlarında üretilen küflü peynirlerin, halk sağlığı açısından değerlendirilebilmesi oldukça önemlidir.

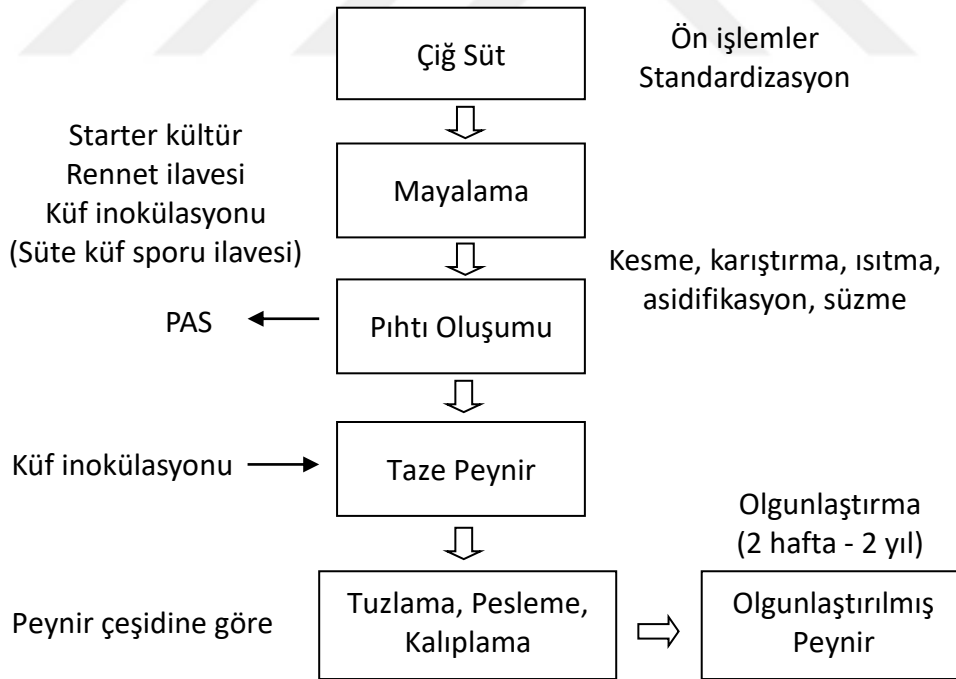
Ülkemizde, küflü peynirlerde küf çeşitliliği üzerine yapılmış moleküler çalışmalar oldukça sınırlı olup, bir iki peynir çeşidi üzerinedir. Sadece morfolojik incelemelerle yapılmış çalışmalar ağır basmaktadır. Bir mikroorganizmanın sağlıklı olarak tanımlanabilmesi için morfolojik incelemenin yanında, genetik çalışmalarla da desteklenmelidir. Ayrıca, küflü peynirlerimizde, mikotoksin genlerinin taranmasıyla ilgili bir çalışma yoktur. Rokfortin C ve mikofenolik asitin gen kümeleri son yıllarda çıkarılmıştır. Bu çalışmada, ilgili mikotoksinlerin biyosentezindeki anahtar genler tespit edilmiştir. Araştırmada, *rds/roqA* ve *mpaC* genleri üzerinden dizayn edilen primerler kullanılmış, daha sonra, bu genlerin genomdaki varlığı değerlendirilmiştir.

Türkiye’de küflü peynir; endüstriyel boyutta üretilmemekte ve küçük, yerel işletmelerle üretim sınırlı kalmaktadır. Katma değere sahip olan ve dünyada seçkin mutfak kültürünün bir parçası olarak bakılan küflü peynirler, yöresel lezzetlerimiz arasında olmasına rağmen değerlendirilememektedir. Bu araştırma, sonraki yıllarda yapılacak detaylı çalışmalarla, yerli küf starteri üretimine imkân sağlaması açısından önemlidir. Çalışma sırasında elde edilen çıktıların, yerli potansiyel küf starteri oluştırmaya fayda sağlayacağı düşünölmektedir. Böylece geleneksel küflü peynirlerimiz değerlendirilecek, bu peynirlerin belli bir standardizasyona ve endüstriyel üretime entegrasyonu hakkında ipuçları sunulacaktır.

LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Küflü Peynirler

Küflü peynirler, peynirin olgunlaştırma sürecinde küflendirilmeye bırakılması ya da küf enjekte edilerek kontrollü şartlarda olgunlaştırılmasıyla elde edilen peynirlerdir (Şekil 2.1). Bu grup peynirler için “küfle olgunlaştırılmış (mould-ripened)” tanımının kullanılması daha doğrudur [1,3].



Şekil 2. 1 Genel hatlarıyla küflü peynir üretimi [2, 3, 4]

Fransa, İtalya, İspanya, Hollanda gibi Avrupa ülkelerinin en çok tanınan Roquefort, Gorgonzola, Camembert, Brie gibi peynirleri seçkin mutfak kültürünün bir parçasıdır. Bunun yanı sıra ülkemizde de yöresel lezzetlerin tüketimi yaygındır [3,4,7].

2.1.1 Dünya’da Küflü Peynir Üretimi ve Çeşitleri

Peynir, besleyici içeriğinin yüksek ve farklı tat, aromalara sahip olması nedeniyle dünyada yaygın bir şekilde tüketilmektedir. Peynir üretiminde önemli bir paya sahip olan küflü peynirlerin üretiminde Fransa, İtalya gibi Avrupa ülkeleri başı çekmektedir. Özellikle Roquefort (mavi damarlı) en çok üretilen ve tüketilen peynirdir [3, 4].

IDF (Uluslararası Sütçülük Federasyonu) 2016 yılı verilerine göre dünyada, sütün yaklaşık %40’ından peynir üretimi yapılmıştır (yaklaşık 23 milyon ton, Çizelge 2. 1).

Türkiye’de 2016 yılı istatistiklerine göre peynir üretimi, yaklaşık 658 bin ton/yıl’dır. Yıllık kişi başına peynir tüketim miktarı ise, 15,2 kg/yıl olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde küflü peynir üretimi daha çok geleneksel yöntemlerle yapıp bölgesel kalmakla birlikte, Roquefort tipi peynir az da olsa yapılmakta veya ithal edilmektedir [23].

Çizelge 2. 1 Ülkeler bazında peynir üretimi [4,23]

Ülke	Üretim (1000 ton/yıl)
AB 28	9.000
ABD	5.400
Brezilya	800
TÜRKİYE	658
Arjantin	521
Kanada	400
Dünya	23.000

Küfle olgunlaştırılmış peynirlerin iç kısımları ve yüzeyleri farklı bir görünüme sahiptir. Genel olarak iki gruba ayrılan bu peynirler, Çizelge 2. 2’de sınıflandırılmıştır. Özellikle Avrupa ülkelerinde ve Kuzey Amerika’da küflü peynirler, oldukça popülerdir ve

uluslararası tanınırlıkları yüksektir. Avrupa Birliği Zirai Ürün Kalite Politikası çerçevesinde, kökenine uygun olarak coğrafi işaret olarak tescillenmiştir [24].

Çizelge 2. 2 Avrupa tipi küfle olgunlaştırılmış peynirlerin sınıflandırılması [3, 4, 9, 25]

İç Kısımları Küflendirilmiş Peynirler	Yüzeyi Küflendirilmiş Peynirler
• Mavi Damarlı (Yeşil): Roquefort, Danablu (Danish Blue), Gorgonzola, Cabrales, Stilton • Norveç tipi: Gamalost	• Yüzeyi Beyaz Küflü (Yumuşak): Camembert, Brie • Çamurumsu Yüzey (Yarı Sert ve Sert): Taleggio, Brick, Limburger, Saint-Nectaire, Tomme de Savoie, Cantal, Salers, Rodez

2.1.1.1 İç Kısımları Küflendirilmiş Peynirler

Mavi (Yeşil) Damarlı (Blue-Veined) Peynirler:

Peynirin içine doğru uzanan mavi-yeşil damarlı (küflü) yarı sert peynirlerdir. Roquefort, Danablu, Gorgonzola, Cabrales, Stilton en çok bilinen çeşitlerdendir [4,9].

Roquefort peyniri üretiminde, süte starter ilavesiyle 30°C’de mayalama yapılır. Genellikle 2-2,5 saat içinde kesim olgunluğu kazanan pıhtı kesilir. Pıhtı çöktürülüp peynir suyunun tamamı alınır. Teleme silindirik kalıplara doldurulur ve üzerine toz *Penicillium roqueforti* veya *Penicillium glaucum* (özellikle Gorgonzola) küf kültürü serpilir (*P.roqueforti* sporları su ile süspanse edilerek mayalamadan önce de peynir sütüne ilave edilebilir). Ham peynir kalıpta 4 gün kalır. Pıhtı tanelerinin kaynaşması sırasında küf miselleri oluşur. Peynirler 5-10°C’de ve %95 bağıl nemde kuru tuzlamayla tuzlanırlar. Peynirler özel delicilerle delinir. Geleneksel üretimde, peynirde lezzet gelişiminin yanı sıra küf gelişiminde de son derece önemli olan çatlakların ve yarıkların oluşumuna, heterofermantatif laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalar katkıda bulunur. Oluşan delik kanallarından peynirin iç kısımlarına hava girişi olur ve *P. roqueforti* küfünün içte de gelişmesi sağlanır. 2-3 hafta sonra karakteristik küf damarları oluşur [4,

25, 26]. Mağaralarda (geleneksel metot), mahzenlerde, kontrollü iklimlendirme odalarında ve/veya kabinlerinde olgunlaştırılır (Şekil 2. 2).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 2. 2 Roquefort mahzeni (a), Roquefort peyniri (b), Danablu (c), Cabrales (d), Gorgonzola (e), Stilton (f) [4, 25]

Norveç Tipi:

Gamalost ya da Gammelost/Gammalost olarak adlandırılan bu peynir türü, başta Norveç'te olmak üzere diğer İskandinav ülkelerinde üretilip tüketilmektedir. Gamalost peyniri üretiminde, yağı alınmış ekşi inek sütü kullanılır. Kolayca ufalanan bir yapıya sahiptir. Olgunlaşma sürecinde, *Mucor* cinsi küflerin kullanıldığı peynirde, iç yüzeyde hafif beyaz ve esmer bir tabaka oluşur (Şekil 2. 3). Ayrıca olgunlaşma sürecinde, *Rhizopus* ve *Penicillium roqueforti*'nin de peynirde gelişebildiği belirtilmektedir [25].



Şekil 2. 3 Norveç tipi Gamalost peyniri [25]

2.1.1.2 Yüzeyi Küflendirilmiş (Yumuşak, Yarı Sert ve Sert) Peynirler

Yüzeyi Beyaz Küflü (Surface White Mould-Ripened, Yumuşak) Peynirler

Peynirin yüzeyinin beyaz bir küf tabakasıyla kaplandığı yumuşak peynirlerdir. Camembert ve Brie en çok bilinen çeşitleridir [4, 25].

Camembert peyniri üretiminde, süte starter ve rennet ilavesiyle 30°C'de mayalanır. Endüstriyel yöntemde *Penicillium camemberti* telemeye ilave edilir. Geleneksel yöntemde ise *Penicillium camemberti* sporlarının, tuzlama aşamasında peynire tuzdan geldiği düşünülmektedir. Teleme kalıplanır. Kalıp peynir salamuraya alınır ya da dışı kuru tuz ile kaplanır. Peynirin yüzeyi 12°C'de 10-12 gün kurutulur (Şekil 2. 4). Olgunlaşmaya bırakılır (iklimlendirme odalarında/kabinlerde, mahzenlerde).



Şekil 2. 4 Camembert ve Brie peynirleri [4]

Çamurumsu Yüzey (Smear-Ripened, Yarı Sert ve Sert) Peynirler:

Smear-ripened peynirlerde, olgunlaşma sürecinde yüzeyde (kabuk) bakteri aktivitesi (*Brevibacterium linens*: aerob, proteolitik bakteri) ön plana çıkar. Bununla birlikte, *Geotrichum candidum*'un yanında bazı küflerin ve mayaların aktivitesi söz konusudur. Peynir yüzeyinde çamurumsu bir tabaka (turuncu/kırmızı) oluşur. Yarı sert ve sert dokuda peynirlerdir. Brick, Limburger, Taleggio en çok bilinen türleridir (Şekil 2. 5). Bu peynirlerin yanı sıra, Saint-Nectaire, Tomme de Savoie, Cantal, Salers, Rodez peynirleri de bilinmektedir [4, 25].

Limburger peynirinin üretiminde, süte rennet ve starter ilavesiyle 32-34°C'de mayalanır. Oluşan pıhtıdan 37°C'de peynir altı suyunun ayrılmasıyla oluşan teleme blok şekilli kalıplara preslenir. 1-2 gün salamurada/kuru tuzda bekletilir. 10-15°C, %95 bağıl nemde 2-3 hafta peynir olgunlaştırılır (çamurumsu yüzeyin oluşumu) [4].



(a)



(b)



(c)

Şekil 2. 5 Çamurumsu yüzey peynirler; *Geotrichum candidum*, peynir yüzeyi (a),
Limburger (b), Taleggio (c) [4, 9]

2.1.2 Geleneksel Küflü Peynirlerimiz

Ülkemizde küflü peynir üretimi genellikle bölgesel kalmakla birlikte, daha çok geleneksel yollarla yapılmaktadır. Ancak bu durum çoğunlukla peynirin kontrolsüz küflendirilmesine neden olmaktadır.

Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliğinin 2015 yılında yayınlanması ile birlikte küflü peynirler için de tanımlama yapılmış ve belli şartlar getirilmiştir. Ancak yetersiz kaldığı görülmektedir. Ülkemizde çok sayıda peynir çeşidi olmasına rağmen coğrafi işaret olarak tescillenmiş sadece 10 çeşit peynir vardır. Küflü peynirlerimizden Erzurum Küflü Civil Peyniri (Göğermiş peynir) ve Divle Obruk Peyniri coğrafi işaret alanları arasındadır. Bunun dışında Konya Küflü (Gök) Peyniri için, Konya Yeşil Peyniri adıyla başvuru yapılmıştır [6, 7].

Ülkemizde mavi-yeşil küflü peynirler yaygındır. Başlıca küflü peynirlerimiz:

- Erzurum Küflü Civil (Göğermiş) Peynir (Şekil 2. 6)
- Konya Küflü (Gök) Peynir (Şekil 2. 7)
- Hatay Küflü Çökelek (Şekil 2. 8)
- Divle (Obruk) Küflü Tulum (Şekil 2. 8)
- Küflü Küp (Çömlek) (Şekil 2. 8)
- Tomas Küflü Peynir (Çökelek, Serto, Dorak) (Şekil 2. 8)

Bunların dışında pek çok bölgede, yöresel peynirler isteğe göre de küflendirilerek tüketilmektedir.

Civil peyniri aynı zamanda çeçil olarak da bilinen peynir, Erzurum başta olmak üzere Kars, Ardahan, Iğdır illerinde de yağsız süttten yapılan bir peynirdir. Küflendirilmiş formuna göğermiş peynir de denilmektedir. Yağsız süt mayalandıktan sonra oluşan teleme Şekil 2. 6' daki gibi tahta kepçelere sarılarak toplanır. Toplanan teleme yoğrulur, çekilir ve asılarak tel hale getirilir. Küf inokülasyonu/küflendirilmeye bırakılarak 90-180 gün olgunlaştırılır [7, 27, 28].



Şekil 2. 6 Civil peyniri [27, 28]

Konya Küflü (Gök) peyniri yapımında, koyun, keçi, inek sütleri kullanılabilir. Sütün mayalanmasından sonra oluşan pıhtı bez torbalara dökülerek süzülür. Teleme keçi ya da koyun tulumuna / plastik bidonlara basılır. Küflendirilerek 3-4 ay olgunlaştırılır [27, 29].



Şekil 2. 7 Gök peynir [27]



Şekil 2. 8 Diğer yöresel peynirlerimiz; Sürk (a), Küflü Tulum (b), Küflü Küp/Çömlek (c), Tomas (d), Divle Obruk (e) [7, 27]

2.1.3 Küflü Peynirlerin Mikrobiyotası

Starter kültür olarak özellikle laktik asit bakterilerinin yanında mayalar ve küfler sekonder mikroorganizmalar olarak peynirin olgunlaştırılmasında kullanılırlar. Küfler, peynirin olgunlaşma aşamasında bakterilerle ve mayalarla interaksiyon halindedir.

LAB'ın (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.) yanı sıra bazı peynir çeşitlerinde *Brevibacterium linens*, *Propionibacterium* spp. bakterileri; *Debaryomyces* spp., *Kluyveromyces* spp. gibi mayalar ve *Penicillium* spp., *Geotrichum candidum*, *Mucor* spp., *Trichothecium* spp., *Fusarium* spp., *Sporendonema* spp., *Scopulariopsis* spp., *Epicoccum* spp. gibi küfler bulunabilir [4, 25, 30].

2.2 Peynirlerde Küf Çeşitliliği

Mavi damarlı küflü peynirlerde olgunlaşma sürecinde küf aktivitesi öne çıkarken; kabuklu peynirlerde küflerin yanı sıra bazı bakteri ve mayaların etkinliğinden de söz edilebilir. Mavi damarlı peynirlerde küfler peynirin iç yüzeyinde yer yer karakteristik mavi-yeşil görüntüyü oluştururken, yüzeyi küflendirilmiş kabuklu peynirlerde kullanılan küfe özgü beyaz; bakteri-maya aktivitesinin etkisiyle turuncu-kırmızı tabaka oluşur (diğer mikroorganizmalarla etkileşim) [4].



Şekil 2. 9 *Penicillium roqueforti* ve Roquefort peyniri (a), *Penicillium camemberti* ve Camembert peyniri (b) [4]

Küflü peynirlerde olgunlaşma sürecinde özellikle *Penicillium* spp.'ın aktivitesi söz konusudur. Şekil 2. 9, en bilinen küf-peynir kombinasyonudur. Ayrıca bazı çeşitlerde *Geotrichum candidum*'un yanı sıra, peynir mikrobiyotasında az da olsa *Fusarium* spp., *Thamnidium* spp., *Aspergillus* spp. gibi küfler de bulunabilir. Saint-Nectaire ve Tome de Savoie gibi yöresel Fransız peynirleri, *Mucor* spp., *Epiccoocum* spp., *Trichothecium roseum* ve *Fusarium domesticum*; Cantal, Salers, Rodez peynirleri ise *Sporendonema casei* türleriyle ilişkilendirilir. Pek çok Fransız-Avusturya peynirinde, *Scopulariopsis* spp. bulunabilir. Norveç tipi Gamalost peynirinde ise, *Mucor mucedo* ve *Mucor racemosus* özellikle kullanılmaktadır. Bunlarla birlikte *Penicillium*'un bazı türleri ve suşları

(*Penicillium verrucosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium commune* gibi) patojen olarak değerlendirilir. Ayrıca bu peynirlerin büyük bir kısmı, *Cladosporium* ve *Geotrichum* türlerini de içeren karışık bir fungal mikrobiyotaya sahiptir [4, 25]

Geleneksel küflü peynirlerimizde ve dünyada tüketimi yaygın olan küflü peynirlerde yapılmış bazı çalışmalar bulunmaktadır. Özkalp ve Durak'ın [29], Konya ve civarı küflü peynirlerin küf çeşitliliğini araştırdığı bir çalışmada, 140 küflü peynir örneği incelenmiş; izolatların %86,16'sını *Penicillium* ve %12,84'ünü *Aspergillus* cinslerine ait 9 küf türü saptanmıştır. Marketlerden toplanan küflü peynirlerle yapılmış bir çalışmada 24 farklı küf türü izole edilmiş olup bunların %70,25'ini *Penicillium* spp. oluşturmuştur. Hayaloğlu ve Kırbağ [10] bu çalışmada, *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti* ve *Penicillium verrucosum*'un yanı sıra *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum* ve *Penicillium chrysogenum* ile *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* türleri de tespit etmişlerdir. Sağdıç vd. [11] ise, Karaman, Konya, Mersin, Nevşehir ve Niğde'den alınan 21 küflü peynir örneğinin mikrobiyotasında, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium* sp. ve *Thamnidium* sp. olmak üzere 8 farklı tür belirlemişlerdir. *Penicillium roqueforti*, küflü peynir örneklerinden en çok izole edilen küf olup, bunu *Penicillium citrinum* ve *Penicillium chrysogenum* türleri takip etmiştir.

Erdoğan vd. [31], Erzurum ve çevresinde satılan 12 adet küflü tulum peynirinden izole ettikleri 16 küf türünden 12'sinin *P.roqueforti*, 4'ünün ise *G.candidum* olduğunu belirtmişlerdir.

Küflü Civil peynirinde yapılmış bir araştırmada, Çakmakçı vd. [28] 41 peynir örneğinden izole ettikleri 186 küften 165'inin *Penicillium roqueforti* suşlarının olduğunu belirlemiştir.

Ozturkoglu Budak vd. [32], Divle (Obruk) peynirinde olgunlaşmanın 60. ve 120. günlerinde örnekler alarak moleküler tekniklerle peynir fungus mikrobiyotasını saptamışlardır. Sonuç olarak, *Penicillium polonicum*, *Penicillium biforme*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* ve *Deborahmyces hansenii*'nin suşları tespit edilmiştir.

Camembert ve Brie peynirlerinde yapılmış bir çalışmada, mikrobiyotada, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pichia*, *Saccharomyces* ve *Yarrowia* olmak üzere 9 fungal cinse ait türler tespit edilmiştir [16]. İspanyol Cabrales peynirinde yapılmış çalışmalarda, peynir mikrobiyotasında küf türleri, *Penicillium* spp. (*Penicillium commune*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citreonigrum*; 12 izolat), *Penicillium roqueforti* (11 izolat), *Geotrichum candidum* (10 izolat) ve *Acremonium charticola* (1 izolat) olarak tespit edilmiştir [14, 15].

2.2.1 Küflerin Metabolizması

Küflerle olgunlaştırılan peynirlerde, küflerin metabolik aktiviteleri sonucu farklı aroma maddeleri ve metabolitler oluşmaktadır. Bu tür peynirlere has kokuların ve tatların oluşmasında, küflerin neden olduğu biyokimyasal reaksiyonlar sorumludur. Ayrıca küflerin peynirin olgunlaşmasındaki fonksiyonları, peynir tekstüründe önemli değişikliklere neden olmaktadır [33, 34].

Deasidifikasyon: Küfler, karbon kaynağı olarak laktik asidi kullanır. Böylece ortam pH'ını yükseltip gelişirler. Pıhtı asitliğini nötralize ettiklerinden kitle pH'sını 4,5'tan 7'ye doğru yükseltirler.

Proteolitik Aktivite: Küfler endopeptidaz ve ekzopeptidaz aktivitesine sahiptir. Kazeini hidrolize ederler. Serbest aminoasitler oluşur, sonra amonyak ve uçucu bileşiklere parçalanırlar. Böylece olgunlaşmayı hızlandırırlar.

Lipolitik Aktivite: Lipoliz sonucu serbest yağ asitlerinden metil ketonlar ve onların sekonder alkollerini oluşur. Böylece küflü peynirlerin karakteristik aroması meydana gelir. Örneğin, Brie ve Camembert peynirlerinin temel aromatik bileşiği *Penicillium camemberti* tarafından üretilen 1-octen-3-ol' dür.

2.2.2 Spontan Küf Gelişimi

Peynirin bulunduğu ortamda, çevreden küf kontaminasyonu sonucu oluşan, peynirin bozulmasına neden olan istenmeyen bir durumdur. Küfler, peynirin üretildiği ve olgunlaştırıldığı ortam şartlarına dayanıklılık göstermeleri nedeniyle önemli bozulma etmenleridir. Olumsuz etkileri; renk bozulmaları, acılık, istenmeyen kokuların oluşumu

gibi duyuşal değişimlerin yanı sıra mikotoksin oluşumudur [33]. Şekil 2. 10' daki gibi daha çok, siyah-beyaz küflenme şeklinde gözükabilir, küflenme homojen değildir.



Şekil 2. 10 Peynirde spontan küf gelişimi

Peynirlerde üretim ve olgunlaşma sırasındaki sanitasyon başta olmak üzere, olgunlaşma süresi, depolama koşulları (sıcaklık, bağıl nem, ambalaj), su aktivitesi gibi faktörler etkilemektedir [4, 33]. Yöresel peynirlerimizin çoğu güvenilir bir küf kültürü ilave edilmeden küflendirilmektedir. Bu nedenle kontrolsüz küflenme, bu peynirlerde meydana gelebilir.

2.2.3 Ticari Kùltürler

Mavi damarlı ve yüzeyi beyaz küfle olgunlaştırılmış ticari ölçekte üretilen Avrupa tipi peynirlerde günümüzde, küf kültürü olarak *Penicillium* spp. özellikle *Penicillium roqueforti* ve *Penicillium camemberti*'nin mikotoksin üretmeyen güvenilir suşları kullanılır [34]. Bunun için de ticari olarak küf starterleri peynire püskürtölmek üzere ya sıvı formda ya da liyofilize formda satılır (Şekil 2. 11). Bu suşların teknolojik özellikleri standardize edilmiştir.

P.roqueforti seçiminde aranan teknolojik özellikler: Kùltürün gelişme hızı, konidya (spor) oluşturma yeteneği, renk stabilitesi, protein ve yağ hidrolizasyonunda etkili enzim sistemleri, acı tat bileşenlerini üretme durumu, aroma maddesi üretebilme yeteneği, toksin oluşturma yeteneği [34].

P.camemberti seçiminde aranan kriterler: Kùltürel özellikler; renk, gelişme ve yüzeyi kaplama hızı, misellerin kalınlığı ve yoğunluğu, kùltürlerin kokusu, sporların çimlenme hızı, sporölasyona yatkınlık. Fizyolojik özellikler; su aktivitesinin fonksiyonu olarak davranışı, istenmeyen mikroorganizmalara karşı antagonistik etki, mikotoksin üretme yeteneği. Biyokimyasal özellikler ise; proteolize yatkınlık (metalloproteaz ve aspartil

proteazın kazein üzerindeki aktivitesi), lipolize yatkınlık (tribütirin üzerindeki etkisi ve kısa zincirli yağ asitlerinden (C₈-C₁₀) metil keton gibi aroma maddesi üretme yeteneği) [34].



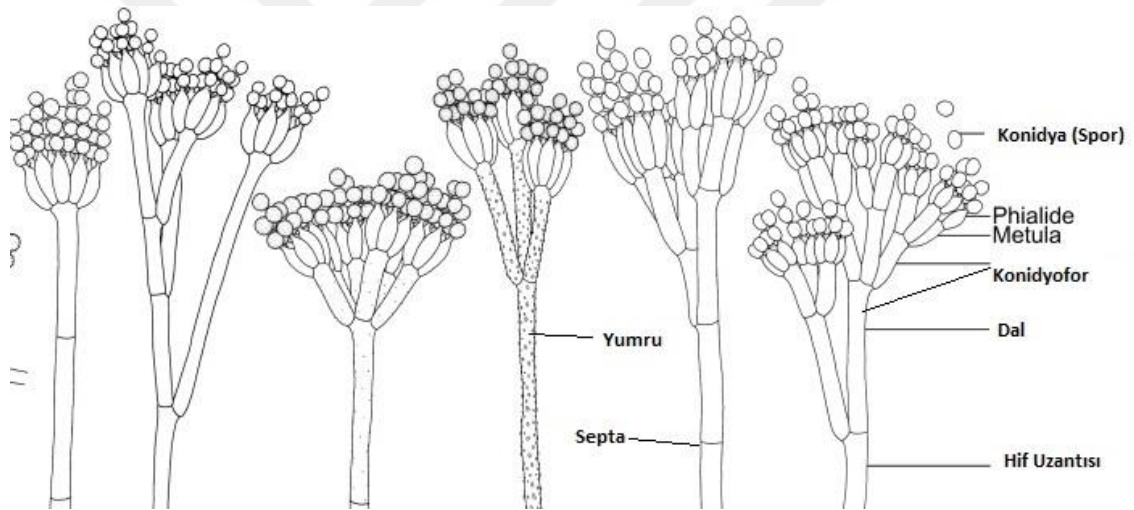
Şekil 2. 11 Bazı ticari küf starterleri

2.3 *Penicillium* spp. ve *Penicillium roqueforti*

Penicillium spp., *Trichocomaceae* ailesinde (şube, sınıf; *Ascomycota*, *Eurotiomycetes*) yer alan filamentli funguslardır. 200'den fazla *Penicillium* türünün tanımlanmış olduğu düşünülmektedir. Toprakta ve ortam havasında bulunmalarının yanı sıra, gıdalarda özellikle tahıl, yem, et ürünleri ve peynir başlıca izolasyon kaynaklarıdır [35].

Penicillium türleri arasında, morfolojik açıdan bazı makroskopik ve mikroskopik farklılıklar bulunmaktadır. *Penicillium* türlerinin morfolojik incelenmesinde, Czapek Dox Agar (CDA), Patato Dekstroz Agar (PDA), Czapek Yeast Agar (CYA), Malt Ekstrakt Agar (MEA), Oat Meal Agar (OAT), Yeast Ekstrakt Sükroz Agar (YES) ve Kreatin Sükroz Agar (CREA)'ın kullanıldığı belirtilmektedir. Türlerin sınıflandırılmasında, koloni renkleri, kolonilerin arka kısımlarının renkleri, koloni çapları, eksudat oluşturmaları ve sekonder metabolitler önemlidir. Koloniler, genellikle yeşil renkli ve tüylü-kadifemsi görünümlüdür. Kolonilerin rengi besiyeri bileşimi ve çevre koşullarına göre değişebilir. Agarda kolonilerin arka kısımları ise, renksiz olmasının yanı sıra krem, sarı, kahverengi veya kırmızı renkler görünebilir. Ayrıca koloniler, kadifemsi (velvety), yünlü (floccose), konidyal kitlerinin kabuk halinde dökülmesi (crustose) ve bölümler halinde (fasciculate) fenotipik özellikler gösterir. Bazı türler koloni üzerinde, eksudat denilen bir çeşit sıvı salgılar. *Penicillium chrysogenum*, kadifemsi bir koloni gösterir ve tipik sarı bir eksudat salgılar. *P.expansum*'un kolonileri bölümler halinde, *P.camemberti* yünlü beyaz koloniler şeklinde gelişir. *P.crustosum* kolonileri kabuklanarak, geliştiği yüzeye pullanıp dökülür [35, 36].

Mikroskopik incelemede, hif, konidyofor, konidya, phialide ve metula farklılığına bakılır. Hücre duvarları, kitinsi sert bir tabakadan oluşur. Birçok hücrenin yan yana gelmesiyle oluşturdıkları ipliksi yapıya hif, hif topluluğuna ise miselyum denir. Hifler (ince, uzun, saydam yapılar), septalı (bölmeli) veya septasız (bölmesiz) olarak görülebilir. Hif uzantıları (stipe) üzerinde, yumrular yer alabilir. Bu yumrular, küfün gelişimi esnasında oksijen yokluğunda oluşmayabilir. Konidyadalar, genellikle küresel şekilli olup, türe göre elipsoid, yassı şekilli olarak değişen sporlardır. Metula, silindir şekillidir ve konidyaları phialidelara bağlar. Konidyoforlar ise; konidyalar, metula ve phialidelerin bir arada bulunduğu hifin baş kısmıdır. Tek dallanma (biverticillate), ikili dallanma (terverticillate) ve ikiden fazla dallanma (quaterverticillate) özelliğine göre üçe ayrılır (Şekil 2. 12). *Penicillium* konidyoforları, genellikle ikili dallanma gösterir [35, 36].



