

PEYNİR KÜFÜ OLARAK *PENICILLIUM ROQUEFORTI*'NİN TAKSONOMİSİ, MORFOLOJİK, GENETİK VE METABOLİK ÖZELLİKLERİ

Hatice Ebrar Kırtıl^{1*}, Banu Metin^{1,2}, Muhammet Arıcı³

¹İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Gıda ve Tarım Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

³Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalürji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

Geliş / Received: 17.07.2020; Kabul / Accepted: 07.11.2020; Online baskı / Published online: 20.11.2020

Kırtıl, H.E., Metin, B., Arıcı, M. (2020). Peynir küfü olarak *Penicillium roqueforti*'nin taksonomisi, morfolojik, genetik ve metabolik özellikleri. *GIDA* (2020) 45 (6): 1188-1200 doi: 10.15237/gida.GD20091

Kırtıl, H.E., Metin, B., Arıcı, M. (2020). Taxonomy, morphological, genetic and metabolic characteristics of *Penicillium roqueforti* as a cheese mold. *GIDA* (2020) 45 (6): 1188-1200 doi: 10.15237/gida.GD20091

ÖZ

Filamentli bir fungus olan *Penicillium roqueforti*, küflü peynirlerin olgunlaştırılmasında sekonder starter olarak kullanılmaktadır. Starter kültür olarak kullanılan işletmelerde, *P. roqueforti* direkt olarak süt içine katılabildiği gibi, peynir pıhtısı üzerine püskürtülerek de inoküle edilmektedir. Ticari starter kültür kullanılmadığında ise ortamdaki bulaşarak peynirde spontan olarak gelişebilir. Son yıllarda, *P. roqueforti*'nin morfolojik, metabolik ve genetik özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Mağara ya da mahzen ortamından gelen *P. roqueforti*'nin peynir matrisine adaptasyonu ve yüzyıllar süren evcilleşme süreci hakkında yeni bulgular ortaya çıkmıştır. Ayrıca, *P. roqueforti*'nin eşeyli üreme yapabildiği tespit edilmiştir ki, bunun biyoteknolojik açıdan büyük önemi söz konusudur. Bu derlemede, gıda endüstrisi için değerli bir tür olan *P. roqueforti*'nin taksonomik, morfolojik, genetik ve metabolik özellikleri sunulmuş, bu özelliklerin küflü peynir üretiminde kullanımı değerlendirilmiş ve *P. roqueforti*'nin biyoteknolojik potansiyeli vurgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Penicillium roqueforti*, küflü peynir, starter kültür, taksonomi, genetik özellikler

TAXONOMY, MORPHOLOGICAL, GENETIC AND METABOLIC CHARACTERISTICS OF *PENICILLIUM ROQUEFORTI* AS A CHEESE MOLD

ABSTRACT

Penicillium roqueforti is a filamentous fungus used as secondary starter culture in mold-ripening of cheese. In facilities using starter cultures, *P. roqueforti* is added directly in milk or introduced by spraying on the cheese curd. If a commercial starter is not used, the fungus can spontaneously grow on cheese through contamination from the environment. In recent years, studies on morphological, metabolic, and genetic characteristics of *P. roqueforti* have been conducted. New findings have been reported on the adaptation of *P. roqueforti* that originates from caves or cellars, to cheese matrix and the domestication process that has been going on for centuries. In addition, this species was found to be able to reproduce sexually, which is of great biotechnological importance. In this review, taxonomic, morphological, genetic, and metabolic features of *P. roqueforti* are presented, the use of

* Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author:

✉ : hatice.kirtıl@izu.edu.tr

☎ : (+90) 212 692 9820

☎ : (+90) 212 693 8229

Hatice Ebrar Kırtıl; ORCID no: 0000-0003-0784-4452

Banu Metin; ORCID no: 0000-0002-3203-0058

Muhammet Arıcı; ORCID no: 0000-0003-4126-200X

these characteristics in cheese production and the biotechnological potential of *P. roqueforti* is emphasized.

Keywords: *Penicillium roqueforti*, mold-ripened cheeses, starter culture, taxonomy, genetic characteristics

GİRİŞ

Ascomycetes'lerin (altşube, sınıf, takım; *Peziizomycotina*, *Eurotiomycetes*, *Eurotiales*) *Aspergillaceae* ailesinin yaklaşık 354 *Penicillium* türü arasında yer alan *Penicillium roqueforti*, özellikle Rokfor, Stilton, Danablu, Gorgonzola ve Blauschimmelkäse gibi mavi-damarlı peynirlerle ilişkilendirilen, ayrıca tahıl, yem, toprak gibi peynir harici izolasyon kaynakları olan saprotrof, filamentli bir fungustur (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014). *P. roqueforti*, ülkemizde üretilen Erzurum Küflü Civil, Divle Obruk ve Konya Küflü gibi küflü peynirlerden de izole edilerek tanımlanmıştır (Çakmakçı vd., 2012; Öztürkoğlu Budak, 2016; Kırtıl, 2018; Seri, 2020). İlk olarak, *P. roqueforti* Thom adıyla peynirden izole edilmiştir. *P. roqueforti*'nin identifikasyonunda önceleri morfolojisi ve ürettiği metabolitler kullanılmıştır (Frisvad ve Samson, 2004). Son yıllarda bu türün tanımlanmasında ve çeşitliliğinin belirlenmesinde moleküler teknikler (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), ribozomal RNA (rRNA) dizileme, multilokus dizi tiplendirme (MLST) vb.) kullanılmaktadır (Geisen vd., 2001; Fernandez-Bodega vd., 2009; Visagie vd., 2014; Gillot vd., 2015). Bu türün, taksonomik olarak *P. carneum*, *P. paneum* ve *P. psychrosexualis* türlerine yakın olduğu tespit edilmiştir (Houbraken vd., 2010). Yakın zamanda bu seri içinde, *P. mediterraneum* olarak adlandırılan bir tür daha tanımlanmıştır (Guevara-Suarez vd., 2020).

P. roqueforti'nin izolasyonunda ve koloni morfolojisinin incelenmesinde Czapek Dox Agar (CDA), Czapek Yeast Agar (CYA), Kreatin Sükroz Agar (CREA), Malt Ekstrakt Agar (MEA), Potato Dekstroz Agar (PDA), Yeast Ekstrakt Sükroz Agar (YES), Oat Meal Agar (OA) besiyerleri kullanılmaktadır (Frisvad ve Samson, 2004). Fungal koloniler, CYA ve MEA besiyerlerinde 14 günde 40-70 mm çapına ulaşırlar. Koloniler, açık yeşilden koyu yeşile değişen tipik mavi-yeşil renktedir. Koloni yapısı, kadifemsi dokudan damarlı dokuya kadar değişebilir (Frisvad ve Samson, 2004). Gillot vd.