Şekil 2. 12 Dallanma özelliği gösteren farklı *Penicillium* türlerinin hif yapıları [35, 36]

Penicillium roqueforti, özellikle mavi damarlı peynirlerle ilişkilendirilen, ayrıca tahıl ve yem gibi farklı kaynaklardan izole edilebilen bir küftür. İlk olarak peynir olgunlaşmasında, *P.roqueforti* Thom bir filamentli fungus prototipi olarak karakterize edilmiştir. İlk başlarda morfolojik özellikleri ve sekonder metabolitleri ile ayırt edilmeye çalışılan *P.roqueforti* suşları, 15 gruba ayrılmıştır. Ancak, daha sonra bu ayrımın yeterli olmadığı görülmüştür. Moleküler tekniklerden, ribozomal RNA sekanslama ve RAPD kullanılmıştır. Kullanılan gen bölgesine göre (5.8S ve 28S), birbirine yakın türler olan *P.roqueforti*/*P.carneum*/*P.paneum*/*P.psychrosexualis* ayrımı zor yapılabilmektedir.

Çünkü, bu türler arasında sekans dizilimlerine göre, birkaç baz farklılık göstermektedir [26, 36, 37].

P.roqueforti, propiyonik asite, asetik asite, laktik asite, yüksek konsantrasyonda CO₂'ye ve %5'e kadar NaCl'ye tolerans gösterir. Optimum inkübasyon şartları, aerobik ortam ve 25°C'de 5-7 gündür. *P. roqueforti*, uygun ortam şartlarında, bazı biyoaktif bileşikler, aroma maddeleri ve mikotoksinler gibi çok sayıda sekonder metabolit üretebilir. Andrastin A, B gibi antitümör etkili bileşiklerin yanı sıra; mikofenolik asit gibi antimikrobiyal ve immüno supresif özelliklerinin yanında mikotoksin olan bir bileşik de sentezlediği bildirilmiştir [25, 26, 36].

2.4 Küflü Peynirlerde Mikotoksin Riski

Penicillium'un bazı türleri (*Penicillium verrucosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium commune* gibi) mikotoksijenik olarak değerlendirilir. Mikotoksijenik küf çeşitliliği, gıda maddelerinin büyük çoğunluğunda değişebilmektedir. Peynir de mikotoksijenik küf çeşitliliği açısından önemli bir gıda maddesidir.

Mikotoksin oluşumunda, çevresel faktörlerin yanı sıra substrat yapısı da önemlidir. Her gıda maddesinde benzer şekilde ortaya çıkmamaktadır. *Penicillium* spp.'nin ürettiği patulinin ve penisilik asitin yanı sıra, peynirde özellikle, *Penicillium roqueforti*'nin bazı suşları PR toksin, rokfortin, mikofenolik asit, isofumigaklavin; *Penicillium camemberti*'nin bazı suşları ise siklopiyazonik asit üretebilir. Peynirin aminoasit kompozisyonu ve mikroaerofilik koşullar nedeniyle, PR toksin peynirde kararlı değildir ve toksisitesi daha düşük olan PR imine indirgenir. Böylece PR toksin gibi bazı sekonder metabolitler peynirle az ilişkilendirilebilir. *Penicillium roqueforti*'ye yakın türler olan *Penicillium paneum*, *Penicillium carneum*, *Penicillium psychrosexualis*'in patulin üretimi söz konusudur [20, 38, 39, 40]. Ayrıca *Aspergillus* spp.'in ürettiği aflatoksin B1 ve B2, biyotransformasyona uğrayarak aflatoksin M1 ve M2 formunda, peynirin hammaddesi sütte bulunabilir. Mikotoksinlerin biyolojik sisteme alınması, mikotoksikozis olarak adlandırılan bazı toksik sendromlara neden olabilir [41]. Optimum fermentasyon şartlarında küflerden elde edilen primer metabolitler, çeşitli fermente ürünlerin üretiminde yarar sağlamaktadır. Sekonder metabolitler olarak bilinen mikotoksinler ise, ekonomik zararlara ve sağlık problemlerine neden olmaktadır. Mikotoksinlerin

kanserojen, teratojen, mutajen etkileri pek çok çalışmada ifade edilmektedir. Peynirlerde mikotoksin üretme yeteneğindeki türlerin belirlenmesi, rastgele ve uygunsuz ortamlarda üretilen küflü peynirlerin mikotoksin yönünden az da olsa potansiyel risk taşıdığına işaret etmektedir [20, 27, 42, 43, 44]. Ülkemizde çeşitli yörelerde mahalli olarak üretilen ve özel lezzet, koku ve tatlara sahip olan bu peynirlerin endüstriyel olarak üretilip daha geniş kitlelere ulaştırılabilmesi ve sağlık açısından değerlendirilebilmesi oldukça önemlidir. Pek çok çalışma ile peynirlerde mikotoksin içeriği araştırılmış, halk sağlığı için tehlikenin boyutları ortaya konmuştur. Ancak ülkemiz bazında küflü peynirlerde yapılmış çalışmalar sınırlıdır.

Mikotoksinlerin de dâhil olduğu fungal sekonder metabolitler, genellikle yaşamsal faaliyetleri sürdürmek için gerekli olmayan maddelerdir. Bunlardan büyük kısmı insan sağlığına zararlıyken, bazıları tıpta ve ilaç sektöründe kullanılmaktadır. Fungal sekonder metabolitlerinden çoğu, yapı bloklarından; özellikle terpen sentaz, poliketid sentaz, ribozomal sentaz ve ribozomal olmayan peptid sentaz enzim gruplarının aktiviteleriyle sentezlenir. Sekonder metabolit biyosentezinde, sentezi sağlayan enzimleri kodlayan genler, bir gen kümesinde birbirine bağlı olarak bulunur [45].

Peynir küflerinin genetik açıdan incelenmesi, mikotoksin üretimleri konusunda ipuçları sunar. *Penicillium* spp.'ın ve özellikle, *Penicillium roqueforti*'nin mikotoksin biyosentez yolları, fonksiyonları belirlenmiş ve gen kümeleri çıkarılmıştır. Mikofenolik asit, rofortin C, PR toksin ve izofumigaklavin bu metabolitlerden küflü peynirlerde en çok üretilenleridir [46, 47].

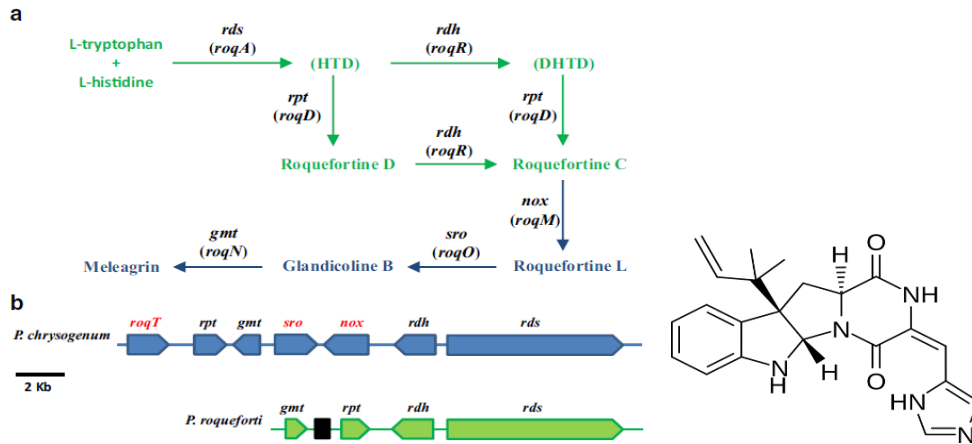
Mikotoksin üretiminde biyotik faktörlerin yanında abiyotik faktörlerin (pH, sıcaklık, NaCl ve O₂ içeriği, C/N oranı vb.) de önemli olduğu bilinmektedir [48]. Küf izolatlarının mikotoksin üretme kapasitelerinin belirlenmesinde ve peynirlerde mikotoksin tespitinde, ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS/MS), sıvı kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektroskopisi (LC-MS/Q-TOF), enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) gibi yöntemler kullanılmaktadır [17, 28, 49]. Erdoğan vd. [31], Küflü Tulum peynirinden 12 adet *Penicillium roqueforti* izole etmiş; bu izolatlar yeast ekstrakt sükröz sıvı besiyerinde (YES), 5, 12 ve 25°C'de 10 gün geliştirerek penisilik asit (5 izolat),

patulin (5 izolat), rokfortin (6 izolat) ve PR toksin (4 izolat) üretme yeteneklerini belirlemiştir. Buna göre, tüm izolatlar farklı sıcaklıklarda toksin üretme yeteneğine sahip olup, en çok 25°C'de toksin üretmişlerdir. Rokfor peynirinin olgunlaşma sürecinde (3 ay) kimyasal kompozisyonunun ve mikrobiyotasının incelendiği bir çalışmada, sentetik besiyerinde PR toksin üreten *Penicillium roqueforti* izolatlarının (%16,6) peynir örneklerinde mikotoksin oluşturmadığı tespit edilmiştir [50]. Fontaine vd. [48]'nin yaptığı bir çalışmada, Avrupa'nın farklı yerlerinden toplanan mavi damarlı peynirlerden izole edilen 96 *P.roqueforti* suşunun, roquefortin C ve mikofenolik asit üretme potansiyelleri incelenmiş, iki sentetik besiyeri ortamında suşlar geliştirilerek karşılaştırılmıştır. Buna göre tüm suşlar bu iki mikotoksini üretme potansiyeline sahip bulunmuştur. Küflü Civil peynirinde yapılmış bir araştırmada, 41 peynir örneğinden izole edilen 186 küften 165'inin *Penicillium roqueforti* suşları olduğu belirlenmiştir. 165 izolatın sadece 28'inin mikotoksin (rokfortin, patulin, PR toksin, penisilik asit) üretmediği tespit edilmiştir [28]. Küflü Civil peynirinde yapılmış bir diğer çalışmada, peynir örneklerinde rokfortin C, penisilik asit, mikofenolik asit, patulin miktarları sırasıyla 0,4-47,0; 0,2-43,6; 0,1-23,1; 0,1-2,3 mg/kg olarak saptanmıştır [20]. Finlandiya peynirlerinde LC-MSMS kullanılarak yapılmış bir çalışmada, rokfortin C tüm peynirlerde 0,8-12 mg/kg; mikofenolik asit ise sadece 1 örnekte 0,3 mg/kg oranlarında belirlenmiştir [51]. Avrupa'nın 15 farklı ülkesinin marketlerinden alınmış 86 mavi damarlı peynirin %37,2'sinde rokfortin C (0,8-1,7 mg/kg) ve mikofenolik asit (0,8-1,3 mg/kg) saptanmıştır [21].

2.4.1 Rokfortin C ve Biyosentezi

Rokfortinler, Gram(+) bakterilere karşı antibakteriyal etkiye sahiptir. Peynirin olgunlaşmasında, bakteri popülasyonunun kontrolünü sağlayabilir. Rokfortin C ise, düşük seviyede de olsa nörotoksik ve sitotoksik etkileri belirlenmiş bir mikotoksindir. Son yıllarda rokfortin C biyosentez yolu ilk olarak, *P. chrysogenum*'da karakterize edilmiştir. *P.chrysogenum*'un rokfortin gen kümesinde, 7 gen bulunur. Sonraki yıllarda, *P.roqueforti* türü üzerinde çalışılmıştır. *P.roqueforti*'de bu biyosentezde görev alan 4 gen ise, *rds* (*roqA*), *rdh* (*roqR*), *rpt* (*roqD*) ve bir reziduel psödogen olan *gmt* (*roqN*)'dir

(Şekil 2. 13 b). Rokfortin C üretiminde anahtar gen olarak, *rds* (*roqA*) geni belirtilmiştir [47, 52].



Şekil 2. 13 Rokfortin grubu ve Rokfortin C'nin biyosentez yolu (a), *P.chrysogenum* ve *P.roqueforti*'de bulunan Rokfortin gen kümesi ve Rokfortin C molekülü (b) [47, 52]

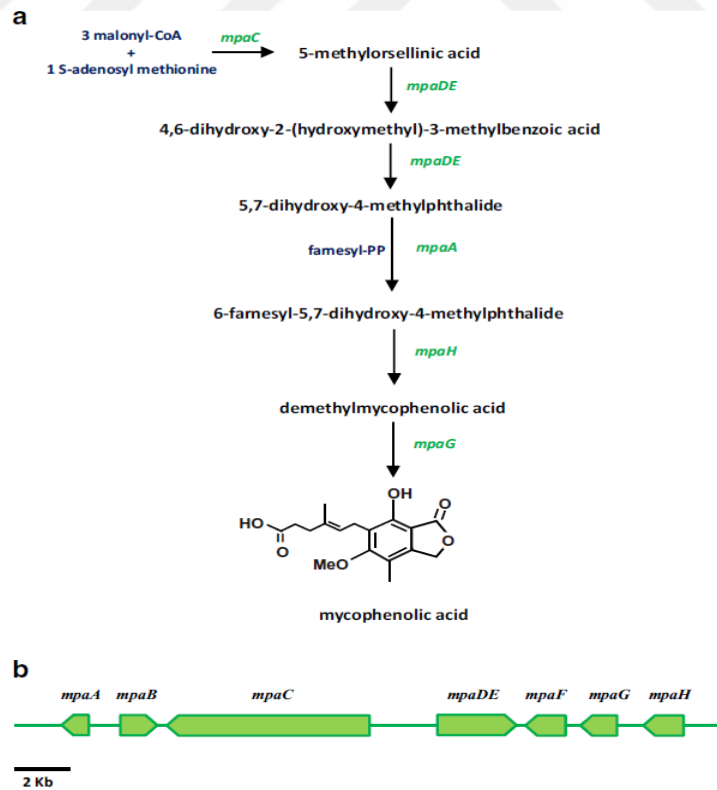
Rokfortin C; öncü bileşikleri L-triptofan ve L-histidin olan bir prenilenmiş diketopiperazin indol alkoloiddir. Şekil 2. 13' te *P.roqueforti*'de rokfortin biyosentezi, *rds* geni ile kodlanan rokfortin dipeptid sentazın (nonribosomal peptid sentaz), bu iki aminoasidi kullanımı ile başlar ve siklopeptid histidiltryptofandiketopiperazin (HTD) oluşur. HTD iki şekilde rokfortin C'ye dönüşebilir. Rokfortin D'nin ara bileşik olarak C formuna dönüştüğü yolda, ilk olarak *rpt* geninin kodladığı preniltransferaz görev alır. *rdh* geninin kodladığı dehidrogenaz enzimi ise rokfortin D'yi rokfortin C'ye dönüştürür. Diğer yolda ise, *rdh* geninin kodladığı dehidrogenaz, HTD'yi dehidro (DHTD) formuna çevirir. DHTD, *rpt* geninin kodladığı preniltransferaz dehidrogenaz ile rokfortin C'ye dönüşür. *P.roqueforti* için rokfortin C son üründür. Rokfortin C'den meleagrine dönüşümü için görev alması gereken *gmt* geni, psödogendir (işlevsiz) [47, 52, 53].

2.4.2 Mikofenolik Asit ve Biyosentezi

Mikofenolik asit, antibiyotik olarak başta değerlendirilse de nörotoksik ve immunosupresif etkileri tespit edilmiştir. Böbrek, karaciğer, kalp nakli yapılan hastalarda organ reddini önlemek için kullanılan ilaçların formülasyonlarında yer almaktadır. İlk olarak mikofenolik asit biyosentezi, *P.brevicompactum* türünde incelenmiştir. Sonraki yıllarda, *P.roqueforti* türünün, *P. brevicompactum*'a benzer bir

mikofenolik asit gen kümesinin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 2. 14b). Bu gen kümesinde (24,4 kbp), *mpaA*, *mpaB*, *mpaC*, *mpaDE*, *mpaF*, *mpaG* ve *mpaH* olmak üzere 7 gen bulunur. Mikofenolik asit üretiminde anahtar gen olarak, *mpaC* geni belirlenmiştir [22, 54].

Mikofenolik asit; öncü bileşikleri 3 malonil-CoA ve 1 S-adenozil metiyonin olan meroterpenoid yapıda zayıf bir organik asittir. Şekil 2. 14a'da *P.roqueforti*'de mikofenolik asit biyosentezi, *mpaC* geninin kodladığı poliketid sentazın, bu iki bileşiği 5-metil orselinik asite dönüştürmesi ile başlar. Bifonksiyonel sitokrom p450-hidrolaz (*mpaDE*), sırasıyla, 4,6-dihidroksi-2-hidroksimetil-3-metilbenzoik asit ve 5,7-dihidroksi-4-metilfitalat bileşiklerini oluşturur. Buradan *mpaA*'nın kodladığı pireniltransferaz ile 6-farnesil-5,7-dihidroksi-4-metilfitalata dönüşür. *mpaH* geninin aktivitesiyle (oksidatif bir enzim) demetilmikofenolik asit oluşur ve bu bileşik *mpaG* geninin kodladığı O-metil transferaz ile son ürün olan mikofenolik asite dönüşür. *mpaB* ve *mpaF* genlerinin işlevi tam olarak belirlenememiştir. Ancak, *mpaF* geninin susturulduğu bir çalışmada, mikofenolik asit üretiminin azaldığı tespit edilmiştir [22, 47, 54].



Şekil 2. 14 Mikofenolik asitin biyosentez yolu (a), *P.roqueforti*'de bulunan mikofenolik asit gen kümesi (b) [47, 54]

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Peynir Örnekleri

Çalışmada materyal olarak kullanılan 17 küflü peynir, 11'i Konya Küflü, 3'ü Divle Tulum, 3'ü Erzurum Civil (Çeçil) olmak üzere, Konya ve İstanbul'daki yerel marketlerden temin edilmiştir (Şekil 3. 1). Peynirleri temsil edecek şekilde, aseptik koşullarda, 250'şer gram alınan örnekler +4°C'de muhafaza edilmiş ve seri bir şekilde küf izolasyonu yapılmıştır. Bu peynirler, 1'den 17'ye kadar numaralandırılmıştır (1-11 Konya Küflü; 12,13,17 Divle Tulum; 14, 15, 16 Erzurum Çeçil). Ayrıca bu çalışmada, daha önce muhtelif küflü peynirlerden (Konya Küflü, Divle-Obruk, Erzurum-Kars yöresi Çeçil, Elazığ-Bingöl yöresi Tomas, Hatay yöresi Sürk ve Akdeniz yöresi Tulum) izole edilen ve Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonunda bulunan küfler de saflaştırılıp kullanılmıştır.



Şekil 3. 1 Konya Küflü (1, 4) ve Erzurum Küflü Civil (15) peyniri örnekleri

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan malzemeler ve ekipmanlar Çizelge 3. 1’de ifade edilmiştir.

Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasallar, cihaz ve ekipmanlar

Besiyerleri ve Kimyasallar	Cihaz ve Ekipmanlar
Patato Dekstroz Agar (Merck)	Biyogüvenlik Kabini, Cryste
Peptonlu Su (Merck)	-20°C Dondurucu, Arçelik
Malt Ekstrakt Broth (Merck)	Otoklav, Hirayama HMC Hclave HV-25L
Yeast Ekstrakt (Merck)	Mikroskop, Olympus BX53, DP27
Sükroz	Çalkalamalı İnkübatör, Wisd Wisecube
Tartarik Asit (Merck)	İnkübatör, Wisd Wisecube
KH ₂ PO ₄ (Merck)	Stomacher Blender, SJIA-04C
MgSO ₄ .7H ₂ O (Merck)	Isıtmalı manyetik karıştırıcı, Heidolp MR 3001
Agar-Agar granulated (Biolife)	Star Blender, VWR LB400
Proteinase K (Sigma)	Analitik Terazı, ATX 224
Phenol - Chloroform-Isoamyl Alcohol (25:24:1) (Acros)	Terazi, Shimadzu TW423L
Sodium dodecyl sulfate (Merck)	Su Banyosu, Wisd WiseBath
Sodium Acetate (Sigma)	Laminar Akış Kabini, JSCB-1500SL
Isopropanol (Merck),	İnkübatör, Nüve EN 120
Glyserol (Merck)	Saf Su Cihazı, Elga Reservoir
Taq Polymerase Mix (2x PCR Master Mix, Intron)	Ultra Saf Su Cihazı
100 bp DNA Ladder (Invitrogen)	-80°C Dondurucu, ESCO ULT Lexicon II
DNA Loading dye (Invitrogen)	Buzdolabı, Samsung
Intron MEGAquick-spin Kit (50 preps)	Rotary Evaporator (Heidolph)

Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasallar, cihaz ve ekipmanlar (devamı)

Besiyerleri ve Kimyasallar	Cihaz ve Ekipmanlar
Vivantis Clean-up Kit-GF-1 PCR (100 preps)	Biyogüvenlik Kabini, CleAir CHD
Agarose (for general use, Sigma)	Vorteks, Wids WiseMix
Primerler (toplam 165 baz çifti) (Sentromer)	Shimadzu BioSpec-(Nano) Spektrofotometre
Tris (Merck)	Termal Döngü Cihazı (PCR), Bio-Rad T100
Borik Asit (Sigma-Aldrich)	Termal Döngü Cihazı (PCR), Applied Biosystems Veriti 96 well
EDTA (Sigma-Aldrich)	Jel Elektroforezi, Thermo Fisher Scientific OWL A2
Laktofenol Pamuk Mavisi (Sigma-Aldrich)	Jel Elektroforezi Güç Kaynağı, Consort EV215
Etanol (Merck)	Jel Görüntüleme Sistemi, BioRad Gel- Doc XR+
Asetonitril (LC-grade) (Sigma-Aldrich)	Soğutmalı Santrifüj, Hettich Universal 320R
Formik Asit (Sigma-Aldrich)	Mikrosantrifüj, FOUR E'S Scientific
CuSO ₄ .5H ₂ O (Merck)	Ultraturrax, T18 (IKA)
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Merck)	Taramalı Elektron Mikroskobu (FEI Quanta FEG 250)
	LC-MS/Q-TOF (Agilent 6530)

3.2 Metot

3.2.1 Mikrobiyolojik Ön Hazırlık (Besiyerlerinin Hazırlanması)

Besiyerleri, pipet uçları, metal spatüller vb. malzemeler ekimlerden önce otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir (Sadece Malt Ekstrakt Agar (MEA), otoklavda 115°C'de 10 dk steril edilmiştir). Patato Dextrose Agar (PDA, Merck), 39 g/L olacak şekilde saf suda çözündürülmüştür. Peynirlerden ekim yapılırken, besiyerlerinin sıcaklığı otoklavdan 45-50°C'ye gelince PDA (25°C'de pH 5,6), %10'luk tartarik asit çözeltisi (14 mL/L), steril filtreden geçirilerek (pH 3,5) asitlendirilmiştir. Malt Ekstrakt Agar, Malt Ekstrakt Broth'tan (MEB, Merck) 17 g/L ve agar-agardan (Merck) 15 g/L kullanılarak saf suda hazırlanmıştır. Yeast Ekstrakt Sükroz Agar (YESA) için; sükroz (150 g/L), yeast ekstrakt (20 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L), iz element solüsyonu (1 mL/L; 100 ml için 0,5 g CuSO₄.5H₂O ve 0,1 g ZnSO₄.7H₂O) kullanılmış ve saf suda çözündürülmüştür. YESA (otoklavlandıktan sonra pH 6,5), fosfat-sitrat buffer (0,2 M Na₂HPO₄, 0,1 M C₆H₈O₇) ile pH 4,5'a ayarlanmıştır. Tüm agarlar 45-50°C'ye gelince, steril petri kaplarına 15'er mL dökülmüş ve katılaştırılmıştır. Yatık agar hazırlamak için, PDA yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış, cam tüplere 7'şer mL paylaştırılarak otoklavlanmış, otoklav sonrası sıvı iken bir aparat üzerine yatırılarak katılaştırılmıştır [55, 56].

3.2.2 Küflü Peynirlerden Küf İzolasyonu

Konya Küflü, Divle Tulum ve Erzurum Çeçil peynirleri olmak üzere 17 adet küflü peynir, küf izolasyonu için, sırasıyla homojenize edilmiştir. Buna göre, steril poşetlerde %0,1'lik 90 mL tamponlanmış peptonlu suda, 10 gram peynir homojenize edilmiştir.

10⁻¹'den 10⁻⁶'ya kadar seri dilüsyonlar hazırlanmış, yayma yöntemiyle her bir dilüsyondan Patato Dextrose Agar (PDA) besiyerine paralel ekim yapılmıştır. Petriler, 25-27°C'de 4-7 gün inkübe edilmiştir [14, 15, 28, 48].

3.2.3 İzole Edilen Küflerin Saflaştırılması

Farklı yörelerde üretilen ve küflü olarak tüketilen peynirlerden (Konya Küflü, Divle-Obruk, Erzurum yöresi Civil (Çeçil), Elazığ-Bingöl yöresi Tomas, Hatay yöresi Sürk ve Akdeniz yöresi Tulum) izole edilen 60 ve Yıldız Teknik üniversitesi Gıda Mühendisliği

Bölümü Kültür Koleksiyonunda bulunan 80 izolattan, farklı küf kolonileri seçilerek, Patato Dextrose Agar (PDA) ve Malt Extract Agar (MEA) besiyerlerine steril şartlarda iğne özeyle üç nokta ekim yapılarak saflaştırılmıştır. Saf isolatlar, 25-27°C'de 4-7 gün inkübe edilmiştir [14, 15, 28, 48].

3.2.4 Morfolojik İnceleme

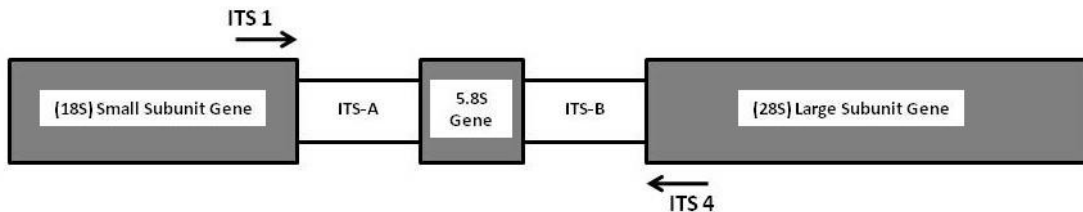
PDA ve MEA besiyerlerinde saflaştırılan 140 izolat, morfolojik olarak incelenmiş ve farklı koloniler seçilerek moleküler tanımlamaya gidilmiştir.

3.2.5 Kültür Stoklarının Oluşturulması ve Depolanması

Saf küf isolatları, stokları yapılmak üzere, PDA veya MEA'da 25-27°C'de 4-7 gün geliştirilmişlerdir. Agarda geliştirilen kültürlerin miselleri steril özeyle toplanarak, 500 µL %40 steril gliserol eklenen mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır [52]. Kültürler, -80 °C'de depolanmıştır. Ayrıca saf isolatlardan morfolojik inceleme sonucu seçilenler (*Penicillium roqueforti* olarak düşünülenler), yatık agarlara (PDA) alınmıştır [14, 28].

3.2.6 Saf İzolatların Genotipik Tanımlanması ve Karakterizasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR)

PCR amplifikasyonu, 5.8S (ITS) ve 28S (LSU) rRNA gen bölgeleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3. 2). Funguslarda ribozomal genler, yüksek oranda korunmuş 18S, 5.8S ve 28S rRNA bölgeleriyle temsil edilir. Bu genler, evrensel primerlerin kolay geliştirildiği birimlerdir. Bölgeler birbirinden, iki ITS (Internal transcribed spacer, ITS1 (ITS-A) ve ITS2 (ITS-B)) bölgesi ile ayrılır. Ayrıca filamentli funguslarda tanımlamada, *calmodulin*, *B-tubulin* ve *elongation factor (EF1-α)* bölgeleri de kullanılmaktadır [57].



Şekil 3. 2 Fungal genomda 18S, 5.8S ve 28S rRNA gen bölgelerinin şematik gösterimi

[58]

3.2.6.1 Genomik DNA İzolasyonu

Morfolojik olarak incelenen ve kolonileri farklı olan küfler tanımlanmıştır. Küflerin DNA izolasyonunda, PCI (Fenol-Kloroform-İzoamil alkol) metodundan yararlanılmıştır. Buna göre, 25:24:1 oranında PCI (Acros, ABD) kullanılmıştır. Petride geliştirilen kültürlerin miselleri steril özeyle, 1X TE (Tris-EDTA) bufferdan 450 µL ilave edilmiş tüplere toplanmıştır. Tüpler hafifçe karıştırılarak buffer içinde misellerin resüspanse edilmesi sağlanmıştır. %10'luk SDS'den 50 µL ve proteinaz K'dan 2 µL (1 mg/mL) misellere ilave edilmiştir. Tüpler iyice karıştırılmış ve 37°C' de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 65 °C' de su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. PCI karışımından tüplere 500 µL ilave edilip iyice karıştırılmıştır. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant yeni tüplere aktarılıp, PCI prosesi tekrarlanmıştır. Yeni tüplere toplanan kısım üzerine 5M 50 µL sodyum asetat ve izoparopanolden 1 mL eklenerek karıştırılmıştır. Tüpler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılıp %70'lik etanolden 500 µL ilave edilmiştir. Tekrar santrifüjden sonra 37°C'de 5 dakika kurutulmuş ve TE bufferdan 100 µL eklenip iyice karıştırılmıştır. DNA kalitesi, BioSpec Nano (Shimadzu, Japonya) spektrofotometrede ölçülmüştür (İzole edilen DNA'ların iyi kalitede olmaları, OD₂₆₀/OD₂₈₀ (optik yoğunluk) değerinin 1,7-2,0 arasında olmasıyla anlaşılır). PCR aşamasına geçene kadar, DNA izolasyonları yapılmış örnekler -20°C'de depolanmıştır [14, 15, 59].

1X TE Tamponunun Hazırlanışı: 100 mL 1X TE tamponu [10 mM Tris-Cl (pH 7,5); 0,1 mM EDTA (pH 8,0)] için öncelikle, 50 mL 1M Tris-Cl ve 50 mL 0,5 M EDTA hazırlanmıştır. Buna göre; 6,06 g Tris tartılıp ultra saf su ile biraz çözündürülüp, hacmi 50 mL'e tamamlanmış ve 0,1 M HCl ile pH'ı 7,5'a ayarlanmıştır (1M Tris-Cl). 9,31 g EDTA tartılıp ultra saf su ile biraz çözündürülüp, hacmi 50'ye tamamlanmış ve pH'ı 1 M NaOH ile 8,0'a ayarlanmıştır (0,5 M EDTA). Solüsyonunun pH'ı 8,0'a gelince, EDTA tamamen çözünmüştür. 1X TE tamponunda, son hacimde 1M Tris-Cl'den 1 mL, 0,5 M EDTA'dan da 0,2 mL alınarak 100 mL'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır. Bu tampon, genomik DNA izolasyonunda ekstraksiyon buffer olarak ve primerlerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.2.6.2 28S D1/D2 rRNA Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

Küflerin tanımlanması, 28S D1/D2 rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Buna göre bu bölgeye ait, sırasıyla ileri ve geri, NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG-3') ve NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primerleri (Sentromer) kullanılmıştır [17, 60, 61].

3.2.6.3 ITS1-5.8S-ITS2 rRNA Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

Küflerin tanımlanması, ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesinin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Buna göre bu bölgeye ait, sırasıyla ileri ve geri, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri (Sentromer, Türkiye) kullanılmıştır [17, 28,60, 61].

3.2.6.4 PCR Karışımının Hazırlanması

Amplifikasyon için oluşturulacak PCR karışımı (25 µL) ve termal döngü (BioRad, Applied Biosystems, ABD) şartları Çizelge 3. 2 ve Çizelge 3. 3'te verilmiştir [28, 61]. Primerler ise, 1X TE (Tris-EDTA) buffer/ultra saf su ile sulandırılarak 100 µM stoklar halinde hazırlanmış ve PCR karışımında kullanılmak üzere 12,5 µM'a 1X TE buffer/ultra saf su ile seyreltilmiştir.

Çizelge 3. 2 PCR amplifikasyonu için hazırlanan karışım [28,61]

Taq DNA Polimeraz Miksi (2X PCR Master Mix, Intron)	12,5 µL
H ₂ O (Ultra Saf)	7,5 µL
Forward Primer (12,5 µM)	2 µL
Reverse Primer (12,5 µM)	2 µL
Örnek (Template) DNA	1 µL
Toplam PCR Karışımı	25 µL

Çizelge 3. 3 PCR amplifikasyonu için primerlere göre termal döngü şartları*

	NL1-NL4	ITS1-ITS4
İlk Denatürasyon	94 °C 5 dk	94°C 1 dk
Denatürasyon	94°C 30 sn	94°C 30 sn
Bağlanma	55 °C 30 sn	52 °C 30 sn
Uzama	72 °C 30 sn	72 °C 1 dk
Son Uzama	72 °C 7 dk	72°C 10 dk
Döngü Sayısı	30	34

*Optimum termal döngü şartları denemelere göre modifiye edilmiştir.

3.2.6.5 PCR Ürünlerinin (Amplikon) Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

0,5X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Tamponunun Hazırlanması: İlk önce 1L 5X TBE tamponu hazırlanmıştır. Bunun için; Tris'ten 54 g, borik asitten 27,5 g ve 0,5 M EDTA' dan 20 mL alınarak aynı kapta çözündürülmüş, hacmi 1L'ye tamamlanmış ve pH'ı 8,0'a ayarlanmıştır. 1L 0,5X TBE tamponu için ise; 100 ml 5X TBE, ultra saf su ile seyreltilerek 1L'ye tamamlanmıştır. Bu tampon, agaroz jel hazırlarken ve elektroforez tankında kullanılmıştır.

Agaroz Jelin Hazırlanması (%1,2'lik): 250 mL' lik 3 adet erlene 1,2 g agaroz tartılmış, 100'er mL 0,5X TBE tamponunda agaroz, mikrodalgada kısa programda çalışarak çözündürülmüştür (kaynatılmıştır). Soğumaya yakın 300 mL jele, 1X etidyum bromür (EtBr)'den 10 µL katılarak pipet ucuyla karıştırılmıştır. 300 mL agaroz jel, tarakları takılmış traye dökülmüş ve katılaşmaya bırakılmıştır.

1X EtBr'nin Hazırlanması: 1 mL 1X EtBr için, 10X'lik EtBr stoğundan 100 µL alınmış ve hacmi steril bir mikrosantrifüj tüpünde 1 mL'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır.

Amplikonların Yürütülmesi ve Görüntülenmesi: Amplifikasyondan sonra oluşan PCR ürünleri ve negatif kontrol, bir miktar yükleme boyasıyla (loading dye) karıştırılmış ve 5'er µL alınarak jele yüklenmiştir. DNA ladder (100 baz çifti) eşliğinde elektroforezde (Thermo Fisher Scientific, ABD) %1,2'lik agaroz jelde, 0,5 X TBE tamponunda (Tris-Borik asit-EDTA), 120 V'da 90 dk (500 mA, 300 W) yürütülmüş, UV-görüntüleme sisteminde (BioRad EZ), bant görüntülerine bakılmıştır. 28S (D1/D2) ve 5.8S (ITS1/ITS2) rRNA gen bölgelerinin amplifikasyonu sonucu sırasıyla, 600 baz çifti (bp) ve 560-580 baz çifti (bp)

boyutlarında PCR ürünleri, ladder (100 bp) ile takibi yapılarak görüntülenmiştir [17, 28, 61].

3.2.6.6 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması (Clean-up)

PCR ürünleri, GF-1 PCF (Vivantis, Malezya) ve MEGAquick-spin (Intron, Güney Kore) purifikasyon kitleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Buna göre, her iki kitin kullanım talimatlarına göre izlenen prosedürler şu şekildedir:

Vivantis GF-1 PCR Clean-up Kit (100 preps): Kit kullanımında ilk olarak, 34 mL wash buffera, 80 mL saf etanol eklenmiştir. PCR buffer ise, 60°C'de 10 dk su banyosunda bekletilmiştir. 25 µL'lik örnekler 75 µL steril saf su eklenmiş, pipetle karıştırılmıştır. Spin kolonu geçirilen filtreli tüplere 500 µL PCR buffer eklenmiş, örneklerin tamamı (100 µL) ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiş, filtreden kolona geçen kısım boşaltılmıştır. 650 µL wash bufferdan (etanollü) eklenmiştir. Filtreden kolona geçen kısım boşaltılmıştır. Boş olan tüpler 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiş ve filtreden kolona geçen kısım boşaltılmıştır. Tüplere takılı kolonlar değiştirilmiştir. 30 µL elüsyon buffer eklenmiş ve 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Filtreden kolona geçen kısım son üründür. Son ürün, PCR tüplerine toplanmıştır ve sekansa gönderilene kadar -20°C'de depolanmıştır.

Intron MEGAquick-spin Total Fragment DNA Purification Kit (50 preps): Kit kullanımında, PCR ürününün 5 katı kadar BNL buffer tüpe eklenmiş ve karışım vortekslenmiştir (Örneğin, 20 µL örneğe 100 µL BNL buffer eklenir). Karışım, spin kolonu geçirilen filtreli tüplere aktarılmış, 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiş ve kolona geçen kısım boşaltılmıştır. 700 µL washing bufferdan eklenmiş ve 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiş, kolona geçen kısım boşaltılmıştır. Tüpler boş bir şekilde, 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiş ve kolona geçen kısım boşaltılmıştır. Kolonlar değiştirilmiştir. Tüplere 30 µL elüsyon buffer ilave edilmiş ve tüpler 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Kolona geçen kısım (son ürün), PCR tüplerine toplanmış ve sekansa gönderilene kadar -20°C'de depolanmıştır.

3.2.6.7 Sekans ve BLAST Analizi

Clean-up işlemiyle elüe edilen son ürünler sekansa gönderilmiştir. Takiben ilgili bölgeler tek yönlü sekanslanmıştır. Sekans kromatogramları, CLC Main Workbench (Qiagen, Almanya) programına aktarılmış ve düzenlenmiştir. Nükleotid dizilimleri ClustalW' da hizalanmıştır. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistemi kullanılarak, %97-100 arasında benzerlik gösteren izolatların hangi türe ait olduğu belirlenmiştir [17, 28, 62].

3.2.6.8 28S D1/D2 ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA Gen Bölgelerinin Filogenetik Ağaçlarının Oluşturulması

28S D1/D2 ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgelerinin filogenetik ağaçları, MegAlign 8.1.2 (DNASTAR, ABD) programında oluşturulmuştur.

3.2.7 Mikroskopik İnceleme

Penicillium roqueforti izolatları, ışık mikroskopunda ve taramalı elektron mikroskopunda görüntülenmiş, misel yapıları (verticillate, konidya, konidyaspor) incelenmiştir. Ayrıca *P.roqueforti* dışında izolatlardan seçilen türler de incelenmiştir.

3.2.7.1 Işık Mikroskopunda Görüntüleme

Penicillium roqueforti ve seçilen diğer *Penicillium* türleri (40 izolat), ışık mikroskopunda (Olympus BX53, DP27, Japonya), 4x, 10x, 20x, 40x ve 100x objektiflerde büyütürken incelenmiştir. Boyamadan incelemede lam kültürü kullanılmış, ayrıca laktofenol pamuk mavisıyla boyayarak da izolatlar incelenmiştir. Misellerin preparatın kenar veya yoğun olmayan kısımlarında 4x, 10x ve 20x'te görüş alanı bulunmuş; özellikle 40x objektifiyle değerlendirme yapılmıştır. *Penicillium* türünün verticillate yapıları, konidya ve konidyasporları immersiyon yağı damlatılarak 100x'te daha detaylı incelenmiştir.

3.2.7.2 Lam Kültürünün Hazırlanması

Küf hifleri, birçok hücrenin uc uca eklenmesiyle oluşan iplikçiklerdir. Bu iplikçiklerin bir araya gelmesiyle oluşan yapıya ise misel denir. Miselleri dağıtmadan, hifleri,

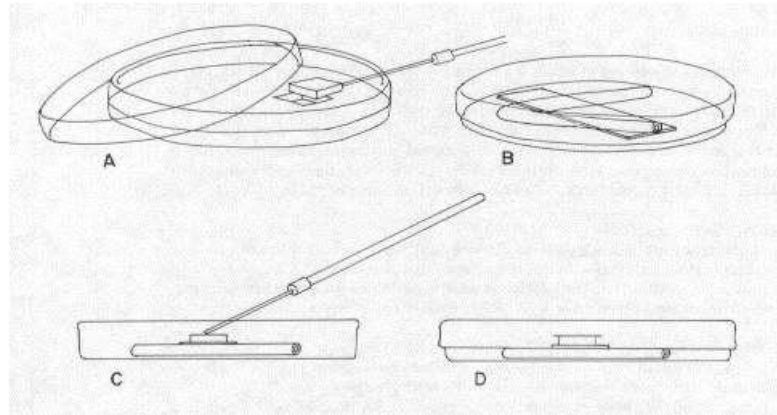
konidyoforları ve konidyaları (sporlar) daha iyi inceleyebilmek için kullanılabilecek en uygun yöntem lam kültürüdür (Şekil 3. 3). Bu yöntemle göre [63, 64, 65]:

1) (A) 45-50°C'ye soğutulmuş PDA, ince bir tabaka halinde petriye dökülmüştür. Agar donunca, steril iğne ve halka öze yardımıyla, 1,5 x 1,5 cm boyutlarında kare şeklinde bir kesit alınmıştır.

2) (B) Steril boş bir petri kutusuna, steril edilmiş bir lam yerleştirilmiştir (Lamın altına yükseltme için U veya V şeklinde cam boru yerleştirilebilir).

3) (C) 1. maddede PDA'dan alınan kesit steril öze yardımıyla lamın ortasına yerleştirilmiştir (Agarın kurumaması için boş petri zeminine steril saf su ile nemlendirilmiş, steril edilmiş bir pamuk koyulabilir). Sonra, steril bir iğne özeyle taze kültürden (5 gün PDA'da inkübe edilmiş) miseller alınarak lama tek nokta ekim yapılmıştır.

4) (D) Hazırlanan lam kültürü, 26°C'de 3 gün inkübe edilip özellikle 40X objektifte incelenmiştir (*Penicillium* spp.'nin oksijenle temasını engellemek için inkübasyon süresince lamın üzeri lamelle kapatılmamış, preparat mikroskopta incelenirken yavaşça lamel yerleştirilmiş ve kaymaması için bantlanmıştır).



Şekil 3. 3 Lam kültürünün hazırlanması [66]

3.2.7.3 Laktofenol Pamuk Mavisi ile Boyama

Laktofenol pamuk mavisi ile yaş preparasyon tekniği, küfleri boyamada sıklıkla kullanılır. Laktik asit fungal yapıyı korurken, fenol, hücre duvarına etki eder. Böylece küfler, hücre duvarlarındaki kitin tabakayı geçen pamuk mavisi ile boyanır. Boya

bileşimi (100 mL); 50 mg metil blue (pamuk mavisi, anilin mavisi), 25 g fenol, 25 g L(+)-laktik asit ve 50 g gliseroldür.

Genellikle 40x objektifinde inceleme yapılır. Boya hazırlanan lam kültürüne direkt damlatma ile ya da temiz bir lama yeni bir preparat hazırlanarak yapılabilir. Buna göre [63, 66]:

- 1) Temiz bir lama bir damla laktofenol pamuk mavisi (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiştir.
- 2) Steril iğne özeyle taze kültürden (25°C'de 5 gün inkübe edilmiş) hiflerin yapılarına zarar vermeden, kolonilerin kenarlarından miseller toplanmış ve yavaşça lam üzerindeki boyaya dağıtılmıştır (Temiz bir bantla da taze kültürden miseller toplanarak direkt lamdaki boyanın üzerine yavaşça kapatılabilir).
- 3) Lamel, boyanın kenarından hava baloncuğu kalmayacak şekilde hafifçe bırakılarak preparat kapatılmış ve 5 dk bekletilmiştir. Preparat, 20x ve 40x objektifte incelenmiştir.

3.2.7.4 Taramalı Elektron Mikroskopunda Görüntüleme

Küf izolatlarının spor ve konidyofor yapıları, taramalı elektron mikroskobu (SEM, FEI QUANTA FEG 250, ABD) ile incelenmiştir. Buna göre seçilen 9 izolat, PDA besiyerine steril iğne özeyle üç nokta ekilerek, 25°C'de 3 gün geliştirilmiştir. İzolatlardan alüminyum tutuculara karbon bantları yardımıyla örnek alınmıştır. 2 kV'luk ivmelendirme voltajında istenen görüntü kalitesi elde edildiğinden, kaplama yapılmamıştır. İzolatlar, 2.500, 5.000, 10.000 ve 20.000 kat büyütülerek görüntülenmiştir.

3.2.8 Tanımlanan Küflerin (*Penicillium roqueforti*) Muhtemel Mikotoksin Genlerinin Tespiti

3.2.8.1 Primer Dizaynı

Penicillium roqueforti suşlarının toksin genlerinin tespiti amacıyla, rokfortin C ve mikofenolik asit genlerini hedef alacak primerler kullanılarak PCR reaksiyonları oluşturulmuş ve ilgili genlerin varlığı incelenmiştir [47]. Rokfortin C ve mikofenolik asit gen kümeleri incelenmiş ve bu mikotoksinlerin üretimlerindeki anahtar genler tespit

edilmiştir. Bu genlere ait aksesyon numaraları PubMed sisteminden taranmış ve ilgili mikotoksinlerin gen dizilimlerine ulaşılmıştır. Primer 3 (Input 4.0) programı ile bu gen dizilimleri üzerinden, dizayn edilen ve Çizelge 3. 5'te belirtilen primerler kullanılmıştır [67]. *Penicillium roqueforti*'nin mikotoksin biyosentezi yolları, fonksiyonları belirlenmiş ve gen kümeleri çıkarılmıştır. Mikofenolik asit üretiminde anahtar gen olarak, Gillot vd. [22] ve Del-Cid vd. [54]'nin çalışmalarında *mpaC* geni belirlenmiştir. Rokfortin C üretiminde ise anahtar gen olarak, Kosalkova vd. [52] ve Ali vd. [53]'nin çalışmalarında, *rds/roqA* geni belirtilmektedir (Çizelge 3. 4).

Çizelge 3. 4 Mikotoksin üretimindeki anahtar genler ve fonksiyonları

Mikotoksin	Gen Adı (Aksesyon Numarası)	Fonksiyonu	Kaynak
Rokfortin C	<i>rds/roqA</i> (Proq01g022790)	Dipeptid sentaz	[47, 52, 53]
Mikofenolik Asit	<i>mpaC</i> (Proq05g069800)	Poliketid sentaz	[22, 47, 54]

3.2.8.2 PCR ile Mikotoksin Genlerinin Taranması

İlgili genler üzerinden dizayn edilen primerlerin, Primer 3 programının verdiği Çizelge 4'deki erime sıcaklıkları (T_m) dikkate alınarak izolatların tanımlanması kısmında anlatılan PCR şartları oluşturulmuştur. Optimum termal döngü şartları denemelere göre modifiye edilmiş, primerlerin erime noktaları dikkate alınarak bağlanma aşaması için sıcaklık gerektiğinde 50-52°C'ye düşürülmüştür.

Amplifikasyondan sonra oluşan PCR ürünleri (amplikonlar), jel elektroforezinde (Thermo Fisher Scientific, ABD) %1-1,2'lik agaroz jelde, TBE tamponunda (Tris-Borik asit-EDTA), 120 V'da 90 dk (500 mA, 300 W) yürütülmüş, UV-jel görüntüleme sisteminde bant görüntülerine bakılmıştır. Hedef genlerin tespitinin doğrulanması amacıyla seçilen bazı örnekler, sekansa gönderilerek nükleotid dizilimleri tekrar incelenmiştir.

Çizelge 3. 5 Dizayn edilen primerler ve özellikleri

Gen Adı (Aksesyon Numarası)	Dizayn Edilen Primerler	Erime Noktası (T _m , °C)	Amplikon Boyutu
<i>rds/roqA</i> (Proq01g022790)	RoqAF: ACTACACCGCCATTGACTCC RoqAR: CTCAATCTCGTGACCTCAA	59,4 57,3	360 bp
<i>mpaC</i> (Proq05g069800)	MpaCF: TCTGTCAAGGCAGACTGGTG MpaCR: TCGTCCGATAGCTCAGTGTG	59,4 59,4	587 bp

3.2.9 Sentetik Besiyerinde Küflerin (*Penicillium roqueforti*) Mikotoksin Üretimlerinin İncelenmesi

Mikotoksin geni tespit edilen izolatların besiyerinde toksin oluşturup oluşturmadıkları LC-MS/Q-TOF (Agilent, ABD) ile test edilmiştir.

3.2.9.1 Küf Kültürlerinin Aktive Edilmesi

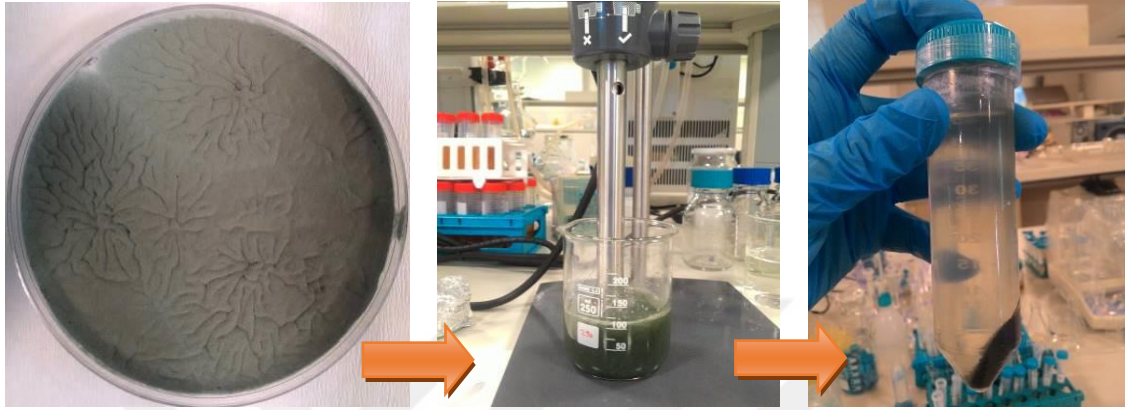
Mikofenolik asit ve roqfortin C üretimi tespiti için seçilen *Penicillium roqueforti* suşları, -80°C’ de muhafaza edilen gliserol stoklarından steril halka öze yardımıyla bir damla alınarak, önceden hazırlanan PDA besiyerinde aktiveleştirilmiştir (25°C’de 5 gün inkübasyon). Aktifleşen kültürden Yeast Ekstrakt Sükroz (YES) agara üç nokta ekim yapılmış ve 25°C’de 7 gün karanlıkta inkübe edilmiştir [49, 68].

Yeast Ekstrakt Sükroz (YES) agar (1 L): 20 g maya ekstraktı; 150 g sükroz; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,005 g CuSO₄.5H₂O; 0,01 g ZnSO₄.7H₂O ve 20 g agar saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır. Otoklav sonrası pH, 4,2’ye fosfat-sitrat buffer ile ayarlanmıştır [35].

3.2.9.2 Mikotoksin Ekstraksiyonu

Kültürün geliştiği YES agardan, steril bir agar deliciyle 10 adet 6 mm çapında agar plakları (4 g) kesilmiş ve 250 mL’lik behere alınmıştır. Behere %0,1 formik asit (v/v)

içeren 25 ml asetonitril eklenerek, bir spatül yardımıyla küflü agar hafifçe ezilmiştir. Karışım, 30 s vortekslenmiş ve sonrasında Ultraturrax T18 (IKA) ile 10.000 rpm'de 1 dk homojenize edilmiştir. Homojenizat, 15 dk ultrasonik su banyosunda tutulmuştur. 5000 g (7530 rpm)'de 4°C'de 10 dk santrifüjlenmiştir (Şekil 3. 4). Üstteki sıvı faz toplanarak steril bir şişeye alınmış ve analiz öncesi -20°C'de muhafaza edilmiştir [49, 51].



Şekil 3. 4 Mikotoksin ekstraksiyon aşamaları

3.2.9.3 LC-MS/Q-TOF ile Mikotoksin Tespiti

Ekstraktlar, 0,2 µm PTFE filtreden geçirilerek 2 mL'lik viallere alınmıştır. Katı besiyerine alınan küflerden elde edilen ekstrakt, LC-MS/Q-TOF (Agilent, ABD) sistemine verilerek kalitatif olarak rokfortin C ve mikofenolik asit varlığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, Nielsen vd. [69], Sumarah vd. [70], O'Brien vd. [71]'nin HPLC ve LC-MS/MS'de yaptıkları çalışmalar modifiye edilerek, Gillot vd. [49]'nin LC-MS/Q-TOF ile yaptığı çalışmayla karşılaştırılarak metot oluşturulmuştur [49, 69, 70, 71]. Ekstrakte edilen metabolitler, Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-flight (QTOF) LC/MS sistem (Agilent Teknolojileri) kullanılarak tespit edilmiştir. Filtrattan 2 µL, HPLC (binary pump 1260 ve degasser) sistemine enjekte edilmiştir. Ayırmada, ZORBAX Extend-C18 kolonu (2.1x50 mm ve 1,8 µm, 600 bar) kullanılmıştır. Kolonun başlangıç sıcaklığı 35°C ve mobil faz akış hızı 0,3 mL/dk: Solvent A, milli-Q su+ %0,1 LC-MS formik asit (v/v)+0,1 amonyum format(v/v) iken; solvent B, %100 RS LC-MS asetonitril. Solvent B, 4 dk boyunca %10'da tutulmuştur. Ardından 36 dk boyunca %10-100'lük bir gradyan akış sağlanmıştır. Son olarak, solvent B, 10 dk boyunca %100, post time ise 5 dk

sürdürülmüştür. Analitler, hem ESI+, hem de ESI- modlarında iyonize edilmiş (ESI: Elektrosprey İyonlaşma) ve MSMS kütle çekimleri alınmıştır.



ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 İzolatların Morfolojik Özellikleri

Yöresel küflü peynirler (17 adet), 10^{-6} 'ya kadar, yayma plak yöntemi ile PDA besiyerlerine paralel ekim yapılmış ve petriler 25°C 'de 5 gün inkübe edilmiştir. Kolonilerin morfolojik özelliklerine göre farklı olduğu düşünülen küfler, PDA'ya çizme yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan 60 izolat, morfolojik olarak incelenmek üzere PDA ve MEA besiyerlerine üç nokta yöntemiyle ekilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, YTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan, yine yöresel küflü peynirlerden önceden izole edilmiş ve tanımlanmamış 80 izolat da kullanılmıştır. Toplam 140 izolat, üç nokta yöntemi ile PDA ve MEA besiyerlerine üç nokta ekim ile tekrar saflaştırılmış ve morfolojik olarak incelenmiştir. İnkübasyon süresi, her ekim için 25°C 'de 5 gün olarak optimize edilmiştir.

Üç nokta ekim yöntemi ile PDA ve MEA besiyerlerine ekilen küf izolatları, 25°C 'de 5 gün inkübasyon sonunda, ilgili besiyerlerinde koloni renkleri ve şekilleri, kolonilerin arka kısımlarının renkleri ve eksudat üretimleri incelenmiştir. Kolonilerin rengi, besiyeri bileşimine göre değişebildiğinden iki besiyerinde morfolojik tanımlama yapılmıştır. PDA'nın küf türleri arasındaki morfolojik farklılıkları tespit edilebilmek için, en iyi besiyeri ortamı olduğu belirtilmiştir [72]. Kolonilerin, PDA ve MEA besiyerinde genellikle tipik yeşil renkli (açık, soluk, koyu) ve tüylü-kadifemsi görünümlü yapılar göstermiştir. Buna göre, tüm izolatların *Penicillium* türüne ait olduğu belirlenmiştir. PDA'da kolonilerin arka kısımları ise, renksiz olmasının yanı sıra krem, sarı, açık yeşil, kahverengi olduğu ve buna göre izolatlar arasında birkaç farklı *Penicillium* türünün

tespit edilebileceği düşünülmüştür. 25°C'de 5 gün inkübasyon sonunda, koloniler arasında bazı farklılıklar belirlenmiştir. *Penicillium* türlerinin kolonilerinin, PDA ve MEA besiyerlerinde farklı yapılar; kadifemsi (velvety), yünlü (floccose), konidyal kitlerinin kabuk halinde dökülmesi (crustose) ve bölümler halinde (fasciculate) özellikler gösterebileceği belirtilmektedir [35, 36]. Farklı türleri yansıtacak şekilde seçilen izolatların koloni morfolojileri, Şekil 4. 1, Şekil 4. 2, Şekil 4. 3, Şekil 4. 4 ve Şekil 4. 5'te numarandırılarak verilmiştir.

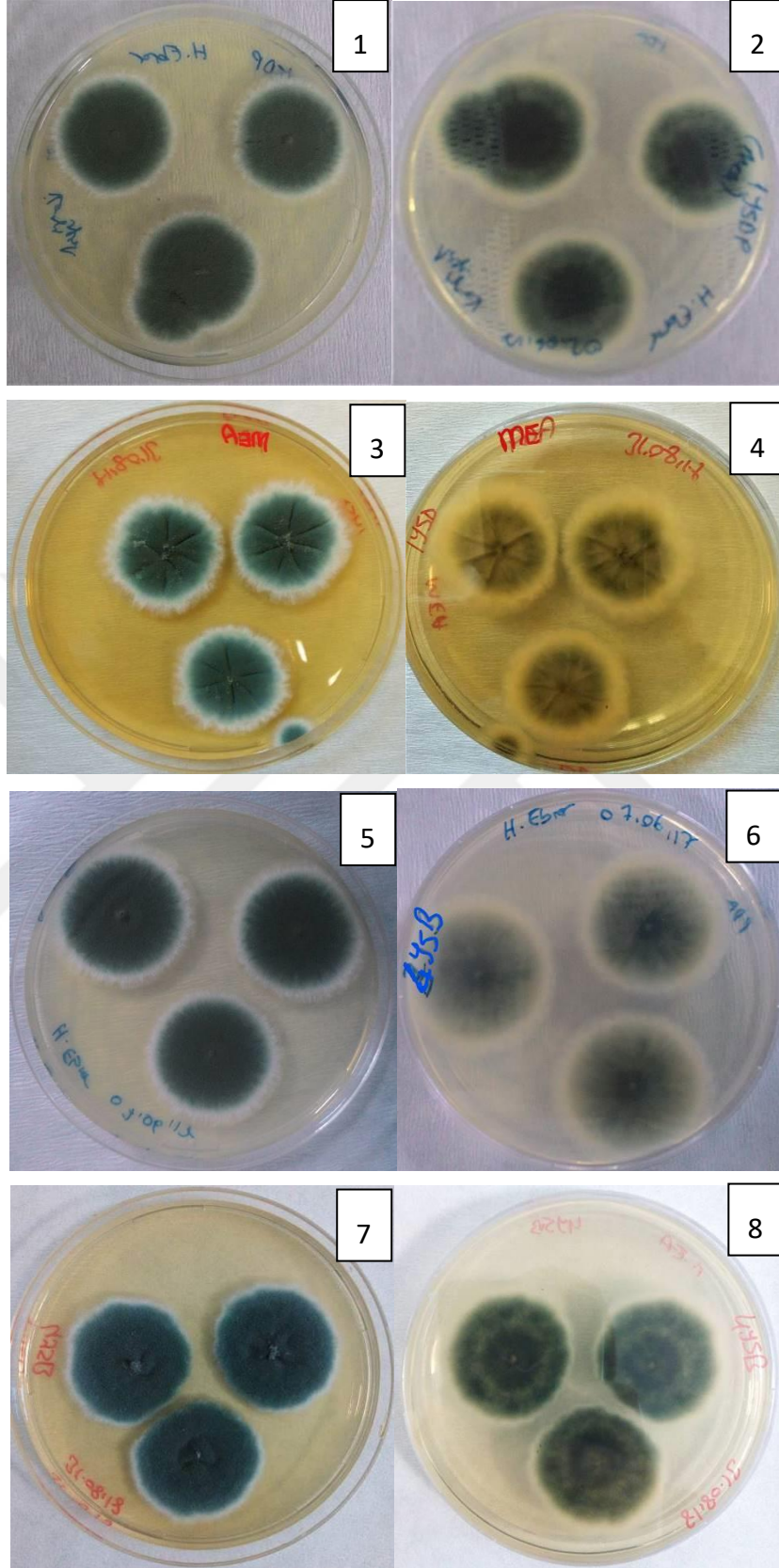
P.roqueforti, PDA ve MEA'da genellikle, tipik yeşil ve kadifemsi koloniler şeklinde gelişir [35, 36, 62]. Şekil 4. 1 ve 4.2'de özellikle MEA besiyerinde 1Y5D ve 12F, bölmeler halinde (fasciculate) morfoloji gösterirken, PDA besiyeri üzerindeki gelişimlerinde bazı farklılıklar vardır. 4Y5B VE 17Y5D diğer izolatların morfolojilerine temelde benzese de, daha farklı yapılar göstermektedir. Gillot vd. [72], *P. roqueforti* suşları arasında bazı morfolojik farklılıklar tespit etmişlerdir.

P.crustosum, kabuk bağlamış, misellerin pul pul döküldüğü yeşil kolonilerden oluşur, kolonilerin alt kısımları ise sarıdır [35, 36]. Şekil 4. 3'te 4Y5D izolatında bu yapılar tespit edilmiştir. *P.commune*'nin kolonileri, hafif yünlü yeşil renklidir ve kolonilerin alt kısımları açık sarı-bej rengindedir [35, 36]. 31A izolatı, Şekil 4. 3'te gösterilmiştir.