(2015), PDA'da 25°C'de 7 gün inkübasyon sonucu inceledikleri *P. roqueforti* suşlarının makroskopik morfolojilerinde çeşitliliğinin olduğunu belirtmişlerdir. Genellikle, aseksüel spor üretmekle birlikte (Frisvad ve Samson, 2004), *P. roqueforti*'nin bazı şartlar altında eşeyli üreme yaptığı da tespit edilmiştir (Ropars vd., 2012; 2014).

P. roqueforti, gelişme şartlarına göre, bazı biyoaktif bileşikler, aroma maddeleri ve mikotoksinler gibi çok sayıda primer ve sekonder metabolit üretebilir. Peynir ortamında *P. roqueforti*'nin andrastin A, B gibi antitümör etkili bileşiklerin yanı sıra; mikofenolik asit gibi antimikrobiyal ve immünesupresif özelliklere sahip metabolitleri de sentezlediği bildirilmiştir. Bu bileşiklerin yanı sıra, rokfortin C, isofumigaklavin, PR toksin gibi mikotoksinleri de ürettiği ifade edilmiştir (Frisvad ve Samson, 2004; Garcia-Estrada ve Martin, 2016; Gillot vd., 2017a; Martin ve Coton, 2017). Ancak son çalışmalarda, *P. roqueforti*'nin bazı metabolitleri peynir ortamında insan sağlığına olumsuz bir etkisinin olmayacağı kadar düşük konsantrasyonlarda ürettiği, PR toksinin de yine peynir ortamında daha az toksik başka bileşiklere dönüştüğü tespit edilmiştir (Hymery vd., 2014). Bu bulgular, Renaud ve Lorgeril (1992)'in ortaya attığı Fransız Paradoksu'nu tekrar gündeme getirmiştir. Bu paradoks, doymuş yağ içeriği yüksek bir beslenme şekline sahip Fransızların, epidemiyolojik bir çalışma sonucu kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan ölümlerinin düşük oranlarda olduğunun tespit edilmesiyle ortaya atılmıştır. Ancak, Petyaev ve Bashmakov (2012), daha sonra bu durumun Fransa'da yüksek oranlarda mavi-damarlı peynir tüketiminden gelen andrastin A, B ve mikofenolik asit gibi biyoaktif bileşiklerden kaynaklandığını öne sürmüştür. Bu bakış açısı, mavi-damarlı ya da küfle olgunlaştırılmış peynirlerin seçkin organoleptik özelliklerinin yanı sıra biyolojik açıdan da değerli olabileceğini düşündürmektedir. Peynirlerin üretiminde sekonder starter kültür olan *P. roqueforti*'nin, sadece yüzeyde değil,

peynirin içinde de üremesi istendiğinden, olgunlaşma başlangıcında peynirde ince çubuklarla delikler açılarak küfün iç kısımlara da erişmesi ve yerleşmesi sağlanır; bu şekilde karakteristik mavi-damarlı yapıya ulaşılır. Bu tür, olgunlaşma sürecinde, geleneksel peynir üretiminde ortamdaki gelip peynirde gelişebileceği gibi, ticari starter formunda da peynire inoküle edilebilir (Fox vd., 2016a; Metin, 2018). Ülkemizde üretilen Erzurum Küflü Civil, Divle Obruk, Konya Küflü, Kars Çeçil, Elazığ-Bingöl Tomas, Hatay Sürk, Çömlek Tulum, Akdeniz Tulum gibi küflü peynirlerde ise daha çok geleneksel küflendirme söz konusudur (Çakmakçı, 2011; Yalman vd., 2016). Son yıllarda yapılan çalışmalarda geleneksel küflü peynirlerimizde baskın küf türünün, Avrupa tipi mavi-damarlı peynirlerdeki gibi, *P. roqueforti* olduğu tespit edilmiştir (Çakmakçı vd., 2012; Öztürkoglu Budak, 2016; Yalman vd., 2016).

P. roqueforti'nin olgunlaştırma sürecinde peynirde baskın türü oluşturmasını, yüzyıllar boyunca peynir ortamına adaptasyonunun ve evcilleşme sürecinin sağladığı öne sürülmüştür (Gibbons ve Rinker, 2015; Bodinaku vd., 2019). *P. roqueforti*'nin evcilleşme süreci özellikle, muhtelemen diğer peynir mikroorganizmalarından genomuna kazandırdığı yatay gen transfer bölgelerinde (horizontal gene transfer, HGT) bulunan laktoz metabolizması ve antimikrobiyal özellikleri içeren *CheesyTer* ve *Wallaby* gen bölgeleriyle ilişkilendirilmiştir (Cheeseman vd., 2014; Ropars vd., 2015).

Son on yılda, *P. roqueforti*'nin taksonomisi, genetik özellikleri, çeşitliliği, eşeyli üreme potansiyeli, fizyolojisi ve metabolizması ile ilgili çalışmalar yapılmış ve biyoteknolojik değeri ortaya konmuştur. Bu derlemede, bu türün morfolojisi, taksonomisi, genetiği, fizyolojisi, metabolizması ve biyoteknolojik potansiyeli ile ilgili çalışmalar incelenmiştir.

P. ROQUEFORTI'NİN MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ

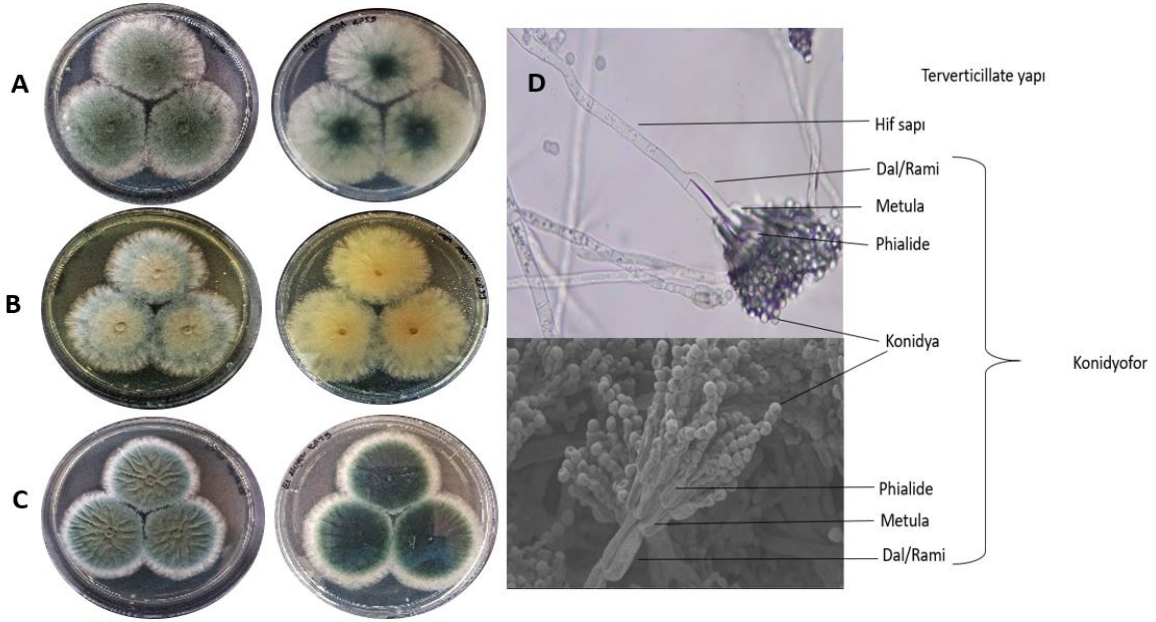
P. roqueforti'nin makroskopik morfolojisinin değerlendirmesinde, CDA, CYA, CREA, MEA, PDA, YES, OA gibi besiyerlerinde gösterdiği koloni şekli, yapısı/dokusu ve renkleri, koloni

çapları ve eksudat oluşturma özellikleri değerlendirilmiştir (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014). Koloniler, genellikle açık yeşilden koyu yeşile değişen renktedir. Koloni yapıları ise, tüylü, kadifemsi, damarlı (buruşuk) görünümlü olabilir (Frisvad ve Samson, 2004). Kolonilerin renkleri ve yapıları, besiyeri bileşimi (farklı şeker kullanımı gibi) ve inkübasyon şartlarına göre değişebilir. PDA besiyerinde 25°C'de 7 gün inkübasyonu sonucu, *P. roqueforti* suşları arasında koloni rengi farklılıkları net bir şekilde tespit edilmiş ve makroskopik morfolojilerinde çeşitliliğin olduğu belirtilmiştir. Bu besiyerinde açık yeşilden koyu yeşile, zeytin yeşilinden donuk yeşile farklı renkli koloniler görülebilir (Gillot vd., 2015). Koloniler, MEA besiyerinde, yeşil, sarı-turuncu renk oluşturabilir. Koloni dokuları, PDA ve MEA besiyerlerinde kadifemsi-yünlü ve merkezleri bombeli yapı gösterirken, YES besiyerinde damarlı (buruşuk) yapı oluşabilir (Şekil 1). Ayrıca besiyerinde, kolonilerin arka kısımları ise, açık yeşil olmasının yanı sıra krem, sarı, kahverengi veya turuncu renkler gösterebilir. Bazı suşlar, koloni üzerinde, hiyalin damlacıkları şeklinde eksudat denilen bir çeşit sıvı salgılar. Kolonilerin dış çeperinde beyaz yünsü yapılar oluşabilir. Kolonilerin çapları ise, CYA ve MEA besiyerlerinde 14 günde 40-70 mm'ye ulaşır (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014; MycoBank, 2020).

P. roqueforti'nin mikroskopik özelliklerinin incelenmesinde, miselyum ve hif yapılarına bakılır. Birden fazla hücrenin yan yana gelmesiyle oluşturdukları iplikli yapıya hif, hif topluluğuna ise miselyum denir. Bu türü, diğer *Penicillium* türlerinden ayırmak için mikroskop altında hif, hif sapı, konidyofor, konidya, phialide, metula, rami/dal (Şekil 1) farklılıkları değerlendirilir (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014). Ancak, *P. roqueforti* suşlarının mikroskopik yapılarını inceleyerek ayırım yapmak mümkün değildir. Kitinsi sert bir tabakadan oluşan hücre duvarlarının yanı sıra, hif sapları (ince, uzun, saydam yapılar), septalı (bölme) veya septasız (bölmesiz) olabilir. Küfün gelişimi esnasında oksijen yokluğunda oluşmayan yumrular (ornamentation), oksijen varlığında hif sapları (stipe) üzerinde yer alabilir. Konidyoforlar ise;

konidyalar, phialide, metula ve ramiden oluşan hifin baş kısmıdır. Bu kısım, 100-200 μm x 4-6,5 μm boyutlarındadır ve ikili dallanmaya (terverticillate) veya ikiden fazla dallanmaya (quaterverticillate) sahip olabilir (Şekil 1).

Konidya, 4-8 μm çapında ve genellikle küresel şekillidir. Phialide, metula ve rami kısımları silindirdir şekillidir ve sırasıyla, 8-10 μm x 2,53 μm , 10-17 μm x 3-4 μm ve 17-33 μm x 3-4 μm boyutlarındadır (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014).



Şekil 1. Bir *Penicillium roqueforti* suşunun farklı besiyerlerinde, sırasıyla, PDA'da ön-arka (A), MEA'da ön-arka (B), YES'de ön-arka (C) koloni morfolojileri ve mikroskopik hif yapısı (D) (Kırıtıl, 2018; Seri, 2020)

P. ROQUEFORTI'NİN TAKSONOMİSİ VE GENETİĞİ

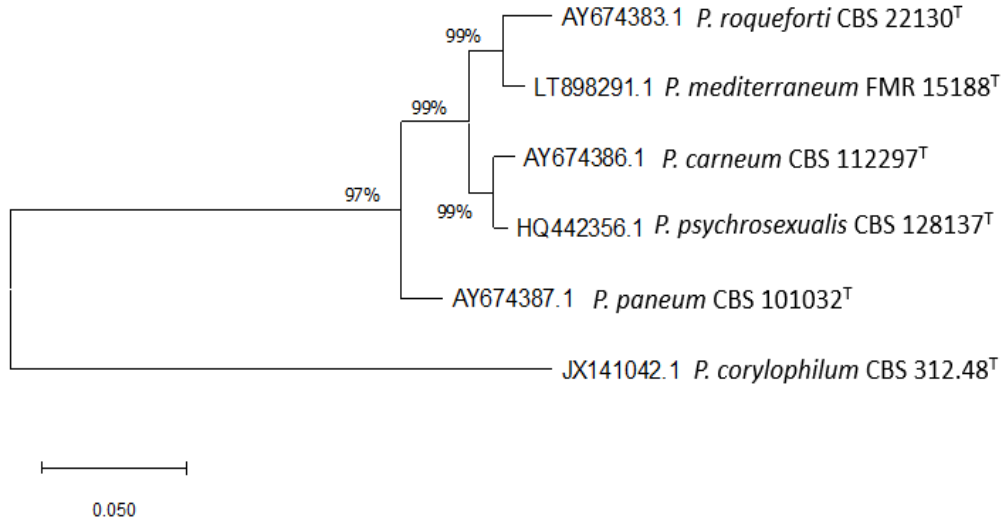
Penicillium roqueforti türü, *Penicillium* cinsinin *Roquefortorum* (*Roqueforti*) serisinde sınıflandırılır. Bu seride filogenetik olarak birbirine yakın türler, *P. roqueforti*, *P. carneum*, *P. paneum*, *P. psychrosexualis* ve *P. mediterraneum* ile yer almaktadır (Houbraken vd., 2010; Guevara-Suarez vd., 2020). Funguslar için genetik tanımlamada kullanılan universal gen bölgelerinden 18S rRNA ve 28S (D1/D2) rRNA, bu türleri tam olarak ayıramamaktadır. Bu türlerin tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında, ITS, β -tubulin (*tub2*, *benA*), calmodulin (*cmdA*) ve RNA polimeraz II geni alt birimi (*rpb2*) gen bölgeleriyle çoklu bölge dizi tiplemesi (MLST) analizi son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır (Houbraken vd., 2010; Houbraken vd., 2016; Guevara-Suarez vd., 2020). Özellikle, *Roquefortorum* serisinin β -tubulin dizilimlerinin polimorfizm gösterdiği bildirilmiştir (Houbraken vd., 2010). *Roquefortorum* serisi