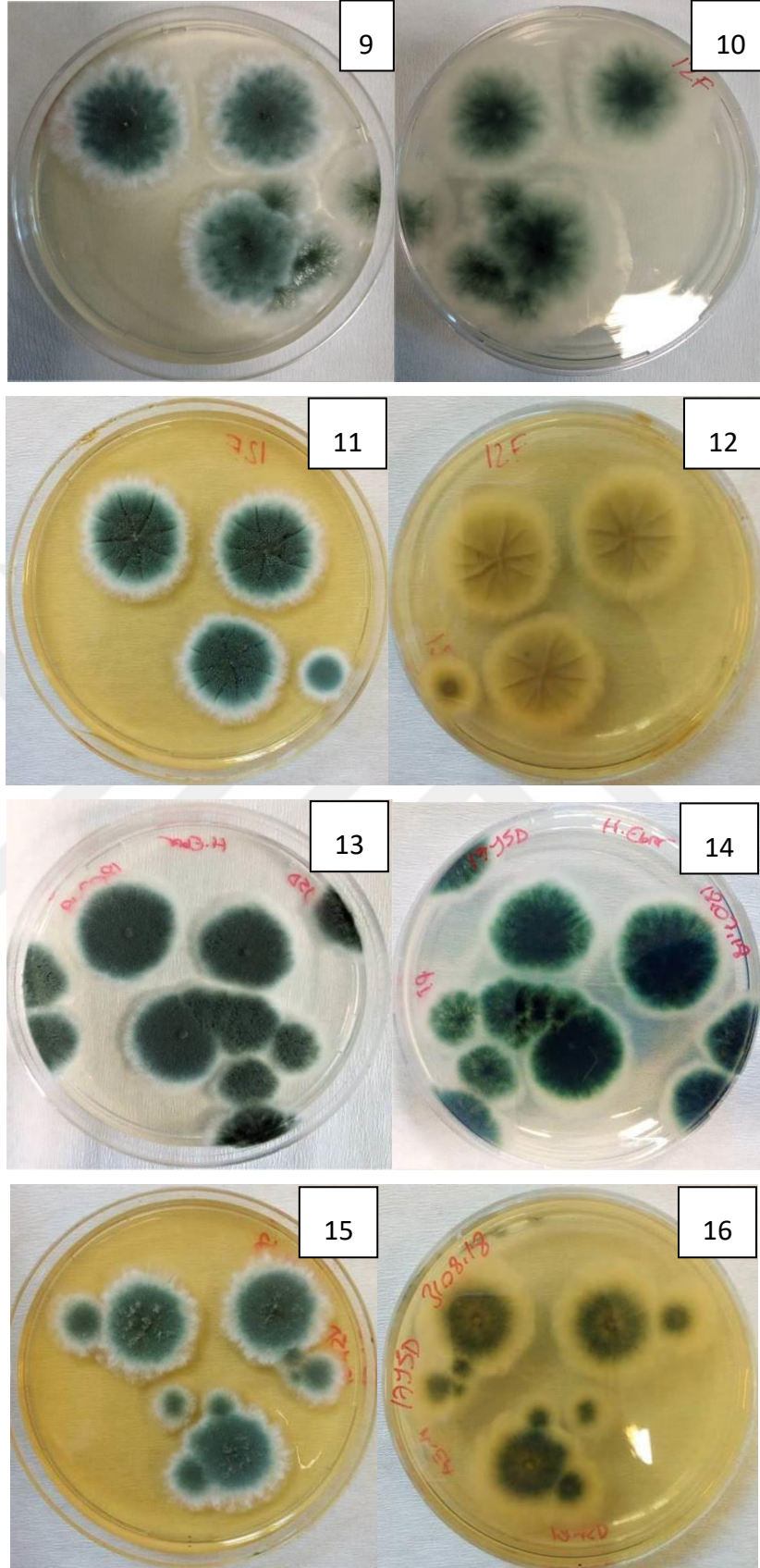
P.spinulosum ve *P.corylophilum*'da ise, yeşil kolonilerinin yanı sıra koloni yüzeyinde halkalar vardır ve kolonilerin alt kısımları krem renktedir [35, 36]. Şekil 4. 4'te 13B ve 30C izolatlarında PDA besiyerinde kolonilerin arkası bej renktedir. Kolonilerin yüzeyinde hafif halkalanmanın yanında, 30C'nin koloni merkezinde tomurcuk yapılar tespit edilmiştir.

P.chrysogenum, tipik yeşil kolonilerinin yanı sıra, PDA besiyerinde sarı, MEA'da beyaz eksudat salgılar ve kolonilerinin alt kısmı da sarı renk gösterir [35, 36]. Şekil 4. 5'teki 13Y6E, bu özellikleri barındırmaktadır.

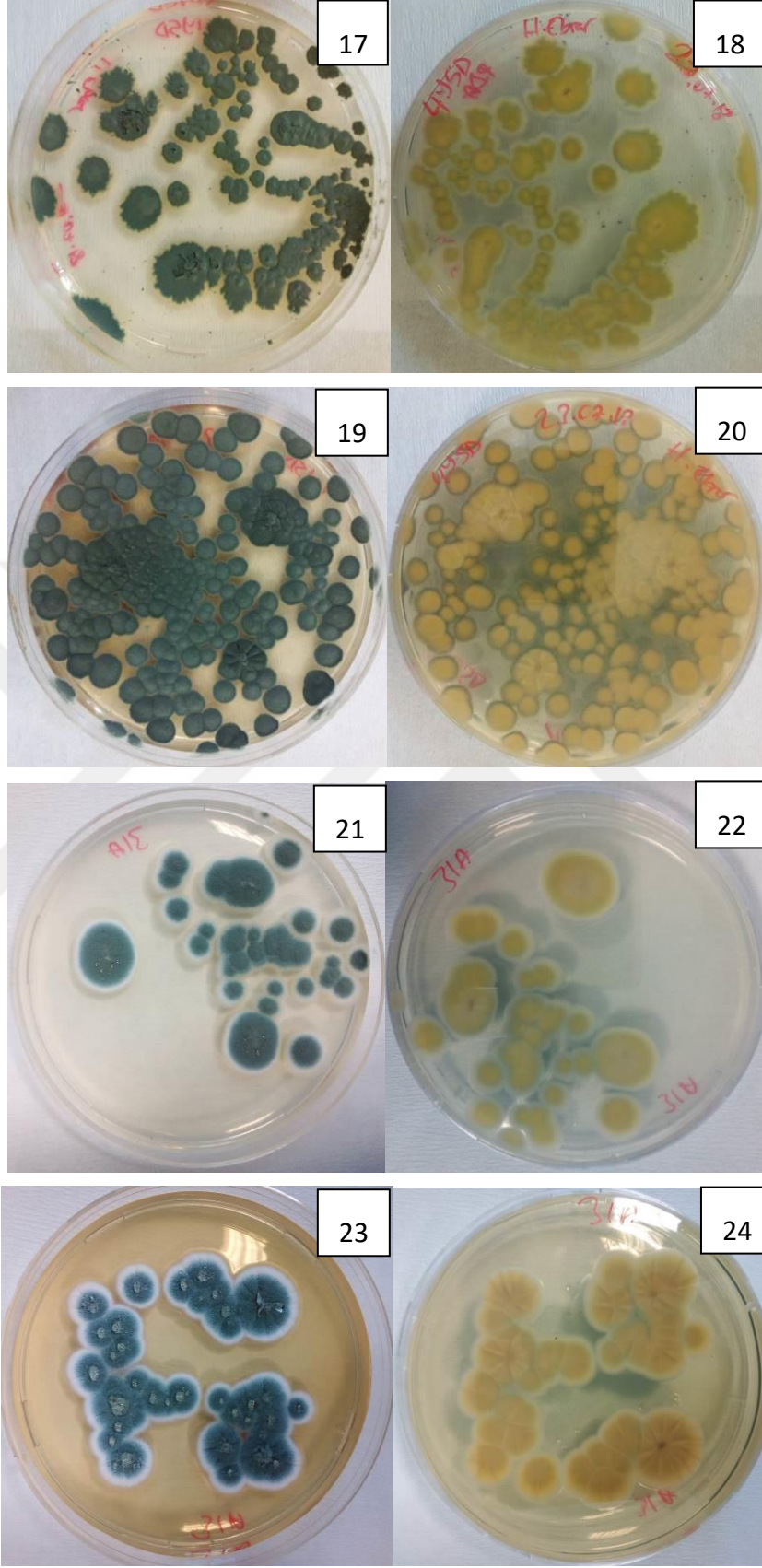
Besiyerlerinde incelenen izolatların morfolojileri, literatürdeki tipik kolonilerinin morfolojik özellikleriyle uyushmaktadır.



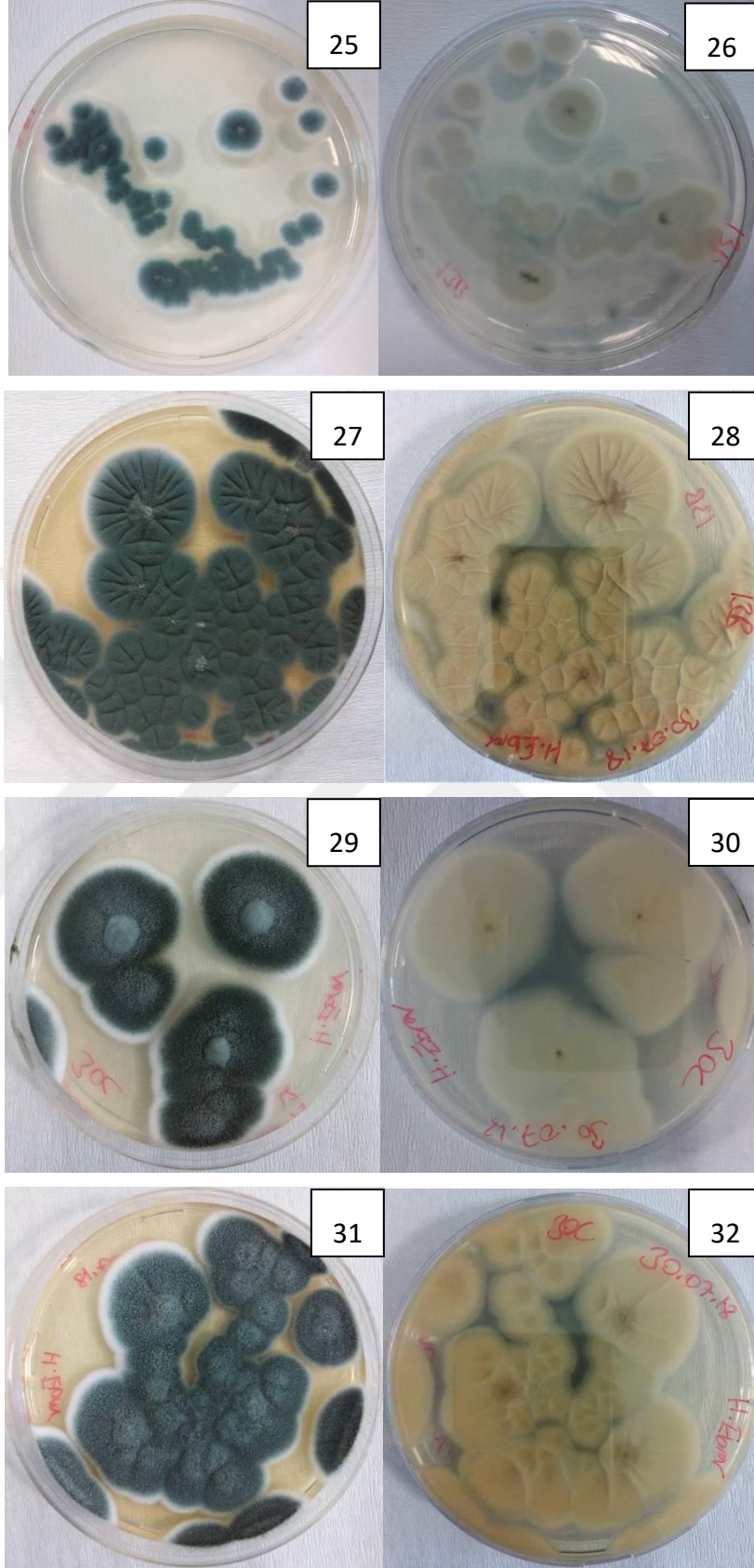
Şekil 4. 1 1Y5D (1:PDA ön, 2:PDA arka, 3:MEA ön, 4: MEA arka) ve 4Y5B (5:PDA ön, 6:PDA arka, 7:MEA ön, 8: MEA arka) kodlu izolatların PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri (*Penicillium roqueforti*)



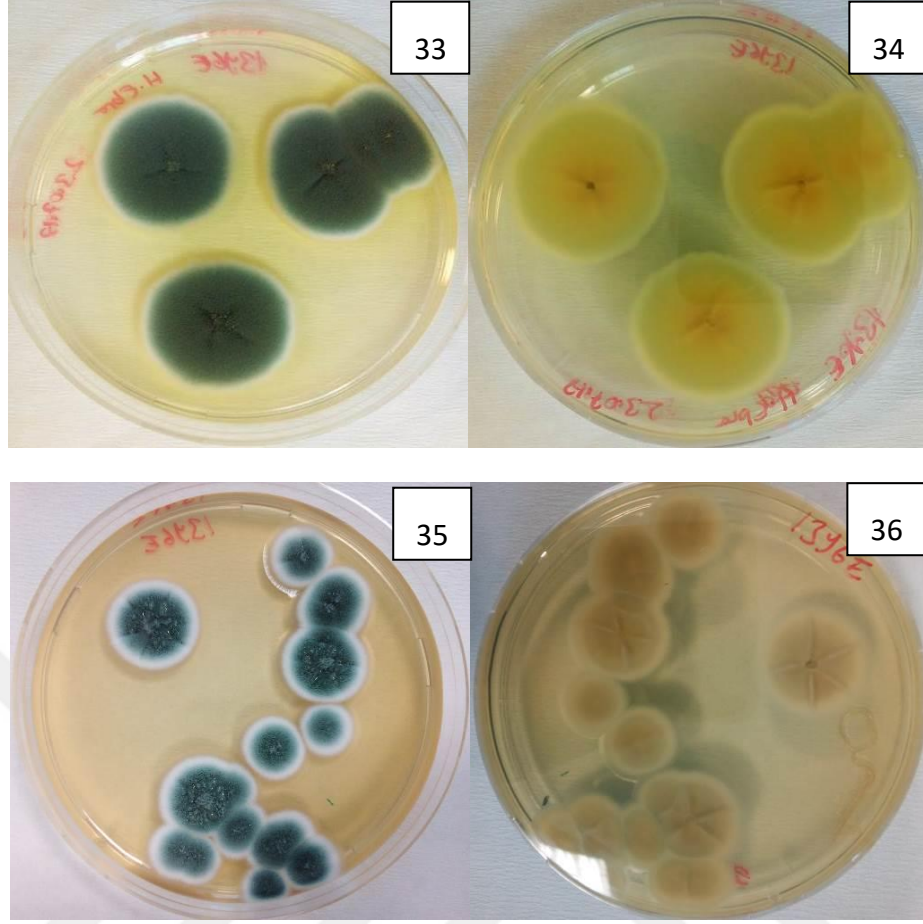
Şekil 4. 2 12F (9:PDA ön, 10:PDA arka, 11:MEA ön, 12: MEA arka) ve 17Y5D (13:PDA ön, 14:PDA arka, 15:MEA ön, 16: MEA) arka kodlu izolatların PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri (*Penicillium roqueforti*)



Şekil 4. 3 4Y5D (17:PDA ön, 18:PDA arka, 19:MEA ön, 20: MEA arka; *Penicillium crustosum*) ve 31A (21:PDA ön, 22:PDA arka, 23:MEA ön, 24: MEA arka; *Penicillium commune*) kodlu izolatların PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri



Şekil 4. 4 13B (25:PDA ön, 26:PDA arka, 27:MEA ön, 28: MEA arka; *Penicillium corylophilum*) ve 30C (29:PDA ön, 30:PDA arka, 31:MEA ön, 32: MEA arka; *Penicillium spinulosum*) kodlu izolatların PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri



Şekil 4. 5 13Y6E (33:PDA ön, 34:PDA arka, 35:MEA ön, 36: MEA arka) kodlu izolatin PDA ve MEA besiyerlerinde koloni morfolojileri (*Penicillium chrysogenum*)

Morfolojik özellikleri incelenen toplam 140 izolattan, 80'inin (%57,1) Roqueforti serisine ait olduğu (özellikle *Penicillium roqueforti*) ve 60 izolatin (%42,9) ise, diğer *Penicillium* türlerine (*P.palitans*, *P.commune*, *P. crustosum*, *P.chrysogenum*, *P.rubens*, *P.spinulosum*, *P.corylophilum*) ait olabileceği düşünülmüştür. Cabrales peynirlerinde morfolojik incelemede, mikrobiyotada dominant tür *Penicillium* spp. ve özellikle *P.roqueforti* olarak belirlenmiştir [15]. Küflü Civil peynirlerinde yapılmış morfolojik incelemede ise, 165 izolatin *P.roqueforti*, 21 izolatin ise *Penicillium* spp.'ın oluşturduğu belirtilmiştir [28].

Morfolojik incelemeler sonucu, genotipik tanımlama için Çizelge 4. 1'de ifade edilen 40 izolat seçilmiştir. Bu izolatların mikroskopik özellikleri de incelenmiştir.

Çizelge 4. 1 Morfolojik İncelemeler Sonucu Genotipik Tanımlama İçin Seçilen İzolatlar

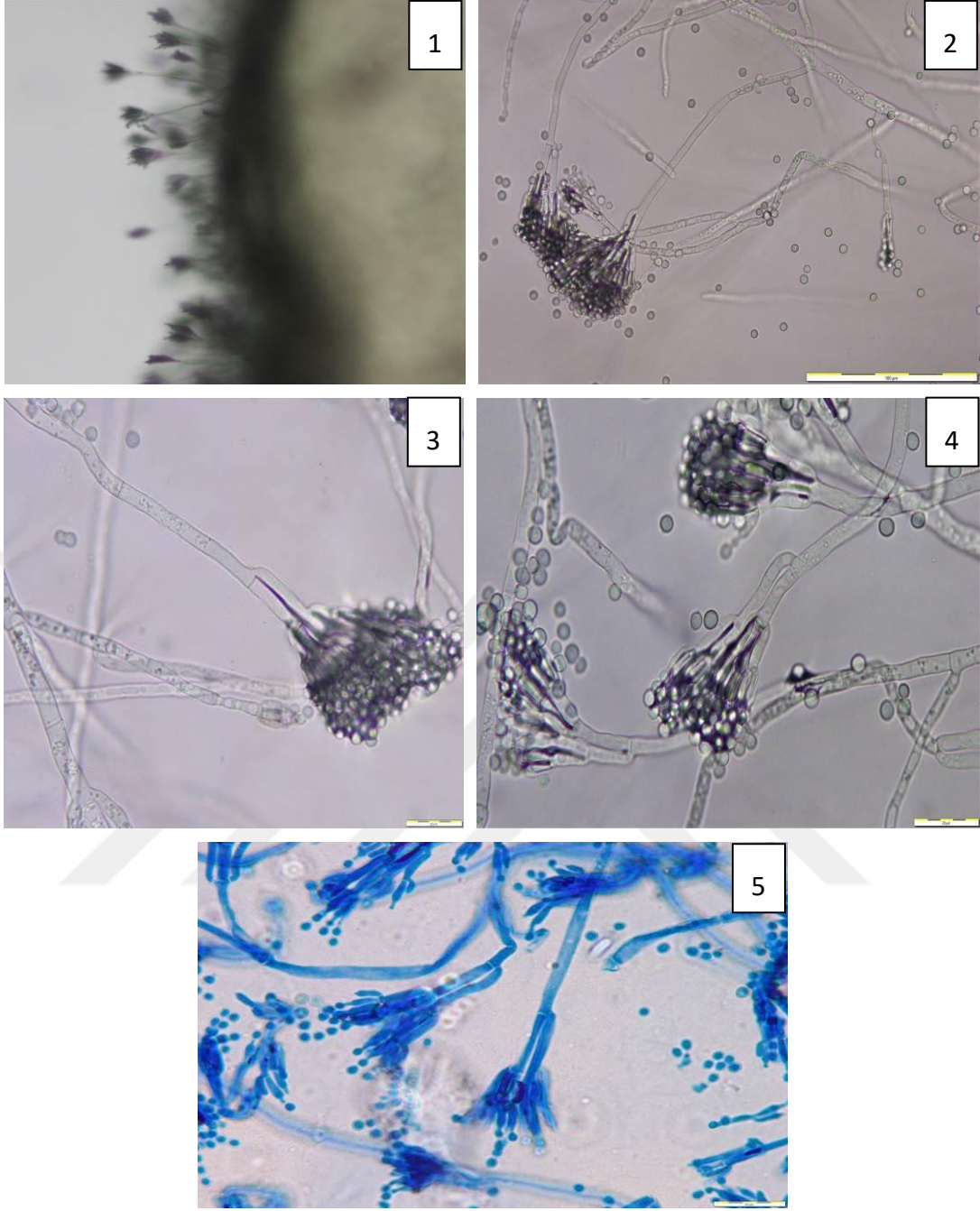
İzolasyon Kaynağı	İzolat Kodu
Konya Küflü Tulum (Gök) Peyniri	1Y5D, 2Y5F, 3Y5A, 4Y5A, 4Y5B, 4Y5D, 5Y5A, 5Y5C, 6Y5B, 6Y5C, 6Y5E, 7Y5E, 8Y5B, 9Y5B, 10Y5C, 11Y5B
Divle Küflü Tulum Peyniri	12Y5D, 13Y6E, 17Y5C, 17Y5D
Erzurum Küflü Civil (Çeçil) Peyniri	14Y5B, 16Y4B
Diğer (Muhtelif Yöresel Küflü Peynirler)	5B, 6, 10D, 11C, 12D, 12F, 13B, 21C, 22E, 23A, 23B, 23C, 25C, 25D, 29D, 30C, 30D, 31A

4.2 Mikroskopik İnceleme

Mikroskopik incelemede izolatların hif, konidyofor, konidya, phialide ve metula yapıları incelenmiştir. İzolatlarla, boyamadan ve boyayarak Olympus BX53 ışık mikroskopunda, özellikle 40x ve 100x büyütme merceklerde, faz-kontrast ayarında çalışılmıştır. Seçilen izolatlar, FEI QUANTA FEG 250 (ABD) taramalı elektron mikroskopunda görüntülenmiştir. *Penicillium* türleri konidyoforları, tek dallanma (biverticillate), ikili dallanma (terverticillate) ve ikiden fazla dallanma (quaterverticillate) özelliğine göre üçe ayrılır [35, 36].

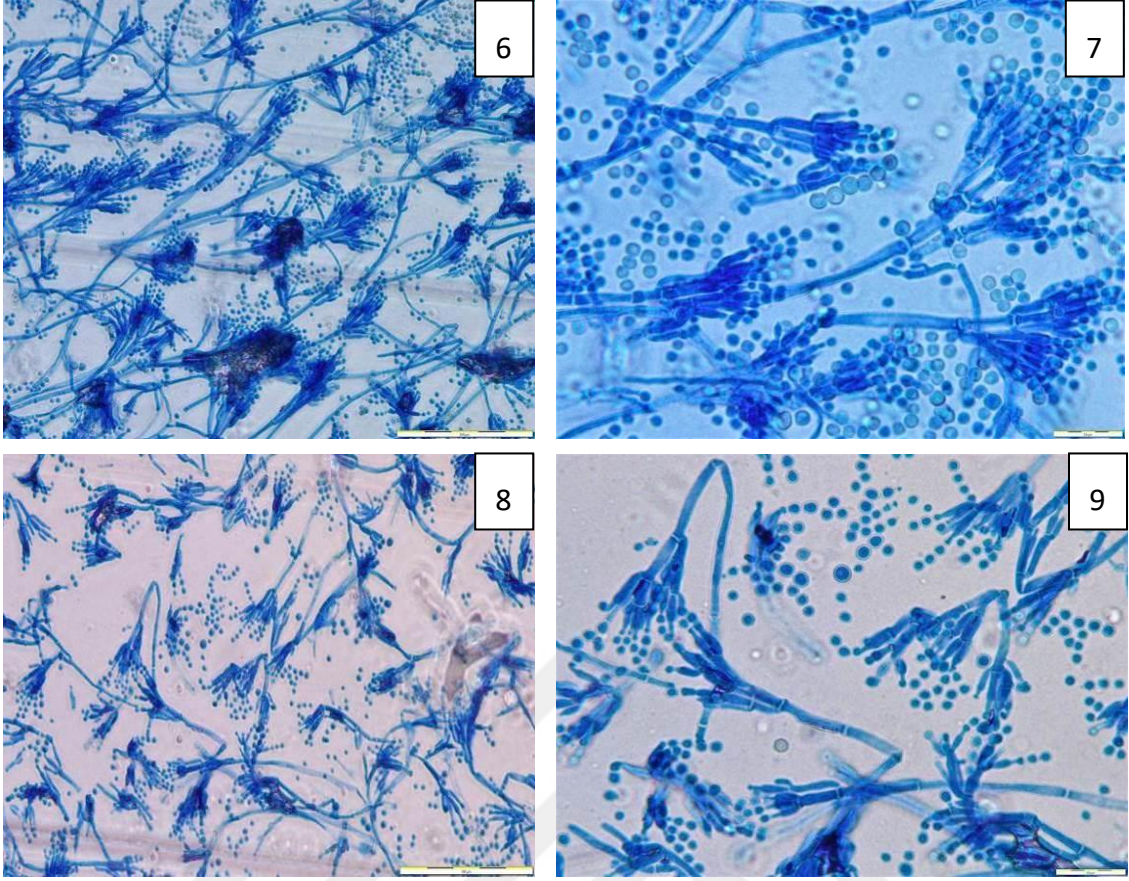
4.2.1 İzolatların Boyamadan ve Laktofenol Pamuk Mavisi ile Boyayarak Işık Mikroskopunda İncelenmesi

Küf izolatları, boyamadan inceleme için, lam kültüründe 25°C'de 3 gün geliştirilmiştir. 3 günden fazla inkübasyon süresinde, spor oluşumunun artması nedeniyle mikroskopta iyi görüntü alınamamış, inkübasyon süresine dikkat edilmiştir. Ayrıca izolatların yaş preparatları, laktofenol pamuk mavisi ile boyayarak hazırlanmış ve görüntülenmiştir.



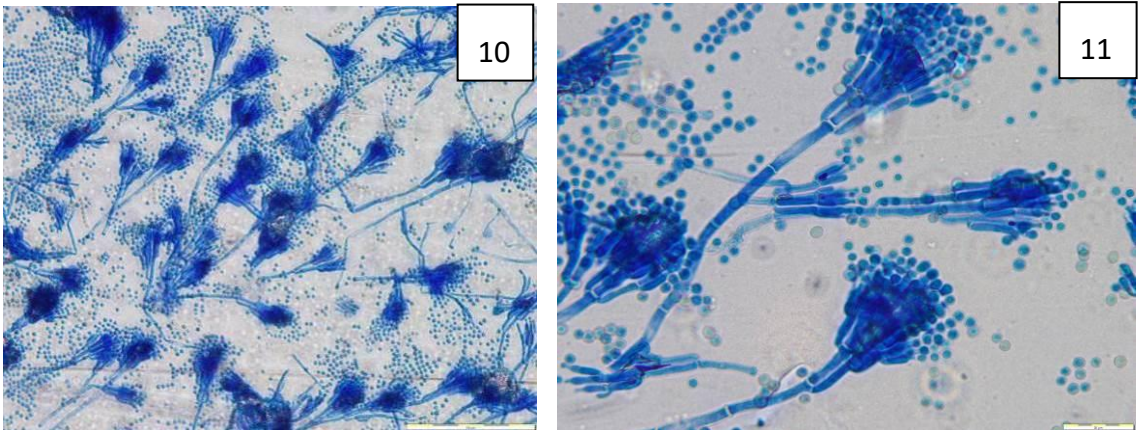
Şekil 4. 6 1Y5D kodlu izolatin lam kültüründe görüntüsü (1: 20x, 2: 40x, 3-4: 100x; 5: 100x-LFPM ile boyama; *Penicillium roqueforti*)

Penicillium roqueforti'de konidyoforlar, genellikle ikili asimetrik dallanma gösterir; hifler, septalı ve yumruludur; metula ve phialide yapıları bulunur [35, 36]. Şekil 4. 6 ve Şekil 4. 7'de bu yapılar, hif uzantılarında septalar ve boyamadan incelemede, yumrular tespit edilmiştir.

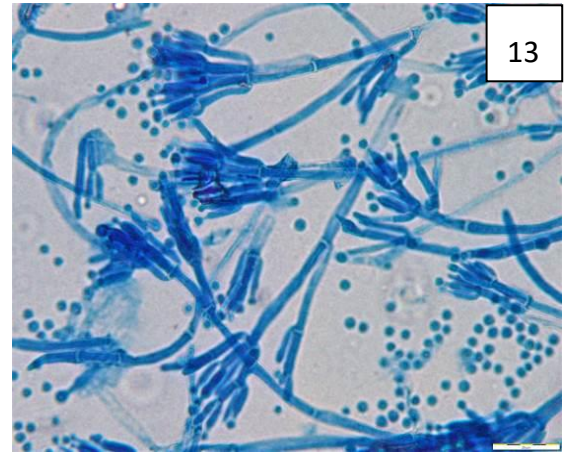
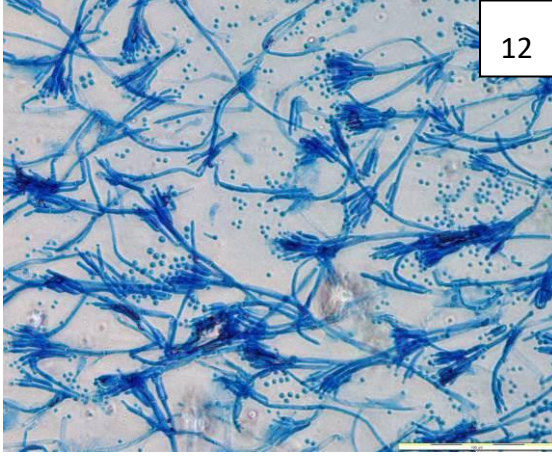


Şekil 4. 7 12F (6: 40x, 7: 100x) ve 17Y5D (8: 40x, 9: 100x) kodlu izolatlar ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; *Penicillium roqueforti*)

Penicillium crustosum ve *Penicillium commune*'de, *P.roqueforti*'den farklı olarak konidyoforlarda ikiden fazla asimetrik dallanma belirlenmiştir. Hif uzantılarındaki septalar görülmüştür (Şekil 4. 8 ve Şekil 4. 9).



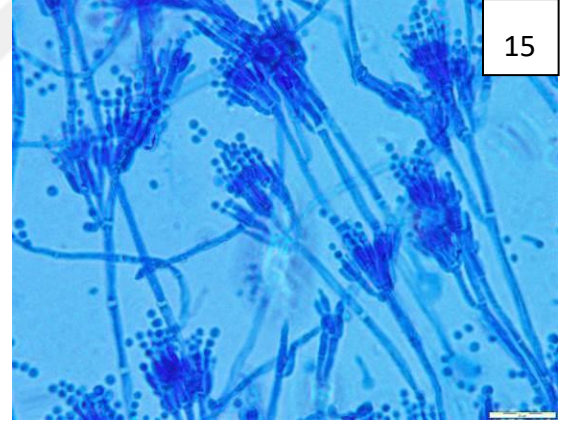
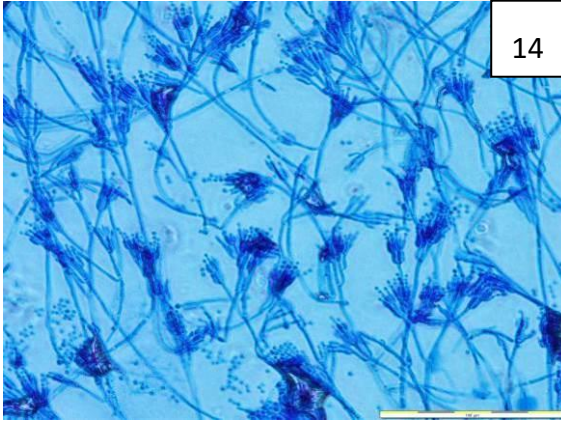
Şekil 4. 8 4Y5D (10: 40x, 11: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; *Penicillium crustosum*)



Şekil 4. 9 31A (12: 40x, 13: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; *Penicillium commune*)

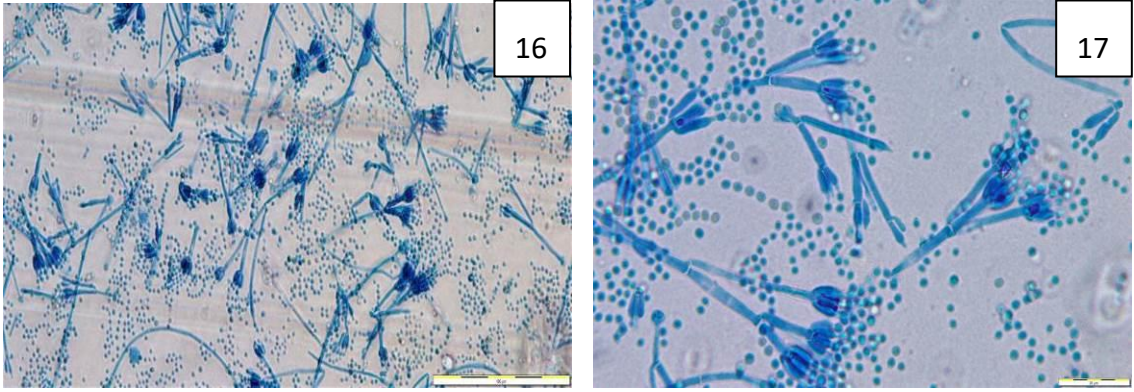
Penicillium crustosum'da konidyofor dallanması, *Penicillium commune*'ye göre daha belirgindir [35].