üyelerinin β -tubulin dizilimleri kullanılarak elde edilen filogenetik ağaç, türlerin ayrımını açıkça göstermektedir (Şekil 2). Bu ağaca göre, *P. roqueforti*'ye en yakın türün *P. mediterraneum* olduğu görülmektedir. Otçul hayvan gübrelerinden izole edilmiş olan *P. mediterraneum*, *Roquefortorum* serisine yeni dahil edilmiştir. Bu türün, *P. roqueforti* ile ITS dizilimi aynı iken, *tub2*, *cmdA*, *rpb2* dizilimlerinde farklılıkların olduğu ifade edilmiştir (Guevara-Suarez vd., 2020).

P. roqueforti suşlarının da kendi içinde çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir. Gillot vd. (2015), *P. roqueforti*'nin farklı morfolojilere sahip izolatları arasında 9 değişik morfolojik tipi olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada çeşitli lokuslar polimorfizm açısından incelenmiş; çeşitlilik hakkında bilgi verici 8 lokus (β -*tub*, *cmd*, *cct8*, *tsr1*, *mcm7*, *Proq235*, *Proq631*, *Proq845*) ve 4 mikrosatelit bölgesi (*Proq16*, *Proq17*, *Proq01_3*, *Proq02_2*)

tespit edilmiştir. *P. roqueforti* izolatlarının bu polimorfik bölgeler kullanılarak birbirlerine yakınlıklarına göre gruplara ayrılması sonucunda,

değişik peynir türlerinden elde edilen izolatların değişik gruplara yerleştiği görülmüştür.



Şekil 2. *Roquefortorum* serisinin β -tubulin gen dizilimleri ve Maximum-likelihood metodu kullanılarak elde edilen filogenetik ilişkisi. Kullanılan tip (T) suşlar: *Penicillium roqueforti* CBS 221.30T (AY674383.1), *Penicillium mediterraneum* FMR 15188T (LT898291.1), *Penicillium carneum* CBS 112297T (AY674386.1), *Penicillium psychrosexualis* CBS 128137T (HQ442356.1) ve *Penicillium paneum* CBS 101032T (AY674387.1). Dizilimler Clustal W programı ile hizalanmış ve filogenetik ağaç, Mega X (Versiyon 10.1.1) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

P. roqueforti'nin farklı morfolojilere sahip suşları, daha önce, kullanıldığı peynire özgü, teknolojik olarak *P. glaucum*, *P. gorgonzolae*, *P. stilton* şeklinde isimlendirilmiştir. Ancak, bu isimlendirme taksonomik geçerliliği olmadığı için kullanılmamıştır (Gillot vd., 2015). Son çalışmalarda, yüzyıllar boyunca farklı peynir üretim proseslerinin kullanılmasının *P. roqueforti* popülasyon yapısını şekillendirdiği öne sürülmüştür. Böylece, bu türün evrimleşme sürecine dair ipuçları sunulmuştur (Gibbons ve Rinker, 2015; Gillot vd., 2015; Ropars vd., 2016a; Ropars vd., 2016b; Bodinaku vd., 2019; Dumas vd., 2020). Farklı peynir türlerine ait izolatların kümelenmesiyle, *P. roqueforti* popülasyonunun yabancı ortak bir atadan gelerek nasıl evcilleştirildiğine, peynir ortamına nasıl adapte olduğuna ve genetik farklılıklarına dair ipuçları elde edilmiştir. Fungusların evcilleşmesi ve ortam adaptasyonunun, yatay gen transferi (HGT), tekrarlı indüklenmiş nokta (RIP) mutasyonları,

seçici delesyon, hibridizasyon gibi mekanizmalar ve retrotranspozonlar, hareketli DNA elemanları gibi araçlar ile sağlanmış olabileceği ifade edilmiştir. Bunlar arasında HGT'nin gıda zincirinde farklı örnekleri belirtilmiş olup, adaptasyon sürecinde ön plana çıkmıştır (Cheeseman vd., 2014; Dumas vd., 2020). *P. roqueforti*'nin evcilleşme süreci, özellikle genomuna kazandırdığı yatay gen transfer bölgelerinde (HGT) bulunan, laktoz metabolizması ve antimikrobiyal özellikleri içeren, *CheesyTer* ve *Wallaby* gen bölgeleriyle ilişkilendirilmiştir. Peynirin olgunlaşma sürecinin ilk günlerinde, bu bölgelerdeki genler yüksek oranda ifade edilerek *P. roqueforti* suşlarına, diğer türlere karşı peynir ortamında yarışmacı ve hızlı gelişme özelliklerini kazandırmaktadır (Cheeseman vd., 2014; Ropars vd., 2015; Dumas vd., 2020). Ayrıca bu bölgeler vasıtasıyla *P. roqueforti* peynirin besin kaynaklarını kullanabilme, proteoliz ve lipoliz mekanizmaları, tuzlu ortamda gelişme, peynirin olgunlaşma

sürecinin başında düşük pH değerini tolere etme, peynir oyuklarına kolonizasyon yeteneği gibi özellikler kazanmıştır (Ropars vd., 2012; Monnet vd., 2014). HGT bölgeleri, *P. roqueforti* FM164 suşunun tüm genomunun dizilenmesiyle, bu türde ilk defa tespit edilmiştir (Ropars vd., 2012; Cheeseman vd., 2014; Ropars vd., 2015). *Wallaby* bölgesi, 248 geni barındırdığından ve 575 kb boyutunda olduğundan uzun bir genomik ada olarak tanımlanmıştır. Bu bölgede bulunan *paf* ve *hce2* genlerinin, *P. roqueforti*'nin diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik özellikleri barındıran antifungal proteinleri kodladığı ifade edilmiştir (Cheeseman vd., 2014; Ropars vd., 2015; 2016a). İkinci büyük bölge olan *CheesyTer*'in, 37 gen bulundurduğu ve 80 kb uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Bu bölge, laktoz metabolizmasından sorumlu laktoz permeaz ve β -galaktosidaz mekanizmalarını kodlayan genleri barındırır (Ropars vd., 2015). Ayrıca, HGT bölgelerini bulandıran *P. roqueforti* suşlarının peynir aromasına da önemli katkısı bulunmaktadır. Lipoliz sonucu peynir ortamında lipid degradasyonunun artmasıyla, ketonlar ve uçucu bileşikler açığa çıkmaktadır. Bunlardan en önemlileri, küflü aroma yerine peynirimsi aromaların ortamda oluşmasını sağlayan 2-heptanon, 8-nonen-2-on, 2-tridekanon gibi bileşiklerdir (Bodinaku vd., 2019; Dumas vd., 2020). Gürkan vd. (2018), Erzurum Civil peynirlerinde çoğunlukla ketonlardan ve alkollerden oluşan 65 uçucu bileşik tespit etmiş ve bu bileşiklerden 2-nonanon, 3-metil-2-pentanon, 2-bütanon ve 2-pentanon ön plana çıkmıştır. Ayrıca bu bileşikler ve oranları, peynirin olgunlaşma sıcaklığı ve süresine göre değişmiştir.

P. roqueforti pek çok ekolojik ortamda bulunabilir. Bu türün, Rokfor peyniri ve diğer peynirlerden izole edilen suşlarının yanı sıra, ağaçlık alan, silaj ya da gıda kontaminantı olarak peynir dışı ortamdan izole edilen suşları olarak toplam 4 popülasyonu belirlenmiştir (Gillot vd., 2015; Coton vd., 2020; Dumas vd., 2020) (Çizelge 1). Bu popülasyonlar, koloni yapısı ve rengi, gelişme hızı, sporlanma oranı ve hızı gibi fenotipik farklılıklar göstermektedir. Popülasyon 4, *Wallaby* ve

CheesyTer genlerini bulundurmaktadır. Ayrıca bu popülasyonda, mikofenolik asit üretiminde anahtar gen olan *mpaC*'de 174 bp'lik bir delesyon nedeniyle, bu toksinin üretimi çok düşük düzeyde olmakta ya da yapılamamaktadır (Gillot vd., 2017b; Coton vd., 2020). Rokfor peynirinden izole edilen Popülasyon 3'te, Popülasyon 1 ve Popülasyon 2'de olduğu gibi HGT bölgeleri bulunmamakta ve *mpaC* geni bulunmaktadır. Bu popülasyonun farklı bir kaynaktan gelerek (silaj ortamından vb.) mağara ortamından peynire yerleşmiş olabileceği öne sürülmüştür (Ropars vd., 2017; Dumas vd., 2020).

Son çalışmalar, *P. roqueforti*'nin eşeyli üreme yapabildiğini ortaya koymuştur (Ropars vd., 2014; 2016b). *Ascomycetes*'lerden *P. roqueforti*'nin farklı popülasyonlarının haploid genomlarının *MAT1-1* ya da *MAT1-2* olmak üzere, insandaki X ve Y kromozomlarına benzer şekilde, tek bir eşey tipi lokusu taşıdığı bildirilmiştir (Ropars vd., 2016a). Bu lokus, feromonlar ve feromon reseptörlerinin üretimini indükleyen transkripsiyon faktörlerini kodlar (Lopez-Villavicencio vd., 2010). Ropars vd. (2014), *P. roqueforti* suşlarının biyotin ilave edilmiş Oat Meal Agar (OA)'da eşeyli üreme özelliklerini incelemiştir. Suşların besince zengin ve stabil koşullarda değil de zorlu koşullarda eşeyli üreme yapabildiği bildirilmiştir. Evrimsel süreçte, eşeyli üreme genlerinin *P. roqueforti*'de yüksek oranda korunmuş olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, peynirden izole edilen popülasyonun %91'inin *MAT1-2* eşey tipine sahip olduğu tespit edilmiştir. *MAT1-1* eşey tipi, daha çok diğer *P. roqueforti* popülasyonlarında (%82) tespit edilmiştir (Ropars vd., 2014). Deneysel çalışmalar, eşeyli üremenin eşesiz üremeye göre zararlı mutasyonları azalttığını ortaya koymuştur (Ropars vd., 2012). Eşeyli üremenin biyoteknolojik açıdan da önemi söz konusudur. Peynir üretiminde çeşitliliği sağlayacak farklı fenotiplere sahip yeni genotipler kolaylıkla geliştirilebilir veya rekombine edilebilir. Yeni nesil suşlar, eşleşen atalarının her ikisinden de gen olarak yeni özellikler kazanabilir ve değişken çevre koşullarına dayanıklı hale gelebilir (Ropars vd., 2012; 2014).

Çizelge 1. *P. roqueforti* popülasyonları ve özellikleri (Coton vd., 2020)

Popülasyon Türü	İzolasyon Kaynağı	HGS Bölgeleri		Metabolitler	
		<i>Wallaby</i>	<i>CheesyTer</i>	<i>mpaC</i> Geni	Metabolitler
Popülasyon 1	Ağaçlık alan, Gıda kontaminantı	Yok	Yok	Var	7'den fazla metabolit ve 65'ten fazla uçucu bileşik** üretimi
Popülasyon 2	Silaj, Gıda kontaminantı	Yok	Yok	Var	
Popülasyon 3	Rokfor peyniri	Yok	Yok	Var	
Popülasyon 4	Diğer peynirler	Var	Var	Delesyon*	

**mpaC* geni delesyona uğradığından mikofenolik asit üretimi çok düşük/yok düzeyde.

**Popülasyon 3'teki suşlar, uçucu bileşik çeşitliliğine sahipken; Popülasyon 4, düşük çeşitliliğe sahip.

Son çalışmalar, *P. roqueforti*'nin eşeyli üreme yapabildiğini ortaya koymuştur (Ropars vd., 2014; 2016b). *Ascomycetes*'lerden *P. roqueforti*'nin farklı popülasyonlarının haploid genomlarının *MAT1-1* ya da *MAT1-2* olmak üzere, insandaki X ve Y kromozomlarına benzer şekilde, tek bir eşey tipi lokusu taşıdığı bildirilmiştir (Ropars vd., 2016a). Bu lokus, feromonlar ve feromon reseptörlerinin üretimini indükleyen transkripsiyon faktörlerini kodlar (Lopez-Villavicencio vd., 2010). Ropars vd. (2014), *P. roqueforti* suşlarının biyotin ilave edilmiş Oat Meal Agar (OA)'da eşeyli üreme özelliklerini incelemiştir. Suşların besince zengin ve stabil koşullarda değil de zorlu koşullarda eşeyli üreme yapabildiği bildirilmiştir. Evrimsel süreçte, eşeyli üreme genlerinin *P. roqueforti*'de yüksek oranda korunmuş olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, peynirden izole edilen popülasyonun %91'inin *MAT1-2* eşey tipine sahip olduğu tespit edilmiştir. *MAT1-1* eşey tipi, daha çok diğer *P. roqueforti* popülasyonlarında (%82) tespit edilmiştir (Ropars vd., 2014). Deneysel çalışmalar, eşeyli üremenin eşeysiz üremeye göre zararlı mutasyonları azalttığını ortaya koymaktadır (Ropars vd., 2012). Eşeyli üremenin biyoteknolojik açıdan da önemi söz konusudur. Peynir üretiminde çeşitliliği sağlayacak farklı fenotiplere sahip yeni genotipler kolaylıkla geliştirilebilir veya rekombine edilebilir. Yeni nesil suşlar, eşleşen atalarının her ikisinden de gen alarak yeni özellikler kazanabilir ve değişken çevre koşullarına dayanıklı hale gelebilir (Ropars vd., 2012; 2014).