Penicillium chrysogenum'da ise, konidyofor başlarında da ikiden fazla dallanma ve hif uzantılarında septalar tespit edilmiştir (Şekil 4. 10).



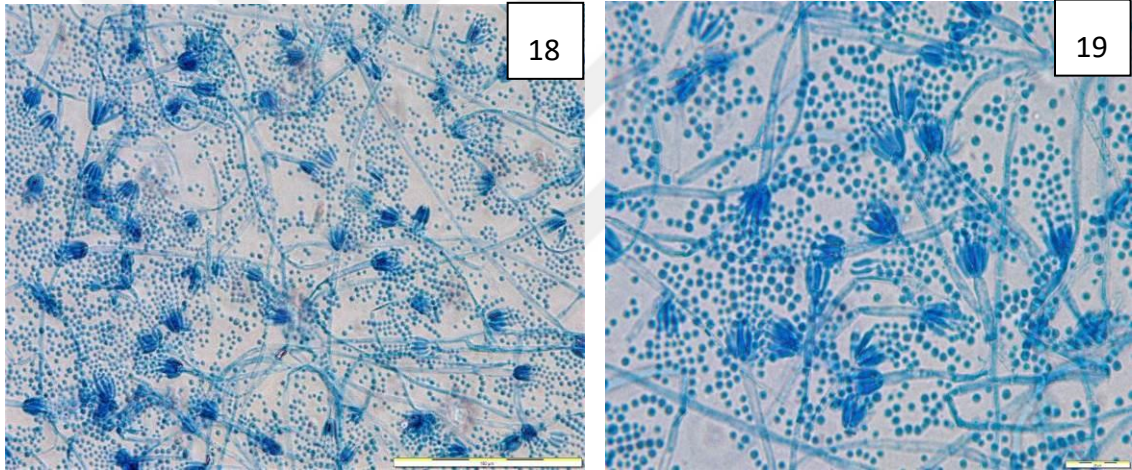
Şekil 4. 10 13Y6E (14: 40x, 15: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; *Penicillium chrysogenum*)

Penicillium corylophilum'da, konidyoforların ikili ya da üçlü asimetrik dallanma gösterdiği, konidyaların philade yapılarına bağlı olduğu ve konidyofor dalına bağlanan metulalarının olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4. 11).



Şekil 4. 11 13B (16: 40x, 17: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; *Penicillium corylophilum*)

Penicillium spinulosum'da, *Penicillium corylophilum*'dan farklı olarak konidyoforlar tek dallanma göstermiştir.

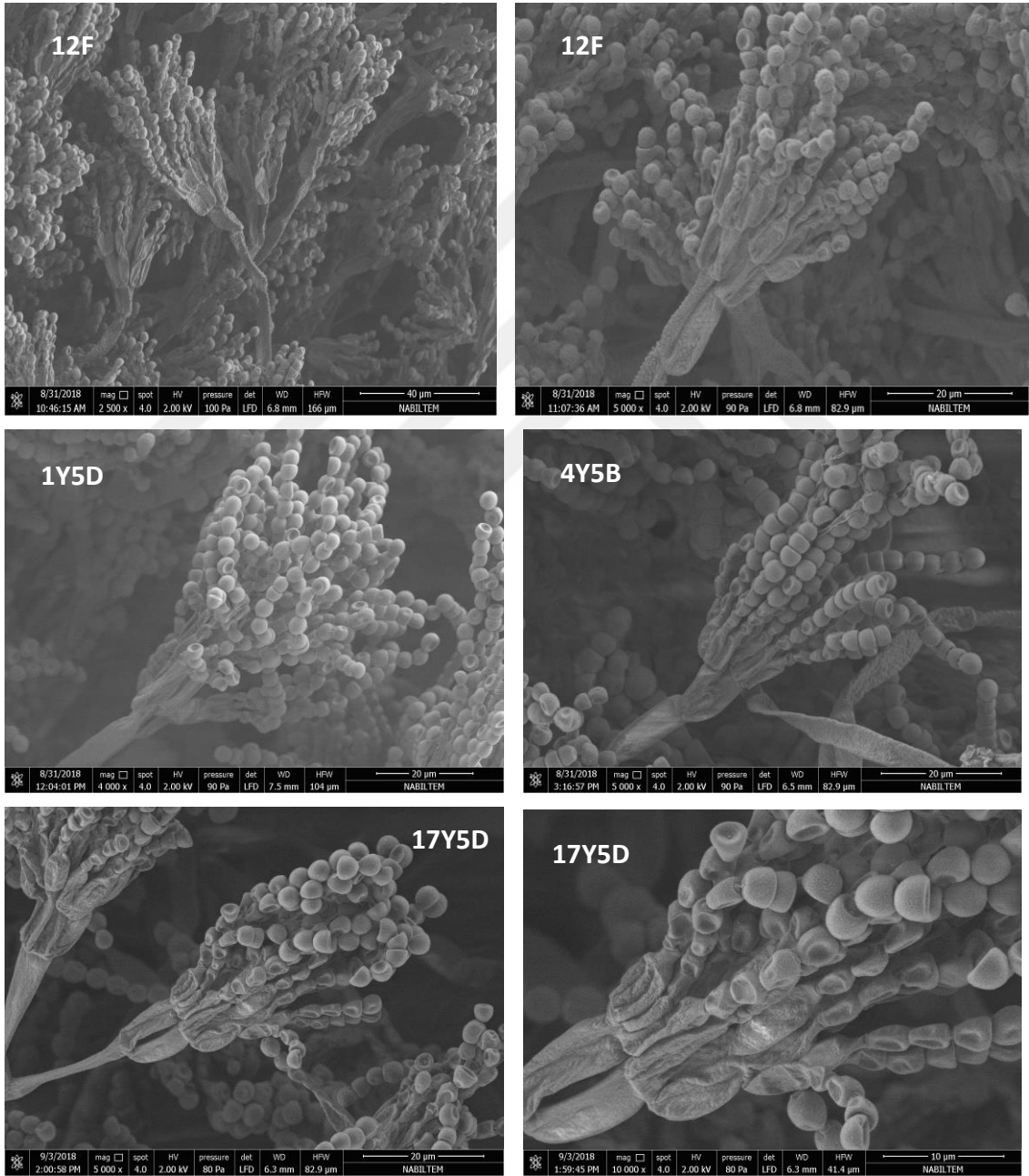


Şekil 4. 12 30C (18: 40x, 19: 100x) kodlu izolata ait mikroskop görüntüleri (LFPM ile boyama; *Penicillium spinulosum*)

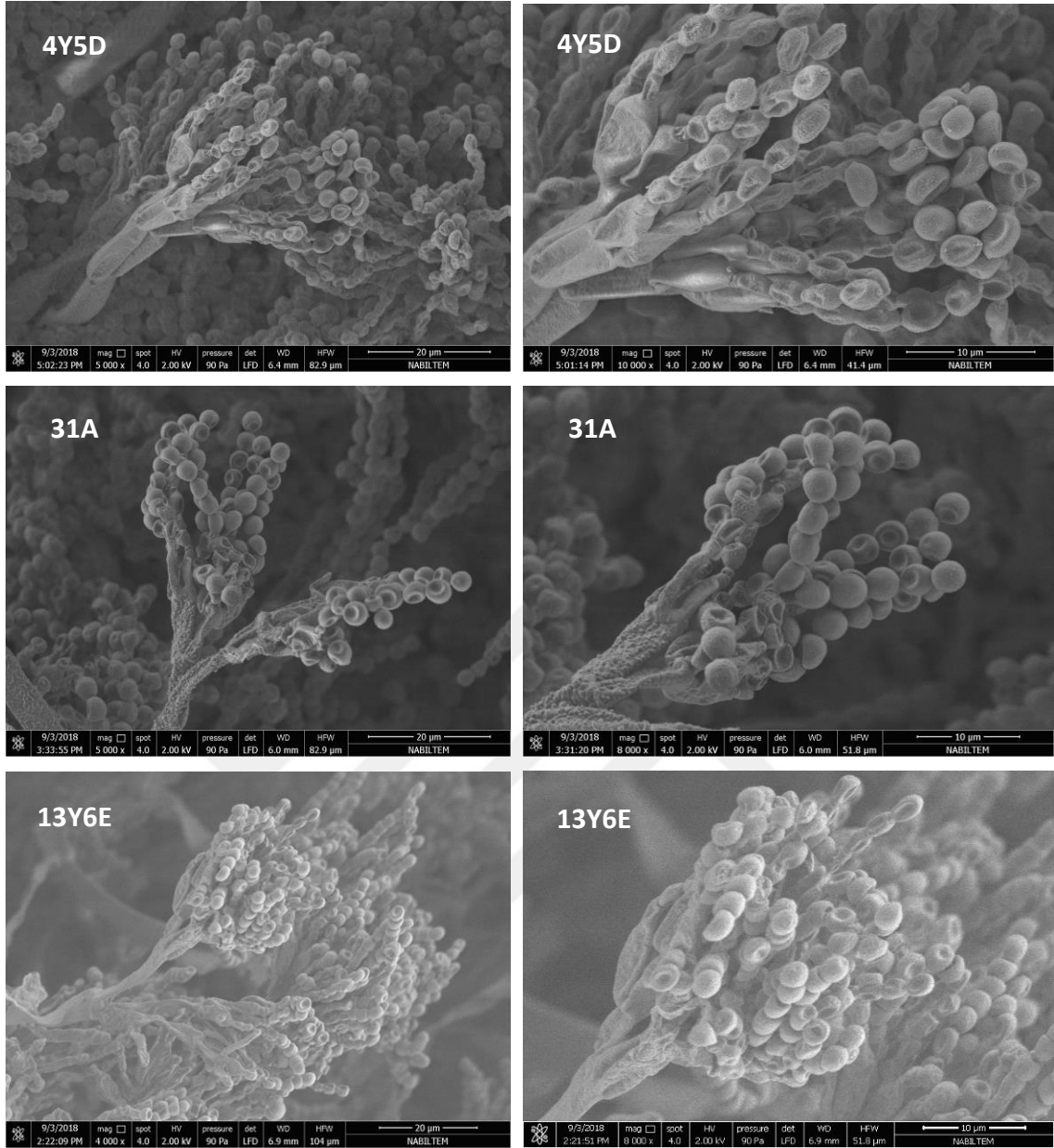
İncelenen *Penicillium* türleri arasında, *P.corylophilum* ve *P.spinulosum*'daki farklılıklar göze çarpmaktadır. Diğer türler için mikroskopik incelemede tam bir tanımlama yapılamamıştır, konidyofor yapıları ve dallanmaları birbirine çok benzemektedir. Konidya yapıları da genel olarak küresel, elipsoid şekillidir. Frisvad ve Samson [35], Visagie vd. [36]'nin çalışmaları baz alınarak mikroskop görüntüleri değerlendirilmiştir [35, 36]. Bu çalışmalarda, sağlıklı bir tanımlama için polifazik yaklaşımın kullanılması gerektiği vurgulanmıştır. Daha detaylı inceleme için, seçilen 9 izolat taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntülenmiştir. Ancak, genotipik tanımlamadan sonra değerlendirmelerin doğruluğu teyit edilmiştir.

4.2.2 İzolatların Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) İncelenmesi

Seçilen kf izolatlarına ait SEM görüntüleri (1Y5D, 4Y5B, 12F, 17Y5D, 4Y5D, 13B, 13Y6E, 30C ve 31A kodlu) Şekil 4. 13, Şekil 4. 14 ve Şekil 4. 15'te verilmiştir. İncelenen küflerin spor ve konidyofor yapılarında bazı farklılıklar belirlenmiştir. Yassı, düz-duvarlı, küresel, elipsoid şekilli sporlar; konidyofor yapılarında silindirik metulalar, asimetrik dallar ve hif uzantıları üzerinde yumrular görüntülenmiştir. Konidyofor büyüklüklerinin izolatlara göre, 10-40 x 21-166 m aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

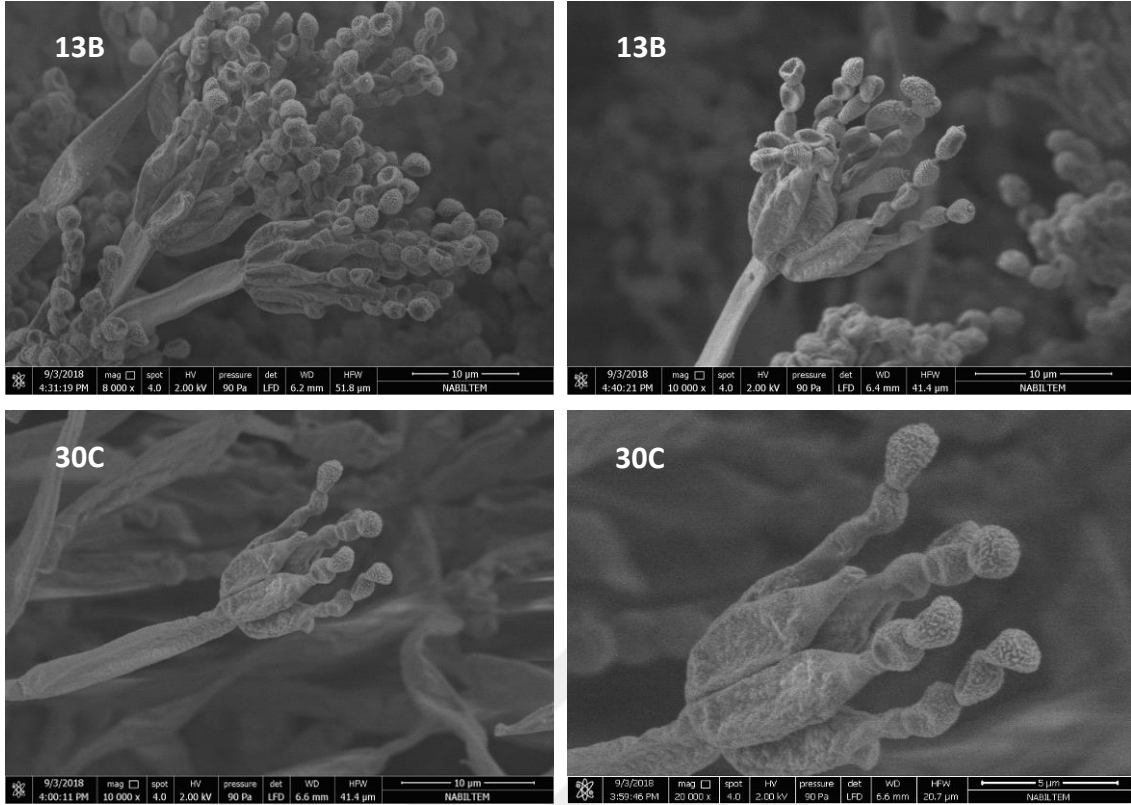


Şekil 4. 13 12F, 1Y5D, 4Y5B ve 17Y5D kodlu izolatların SEM görüntüleri (*P.roqueforti*)



Şekil 4. 14 4Y5D (*P.crustosum*), 31A (*P.commune*) ve 13Y6E (*P.chrysogenum*) kodlu izolatların SEM görüntüleri

Şekil 4. 13 ve Şekil 4. 14'teki görüntülerde, seçilen izolatların konidyofor yapıları ve konidyalı arasında küçük farklılıklar tespit edilmiştir. Şekil 4. 15'teki *P.corylophilum* ve *P.spinulosum* türlerinin hif yapılarının, incelenen diğer izolatlardan farklı olduğu görülmektedir.



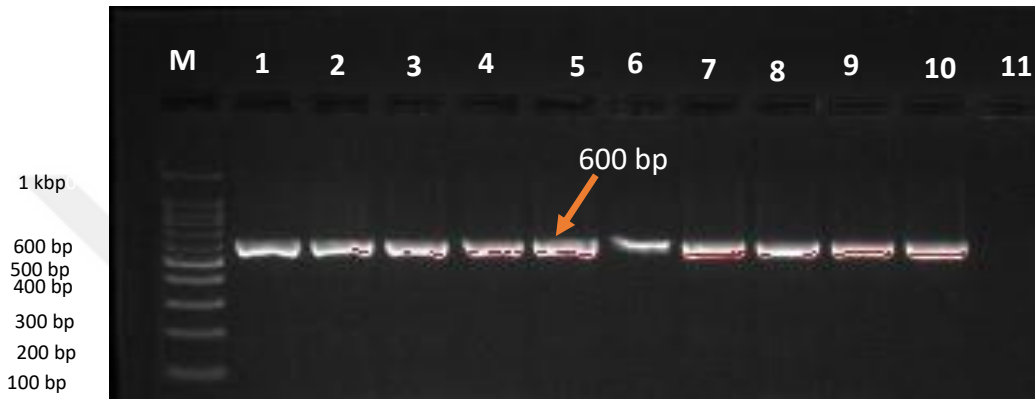
Şekil 4. 15 13B (*P.corylophilum*) ve 30C (*P.spinulosum*) kodlu izolatların SEM görüntüleri

4.3 İzolatların Genotipik Tanımlanması

Morfolojik incelemeler sonucu seçilen 40 izolatın ilk olarak 30'unun 28S rRNA gen bölgesiyle sekanslararak tanımlaması yapılmış fakat tanımlamada iyi sonuç alınamamıştır. Bu bölgenin *Penicillium* alt türlerini ve özellikle *Penicillium roqueforti*'yi, *Penicillium paneum* ve *Penicillium sp.*'den tam olarak ayıramadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle 40 izolat, ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (ITS) bölgesiyle sekanslanmış ve genotipik tanımlamada daha iyi sonuç alınmıştır. Ancak ITS bölgesinin bazen, *Roqueforti* serisi denilen *P.roqueforti*/*P.carneum*/*P.psychrosexualis* türlerini iyi ayıramadığına dair tespitler literatürde yer almaktadır. Bu nedenle tanımlama için, β -tubulin (*BenA*), calmodulin (*CaM*), elongation faktor 1 alpha (*EF1 α*), mitokondriyal sitokrom c oksidaz 1 (*CO1*) gibi farklı gen bölgeleri (DNA barkod sistemleri) ile microsatellite lokusları önerilmektedir [26, 36, 62, 73, 74].

4.3.1 28S D1/D2 rRNA Dizi Analizi Sonuçları

28S D1/D2 rRNA gen bölgesine ait universal primer çifti kullanılarak, ileri primer NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG-3') ve geri primer NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bantlar, *Penicillium* cinsine aittir ve PCR ürünlerinin boyutu yaklaşık 600 baz çifti (bp) uzunluğundadır. Şekil 4. 16'da 10 izolatin PCR reaksiyonu sonucu elde edilen %1,2'lik jel görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4. 16 28S rRNA gen bölgesi PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü; M: DNA marker (100 bp-1kbp), 1: 1Y5D, 2: 2Y5F, 3: 4Y5A, 4: 5B, 5: 6Y5C, 6: 7Y5E, 7: 8Y5B, 8: 9Y5B, 9:10D, 10: 12F, 11: Negatif kontrol

İzolatların 28S rRNA gen bölgesine göre izolatların sekansları BLAST'a girilmiştir. Çizelge 4. 2'de 28S bölgesine göre izolatların karşılaştırıldığı tür ve benzerlik oranları erişim numaralarıyla birlikte verilmiştir. İzolatların 28S rRNA gen bölgesi dizi analiz sonuçları ise ekte verilmiştir.

Çizelge 4. 2 İzolatların 28S rRNA dizi analizlerine göre BLAST sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Gen Bank Erişim Numarası	Karşılaştırıldığı Küf Türleri	% Benzerlik
1.	1Y5D	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
2.	2Y5F	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
3.	4Y5A	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	100
4.	4Y5B	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
5.	4Y5D	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	100
6.	5B	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	100
7.	5Y5A	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
8.	5Y5C	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	100
9.	6Y5B	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
10.	6Y5C	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
11.	7Y5E	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
12.	8Y5B	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
13.	9Y5B	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100
14.	10D	FJ430767.1	<i>Penicillium spinulosum</i> strain CCF3823	100
15.	10Y5C	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	100

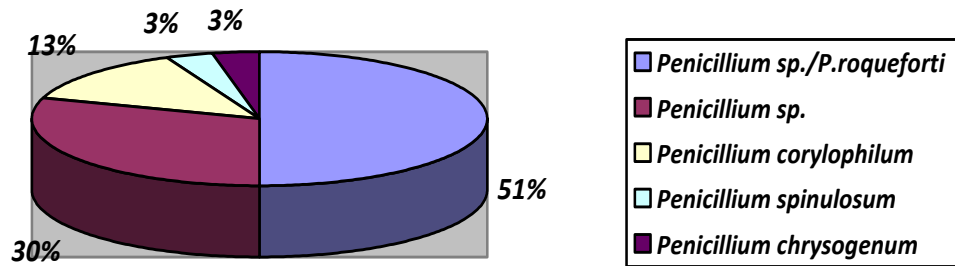
Çizelge 4. 2 İzolatların 28S rRNA dizi analizlerine göre BLAST sonuçları (devamı)

Sıra No	İzolat Kodu	Gen Bank Erişim Numarası	Karşılaştırıldığı Küf Türleri	% Benzerlik
16.	11C	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	99
17.	11Y5B	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain D116-79	100
18.	12D	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	100
19.	12F	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain D116-79	100
20.	13B	JN938951.1	<i>Penicillium corylophilum</i> strain DAOM 221130	100
21.	13Y6E	KY781803.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> culture QCC:MO46/17	100
22.	14Y5B	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain D116-79	100
23.	17Y5D	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain D116-79	100
24.	21C	JN938951.1	<i>Penicillium corylophilum</i> strain DAOM 221130	100
25.	22E	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	100
26.	23A	JN938951.1	<i>Penicillium corylophilum</i> strain DAOM 221130	100
27.	23B	JN938951.1	<i>Penicillium corylophilum</i> strain DAOM 221130	99
28.	23C	LT899786.1 / LT558901.1	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain D116-79	100
29.	30D	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	100
30.	31A	KY486889.1	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	100
3Y5A		28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.		

Çizelge 4. 2 İzolatların 28S rRNA dizi analizlerine göre BLAST sonuçları (devamı)

İzolat Kodu	
6	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.
6Y5E	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.
12Y5D	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.
16Y4B	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.
17Y5C	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.
25C	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.
25D	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.
29D	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.
30C	28S bölgesiyle sekanslanmamıştır.

28S rRNA gen bölgesiyle, 30 izolattan 15'i (%50) *Penicillium sp. / Penicillium roqueforti*, 9'u (%30) *Penicillium sp.*, 4'ü *Penicillium corylophilum* (%13), 1'i (%3) *Penicillium spinulosum* ve 1'i (%3) *Penicillium chrysogenum* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4. 17).



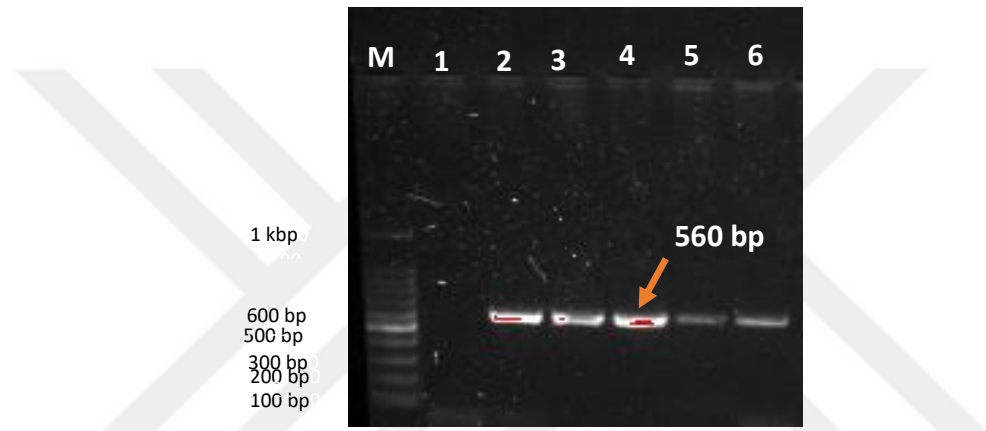
Şekil 4. 17 İzolatların 28S rRNA bölgesine göre dağılımı

Bu bölgeye göre, *P. roqueforti* türlerinin diğer *Penicillium* türlerinden (özellikle *Penicillium paneum*'dan) ve *Penicillium sp./P. crustosum/P. commune* ayrımının iyi yapılamadığı tespit edilmiştir. Fungal türlerin tanımlanmasında çoğunlukla kullanılan bu

bölgenin filamentli funguslar için de değerlendirildiği literatürde yer almaktadır. Ancak, küf tanımlamada bu bölge için BLAST sistemindeki veriler yetersizdir.

4.3.2 ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (ITS) Dizi Analizi Sonuçları

ITS gen bölgesine ait universal primer çifti kullanılarak, ileri primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve geri primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bantlar, *Penicillium* cinsine aittir ve PCR ürünlerinin boyutu, yaklaşık 560 baz çifti (bp) uzunluğundadır. Şekil 4. 18'de, 5 izolatin PCR reaksiyonu sonucu elde edilen %1,2'lik jel görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4. 18 ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgesi (ITS) PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü; M: DNA marker (100 bp-1kbp), 1: Negatif kontrol, 2: 4Y5A, 3: 5B, 4: 6Y5C, 5: 7Y5E, 6: 8Y5B

İzolatların 5.8S rRNA (ITS) gen bölgesine göre izolatların sekansları BLAST'a girilmiştir. Çizelge 4. 3'te ITS bölgesine göre izolatların karşılaştırıldığı tür ve benzerlik oranları erişim numaralarıyla birlikte verilmiştir. İzolatların ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgesi dizi analiz sonuçları ekte verilmiştir. Çizelge 4. 3'te yer alan referans suşlar kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Çizelge 4. 3 İzolatların ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (ITS) dizi analizlerine göre BLAST sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Gen Bank Erişim Numarası	Karşılaştırıldığı Küf Türleri	% Benzerlik
1.	1Y5D	MF185964.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145	98
2.	2Y5F	MF185964.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145	100
3.	3Y5A	KY315937.1	<i>Penicillium roqueforti</i> voucher FF1C	100
4.	4Y5A	MF185964.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145	99
5.	4Y5B	KM115117.1	<i>Penicillium roqueforti</i> strain NBProq2013A09	100
6.	4Y5D	KY022755.1	<i>Penicillium crustosum</i> strain DQ-30	99
7.	5B	GU134900.1	<i>Penicillium commune</i> isolate Z4-10	100
8.	5Y5A	KY315937.1	<i>Penicillium roqueforti</i> voucher FF1C	100
9.	5Y5C	MF186087.1	<i>Penicillium crustosum</i> isolate SFC101815	99
10.	6	MF475926.1	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Su-X-1	100
11.	6Y5B	KY828914.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184	99
12.	6Y5C	MF185964.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145	99
13.	6Y5E	MF185964.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145	98
14.	7Y5E	MH971248.1 / MH864839.1 / MH860759.1	<i>Penicillium carneum</i> isolate BC1278 / <i>Penicillium psychrosexualis</i> strain CBS 128137 / <i>Penicillium roqueforti</i> strain CBS 498.73	97
15.	8Y5B	KY828914.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184	99
16.	9Y5B	KY828914.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184	100

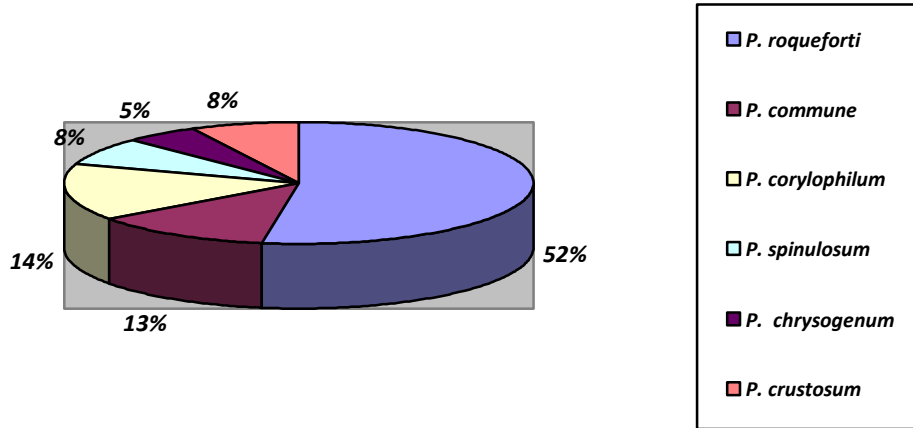
Çizelge 4. 3 İzolatların ITS1-5.8S-ITS2 dizi analizlerine göre BLAST sonuçları (devamı)

Sıra No	İzolat Kodu	Gen Bank Erişim Numarası	Karşılaştırıldığı Küf Türleri	% Benzerlik
17.	10D	MF186143.1	<i>Penicillium spinulosum</i> isolate SFC102232	100
18.	10Y5C	MF185964.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145	99
19.	11C	MH279669.1	<i>Penicillium commune</i> strain SYPF 7097	100
20.	11Y5B	KM115117.1	<i>Penicillium roqueforti</i> strain NBProq2013A09	99
21.	12D	MH481304.1	<i>Penicillium commune</i> isolate 18	100
22.	12F	KY828914.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184	99
23.	12Y5D	MF186087.1	<i>Penicillium crustosum</i> isolate SFC101815	100
24.	13B	MF476028.1	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Sp-VI-1.2	99
25.	13Y6E	MH517445.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> strain KN1	99
26.	14Y5B	MF185964.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145	100
27.	16Y4B	KY828914.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184	99
28.	17Y5C	KM115117.1	<i>Penicillium roqueforti</i> strain NBProq2013A09	100
29.	17Y5D	KM115117.1	<i>Penicillium roqueforti</i> strain NBProq2013A09	99
30.	21C	MF476028.1	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Sp-VI-1.2	100
31.	22E	MH279669.1	<i>Penicillium commune</i> strain SYPF 7097	100
32.	23A	MF475918.1	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Su-VII-3	100

Çizelge 4. 3 İzolatların ITS1-5.8S-ITS2 dizi analizlerine göre BLAST sonuçları (devamı)

Sıra No	İzolat Kodu	Gen Bank Erişim Numarası	Karşılaştırıldığı Kūf Türleri	% Benzerlik
33.	23B	MF476028.1	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Sp-VI-1.2	99
34.	23C	MF185964.1	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145	99
35.	25C	MF476028.1	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Sp-VI-1.2	99
36.	25D	MH469504.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> isolate SW121	100
37.	29D	KY315937.1	<i>Penicillium roqueforti</i> voucher FF1C	99
38.	30C	MF186143.1	<i>Penicillium spinulosum</i> isolate SFC102232	100
39.	30D	MF186143.1	<i>Penicillium spinulosum</i> isolate SFC102232	99
40.	31A	MH481304.1	<i>Penicillium commune</i> isolate 18	99

ITS bölgesiyle, 40 izolattan 21'si (%52) *Penicillium roqueforti*, 6'sı (%14) *Penicillium corylophilum*, 5'i (%13) *Penicillium commune*, 3'ü (%8) *Penicillium spinulosum*, 3'ü (%8) *Penicillium crustosum* ve 2'si (%5) *Penicillium chrysogenum* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4. 19).



Şekil 4. 19 İzolatların 5.8S rRNA bölgesine göre dağılımı

Ancak Roqueforti serisi olarak nitelendirilebilecek 21 izolattan 1'inde *P.carneum*/*P.psychrosexualis*/*P.roqueforti* ayrımı yapılamamıştır. ITS bölgesinin, bu türler arasında iyi ayırım yapamadığı belirtilmiştir [62].

Genotipik tanımlama sonuçlarında, küflü peynirlerin mikobiyotasında baskın türün *Penicillium* spp. olduğu ve özellikle *Penicillium roqueforti* türünün izole edildiği pek çok çalışmada ifade edilmiştir. Bu durum, son yıllarda yapılmış çalışmalarla birlikte bu türlerin, olgunlaşma sürecinde peynir matriksine adaptasyonu ve dominant türü oluşturması horizontal transfer gen bölgelerinin varlığına bağlanmıştır. Bu bölgelerden biri olan *Wallaby*, bazı antimikrobiyal fonksiyonları ve diğer türlere karşı rekabetçi özellikleri taşır. Diğer bir bölge CheesyTer ise, laktöz permeaz, β -galaktosidaz gibi laktöz metabolizmasından sorumlu enzimleri kodlayan genler ve gelişme hızı fonksiyonlarını barındırır. Bu gen bölgeleri bulunan tüm türler, peynirden izole edilmiştir [25, 26, 75, 76, 77].

4.3.3 İzolatların 28S D1/D2 rRNA ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA Gen Bölgeleri BLAST Sonuçlarının Karşılaştırılması

Küf izolatlarının genotipik tanımlanmasında ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (ITS) bölgesinden, 28S rRNA (LSU) bölgesine göre daha iyi sonuçlar alınmıştır. Her iki bölgeyle sekanslanan 30 izolatın sonuçları Çizelge 4. 4'te verilmiştir. Ancak her iki bölgede de özellikle *P.roqueforti*' nin bazı izolatlar için ayrımı iyi yapılamamıştır. Genbank BLAST sisteminde, her iki bölgede bazı izolatlarda düşük benzerlik oranları tespit edilmiştir. Literatürde, Genbank'taki fungal türlere ait veri yetersizliğine ve ayrıca fungal sınıflandırmada revizyona ihtiyaç olduğuna işaret edilmiştir. Ayrıca, Genbank'ta erişime açık olan özellikle ITS bölgesine ait çoğu dizilimin düşük kalitede olduğu belirtilmiştir. Yaklaşık 3.8 milyon olduğu düşünülen fungus türlerinden, Genbankta sadece 23.000'den daha az (%0,6) türe ait veri yer almaktadır. Bu oran içinde filamentli funguslar (küf), mayalardan daha azdır. Son yıllarda ITS ve LSU bölgelerinin, özellikle küflerin tanımlanmasında daha iyi sonuçlar alınabileceğine, Genbank'taki türlerin validasyonuna ve yeni verilerin eklenmesine dair bazı çalışmalar yapılmıştır. Westerdijk Enstitüsü'nün 2017 yılında başlattığı DNA Barkodlama Projesi, özellikle küf veritabanlarını geliştirmeye yöneliktir. Böylece, 2018 yılının sonuna doğru Genbank'a

suşlarıyla birlikte validasyonu yapılmış 7.300 küf türüne ait 24.000 dizilim yüklenmiştir [78, 79].

Bu çalışmada kullanılan LSU ve ITS bölgelerine ait sonuçlar Çizelge 4.4'te bazı izolatlarda benzerlik gösterse de, özellikle LSU bölgesi için sonraki yıllarda Genbank sisteminin güncellenmesiyle ve bu bölgelere ait farklı primerlerin de denenmesiyle farklı bir boyut kazanıp, daha iyi sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.



Çizelge 4. 4 Tanımlama için seçilen 40 izolatin 28S rRNA ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgeleri BLAST sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	28S Gen Bölgesine Göre	5.8S (ITS) Gen Bölgesine Göre
1.	1Y5D	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145
2.	2Y5F	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145
3.	4Y5A	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145
4.	4Y5B	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> strain NBProq2013A09
5.	4Y5D	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium crustosum</i> strain DQ-30
6.	5B	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium commune</i> isolate Z4-10
7.	5Y5A	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> voucher FF1C
8.	5Y5C	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium crustosum</i> isolate SFC101815
9.	6Y5B	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184
10.	6Y5C	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145
11.	7Y5E	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium carneum</i> isolate BC1278 / <i>Penicillium psychrosexualis</i> strain CBS 128137 / <i>Penicillium roqueforti</i> strain CBS 498.73
12.	8Y5B	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184
13.	9Y5B	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184

Çizelge 4. 4 Tanımlama için seçilen 40 izolatın 28S rRNA ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgeleri BLAST sonuçları (devamı)

Sıra No	İzolat Kodu	28S Gen Bölgesine Göre	5.8S (ITS) Gen Bölgesine Göre
14.	10D	<i>Penicillium spinulosum</i> strain CCF3823	<i>Penicillium spinulosum</i> isolate SFC102232
15.	10Y5C	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145
16.	11C	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium commune</i> strain SYPF 7097
17.	11Y5B	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> strain NBProq2013A09
18.	12D	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium commune</i> isolate 18
19.	12F	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate FBKL3.0184
20.	13B	<i>Penicillium corylophilum</i> strain DAOM 221130	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Sp-VI-1.2
21.	13Y6E	<i>Penicillium chrysogenum</i> culture QCC:MO46/17	<i>Penicillium chrysogenum</i> strain KN1
22.	14Y5B	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145
23.	17Y5D	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain DI16-79	<i>Penicillium roqueforti</i> strain NBProq2013A09
24.	21C	<i>Penicillium corylophilum</i> strain DAOM 221130	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Sp-VI-1.2
25.	22E	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium commune</i> strain SYPF 7097
26.	23A	<i>Penicillium corylophilum</i> strain DAOM 221130	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Su-VII-3
27.	23B	<i>Penicillium corylophilum</i> strain DAOM 221130	<i>Penicillium corylophilum</i> isolate Sp-VI-1.2

Çizelge 4. 4 Tanımlama için seçilen 40 izolatın 28S rRNA ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgeleri BLAST sonuçları (devamı)

Sıra No	İzolat Kodu	28S Gen Bölgesine Göre	5.8S (ITS) Gen Bölgesine Göre
28.	23C	<i>Penicillium</i> sp. strain FMR 15032/ <i>Penicillium roqueforti</i> strain D116-79	<i>Penicillium roqueforti</i> isolate SFC101145
29.	30D	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium spinulosum</i> isolate SFC102232
30.	31A	<i>Penicillium</i> sp. isolate P14	<i>Penicillium commune</i> isolate 18

4.3.4 İzolatların Filogenetik İlişkisi

İzolatlar, 28S D1/D2 (30 izolat) ve ITS (40 izolat) gen bölgeleri için, MegAlign programında Neighbour-joining yönteminde, 2000 tekrar (bootstrap analizi) yapılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur (Şekil 4. 20 ve Şekil 4. 21). İlk olarak dizilimler, Clustal W'da incelenmiş ve hizalanmıştır. Çizelge 4. 5 ve Çizelge 4. 6'daki NCBI'den dizilimleri alınan referans suşlar, ağaçlarda kullanılmıştır.

Çizelge 4. 5 Filogenetik ağaçta kullanılan referans suşlar (28S Bölgesi)

Küf Suşu	Gen Bank Erişim Numarası	Kaynak
<i>Penicillium roqueforti</i> DAOM 231152	JN938939.1	[80]
<i>Penicillium roqueforti</i> NRRL: 749	EU427296.1	[81]
<i>Penicillium chrysogenum</i> CBS 132213	MH877438.1	[79]
<i>Penicillium spinulosum</i> CCF3823	FJ430767.1	[82]
<i>Penicillium corylophilum</i> DAOM 221130	JN938951.1	[80]

Şekil 4. 20'ye göre, Konya Küflü Tulum örneklerinden izole edilen 1Y5D, 2Y5F, 4Y5B, 5Y5A, 6Y5B, 6Y5C, 7Y5E, 8Y5B, 9Y5B, 10Y5C, 11Y5B kodlu izolatlar *Penicillium roqueforti*/*Penicillium* sp.; 4Y5A, 4Y5D, 5Y5C ise *Penicillium* sp. olarak tanımlanmıştır.

Divle Obruk Küflü Tulum örneklerinden izole edilen 13Y6E *P.chrysogenum*; 17Y5D, *Penicillium roqueforti*/*Penicillium* sp. ve Erzurum Küflü Civil’den izole edilen 14Y5B, *Penicillium roqueforti*/*Penicillium*’dir. Diğer (muhtelif) küflü peynirlerden izole edilen 12F, 23C kodlu izolatlar *Penicillium roqueforti*/*Penicillium* sp.; 13B, 23A, 21C, 23B ise *P.corylophilum*; 10D, *P.spinulosum*; 5B, 11C, 12D, 22E, 30D ve 31A ise diğer *Penicillium* sp.’dir.

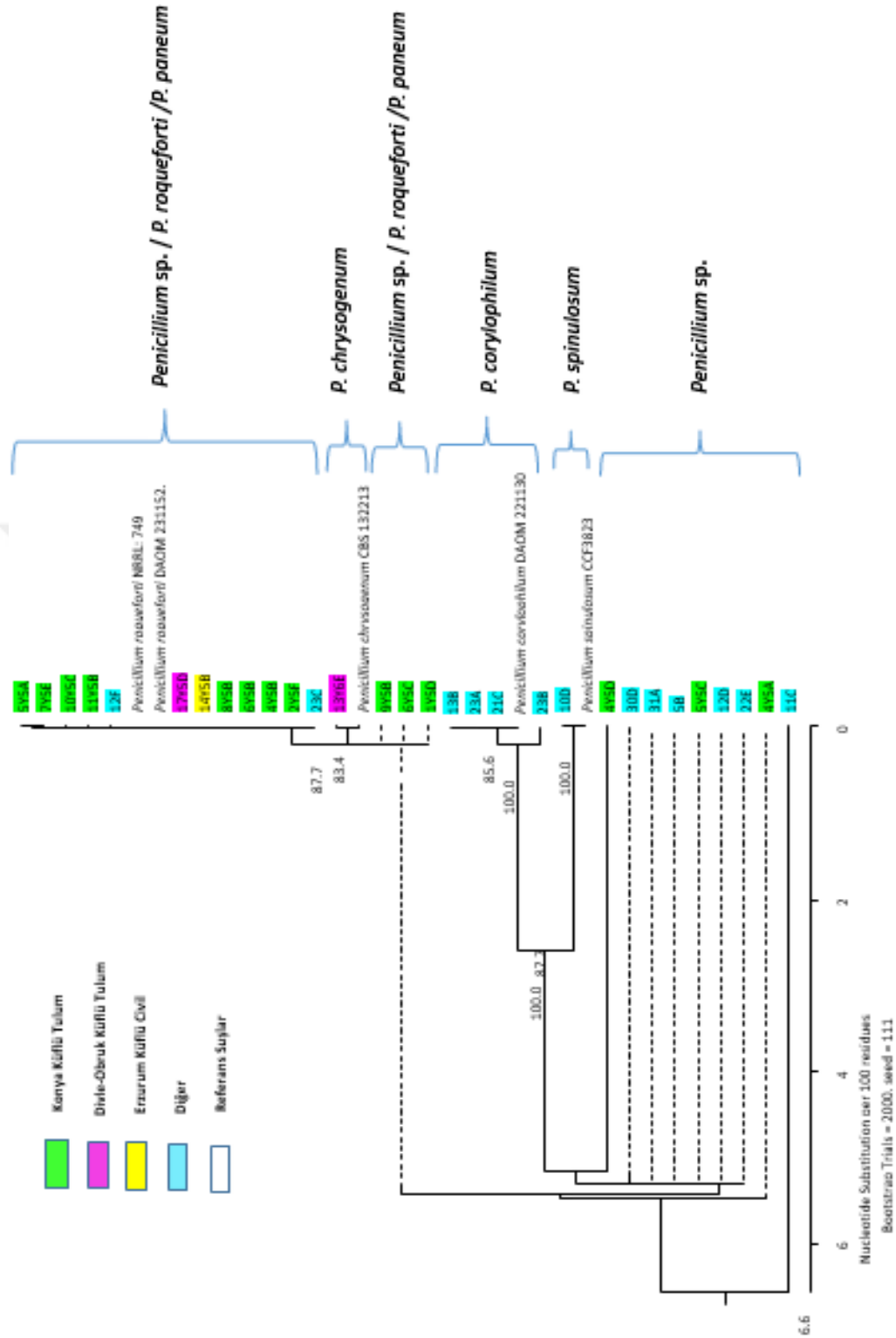
Çizelge 4. 6 Filogenetik ağaçta kullanılan referans suşlar (5.8S ITS Bölgesi)

Küf Suşu	Gen Bank Erişim Numarası	Kaynak
<i>Penicillium roqueforti</i> CBS 221.30	NR_103621.1	[62]
<i>Penicillium chrysogenum</i> CBS 306.48	NR_077145.1	[83]
<i>Penicillium corylophilum</i> NRRL 802	NR_121236.1	[81]
<i>Penicillium commune</i> CBS 311.48	NR_111143.1	[83]
<i>Penicillium crustosum</i> FRR 1669	NR_077153.1	[84]
<i>Penicillium spinulosum</i> FRR 1750	NR_077158.1	[84]

Şekil 4. 21’e göre, Konya Küflü Tulum örneklerinden izole edilen 1Y5D, 2Y5F, 3Y5A, 4Y5A, 4Y5B, 5Y5A, 6Y5B, 6Y5C, 6Y5E, 8Y5B, 9Y5B, 10Y5C, 11Y5B kodlu izolatlar *Penicillium roqueforti*; 7Y5E, *Penicillium carneum*/*P.psychrosexualis*/*P.roqueforti*; 4Y5D ve 5Y5C ise diğer *Penicillium crustosum* olarak tanımlanmıştır. Divle Obruk Küflü Tulum örneklerinden izole edilen 12Y5D, *P.crustosum*; 13Y6E, *P.chrysogenum*; 17Y5C ve 17Y5D, *Penicillium roqueforti*; ve Erzurum Küflü Civil’den izole edilen 14Y5B ve 16Y5B, *Penicillium roqueforti*’dir. Diğer (muhtelif) küflü peynirlerden izole edilen 12F, 23C, 29D kodlu izolatlar *Penicillium roqueforti*; 6, 13B, 23A, 21C, 23B, *P.corylophilum*; 10D, 30C, 30D, *P.spinulosum*; 5B, 11C, 12D, 22E, 30D ve 31A, *Penicillium commune*; 25D ise *P.chrysogenum*’dur.

Konya ve civarı küflü peynirlerinde yapılmış bir çalışmada, 140 küflü peynir örneği incelenmiş; izolatların %86,16’sını *Penicillium* ve %12,84’ünü *Aspergillus* cinslerine ait 9

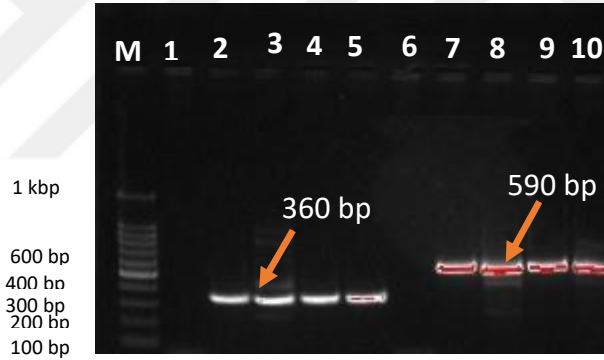
küf türü saptanmıştır [29]. Bir diğer çalışmada 24 farklı küf türü izole edilmiş olup bunların %70,25'ini *Penicillium* türleri (*Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*) tespit edilmiştir [10]. Konya, Mersin, Nevşehir ve Niğde'den alınan 21 küflü peynir örneğinin mikrobiyotasında, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium* sp. ve *Thamnidium* sp. olmak üzere 8 farklı tür belirlenmiştir. *Penicillium roqueforti*, küflü peynir örneklerinden en çok izole edilen küf olup, bunu *Penicillium citrinum* ve *Penicillium chrysogenum* türleri takip etmiştir [11]. Erzurum ve çevresinde satılan 12 adet küflü tulum peynirinden izole ettikleri 16 küf türünden 12'sinin *P.roqueforti* olduğu belirtilmiştir [31]. Küflü Civil peynirinde yapılmış bir araştırmada, 41 peynir örneğinden izole ettikleri 186 küften 165'inin *Penicillium roqueforti* suşlarının olduğunu belirlenmiştir [28]. Divle (Obruk) peynirinde ise, *Penicillium polonicum*, *Penicillium biforme*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* ve *Deboramyces hansenii*'nin suşları tespit edilmiştir [32]. Tanımlama sonuçları, literatürdeki çalışmalara benzerlik göstermiştir.



Şekil 4. 20 İzole edilen *Penicillium* türlerinin Neighbour-joining metoduna göre 28S D1/D2 rRNA gen bölgesi (LSU) filogenetik ilişkisi (2000 bootstrap, 540 bp)

4.4 Tanımlanan *Penicillium roqueforti* İzolatlarının Mikotoksin Genlerinin Varlığı

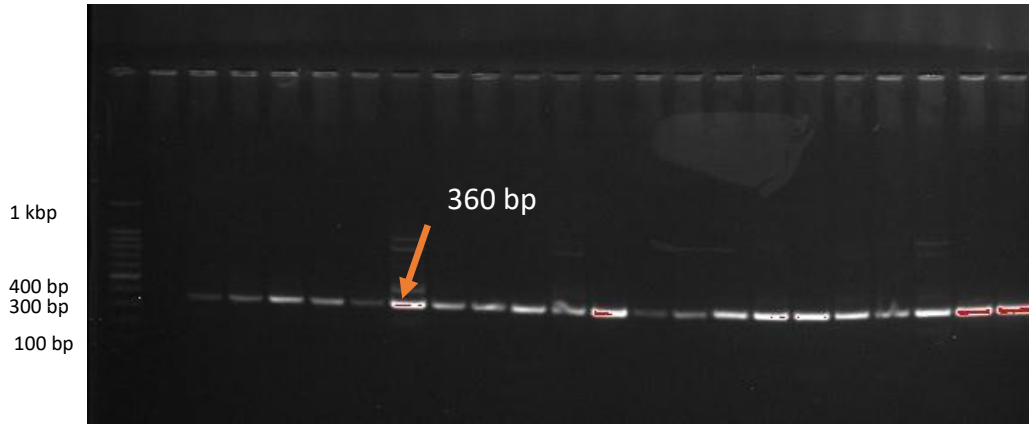
ITS bölgesi dizileme sonuçlarına göre tanımlanmış 21 *Penicillium roqueforti* izolatının toksin genlerinin tespiti amacıyla, rokfortin C ve mikofenolik asit üretiminden sorumlu anahtar genleri hedef alacak şekilde dizayn primerler kullanılarak PCR reaksiyonları oluşturulmuş ve ilgili genlerin varlığı klasik PCR taramasıyla incelenmiştir. Rokfortin C üretiminde ise anahtar gen olan *rds/roqA*'yı temsil eden ileri primer RoqAF (5'-ACTACACCGCCATTGACTCC-3') ve geri primer RoqAR (5'-CTCAATCTCGTGACCTCAA-3') ile; mikofenolik asit üretiminde ise anahtar gen olan *mpaC*'yi temsil eden ileri primer MpaCF (5'-TCTGTCAAGGCAGACTGGTG-3') ve geri primer MpaCR (5'-TCGTCCGATAGCTCAGTGTG-3') ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin boyutu, *roqA* geni için yaklaşık 360 ve *mpaC* geni için 590 baz çifti (bp) uzunluğundadır. Şekil 4. 22'de, 4 izolatın PCR reaksiyonu sonucu elde edilen %1,2'lik jel görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4. 22 Mikotoksin genleri PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü; M: DNA marker (100 bp-1kbp), 1: *roqA* negatif kontrol, 2: 1Y5D, 3: 12F, 4: 5Y5A, 5: 29D, 6: *mpaC* negatif kontrol, 7: 1Y5D, 8: 12F, 9: 5Y5A, 10: 29D

4.4.1 *Penicillium roqueforti* İzolatlarında Rokfortin C Üretiminden Sorumlu *rds/roqA* Geninin Taranması

Tüm *Penicillium roqueforti* izolatlarında (21) PCR taraması sonucu, rokfortin C üretiminden sorumlu *roqA* geni tespit edilmiştir. Şekil 4.23' te, tüm *Penicillium roqueforti* izolatlarının %1,2'lik jel görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4. 23 Soldan sağa DNA marker (100 bp-1kbp), *roqA* negatif kontrol, 1Y5D, 2Y5F, 3Y5A, 4Y5A, 4Y5B, 5Y5A, 6Y5B, 6Y5C, 6Y5E, 7Y5E, 8Y5B, 9Y5B, 10Y5C, 11Y5B, 12F, 14Y5B, 16Y4B, 17Y5C, 17Y5D, 23C ve 29D

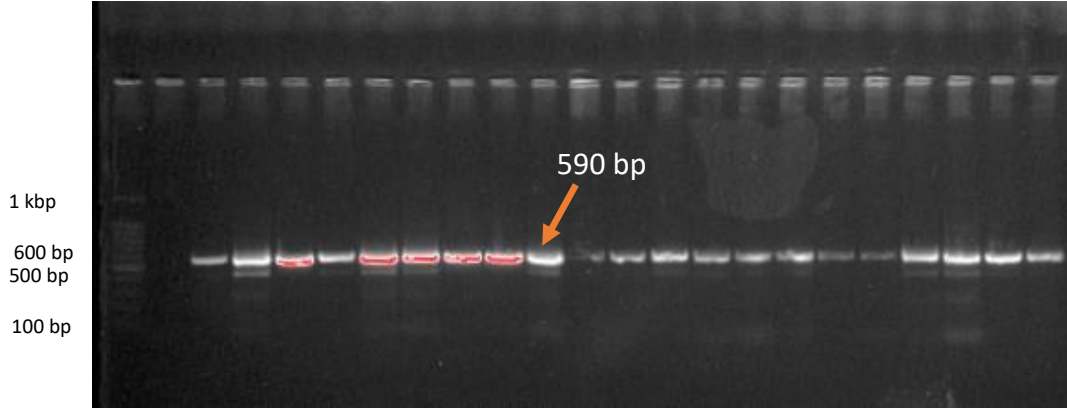
Doğrulama için 2 izolat seçilerek dizileme analizi yapılmıştır. Sonuçlar, Çizelge 4. 7’de verilmiştir.

Çizelge 4. 7 1Y5D ve 12F kodlu izolatların *roqA* dizi analizine göre BLAST sonuçları

İzolat Kodu	GenBank Erişim Numarası	Karşılaştırılan Sonuç	% Benzerlik
1Y5D	KP970559.1	<i>Penicillium roqueforti</i> dipeptid sentaz (Proq01g022790) geni	99
12F	KP970559.1	<i>Penicillium roqueforti</i> dipeptid sentaz (Proq01g022790) geni	99

4.4.2 *Penicillium roqueforti* İzolatlarında Mikofenolik Asit Üretiminden Sorumlu *mpaC* Geninin Taranması

Tüm *Penicillium roqueforti* izolatlarında (21) PCR taraması sonucu, mikofenolik asit üretiminden sorumlu *mpaC* geni tespit edilmiştir. Şekil 4. 24’te, tüm *Penicillium roqueforti* izolatlarının %1,2’lik jel görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4. 24 Soldan sağa DNA marker (100 bp-1kbp), *mpaC* negatif kontrol, 1Y5D, 2Y5F, 3Y5A, 4Y5A, 4Y5B, 5Y5A, 6Y5B, 6Y5C, 6Y5E, 7Y5E, 8Y5B, 9Y5B, 10Y5C, 11Y5B, 12F, 14Y5B, 16Y4B, 17Y5C, 17Y5D, 23C ve 29D

Doğrulama için 2 izolat seçilerek dizileme analizi yapılmıştır. Sonuçlar, Çizelge 4. 8’de verilmiştir.

Çizelge 4. 8 İzolatların *mpaC* geni dizi analizine göre BLAST sonuçları

İzolat Kodu	GenBank Erişim Numarası	Karşılaştırılan Sonuç	% Benzerlik
1Y5D	KU234531.1	<i>Penicillium roqueforti</i> PTX.PR.27 mikofenolik asit biyosentez gen bölgesi	99
12F	KU234531.1	<i>Penicillium roqueforti</i> PTX.PR.27 mikofenolik asit biyosentez gen bölgesi	99

Literatürde, *roqA/rds* ve *mpaC* genlerinin izolatlar üzerinde değerlendirilmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

4.5 Seçilen *Penicillium roqueforti* İzolatlarında Mikotoksin (Rokfortin C ve Mikofenolik Asit) Üretim Yeneteklerinin LC-MS/Q-TOF ile Belirlenmesi

Şekil 4. 21’deki ITS bölgesinin filogenetik ağacındaki farklılıklar gözetilerek seçilen, farklı suşları temsil eden 4 *Penicillium roqueforti* izolatında (1Y5D, 4Y5B, 12F ve 17Y5D kodlu) sentetik besiyerinden (YESA) toksin ekstraksiyonu yapılmıştır [21, 49, 51]. Hedef

toksinlerin (rokfortin C ve mikofenolik asit) moleköl ağırlıkları metoda girilerek, LC-MS/QTOF cihazında ESI-’e göre daha iyi sonuç alınan ESI+ modda kalitatif analizleri gerçekleştirilmiş ve MSMS çekimleri alınmıştır. Çizelge 4. 9’da izolatlara göre, rokfortin C ve mikofenolik asit üretme yetenekleri belirtilmiştir. Sonuçlar cihaz kütüphanesinden taranarak, hedef toksinler dışında ortamdaki diğer metabolitlerin varlığı da incelenmiştir.

Çizelge 4. 9 Seçilen *Penicillium roqueforti* izolat ekstraktlarında hedef toksinlerin varlığı

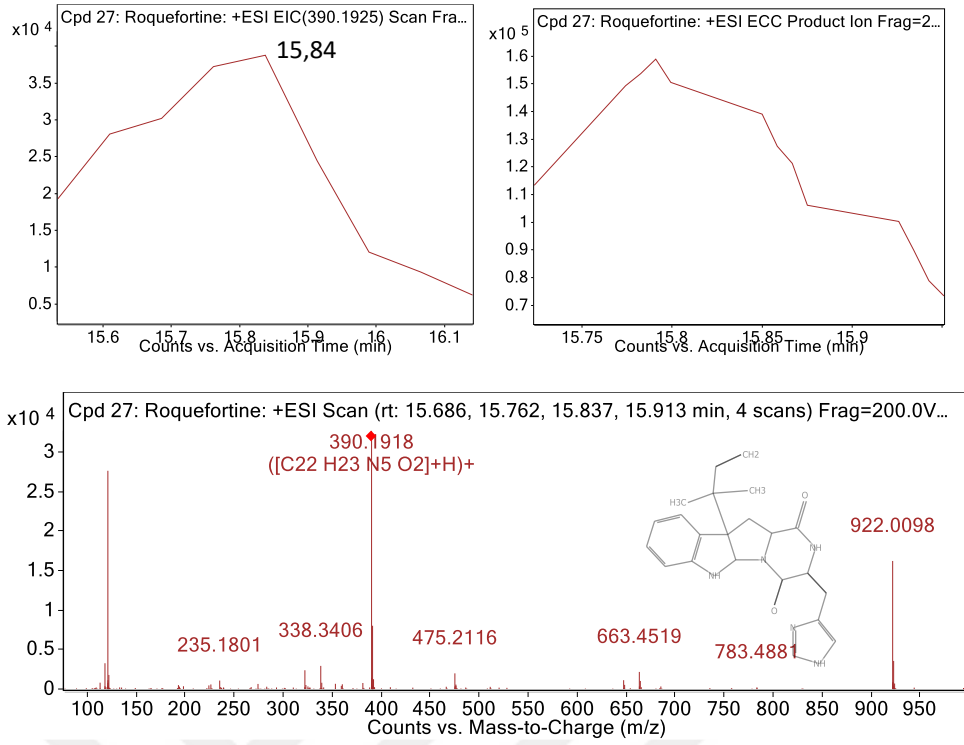
İzolat Kodu	Rokfortin C	Mikofenolik Asit
1Y5D	-	-
4Y5B	+	-
12F	+	-
17Y5D	+	-

+:var, -:yok

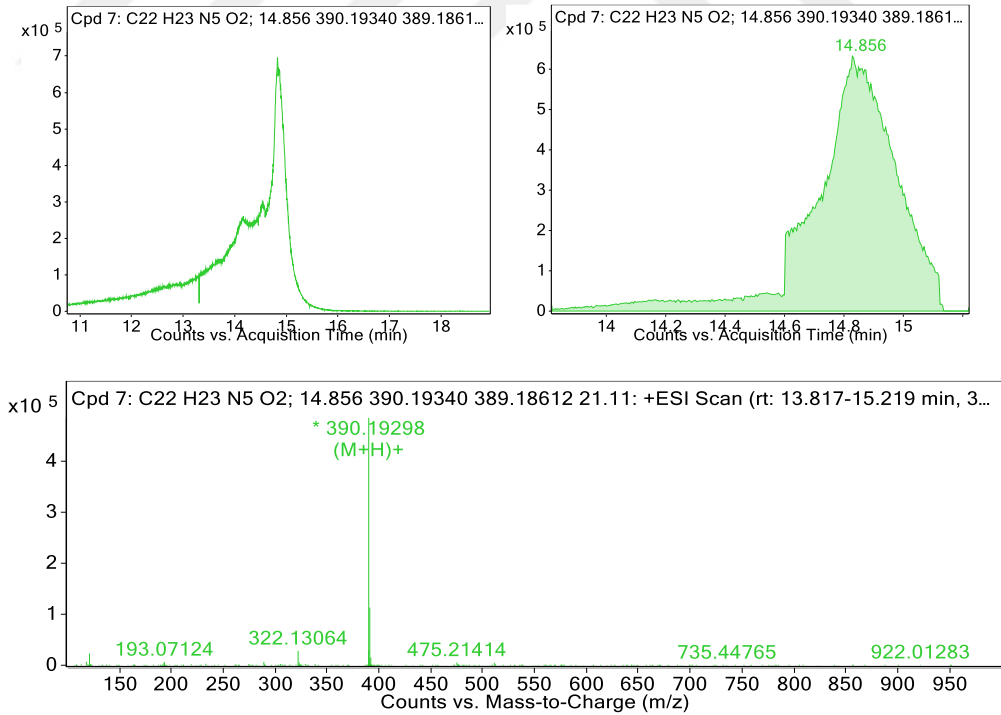
4.5.1 İzolatların Rokfortin C Üretimi

Rokfortin C’nin moleköl ağırlığı, 389,5 g/mol olarak metoda (hedef küfle) girilmiştir. Seçilen izolatlardan 4Y5B, 12F ve 17Y5D’nin (4 izolatın 3’ünün) rokfortin C ürettiği tespit edilmiştir. 1Y5D kodlu izolatın ekstraktında ise, rokfortin C tespit edilmemiştir (Çizelge 4. 10).