***P. ROQUEFORTI*'NİN FİZYOLOJİSİ VE METABOLİZMASI**

P. roqueforti'nin optimum inkübasyon şartları, aerobik ortam ve 25°C'de 5-7 gündür. Ayrıca,

propiyonik aside, asetik aside, laktik aside, yüksek konsantrasyonda CO₂'ye ve %5'e kadar NaCl'ye tolerans göstermektedir. Ayrıca, peynirin olgunlaşması sırasında, depo koşullarındaki (10-12°C) sıcaklıklarda gelişebilir ve daha düşük sıcaklıklara da dayanıklıdır (Frisvad ve Samson, 2004; Visagie vd., 2014; Gillot vd., 2015). Bu tür, peynirdeki metabolik süreçler sonucu primer ve sekonder metabolitler üretebilir. Primer metabolitler, yaşamsal faaliyetler sonucu oluşan temel metabolizma ürünleridir. Peynirden izole edilen pek çok *P. roqueforti* suşu, karbonhidrat metabolizmasında laktoz permeaz ve β-galaktosidaz enzimlerini bulundurduğundan laktozu kullanabilir (Ropars vd., 2015). Proteolitik ve lipolitik aktiviteler sonucu bazı biyoaktif peptidler ve uçucu aromatik bileşikler (2-heptanon, 8-nonen-2-on, 2-tridekanon vb.) üretebilir. *P. roqueforti*, melanin biyosentezi gen kümesini bulundurduğundan mavi-damarlı, küfle olgunlaştırılan peynirlere has mavi-yeşil renkleri oluşturan pigmentleri üretir. Bu pigmentlerin spor yüzeyini kaplayan melanini oluşturduğu bildirilmiştir (Cleere, 2017; Bodinaku vd., 2019; Coton vd., 2020). Daha önce *Aspergillus fumigatus*'ta bulunan DHN-melanin biyosentez yolu, *P. roqueforti*'de de tespit edilmiştir. DHN-melanin biyosentezi gen kümesi, 6 gen içerir ve 19 kb büyüklüğündedir. Bu gen kümesinde bulunan genlerin UV mutajenez yöntemi kullanılarak kahverengi, pembe, yeşil, koyu mavi, beyaz renkli sporlar üretilebildiği ifade edilmiştir. Böylece, mutant sporlar kullanılarak değişik renkte peynirler üretilebilir ve peynir endüstrisine ilgi çekici bir pazarlama stratejisi olarak sunulabilir (Cleere, 2017).

Sekonder metabolitler, genellikle yaşamsal faaliyetleri sürdürmek için gerekli olmayan, mikotoksinleri ve bazı biyoaktif bileşikleri içerirler. Bazıları tıbbi uygulamalarda ve farmakolojide kullanılırken, bazıları da insan sağlığına zararlıdır. Mikotoksinler, sağlık problemlerine (kanserojen, teratojen, mutajen etkiler vb.) neden olmalarının yanı sıra ekonomik zararlara da yol açabilirler (Şengün vd., 2008; Hymery vd., 2014). Sekonder metabolitler genel olarak, yapı bloklarından; özellikle terpen sentaz, poliketid sentaz, ribozomal sentaz ve ribozomal olmayan peptid sentaz enzim gruplarının aktiviteleriyle sentezlenir. Biyosentezi sağlayan enzimleri kodlayan genler, bir gen kümesinde birbirine bağlı olarak bulunur (Brown vd., 2011). Son yıllarda, *P. roqueforti*'nin sekonder metabolitlerinin gen kümeleri ve fonksiyonları belirlenmiştir. Bu metabolitler arasında rokfortin C, mikofenolik asit, PR toksin, izofumigaklavin gibi bileşikler mikotoksin olarak değerlendirilirken, andrastin A biyoaktif bir bileşik olarak ön plana çıkmaktadır (Hymery vd., 2014; Garcia-Estrada ve Martin, 2016). Rokfortin C, Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyal aktiviteye sahiptir. Ayrıca, bu mikotoksinin düşük seviyede de olsa nörotoksik ve sitotoksik etkileri bildirilmiştir (Kosalkova vd., 2015; Garcia-Estrada ve Martin, 2016). Mikofenolik asit, böbrek, karaciğer, kalp nakli yapılan hastalarda organ reddini önlemek için kullanılan immünosupresif bir bileşik olarak ilaçların formülasyonlarında kullanılır (Del-Cid vd., 2016; Gillot vd., 2017b). Andrastin A ise, antitümör ve antikarsinojen etkileri tespit edilmiş biyoaktif bir bileşiktir ve *P. roqueforti* tarafından peynir ortamında üretimi saptanmıştır (Fernandez-Bodega vd., 2009).

Mikotoksin üretiminde biyotik faktörlerin yanı sıra pH, sıcaklık, NaCl ve O₂ içeriği, C/N oranı gibi abiyotik faktörlerin de önemli olduğu bilinmektedir (Fontaine vd., 2015). Ayrıca, çevresel faktörlerin yanı sıra substrat yapısı da önemlidir. Her gıda maddesinde benzer şekilde ortaya çıkmamaktadır. *P. roqueforti*'nin bazı suşları peynirde PR toksin, rokfortin, mikofenolik asit, isofumigaklavin üretebilir. Ancak, peynirin aminoasit kompozisyonu ve mikroaerofilik

koşullar nedeniyle, PR toksin peynirde kararlı değildir ve peynir ortamında toksisitesi daha düşük olan PR imine indirgenir (Hymery vd., 2014; Perrone ve Susca, 2017). Mikotoksin üretimi daha çok Çizelge 1'deki ağaçlık alan, silaj gibi izolasyon kaynakları olan ve gıdalarda bozulmaya yol açan Popülasyon 1 ve Popülasyon 2 ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca bulgular, *P. roqueforti*'nin evrimsel süreçte peynire adaptasyonunda bazı sekonder metabolitlerinin üretimini azalttığını göstermektedir. Örneğin, Çizelge 1'deki Popülasyon 4'teki suşlar mikofenolik asit üretiminde anahtar gen olan *mpaC*'de 174 bp'lik bir delesyon bulduğundan, bu toksinin üretimi çok düşük düzeydedir ya da yapılamamaktadır (Gillot vd., 2017b; Coton vd., 2020). Bu popülasyondaki *Wallaby* ve *CheesyTer* HGT bölgelerine sahip suşlar peynirde gelişerek, diğer mikotoksijenik türlerin gelişmesini baskılayabilir. Ayrıca, *Roquefortorum* serisine ait diğer türlerden *P. paneum*, *P. carneum* ve *P. psychrosexualis*'in patulin üretimi söz konusudur (Hymery vd., 2014; Perrone ve Susca, 2017). *P. mediterraneum*'in ikincil metabolitleriyle ilgili bir bilgi literatürde henüz yer almamaktadır.