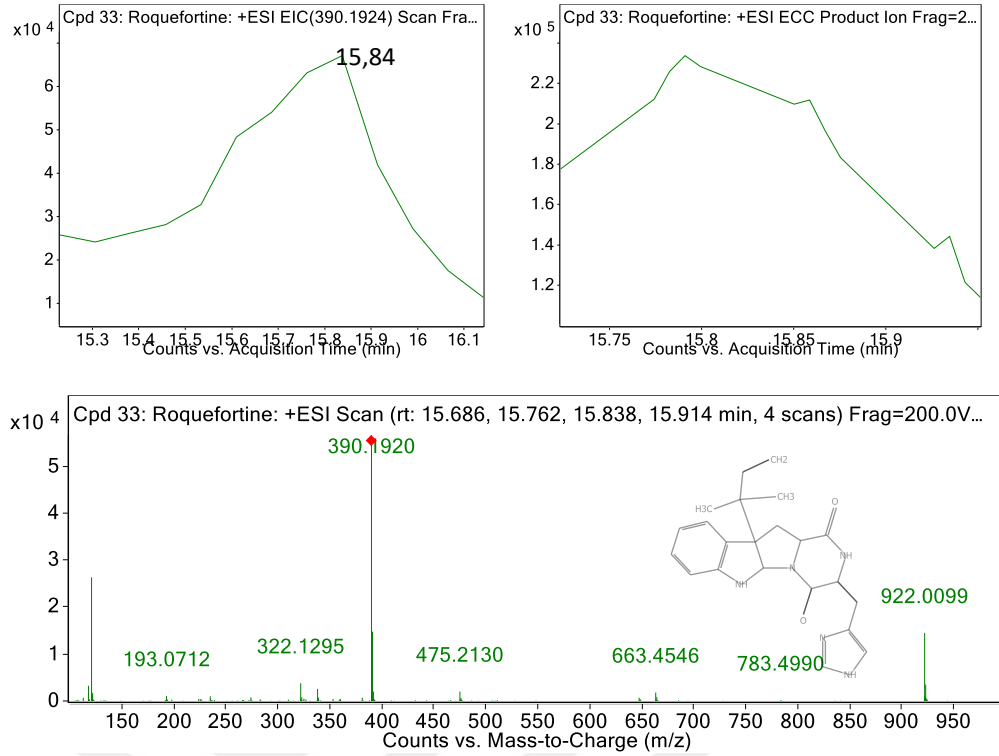
Sırasıyla Şekil 4. 25, Şekil 4. 26 ve Şekil 4. 27’de, seçilen izolatların rokfortin C ($C_{22}H_{23}N_5O_2$) bileşen kromatogramlarında (ESI+ modda) bileşiğin alıkonma zamanı ve kütle spektrumunda $[H^+]$ iyonu eklenmiş hali yer almaktadır. Buna göre, 4Y5B izolatına ait ekstraktta, bileşiğin alıkonma zamanı 15,84 (dk) olarak belirlenmiştir. 12F’de 14,86 (dk) ve 17Y5D’de ise, 15,84 (dk)’dür. Böylece rokfortin C’nin kolona 14.-16. dk’da geldiği ifade edilebilir.



Şekil 4. 25 4Y5B kodlu izolata ait ekstraktta tespit edilen Rokfortin C'nin bileşen kromatogramı ve kütle spektrumu



Şekil 4. 26 12F kodlu izolata ait ekstraktta tespit edilen Rokfortin C'nin bileşen kromatogramı ve kütle spektrumu



Şekil 4. 27 17Y5D kodlu izolata ait ekstraktta tespit edilen Rokfortin C'nin bileşen kromatogramı ve kütle spektrumu

4.5.2 İzolatların Mikofenolik Asit Üretimi

Mikofenolik asitin molekül ağırlığı, 320,34 g/mol olarak metoda (hedef küfle) girilmiştir. Seçilen izolatların ekstraktlarında, mikofenolik asit tespit edilememiştir.

Küflü peynirlerden izole edilmiş *Penicillium roqueforti* suşları üzerinde, sıvı kromatografisi (HPLC, UPLC, LC-MS/MS, LC-MS/Q-TOF vb.) ile kalitatif ve kantitatif olarak son yıllarda bazı sekonder metabolit çalışmaları yapılmıştır. Larsen vd. [85]'nin peynir agar (CA) ekstraktlarında (2 suş) rokfortin C üretimi belirlenirken, mikofenolik asit üretimi tespit edilmemiştir. Nielsen vd. [69], farklı besiyerlerinden toksin ekstraksiyonu yapmışlar ve 9 *P.roqueforti* izolatının hepsinde rokfortin C tespit edilirken, 1'inde mikofenolik asit saptanmamıştır. Mavi damarlı peynirlerden izole edilen 96 *P.roqueforti* suşunun, roquefortin C ve mikofenolik asit üretme potansiyelleri incelenmiş ve göre tüm suşlar bu iki mikotoksini üretme potansiyeline sahip bulunmuştur [48]. Gillot vd.'nin [49] yaptığı çalışmada, mavi damarlı peynirlerden izole edilmiş 164 izolattan morfolojik ve genetik kriterler göz önünde bulundurularak

seçilmiş 55 *P.roqueforti* izolatında LC-MS/QTOF cihazı kullanılarak toksin analizi yapılmıştır. YES agarda geliştirilen bu izolatların ekstraktlarında, özellikle rokfortin C ve izofumigaklavin A, mikofenolik asite oranla daha yüksek konsantrasyonlarda ve örneklerin %96'sında tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, seçilen 3 izolatın rokfortin C sentezlemesi, literatürde belirtilen verilerle ilişkilendirilebilir. Seçilen izolatların ekstraktlarında mikofenolik asit tespit edilmemesi, izolatlarda bulunan, bu metabolitin üretiminden sorumlu *mpaC* geninin eksprese edilememesi ya da bu gende meydana gelmiş olan bir delesyondan (174 bp) kaynaklanabileceği ifade edilebilir [22].

4.5.3 Diğer Metabolitler

Seçilen izolatların ekstraktlarında, LC-MS/QTOF cihazının kütüphanesinden eşleşen ve tanımlanan diğer metabolitler Çizelge 4.10'da verilmiştir. Bunlar arasında, fumigaklavin A, agroklavin, sulfadimidin, kolin, D-karnitin, trimetilaminoasetat gibi metabolitler yer almaktadır. Özellikle, toksin olarak değerlendirilen fumigaklavin A ve agroklavin'in *P.roqueforti* tarafından sentezlenebildiği belirtilmektedir [49, 69, 86].

Peynir üretiminde kullanılan küf starterlerinin, özellikle *P.roqueforti*, sentetik besiyerlerinde rokfortin, mikofenolik asit, PR toksin, izokumarin toksinleri ve türevlerini üretebildiği pek çok çalışmada ifade edilmiştir. Ancak, küfle olgunlaştırılmış peynirlerde yapılmış mikotoksin çalışmaları, bu starterlerin farklı toksinleri kültür ortamında üretmesine rağmen, peynirde üretimlerinin oldukça kısıtlı ve önemsizmeyecek kadar düşük miktarlarda olduğunu göstermektedir. Bu durum, biyotik ve abiyotik faktörlerden kaynaklanabilir. Biyotik faktörler; toksijenik potansiyel, gen ekspresyonu ve ortam mikrobiyotasının etkisidir. Özellikle laktik asit bakterileri, peynir mikrobiyotasında sekonder starter kültür metabolitlerinin üretimini baskılayabilir. Abiyotik faktörler ise; süt çeşidi, peynir matriksi, C/N oranı, öncü bileşikler, NaCl ve O₂ oranı, pH, redoks potansiyeli, su aktivitesi (a_w), olgunlaşma süresi ve sıcaklık gibi pek çok çevresel etkidir [19, 48, 75].

Çizelge 4. 10 LC-MS/QTOF cihazının kütüphanesinden eşleşen metabolitler

İzolat Kodu	RT (Alıkonma Zamanı, s)	Kütlesi (g/mol)	Eşleşen Bileşik	Formülü
1Y5D	0,78	104,11	Kolin	C ₅ H ₁₄ NO
	1,01	298,17	Fumigaklavin A	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂
	1,52	238,15	Agroklavin	C ₁₆ H ₁₈ N ₂
	2,3	162,11	D-Karnitin	C ₇ H ₁₅ NO ₃
4Y5B	0,78	104,11	Kolin	C ₅ H ₁₃ NO
	1,04	298,17	Fumigaklavin A	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂
	1,52	238,15	Agroklavin	C ₁₆ H ₁₈ N ₂
	1,89	118,08	Trimetilaminoasetat	C ₆ H ₁₃ S
	15,84	389,18	Rokfortin C	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂
	17,66	278,09	Sulfadimidin	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S
12F	1,01	298,17	Fumigaklavin A	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂
	14,86	389,18	Rokfortin C	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂
17Y5D	1,03	298,17	Fumigaklavin A	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂
	1,89	118,08	Trimetilaminoasetat	C ₆ H ₁₃ S
	15,84	389,18	Rokfortin C	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂
	25,39	496,34	1-Palmitoil fosfatidilkolin	C ₂₄ H ₅₁ NO ₇ P

Rokfortin C ve mikofenolik asitin, diğer toksin çeşitlerine göre toksisitelerinin ve sitotoksik etkilerinin düşük olduğu ifade edilmektedir. Fakat toksisite çalışmaları oldukça sınırlıdır. Fontaine vd. [87], *Caco-2* bağırsak hücrelerinde bu iki metabolitin sitotoksik etkilerini %50 inhibitör konsantrasyonu değerine (IC50) göre incelemiş ve EFSA normlarındaki patulin, aflatoksin, okratoksin ve fumonisin gibi toksinlerin verileriyle kıyaslamışlardır. Buna göre rokfortin C'nin patuline göre *Caco-2* hücrelerine 30 kat daha az sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak rokfortin C'nin mikofenolik asite göre 14 kat daha fazla sitotoksik etkisi olduğu belirlenmiştir. *Caco-2* hücrelerinde yapılmış bir diğer çalışmada Hymery vd. [88], rokfortin C ve mikofenolik asitin akut etkisinin yanı sıra kronik etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. *Caco-2* hücreleri, 21 gün ilgili toksinlere farklı dozlarda maruz bırakılmıştır. Süre ve doz artışına göre düşük toksik etkiler tespit edilmiş, ancak kronik bir etkiyi belirlemek için 21 gün yetersiz bulunmuştur. Gıda ile birlikte alınan bu toksinlerin, akut bir sağlık problemine neden olmayacağı belirtilmekle beraber, olası kronik sağlık problemlerine etkisi bilinmemektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Konya Küflü Tulum, Divle-Obruk Küflü Tulum, Erzurum Küflü Civil olmak üzere 17 geleneksel küflü peynirden küf izolasyonu yapılmış ve muhtelif peynirlerden (Konya Küflü, Divle-Obruk, Kars yöresi Çeçil, Elazığ-Bingöl yöresi Tomas, Hatay yöresi Sürk ve Akdeniz yöresi Tulum) önceden izole edilmiş olan küf izolatlarıyla birlikte saflaştırılmıştır. Buna göre:

- Toplam 140 küf izolatın koloni morfolojileri incelenmiş ve izolatların %52,1'inin *P.roqueforti* olabileceği düşünülmüştür.
- Genotipik tanımlama için seçilen 40 izolat, ışık mikroskopunda incelenmiştir. Ancak, bazı izolatların hif yapıları arasında farklılıklar belirlense de kesin bir ayırım yapılamamıştır. İzolatların konidyofor yapıları, dallanmalar ve konidyalara birbirine çok benzemektedir. Bunun için, farklı olabileceği düşünülen 6 türe ait 9 izolat taramalı elektron mikroskopunda görüntülenmiştir.
- Genotipik tanımlamada seçilen 30 izolat 28S D1/D2 rRNA (LSU) bölgesine göre, 15'i (%50) *Penicillium* sp. / *Penicillium roqueforti*, 9'u (%30) *Penicillium* sp., 4'ü *Penicillium corylophilum* (%13), 1'i (%3) *Penicillium spinulosum* ve 1'i (%3) *Penicillium chrysogenum* olarak tanımlanmıştır. Ancak bazı izolatlar için, *Penicillium* sp./ *P.roqueforti*/ *P.paneum* ayrımı iyi yapılamamıştır. ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (ITS) gen bölgesiyle ise, 40 izolattan 21'si (%52) *Penicillium roqueforti*, 6'sı (%14) *Penicillium corylophilum*, 5'i (%13) *Penicillium commune*, 3'ü (%8) *Penicillium spinulosum*, 3'ü (%8) *Penicillium crustosum* ve 2'si (%5) *Penicillium chrysogenum* olarak tanımlanmıştır.

Penicillium roqueforti olarak tanımlanan 21 izolattan 1'inde *Roqueforti* serisi olarak *P. carneum* /*P. psychrosexualis* /*P. roqueforti* ayrımı iyi yapılamamıştır. Böylece morfolojik incelemeler ve ITS bölgesi baz alınarak, izolatların, *P. roqueforti*, *P. corylophilum*, *P. commune*, *P. spinulosum*, *P. crustosum* ve *P. chrysogenum* olmak üzere 6 türden oluştuğu belirlenmiştir. Son yıllarda, Genbank'taki güncellemelerden sonra küfler için genotipik tanımlamalardan daha sağlıklı sonuçlar ve yüksek benzerlik oranları alınabileceği düşünülmektedir.

- *P. roqueforti* olarak tanımlanan 21 izolatta rokfortin C ve mikofenolik asit üretiminde rol oynayan genler taranmıştır. Sırasıyla bu mikotoksinlere ait, *roqA/rds* ve *mpaC* genlerinden primer dizayn edilmiştir. Tüm *P. roqueforti* suşlarında bu genlerin olduğu tespit edilmiştir.
- *P. roqueforti* izolatları arasında ITS ağacından seçilen 4 izolatın sentetik besiyerinde rokfortin C ve mikofenolik asit üretimi, LC-MS/Q-TOF cihazıyla kalitatif olarak belirlenmiştir. İzolatların 3'ü rokfortin C üretirken, hiçbirinin ekstraktında mikofenolik asit saptanmamıştır. 1Y5D kodlu izolatın ekstraktında, her iki mikotoksin de tespit edilmemiştir. Bu izolat, sekonder starter olarak değerlendirilebilir, üzerinde detaylı çalışılmalıdır.

P. roqueforti'lerin rokfortin C ve mikofenolik asit genlerini bulundurmasına rağmen, bu genleri eksprese edemediği ya da bazı abiyotik ve biyotik faktörler nedeniyle, mikotoksinleri bazen sentezleyemediği hakkında bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, peynirde üretimlerinin ve toksisitelerinin düşük olduğu ifade edilen bu mikotoksinlerle ilgili çalışmalar sınırlıdır. Özellikle, geleneksel küflü peynirlerimizde detaylı çalışma bulunmamaktadır. Çeşitli yörelerde mahalli olarak üretilen ve özel lezzet, koku ve tatlara sahip olan bu peynirlerin endüstriyel olarak üretilip daha geniş kitlelere ulaştırılabilmesi ve sağlık açısından değerlendirilebilmesi oldukça önemlidir.

Ülkemizde peynirler için starter-sekonder kültür üretimi endüstriyel boyutta yapılmamakta, yurtdışından temin edilmektedir. Bu peynirlerden özellikle *P. roqueforti* suşlarının izole edilip, polifazik (morfolojik, genotipik, kemotaksonomik) incelemeye tabi tutularak, yerli küf kültürü seçimine yardımcı olabilecek fonksiyonel-metabolizma ve teknolojik özelliklerinin detaylı incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Türk Gıda Kodeksi (TGK), (2015). "Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği, 2015/6", <http://www.mevzuat.gov.tr>, Son Erişim Tarihi: 03.12.2018
- [2] Sandine, W.E. ve Elliker, P.R., (1970). "Microbially induced flavors and fermented foods, flavor in fermented dairy products", Journal of Agriculture and Food Chemistry, 18(4): 557- 562.
- [3] Fox, P.F. ve McSweeney, P.L.H., (2004). "Cheese: An overview". Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Editörler: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., 1.Cilt, 3.Baskı, Elsevier Academic Press, London.
- [4] Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. ve McSweeney, P.L.H., (2016). "Fundamentals of cheese science", 2rd edition, Springer, New York.
- [5] Çetinkaya, A., (2005). "Yöresel peynirlerimiz", 1.baskı, Kars.
- [6] Türk Patent Enstitüsü (TPE), (2018). "Geographical Registered List", <http://www.turkpatent.gov.tr/TURKPATENT/geographicalRegisteredList/>, Son Erişim tarihi: 03.12.2018
- [7] Çakmakçı, S., (2011). "Türkiye Peynirleri". Peynir Biliminin Temelleri, Editörler: Hayaloğlu, A.A. ve Özer, B., 1.Baskı, Sidas Medya LTD.ŞTİ., İzmir.
- [8] Üçüncü, M., (2008). "Peynir Sözcüğünün Kökeni ve Peynirin Tarihsel Gelişimi". A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi, 1.Cilt, 2.Baskı, Meta Basım, İzmir.
- [9] McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G. ve Fox, P.F., (2004). "Diversity of Cheese Varieties: An overview". Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Editörler: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., 2.Cilt, 3.Baskı, Elsevier Academic Press, London.
- [10] Hayaloğlu, A.A. ve Kırbağ, S., (2007). "Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese", International Journal of Food Microbiology, 155: 376-380.
- [11] Sağdıç, O., Özçelik, S., Şimşek, B. ve Özdemir, C., (2008). "Geleneksel yöntemle üretilen küflü peynirlerin mikrobiyolojik nitelikleri ve küf florası", Türkiye 10. Gıda Kongresi, sy.709-712, 21-23 Mayıs, Erzurum.

- [12] Şengün, İ.Y., Karapınar, M., Yaman, D.B. ve Yenice, E., (2006). "İsparta ili ve yöresine ait geleneksel küflü çömlük peynirinin mikroflorası üzerine bir araştırma", Türkiye 9.Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, 461-464.
- [13] Suranska, H., Raspor, P., Uroic, K., Golic, N., Kos, B., Mihajlovic, S., Begovic, J., Suskovic, J., Topisirovic, L. ve Cadez, N., (2016). "Characterisation of the yeast and mould biota in traditional White pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques", Folia Microbiologica, 61(6): 455-463.
- [14] Florez, A.B. ve Mayo, B. (2006). "Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE", International Journal of Food Microbiology, 110: 165-171.
- [15] Florez, A.B., Alvarez-Martin, P., Lopez-Diaz, T.M. ve Mayo, B., (2007). "Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates", International Dairy Journal, 17: 350-357.
- [16] Arteau, M., Labrie, S. ve Roy, D., (2010). "Terminal- restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese", International Dairy Journal, 20: 545-554.
- [17] Panelli, S., Buffoni, J.N., Bonacina, C. ve Feligini, M., (2012). "Identification of moulds from the Taleggio cheese environment by the use of DNA barcodes", Food Control, 28: 385-391.
- [18] Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S. ve Dupont, J., (2012). "A taxonomic and ecological overview of cheese fungi", International Journal of Food Microbiology, 155: 199-210.
- [19] 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.
- [20] Çakmakçı, S., Gürses, M., Hayaloğlu, A.A., Çetin, B., Şekerci, P. ve Dağdemir, E., (2015). "Mycotoxin production capability of *Penicillium roqueforti* in strains isolated from mould-ripened traditional Turkish civil cheese". Food Additives and Contaminants, Part A, 32(2): 245-249.
- [21] Fontaine, K., Passero, E., Vallone, L., Hymery, N., Coton, M., Jany, J.L., Mounier, J. ve Coton, E., (2015). "Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheese", Food Control, 47: 634-640.
- [22] Gillot, G., Jany, J.L., Dominguez-Santos, R., Poirier, E., Debaets, S., Hidalgo, P.I., Ullan, R.V., Coton, E. ve Coton, M., (2017). "Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*", Food Microbiology, 62: 239-250.
- [23] Ulusal Süt Konseyi, (2016). "Dünya ve Türkiye'de Süt Sektör İstatistikleri", <http://www.ulusalsutkonseyi.org.tr/media/2016-sut-raporu.pdf>, Son Erişim tarihi: 03.12.2018

- [24] European Commission, (2018). "EU agricultural product quality policy", http://ec.europa.eu/agriculture/quality_en , Son Erişim Tarihi: 03.12.2018
- [25] 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.
- [26] Martin, J.F. and Coton M., (2017). "Blue Cheese: Microbiota and Fungal Metabolites". Fermented Foods in Health and Disease Prevention, Editörler: Frias, J. ve Martinez-Villaluenga, C., Penas, E., 1.Baskı, Academic Press.
- [27] Özgören, E. (2012). "Türkiye’de ticari ölçekte üretilen bazı küflü peynirlerin toplam aflatoksin, aflatoksin M1 ve okratoksin A düzeylerinin belirlenmesi", Yüksek lisans tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- [28] Çakmakçı, S., Çetin, B., Gürses, M., Dağdemir, E. ve Hayaloğlu, A.A., (2012). "Morphological, molecular and mycotoxigenic identification of dominant filamentous fungi from Moldy Civil Cheese", Journal of Food Protection, 75 (11): 2045-2049.
- [29] Özkalp, B. ve Durak, Y., (1998). "Konya ve civarı küflü peynirlerinde küf florasının araştırılması", Tübitak Turkish Journal of Biology, 22: 341-346.
- [30] Anonim, (2016). "*Geotrichum candidum*", <http://microbialfoods.org/geotrichum-candidum-mold-transition/> , Son Erişim tarihi: 03.12.2018
- [31] Erdoğan, A., Gurses, M. ve Sert, S., (2003). "Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum Cheeses produced in Turkey", International Journal of Food Microbiology, 85: 83-85.
- [32] Ozturkoglu Budak, S., Figge, M.R., Houbraken, J. ve Vries, R.P. (2016). "The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening", International Dairy Journal, 58: 50-53.
- [33] Gürsoy, O. ve Kesenkaş, H., (2011). "Peynir Mikrobiyolojisi". Peynir Biliminin Temelleri, Editörler: Hayaloğlu, A.A. ve Özer, B., 1.Baskı, Sidas Medya LTD.ŞTİ., İzmir.
- [34] Kılıç, S., (2011). "Peynir Starter Kültürleri". Peynir Biliminin Temelleri, Editörler: Hayaloğlu, A.A. ve Özer, B., 1.Baskı, Sidas Medya LTD.ŞTİ., İzmir.
- [35] Frisvad, C.F. 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: 1-174.
- [36] Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. ve Samson, R.A., (2014). "Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*", Studies in Mycology, 78: 343-371.
- [37] Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Holzapfel, W.H. ve Jakobsen, M., (2001). "Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese

- starter cultures by RAPD typing.”, International Journal of Food Microbiology, 65(3): 183-191.
- [38] Frisvad, J.C., Thrane, U. ve Samson, R.A., (2007). “Mycotoxin producers”. Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food. Editörler: Dijksterhuis, J., ve Samson, R.A., CRC press, Mycology Volume: 25, New York.
 - [39] Stark, J., (2007). “Cheese and Fermented Sausages”. Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food. Editörler: Dijksterhuis, J., ve Samson, R.A., CRC press, Mycology Volume: 25, New York.
 - [40] Perrone, G. ve Susca, A., (2017). “*Penicillium* species and their associated mycotoxins”. Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols. Editorler: Moretti, A. ve Susca, A., Humana Press Springer Protocols, 1.Baskı, New York.
 - [41] EFSA, (2014). “Chemical contaminants: Mycotoxins”, <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins>, Son Erişim tarihi: 03.12.2018
 - [42] Sengun, I.Y., Yaman, D.B. ve Gonul, S.A., (2008). “Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review”, World Mycotoxin Journal, 15 (3): 291-298.
 - [43] Banjara, N., Suhr, M.J. ve Hallen-Adams, H.E. (2015). “Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types”, Current Microbiology, 70: 792-800.
 - [44] Benkerroum, N., (2016). “Mycotoxins in dairy products”, International Dairy Journal, 62: 63-75.
 - [45] Brown, D.W., Butchko, R.A.E. ve Proctor, R.H., (2011). Identification of genes and gene clusters involved in mycotoxin synthesis, Editör: De Saeger, S., sf. 333-348, Woodhead Publishing, 2.baskı, Cambridge, UK.
 - [46] Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G. ve Coton, E., (2014). “Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review”, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety”, 13(4): 437-456.
 - [47] Garcia-Estrada, C. ve Martin, J.F., (2016). Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses, Applied Microbiology and Biotechnology, 100: 8303-8313.
 - [48] Fontaine, K., Hymery, N., Lacroix, M.Z., Puel, S., Puel, O., Rigalma, K., Gaydou, V., Coton, E. ve Mounier, J., (2015). “Influence of intraspecific variability and abiotic factors mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*”, International Journal of Food Microbiology, 215: 187-193.
 - [49] Gillot, G., Jany, J.C., Poirier, E., Maillard, M.B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E. ve Coton, M., (2017). “Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species”, International Journal of Food Microbiology, 241: 141-150.
 - [50] El Dairouty, R. K., Abd Alla, A. M., El-Senaity, M. M., Tawfek, N. F. ve Sharaf, O.M., (1990). “Chemical and microbiological changes in Roquefort style cheese during ripening”, Ecology of Food and Nutrition, 24(2): 89-96.

- [51] Kokkonen, M., Jestoi, M. ve Rizzo, A., (2005). "Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry.", *Food Additives & Contaminants*, 22(5): 449-456.
- [52] Kosalkova, K., Dominguez-Santos, R., Coton, M., Coton, E., Garcia-Estrada, C., Liras, P. ve Martin, J.F., (2015). A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrins in three different *Penicillium roqueforti* strains, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 7601-7612.
- [53] Ali, H., Ries, M.I., Nijland, J.G., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A.L., Vreeken, R.J. ve 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.
- [54] Del-Cid, A., Gil-Duran, C., Vaca, I., Rojas-Aedo, J.F., Garcia-Rico, R.O., Levican, G. ve Chavez, R., (2016). Identification and functional analysis of the mycophenolic acid gene cluster of *Penicillium roqueforti*, *PLoS One*, 11(1): e0147047.
- [55] Anonim, (2011). Merck Mikrobiyoloji El Kitabı, Editörler: Halkman, A.K., Sağdaş, Ö.E., 2.Baskı, Ankara.
- [56] Atlas, R.M., (2010). Handbook of Microbiological Media, CRC Press, 4.Baskı, New York.
- [57] Munaut, F. ve Van Hove, F., (2011). "Molecular identification of mycotoxigenic fungi in food and feed", Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed, Editör: De Saeger, S., sf.298-331, Woodhead Publishing, 2.baskı, Cambridge, UK.
- [58] Tarbell, T., (2008). "Molecular characterization of fungal species from pure cultures and environmental samples", <http://www.biotechniques.org/students/2008/tarbell/>
- [59] Umesha, S., Manukumar, H.M. ve Raghava, S., (2016). "A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens", 3 Biotech, 6(2): 123-132.
- [60] White, T.J., Bruns, T., Lee, S. ve 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.
- [61] Fernandez-Bodega, M.A., Mauriz, E., Gomez, A. ve Martin, J.F., (2009). "Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeon and Bejes-Tresviso local varieties of blue-veined cheeses", *International Journal of Food Microbiology*, 136(1): 18-25.
- [62] Houbraken, J., Frisvad, J.C. ve Samson, R.A., (2010). "Sex in *Penicillium* series *Roqueforti*", *IMA Fungus*, 1(2): 171-180.
- [63] Mantar Preparat ve Kültür Hazırlama Yöntemleri, Lam Kültürü Hazırlama, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CF>

- [64] Rosana, Y., Matsuzawa, T., Gonoj, T. ve Karuniawati, A., (2014). "Modified slide culture method for faster and easier identification of dermatophytes", *Microbiology Indonesia*, 8(3): 135-139.
- [65] Toth, E.M., Borsodi, A.K., Felföldi, T., Vajna, B., Sipos, R. ve Marialigeti, K., (2013). "Exercise 43: Preparing slide-cultures with humidity chambers", Editörler: Toth, E.M., Marialigeti, K., *Practical Microbiology: Based on the Hungarian practical notes entitled Mikrobiologiai Laboratoriumi Gyakorlatok, Macaristan*.
- [66] Moulds Under the Microscope, Preparations of Slides, <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Examination.html>, Son Erişim Tarihi: 03.12.2018
- [67] Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., (2012). "Primer3-new capabilities and interfaces", *Nucleic Acids Research*, 40(15): e115.
- [68] Santini, A., Mikusova, P., Sulyok, M., Krska, R., Labuda, R. ve Srobarova, A., (2014). "*Penicillium* species isolated from Slovak grape berries taxonomy assessment by secondary metabolite profile", *Mycotoxin Research*, 30: 213-220.
- [69] Nielsen, K.F., Sumarah, M.W., Frisvad, J.C. ve Miller, J.D., (2006). "Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3756-3763.
- [70] Sumarah, M.W., Miller, J.D. ve Blackwell, B.A., (2005). "Isolation and metabolite production by *Penicillium roqueforti*, *P.paneum* and *P.crustosum* isolated in Canada", *Mycopathologia*, 159: 571-577.
- [71] O'Brien, M., Nielsen, K.F., O'Kiely, P., Forristal, P.D., Fuller, H.T. ve Frisvad, J.C., (2006). "Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad, *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9268-9276.
- [72] Gillot, G., Jany, J.L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., Lopez-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T. ve Coton, E., (2015). "Insights into *Penicillium roqueforti*: Morphological and genetic diversity", *PLoS One*, 10(6): e0129849 (1-21).
- [73] Seifert, K.A., Samson, R.A., DeWaard, J.R., Houbraken, J., Levesque, C.A., Moncalvo, J.M., Louis-Seize, G.ve Hebert, P.D.N., (2007). "Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case", *PNAS*, 104(10): 3901-3906.
- [74] Giraud, F., Giraud, T., Aguileta, G., Fournier, E., Samson, R., Cruaud, C., Lacoste, S., Ropars, J., Tellier, A. ve Dupont, J., (2010). "Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated

- with cheese manufacturing”, International Journal of Food Microbiology, 137(2-3): 204-213.
- [75] 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. ve Giraud, T., (2015). “Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi”, Current Biology, 25(19): 2562-2569.
 - [76] Ropars, J., Lopez-Villavicencio, M., Snirc, A., Lacoste, S. ve Giraud, T., (2017). “Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*”, PLoS One, 12(3): e0171387.
 - [77] 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. ve Brygoo, Y., (2014). “Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi”, Nature Communications, 5: 2876.
 - [78] Vu, D., Szöke, S., Wiwie, C., Baumbach, J., Cardinali, G., Röttger, R. ve Robert, V., (2014). “Massive fungal biodiversity data re-annotation with multi-level clustering”, Scientific Reports, 4: 6837.
 - [79] Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J.Z., Cardinali, G., Houbraken, J., Boekhout, T., Crous, P.W., Robert, V. ve Verkley, G.J.M., (2019). “Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation”, Studies in Mycology, 92: 135-154.
 - [80] Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. ve Fungal Barcoding Consortium, (2012). “Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi”, PNAS, 109(16): 6241-6246.
 - [81] Peterson, S.W. ve Horn, B.W., (2009). “*Penicillium parvulum* and *Penicillium georgiense*, sp.nov., isolated from the conidial heads of *Aspergillus* species”, Mycologia, 101(1): 71-83.
 - [82] Hujslova, M., Kubatova, A., Chudickova, M. ve Kolarik, M., (2009). “Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Reserve, Czech Republic”, Mycological Progress, 9(1): 1-15.
 - [83] Rakeman, J.L., Bui, U., Lafe, K., Chen, Y.C., Honeycutt, R.J. ve Cookson, B.T., (2005). “Multilocus DNA sequence comparisons rapidly identify pathogenic molds”, Journal of Clinical Microbiology, 43(7): 3324-3333.
 - [84] Haugland, R.A., Varma, M., Wymer, L.J. ve Vesper, S.J., (2004). “Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species”, Systematic and Applied Microbiology, 27(2): 198-210.
 - [85] Larsen, T.O., Gareis, M. ve Frisvad, J.C., (2002). “Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common *Penicillia* on cheese agar”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(21): 6148-6152.