BİYOTEKNOLOJİK POTANSİYEL VE STARTER KÜLTÜR OLARAK *P. ROQUEFORTI*'NİN KULLANIMI

P. roqueforti, sekonder starter kültür olarak mavi-damarlı ve diğer küflü peynirlerin olgunlaştırılmasında kullanılır. Bu kültür, liyofilize sporlar formunda süt içine katılır veya peynir pıhtısı üzerine spor solüsyonu halinde püskürtülerek bulaştırılır. Ticari starter kullanılmayan, geleneksel yöntemlerle üretimlerde ise ortamdan bulaşarak peynirde spontan olarak gelişebilir. Böylece olgunlaşma süreci sonunda küflü peynirlere has tat, koku ve aroma oluşur (Fox vd., 2016b; Metin, 2018).

Peynir endüstrisinde, *P. roqueforti* sporları klonal suştan geliştirilir ve böylece suşlar eşeysiz üreme ile çoğaltılır. *P. roqueforti*'nin biyoteknolojik izolatları arasında, bir türün tek klonunu temsil ettiğinden genomlarında herhangi bir polimorfizm bulunmaz. Bu nedenle yeni suş geliştirilmesi, çoğunlukla rastgele mutasyona bağlıdır. Eşeyli üreme ile aynı atadan gelen farklı

bireyler, yeni nesil suşlarda genetik çeşitliliği, rekombinasyonu sağlar ve zararlı mutasyonlar genomdan temizlenebilir (Giraud vd., 2010; Ropars vd., 2012; 2014). Eşeyli üreme, endüstriyel suşların geliştirilmesinde kullanılacak kolay bir yöntemdir (Böhm vd., 2013). Bu yöntemle geliştirilen suşlara istenen özellikler kazandırılabilir ve yeni çeşit peynirler üretilebilir. Ayrıca, evcilleşen popülasyonun peynir üretimi prosesinde stabil kalması sağlanabilir ve güvenilir, yüksek kalitede peynir üretimi yapılabilir (Bodinaku vd., 2019). Geleneksel peynirlerin kendilerine has dokusu da korunabilir.

Yatay gen transferi ile hareketli DNA elemanlarının ökaryotik genomlara girişi, temel genomik çeşitlilik ve biyoteknolojik inovasyon için önemli bir itici güç olmuştur. Evrimsel süreçte, genetik modifikasyonun organizmaların sadece atalarına değil ekolojilerine de bağlı olduğu tespit edilmiş ama tüm mekanizmalar henüz açıklanamamıştır (Schaack vd., 2010). *P. roqueforti*'nin evrimsel sürecinin ve peynir ortamına adaptasyon mekanizmalarının aydınlatılması ile HGT genleri gibi birçok aday alternatif genin tanımlanması sağlanabilir. Böylelikle, peynir üretimi için ilginç özellikler seçilerek yeni nesil starterler üretilebilir (Dumas vd., 2020).

P. roqueforti, katma değeri yüksek molekülleri üretebildiği için multifonksiyonel hücre fabrikası olarak nitelendirilmiştir (Mioso vd., 2015). Proteolitik-lipolitik aktiviteleri nedeniyle enzimatik potansiyeli bilinmektedir. Ayrıca, medikal uygulamalar için metabolit üretiminde, gıda uygulamaları için aroma üretiminde ve biyoremediasyon ajanı olarak kullanılabilir (Coton vd., 2020).

PEYNİRİN OLGUNLAŞMA SÜRECİNDE *P. ROQUEFORTI*'NİN ROLÜ

Peynirlerde sekonder starter olarak kullanılan *P. roqueforti*, peynirin olgunlaşma sürecinde bakterilerle ve mayalarla etkileşim halindedir. Starter kültür olarak özellikle laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.) yanı sıra peynir çeşidine ve üretim metoduna göre *Brevibacterium linens*, *Propionibacterium* spp. gibi bakteriler ve *Debaryomyces* spp., *Kluyveromyces* spp.,

diğer *Penicillium* spp., *Geotrichum candidum* gibi fungal türler ortamda bulunabilir (Anonim, 2015; Fox vd., 2016c; Metin, 2018). Ancak, özellikle Çizelge 1'de verilen Popülasyon 4'e dahil olan suşlar, HGT genleri bulundurduğundan diğer fungal türlerin peynir ortamında gelişimini baskılayabilir. Avrupa tipi mavi-damarlı peynirlerde ve ülkemizde üretilen Erzurum Küflü Civil, Konya Küflü, Divle Obruk Tulum gibi peynirlerde yapılan çalışmalarda *P. roqueforti*, peynir mikrobiyotasında dominant tür olarak tespit edilmiştir (Çakmakçı vd., 2012; Öztürkoğlu Budak, 2016; Kırtıl, 2018; Seri, 2020).

P. roqueforti başta olmak üzere, küflerin metabolik aktiviteleri sonucu farklı aroma maddeleri ve metabolitler oluşmaktadır. Ayrıca küfler, peynir tekstüründe önemli değişikliklere neden olmaktadır. Olgunlaşma sürecinde, küflerin neden olduğu biyokimyasal reaksiyonlar sonucu, küflü peynirlere has koku, aroma ve tat oluşur. Bu reaksiyonlar temel olarak, deasidifikasyon, proteolitik ve lipolitik aktiviteler olarak sınıflandırılabilir (Fox vd., 2016d). Ayrıca, peynirde mavi-yeşil rengi sağlayan küf pigmentleri üretimi ve sekonder metabolit üretimi de gerçekleşir (Cleere, 2017; Coton vd., 2020).

Deasidifikasyon sonucu *P. roqueforti*, laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asidi karbon kaynağı olarak kullanır. Pıhtı asitliğini nötralize ederek ortam pH'sını 4,5'tan 7'ye doğru yükseltir. Bu tür ayrıca, endopeptidaz ve ekzopeptidaz aktivitesine sahip olduğundan kazeini hidrolize edebilir. Böylece peynir matriksinde serbest aminoasitler oluşur. Serbest aminoasitler, amonyak ve uçucu bileşiklere parçalanarak olgunlaşmayı hızlandırır. Lipolitik aktiviteler sonucu ise, küflü peynirlerin karakteristik aroması oluşur. Serbest yağ asitlerinden metil ketonlar ve onların sekonder alkollerini meydana gelir (Fox vd., 2016d; Martin ve Coton, 2017; Bodinaku vd., 2019).