- [86] Fernandez-Bodega, A., Alvarez-Alvarez, R., Liras, P. ve Martin, J.F., (2017). "Silencing of a second dimethylallyltryptophan synthase of *Penicillium roqueforti* reveals a novel clavinet alkaloid gene cluster", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15): 6111-6121.
- [87] Fontaine, K., Mounier, J., Coton, E. ve Hymery, N., (2016). "Individual and combined effects of roquefortine C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells", *World Mycotoxin Journal*, 9(1): 51-61.
- [88] Hymery, N., Mouinier, J. ve Coton, E., (2018). "Effect of *Penicillium roqueforti* mycotoxins on Caco-2 cells: Acute and chronic exposure", *Toxicology in Vitro*, 48: 188-194.



SEKANS SONUÇLARI

SEKANS SONUÇLARINA GÖRE 30 İZOLATIN DİZİMLERİ (28S D1/D2 GEN BÖLGESİ)

1Y5D kodlu izolat

GGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGTAGAGGATGC
TTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGT
ATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC
AGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGATAGCGCACA
AGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGT
TGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCATTTCGTGCCGGTGT
ATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTCGGAAGGTAAC
GCCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGAGGAACGCGCT
TCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGCGACCCGTCTT

2Y5F kodlu izolat

GGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAAT
TTGTAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGG
GTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGA
CCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGC
ATTCGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGC
CCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGA
CCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGCGACCCGTCTTG

4Y5A kodlu izolat

CAGTTACGGCGAGTGAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCAT
TGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCA
TAGAGGGTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAG
TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGC
CGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGT
TAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTC
GCCGGCATTCTGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTC
AAAGGCCCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTG
CCTAGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGT

4Y5B kodlu izolat

GAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGT
AGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTATAGAGGGTG
AGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCG
ATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCAC
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTCAGCCGGCATT
GTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTC
GGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGA
GGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTTCGTAAGCGA

4Y5D kodlu izolat

CGAGTGAAGCGGCAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGC
AGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTATAGAGGGTG
AGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCG
ATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTTAAAAACAC
GTGAAATTGTTTAAAGGGAAACGCTTGCGAACCACACTCGCTCGCGGGGTTCACCCCGCATT
CGGGACTGTGTATTTCCCCGAGGGCGGGGCCAGCGGGGTTTGGGCGGTGAGCCAAACGCC
TCAGCAGGTAACGCCTTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCTATGCGACCTGCCTAGACG
CGAGGAACGCTCTTCGTGCTCGGACGCTGGCATAAGTGGTTGTC

5B kodlu izolat

GAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGC
AGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTATAGAGGGTG
AGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCG
ATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCAC
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTCAGCCGGCATT
GTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTC

GGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGA
GGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGCG

5Y5A kodlu izolat

GAGTGAAGCGGCAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGTA
GAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTGA
GAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTT
GGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGAT
AGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACG
TGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTTCGACCACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCATTTCG
TGCCGGTGTATTTCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTCG
GAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGAG
GAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGCGA

5Y5C kodlu izolat

GCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTT
GCAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGT
GAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTG
TTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACC
GATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGC
ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTTCGACCACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCAT
TCGTGCCGGTGTATTTCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCC
TCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACC
GAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAG

6Y5B kodlu izolat

CTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGAG
CGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGGGATG
GGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAA
TGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGT
GATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG
GAAGCGCTTTCGACCACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCATTTCGTGCCGGTGTATTTCCC
GCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTCGGAAGGTAACGCCCTA
GGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTC
GGACGCTGGCATAATGGTCGTAAG

6Y5C kodlu izolat

CTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGAG
CGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGGGATG
GGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAA
TGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGT

GATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG
GAAGCGCTTGCAGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTGAGCCGGCATTCTGTCGGGTGTATTTCCCC
GCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTCGGAAGGTAACGCCCCTA
GGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTC
GGACGCTGGCATAATGGTCGTAAG

7Y5E kodlu izolat

CGGCGAGTGAAGCGGCAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAAT
TTGTAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGG
GTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGA
CCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTGAGCCGGC
ATTCGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGC
CCTCGGAAGGTAACGCCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGA
CCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAG

8Y5B kodlu izolat

GTCTCATTGCCCCAGCTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCT
TCGGGGTCCGCATTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGG
AACGGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAG
CTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAA
GCTAAATATTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTT
TGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGACCAGACTCGC
TCGCGGGGTTGAGCCGGCATTCTGTCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTT
GGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGT
GCAATGCGACCTGCCTAGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTA
AGCGACCCGTCTTGAACGAGACGGACCCA

9Y5B kodlu izolat

GAGTGAGCGGCAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGTAG
AGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTGAG
AATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTG
GGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGATA
GCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACGT
GAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTGAGCCGGCATTCTGT
GCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTCGG
AAGGTAACGCCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGAGG
AACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGCGACC

10D kodlu izolat

CGGCGAGTGAAGCGGTAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAA
TTTGCAGAGGATGTTTCGGGAGCAGCCCCATCTAAGTGTCTGGAACGGACCGTCATAGAG
GGTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCTGCGCCCATGTGAAACTCCTTCGACGAGTCGAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAG
ACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCATCAGACTCGCCTTGGGGGTTCAGCCGGC
ATTCGTGCCGGTGTACTTCCCCCAGGGCGGGGCCAGCGTCGGTTTGGGTGGCTGGTCAAAGGC
CCTTGGAATGTAACGCCTCTCGGGGCGTCTTATAGCCAAGGGTGCCATGCAGCCTACCTGGAC
CGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTA

10Y5C kodlu izolat

CGCGTTATTGCCAGATAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCC
TTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCATCTAAGTGCCCTG
GAACGGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAA
GCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAA
AGCTAAATATTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACT
TTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTCG
CTCGCGGGGTTCAGCCGGCATTTCGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGGCCAGCGTCGGTTT
GGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGT
GCAATGCGACCTGCCTAGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTA
AGCGACCCGTCTTGAACCGA

11C kodlu izolat

AACGGACAGTGGTGCGACAACACTGCGGTTTGATGACTGTGGGCTATTTGGGTCCGATCTGC
AATTAGCATACCAGGTTAACCCAGCCGCCCTAACTACGTGACCTGGAACGGGACGTCATAGA
GGGTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGA
GTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGA
GACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAA
AAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTCGCTCGCGGGGTTCAGCCG
GCATTCGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAG
GCCCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTA
GACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCG

11Y5B kodlu izolat

CGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAA
TTTGTAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAG
GGTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAG
ACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTCGCTCGCGGGGTTCAGCCGGC
ATTCGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGC

CCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGA
CCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTA

12D kodlu izolat

GGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAAT
TTGCAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGG
GTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGA
CCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTCGCTCGCGGGGTTCAGCCGGC
ATTCGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGC
CCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGA
CCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAA

12F kodlu izolat

GGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAAT
TTGTAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGG
GTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGA
CCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTCGCTCGCGGGGTTCAGCCGGC
ATTCGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGC
CCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGA
CCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAA

13B kodlu izolat

CGAGTGAGCGGCAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGC
AGAGGATGCTTCGGGAGTGGCCCCATCTAAGTGCTCTGGAACGGGCCGTCATAGAGGGTGA
GAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGACCATGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTT
GGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGAT
AGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACG
TGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTCGCCTACGGGGTTCAGCCGGTATTTCG
TACCGGTGTACTTCCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTCG
GAATGTAACGCCTCTCGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCCATGCGGCCAGCCCGGACCGAG
GAACGCGCTTCGGCACGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGCGA

13Y6E kodlu izolat

GGCGAGTGAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATT
TGTAAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGG
TGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTT
GTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGAC

CGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAG
CACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCA
TTCGTGCCGGTGTACTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCC
CTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGAC
CGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAG

14Y5B kodlu izolat

CGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTG
TAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTG
AGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCG
ATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCAC
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCATTTC
GTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTC
GGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGA
GGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGC

17Y5D kodlu izolat

GGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAAT
TTGTAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGG
GTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGA
CCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGC
ATTCGTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGC
CCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGA
CCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAA

21C kodlu izolat

GGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTCGGGGTCCGCATTGTAAT
TTGCAGAGGATGCTTCGGGAGTGGCCCCATCTAAGTGCTCTGGAACGGGCCGTCATAGAGG
GTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGACCATGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGA
CCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCCTACGGGGTTTCAGCCGGT
ATTCGTACCGGTGTACTTCCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGC
CCTCGGAATGTAACGCCTCTCGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCCATGCGGCCAGCCCGGA
CCGAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAG

22E kodlu izolat

GAGTGAAGCGGCAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGCA
GAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTGA
GAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTT
GGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGAT
AGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACG
TGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCATTTCG
TGCCGGTGTATTTCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCCCTCG
GAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGAG
GAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGCGA

23A kodlu izolat

GCGAGTGAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTCGGGGTCCGCATTGTAATTT
GCAGAGGATGCTTCGGGAGTGGCCCCATCTAAGTGCTCTGGAACGGGCCGTCATAGAGGGT
GAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGACCATGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTG
TTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACC
GATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGC
ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCCTACGGGGTTCAGCCGGTAT
TCGTACCGGTGTACTTCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCC
TCGGAATGTAACGCCTCTCGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCCATGCGGCCAGCCCGGACC
GAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGC

23B kodlu izolat

GGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTCGGGGTCCGCATTGTAAT
TTGCAGAGGATGCTTCGGGAGTGGCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGTCATAGAGG
GTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCATGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGA
CCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAA
GCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCCTACGGGGTTCAGCCGGT
ATTCGTACCGGTGTACTTCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGC
CCTCGGAATGTAACGCCTCTCGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCCATGCGGCCAGCCCGGA
CCGAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCTGGCATAATGGTCGTAA

23C kodlu izolat

CGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTG
TAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTG
AGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCG
ATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCAC

GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTAGCCGGCATTG
GTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTCGGTCAAAGGCCCTC
GGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGA
GGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGC

30D kodlu izolat

CGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGCGGGTCCGCATTGTAATTTG
CAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTG
AGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCG
ATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCAC
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTAGCCGGCATTG
GTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTCGGTCAAAGGCCCTC
GGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGA
GGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGC

31A kodlu izolat

CGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGCGGGTCCGCATTGTAATTTG
CAGAGGATGCTTCGGGAGCGGTCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTCATAGAGGGTG
AGAATCCCGTATGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCG
ATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCAC
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTAGCCGGCATTG
GTGCCGGTGTATTTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTCGGTCAAAGGCCCTC
GGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGA
GGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAGC

SEKANS SONUÇLARINA GÖRE 40 İZOLATIN DİZİMLERİ (ITS1-5.8S-ITS2 GEN BÖLGESİ)

1Y5D kodlu izolat

CCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGTCACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACA
AATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCTTCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCT
TTTGTGTTGGGTCTCGTTCTCCGATTCTTGAGGTCGGGTTTTGAAAGGCAGCGGCGGCACCGC
GTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGA
TCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGA

2Y5F kodlu izolat

ATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGTTTACACCCCGGGC
CCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAAT
TATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT
GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTG
GGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCC
TCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC

3Y5A kodlu izolat

CCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGTTTACACCCCGGGCCCGCG
CCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAATTATTT
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAC
GTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTAT
TCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCT
CGTCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAG
CGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTT
ATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

4Y5A kodlu izolat

ATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGTTTACACCCCGGGC
CCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAAT
TATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT
GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTG
GGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCC
TCCAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC

4Y5B kodlu izolat

TCTCTGGGTCACCTCCCACCCGTGTTTATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGC
CGCCGGGGGTTTACACCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCGAACTCTGTCTGAAG
AATGCAGTCTGAGAACAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCG
AGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG
CTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCGAAA
GGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGC
CCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG

4Y5D kodlu izolat

GGTCCACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCG
CGGGGGGCTTACGCCCCGGGCGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGAT
TGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAG
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCT
GCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAA
GGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGC
CCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG

5B kodlu izolat

GTCACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCG
GGGGGCTCACGCCCCGGGCGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTG
AAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCT
TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
CTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGC
AGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCG
GCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT

5Y5A kodlu izolat

GGGGGGTTTACACCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCGAACTCTGTCTGAAGAATG
CAGTCTGAGAACAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCT
TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
CTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCGAAAGGCA
GCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGG
CCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC
GCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCG

5Y5C kodlu izolat

GGGTCCACCTCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGGCCG
CCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGA
TTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGA
GTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGC
TGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCCGAA
AGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCCCCCGCTCTGTAGG
CCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG

6 kodlu izolat

AGGTCACCTGAAAAAAGATTGATGGTTGTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTACAAGAGCGGG
TGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCC
CCCGGGAAGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGG
ACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACT
GAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGA
GATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTATTTAGCTAATTGCTCAGACTGCAATCTTCAGACAGTGT
TCAATGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCAGAGGGCAGAAGCCCCCGGCGGCCGTGAGGCG
GGCCCGCCGAAGCAACAAGGTACAATAACATGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTC
ACTC

6Y5B kodlu izolat

CCCGTGTTTATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACCTGTGCATGCCGGGGGGTTTAC
ACCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAA
CAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCTATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA
TTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGG
CTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACC
GCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCC
GATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG
CATATCAAT

6Y5C kodlu izolat

GGGGGGTTTATCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGC
AGTCTGAGAACAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCTA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTT
TGAACGCTCATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC
TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAG
CGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTTTTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC
GGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGATCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC
TGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

6Y5E kodlu izolat

GGGGTTTACACCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCA
GTCTGAGAACAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTTCGGCATCTAT
GAAGAACGCATCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT
GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCT
CAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGC
GGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTTTGTAGGCCCGGCC
GGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC
TTAA

7Y5E kodlu izolat

AACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATT
CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGT
CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTATGTGTTGGGTCTCGTCTCCGATTCTTGAGG
TTCATTTTGTAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCC
GCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGTCTCGGATC
AGGTAGGGATACCCGC

8Y5B kodlu izolat

CCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGTGCCGCCGGGGGTTTACACCCCGGGCCCGC
GCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAATTATT
TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
CGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGT
ATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGT
CTCGTCTCCGATTCTGGAGGTCGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCG
AGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATT
TTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG

9Y5B kodlu izolat

CCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGTTTACACCCCGGGCCCGC
CCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAATTATTT
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAC
GTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTAT
TCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCT
CGTCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAG
CGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTT
ATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

10D kodlu izolat

CCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGTGC GCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCTTCTGCC
CCCGGGTCCGCGCGCACCGGAGACACCATTGAACTCTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCATAA
ACTAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCT
TGTGTGTTGGGCTCCGTCCCCCGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGAGTCCG
GTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCG

10Y5C kodlu izolat

ATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGTTTACACCCCCGGGC
CCGCGCCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAAT
TATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT
GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTG
GGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCAAAAGGCAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCC
TCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC

11C kodlu izolat

CCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGCTCACG
CCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGA
AAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGC
TTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACC
GCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCC
GATCAACCCAAATTTTTATCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAGTTAAG
CATATCAATAA

11Y5B kodlu izolat

CCCGTGTTTATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGTTTACAC
CCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACA
AATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCT
TGTGTGTTGGGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGC
GTCCGGTCTCCAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCCCTAGCCAA
TGG

12D kodlu izolat

TCACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGG
GGGGCTACGCCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGA
AGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC
TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCA
GCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGG
CCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCGGGTGGACTCGGAACAGGTAGGGATAC

12F kodlu izolat

TTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGTTTACACCCCCGGGCCCCGCGCCCC
CCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAATTATTTAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCTATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAA
TGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTC
CTCCTATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTA
TGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCC
AGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG

12Y5D kodlu izolat

GCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCC
GCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGAGATCGGGGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGGGCTT
GAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCG
TTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTT
CATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGA
CTTCAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGGCGTAAGCC
CCCCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAAGGTAAAATAAACACGGGTGGGA
GGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACT

13B kodlu izolat

CCACCCATGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCTTCT
GCCCTCTGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCATTGAACACTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCA
ATTAGCTAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCAC
GGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCTTCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAG

13Y6E kodlu izolat

ACCTCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGG
GGCTTACGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGT
CTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCA
AGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGG

14Y5B kodlu izolat

CCCGTGTTTATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGTTTACAC
CCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACA
AATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCT
TGTGTGTTGGGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGC
GTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCC

16Y4B kodlu izolat

CACCTCCACCCGTGTTTATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGG
GGTTTACACCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTC
TGAGAACAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAA
GCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGC
GGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGC
GCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGAACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC

17Y5C kodlu izolat

CCCACCCGTGTTTATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGTTT
ACACCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAG
AACAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCC
GGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCA
CCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTG
CC

17Y5D kodlu izolat

GGTCACCTCCCACCCGTGTTTATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCG
GGGGGTTTACACCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGC
AGTCTGAGAACAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA
TGAAGAACGCACCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCATTGAATCATCAAGTCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCAAGCGTCCTTGATGCCC
TCTGGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTATTTGTCCGATTCTGGAGGACGGGGCCCAAAAGGCAGC
GGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCG

21C kodlu izolat

CTCTGGGTCACCTCCCACCCATGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCC
GCCGGGGGGCTTCTGCCCTCTGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCATTGAACACTGTCTGAAG
ATTGCAGTCTGAGCAATTAGCTAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT
GCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCTTCCCGGGGGACGGGGCCCGAA
GGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTTGATAG
CCCGGCCGGCGCTTGCCGACAACCATCAATCTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG

22E kodlu izolat

CCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTCAC
GCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGT
GAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCC
GGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCTCCGGGGGACGGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGC
ACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTT
GCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT
AAGCATATCAATAA

23A kodlu izolat

TGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCTTCTGCCCTCT
GGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCATTGAACACTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCAATTAGCT
AAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCG
CCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGT
GTGTTGGGCCCCGTCTCTTCCCGGGGGACGGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCC
GGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGACAA
CCATCAATCTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

23B kodlu izolat

TGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCTTCTGCCCTCT
GGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCATTGAACACTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCAATTAGCT
AAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAAAACGCAGCGAA
ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCG
CCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGT
GTGTTGGGCCCCGTCTCTTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCC
GGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGACAA
CCATCAATCTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC

23C kodlu izolat

GGTCACCTCCACCCGTGTTTATTTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCG
GGGGGTTTACACCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGC
AGTCTGAGAACAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCCGGCTGCCCT
CAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCTCCGATTCTGGAGGACGGGCCCGAAAGGCAGC
GGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCT

25C kodlu izolat

GTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCTTCTGCCCTCTGGCCCGC
GCCCGCCGAAGACACCATTGAACACTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCAATTAGCTAAATAAG
TTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCAATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTG
GTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGG
GCCCCGTCTCTCTTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCTC
GAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGACAACCATCAA
TCTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC

25D kodlu izolat

CTCTGGGTCACCTCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGG
CCGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGA
AGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCAT
CGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT
TTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGA
AAGGCAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG
GCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTA

29D kodlu izolat

CCCGTGTATTATTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGTTACAC
CCCCGGGCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACA
AATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCAATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCT
TGTGTGTTGGGTCTCGTCCTCCGATTCTGGAGGACGGGCGCCGAAAGGCAGAAAGCGGCACCG
CGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCG
ATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAGTAAAGC
ATATCAATA

30C kodlu izolat

ACCTCCACCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGTGCGCCCGCCTACGGCCGCCGGGGG
GCTTCTGCCCCCGGGTCCGCGCGCACCGGAGACACCATTTGAAGTCTGTCTGAAGATTGCAGTC
TGAGCATAACTAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATACTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA
AGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCCGTCCCCCGGGGACGGGCGCCGAAAGGCAGCGGCGGCA
CCGAGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCA
AACGAAAACCCAACATCCTTTGG

30D kodlu izolat

GGTCACCTGAAAGGATGATGGGTTGTCGGCTGGCGCCGGCCGGGCCTACAGCAGCGGGTGA
CAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACTCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCCGGGCCGTCCCCGG
GGGGACGGAGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATG
CCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCA
ATTCACATTAGTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGT
TGAAAGTTTAACTTATTTAGTTTATGCTCAGACTGCAATCTTCAGACAGAGTTCAATGGTGTC
TCCGGTGCGCGCGGACCCGGGGGCGAGAAGCCCCCGGCGGCCGTGAGGCGGGCGCACCGAA
GCAACAAGGTACAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCAGTAATGA

31A kodlu izolat

CCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGC
GCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTAT
TTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGG
TATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGG
CCCCGTCTCCGATCTCCGGGGGACGGGCGCCGAAAGGCAGCGGCGGCCCGCGTCCGGTCTC
CGGGGGG

HEDEF MİKOTOKSİN GENLERİNİN SEKANS SONUÇLARI

ROKFORTİN C (*roqA/rds*) GEN BÖLGESİ DİZİMLERİ

1Y5D

GCATGCAGTCGGATTTTCTCCAACGCGTCATGTTGGATCGTTGACCCGGAGAACCATGATGAG
CTTCAACCGGTTGGCTCCGTGGGAGAACTATTGATCGGTGGGCCGATTGTTGGAAGAGGCTA
TATCAACCGAACCCAGGAGTCTGCAGCGGCCTTCATTCGTGATCCTGTCTGGAGCGAGAACTT
CCCCTTCTTACGAGGAGACCGACTGTACAAGACTGGAGATCTCGCTTCCTTGAATGCAGACGG
GTCCTTAACTTTGGTCGGCCGAAAGGATACACAGGTCAAGCTCAATGGGCAACGGATTGAGG
TGCCGAGATTGAGAAGA

12F

GGAGTCGCAGTCGGATTTTCTCCAACGCGTCATGTTGGATCGTTGACCCGGAGAACCATGATG
AGCTTCAACCGGTTGGCTCCGTGGGAGAACTATTGATCGGTGGGCCGATTGTTGGAAGAGGC
TATATCAACCGAACCCAGGAGTCTGCAGCGGCCTTCATTCGTGATCCTGTCTGGAGCGAGAAC
TTCCCCTTCTTACGAGGAGACCGACTGTACAAGACTGGAGATCTCGCTTCCTTGAATGCAGAC
GGGTCCTTAACTTTGGTCGGCCGAAAGGATACACAGGTCAAGCTCAATGGGCAACGGATTGA
GGTACAGAGAATTGAGAAGA

MİKOFENOLİK ASİT (*mpaC*) GEN BÖLGESİ DİZİMLERİ

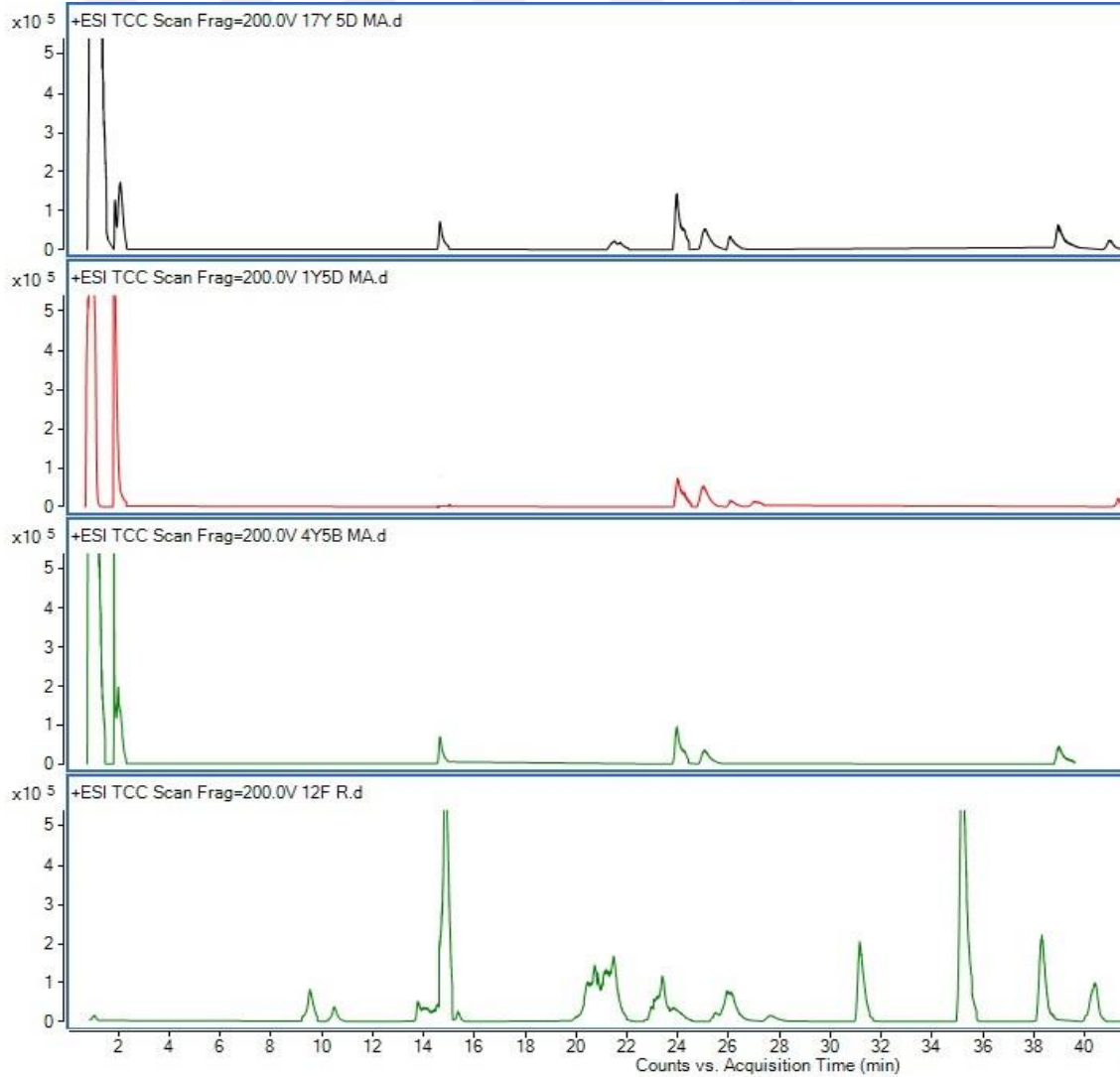
1Y5D

GGTCGCATTCTAACAGCGCCGATATGGAAGTTGACGAGTCCCGTCTTCTATCCATCGGCCAGG
AAGAGTTCGTCCACGATCAGCTAGAGGCCGTCTGGTAGCCAGGAGCAACCTTGATGTCTAC
GGGGCAGGAGTGTTTGCTAACGGTAACACGTCGGCTCGCTCCGCAGTGTCGCTGCAGAACGG
CACGAACACCCTCAATGGTAGTCCACAGGCAGCTGAGATGCCACCTATTGCCATTACTGGCAT
GGCTTGTAGATATTCTAACGCAGACACCACGAGCGAGCTATGGGATTTGCTGGAGCTGGGGG
TATGTACAGTGGAGAAGGCCCTGGGAATCGGTTCCGGATGCCAGACTTGCCAGCGGGAGCCC
AAGGGCCCATTTTGGGGTCACTTCCTCGACCGGCCAGATGCATTGACCATCGTTTTTTTAAACA
TCTCAGCGCGAGAGGCCGAGTCCATGGATCCACAACAACGCGTGTTGCTGCAAGTAGCATAT
GAAGCCATGGAGTCTGCCGGATACTGCGGATGGCAGCACACTGAGGTATTATGACGAAGAAA

12F

GCGCATCTACAGCGCCGATATGGAAGTTGACGAGTCCCGTCTTCTATCCATCGGCCAGGAAGA
GTTTCGTCCACGATCAGCTAGAGGCCGTCTGGTAGCCAGGAGCAACCTTGATGTCTACGGGG
CAGGAGTGTTTGCTAACGGTAACACGTCGGCTCGCTCCGCAGTGTCGCTGCAGAACGGCACG
AACACCCTCAATGGTAGTCCACAGGCAGCTGAGATGCCACCTATTGCCATTACTGGCATGGCT
TGTAGATATTCTAACGCAGACACCACGAGCGAGCTATGGGATTTGCTGGAGCTGGGGGTATG
TACAGTGGAGAAGGCCCTGGGAATCGGTTCCGGATGCCAGACTTGCCAGCGGGAGCCCAAG
GGCCCATTTTGGGGTCACTTCCTCGACCGGCCAGATGCATTGACCATCGTTTTTTTAAACATCT
CAGCGCGAGAGGCCGAGTCCATGGATCCACAACAACGCGTGTTGCTGCAAGTAGCATATGAA
GCCATGGAGTCTGCCGGATACTGCGGATGGCAAACACACTGAGTAATCCGGACAAGAAA

TOPLAM BİLEŞEN KROMATOGRAMLARI

Seçilen *P.Roqueforti* İzolatlarının Toplam Bileşen Kromatogramları
(TCC)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hatice Ebrar KIRTIL
Doğum Tarihi ve Yeri : 30.06.1993 / Bakırköy, İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : hebrarkrtl@gmail.com
hatice.kirtil@izu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Gıda Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2018
Lisans	Gıda Mühendisliği (Tam Burslu)	İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi	2015
Lise		Güngören Anadolu İmam Hatip Lisesi	2011

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2017-devam	İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Bildiri

1. Kırtıl, H.E., Çakır, E., Durak, M.Z. ve 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”, International Agricultural Science Congress, Van, TÜRKİYE, 9-12 Mayıs.
2. Çakır, E., Kırtıl, H.E., Durak, M.Z. ve Arıcı, M., (2017). “Some Properties of Essential Oil Added Turkish Traditional Beverage Boza”, I. International Congress on Medical and Aromatic Plants “Natural and Healthy Life”, Konya, TÜRKİYE, 10-12 Mayıs.

Proje

1. Geleneksel Ekşi Hamur Üretimine Yönelik Teknolojik Özellikleri Yüksek Yerli Ticari Starter Kültür Üretimi, 2017 (Tübitak 1505 TEYDEB, Proje No: 5150003, Bursiyer).

ÖDÜLLERİ

1. Bölüm İkinciliği (Lisans: 3,85/4,00) - 2015