SONUÇ

Mavi-damarlı peynirler gibi küflü peynirlerin olgunlaştırılmasında sekonder starter olarak kullanılan *P. roqueforti*, son yıllarda gıda kaynaklı küfler arasında en çok incelenen tür olarak ön plana çıkmaktadır. Küflü peynirlere has tat, aroma

ve kokuyu oluşturan bu türün incelenmesi, gıda sanayi açısından oldukça önemlidir. *P. roqueforti*'nin evcilleşme ve adaptasyon süreci üzerine son çalışmalar, bu türün popülasyonlarını ve özelliklerini belirleyerek filogenetik pozisyonunu yeniden şekillendirmiştir. *P. roqueforti*'nin evcilleşme sürecinin araştırılmasıyla ve henüz bilinmeyen sekonder metabolit gen kümelerinin tespit edilmesiyle, bu türün fizyolojisi ve metabolizması daha iyi anlaşılabilir. Bu türün popülasyonlarının tüm genomlarının dizilenmesi, metabolik potansiyeli ve regülasyonu için yeni ipuçları sunacaktır. Bu derlemede, peynir küfü olarak *P. roqueforti*'nin morfolojisi, genetik özellikleri, taksonomisi, fizyolojisi ve metabolitleri, peynirin olgunlaşma rolü incelenerek özetlenmiş, peynir ortamına adaptasyon ve evcilleşme süreci ile ilgili elde edilen yeni bulgular değerlendirilmiştir. Ayrıca, *P. roqueforti*'nin eşeyli üreme kabiliyetine de değinilmiştir. Eşeyli üreme ile farklı bireylerin özelliklerinin rekombinasyonu ile farklı fenotiplere sahip yeni nesiller geliştirilebilir. Bu durum, starter kültür geliştirilmesi açısından biyoteknolojik önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 119O314 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu makale ile ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında bir çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKILARI

HEK ve BM derleme çalışmasını planlamış, HEK makale taslağını hazırlamış, BM ve MA inceleme ve düzenleme aşamalarında katkı sağlamışlardır. Tüm yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamışlardır.

KAYNAKLAR

Anonim, (2015). “*Geotrichum candidum*”, <http://microbialfoods.org/geotrichum-candidum-mold-transition/> , Son Erişim tarihi: 14.07.2020

Bodinaku, I., Shaffer, J., Connors, A.B., Steenwyk, J.L., Biango-Daniels, M.N., Kastman, E.K., Rokas, A., Robbat, A., Wolfe, B.E. (2019).

Rapid phenotypic and metabolomic domestication of wild *penicillium* molds on cheese. *ASM MBio*, 10(5): e02445-19. <https://doi.org/10.1101/647172>

Böhm, J., Hoff, B., O’Gorman, C.M., Wolfers, S., Klix, V., Binger, D., et al. (2013). Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(4): 1476–1481. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217943110>

Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Proctor, R.H., (2011). *Identification of genes and gene clusters involved in mycotoxin synthesis*. Ed.: De Saeger, S., Woodhead Publishing, 2nd edition, Cambridge, UK, 333-348 p.

Cleere, M., (2017). Pigment Biosynthesis Genes in the Blue Cheese Fungus *Penicillium roqueforti*, PhD thesis, University of Nottingham, Nottingham, UK, 93 p.

Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Abraham, A.L., Ceppi, M., Conseiller, E., Debuchy, R., Malagnac, F., Goarin, A., Silar, P., Lacoste, S., Sallet, E., Bensimon, A., Giraud, T., Brygoo, Y., (2014). Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nature Communications*, 5: 2876. <https://doi.org/10.1038/ncomms3876>

Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Mounier, J., Jany, J.J., (2020). *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biol Rev*, 34(2): 59-73. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>

Çakmakçı, S., (2011). Türkiye Peynirleri. *Peynir Biliminin Temelleri*, Ed.: Hayaloğlu, A.A. ve Özer, B., 1.Baskı, Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir.

Çakmakçı, S., Çetin, B., Gürses, M., Dağdemir, E., Hayaloğlu, A.A., (2012). Morphological, molecular and mycotoxigenic identification of dominant filamentous fungi from Moldy Civil Cheese. *J Food Prot*, 75 (11): 2045-2049. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-107>

- Del-Cid, A., Gil-Duran, C., Vaca, I., Rojas-Aedo, J.F., Garcia-Rico, R.O., Levican, G., Chavez, R., (2016). Identification and functional analysis of the mycophenolic acid gene cluster of *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*, 11(1): e0147047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147047>
- Dumas, E., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R.C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T. (2020). Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Molecular Ecology*, 00: 1– 22. <https://doi.org/10.1101/451773>
- Fernandez-Bodega, M.A., Mauriz, E., Gomez, A., 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. *Int J of Food Microbiol*, 136(1): 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.014>
- Frisvad, C.F., Samson, R.A., (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud Mycol*, 49: 1-174.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., (2016a). Principal families of cheeses: Blue veined cheeses (Chapter 3). In: *Fundamentals of Cheese Science*, 2nd edition, Springer, New York, pp. 54-57.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., (2016b). Cheese Flavour (Chapter 13). In: *Fundamentals of Cheese Science*, 2nd edition, Springer, New York, pp. 443-472.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., (2016c). Microbiology of Cheese Ripening (Chapter 11). In: *Fundamentals of Cheese Science*, 2nd edition, Springer, New York, pp. 333-351.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., (2016d). Biochemistry of Cheese Ripening (Chapter 12). In: *Fundamentals of Cheese Science*, 2nd edition, Springer, New York, pp. 391-439.
- Fontaine, K., Hymery, N., Lacroix, M.Z., Puel, S., Puel, O., Rigalma, K., Gaydou, V., Coton, E., Mounier, J., (2015). Influence of intraspecific variability and abiotic factors mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *Int J of Food Microbiol*, 215: 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.021>
- Garcia-Estrada, C., Martin, J.F., (2016). Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100: 8303-8313. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7788-x>
- Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Holzapfel, W.H., Jakobsen, M., (2001). Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int J of Food Microbiol*, 65(3): 183-191. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00514-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00514-6)
- Gibbons, J.G., Rinker, D.C., (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr Opin Genet Dev*, 35: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.07.003>
- Gillot, G., Jany, J.L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., Lopez- Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., Coton, E., (2015). Insights into *Penicillium roqueforti*: Morphological and genetic diversity. *PLoS One*, 10(6): e0129849 (1-21). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129849>
- Gillot, G., Jany, J.C., Poirier, E., Maillard, M.B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E., Coton, M., (2017a). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *Int J of Food Microbiol*, 241: 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001>
- Gillot, G., Jany, J.L., Dominguez-Santos, R., Poirier, E., Debaets, S., Hidalgo, P.I., Ullan, R.V., Coton, E., Coton, M. (2017b). Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. *Food Microbiol*, 62: 239-250. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.013>

- Giraud, F., Giraud, T., Aguilera, G., Fournier, E., Samson, R., Cruaud, C., Dupont, J. (2010). Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *Int J of Food Microbiol*, 137 (2-3): 204-213. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.014>
- Guevara-Suarez, M., García, D., Cano-Lira, J.F., Guarro, J., Gené, J. (2020). Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium-like fungi in *Aspergillaceae*. *Fungal Syst Evol*, 5: 39-75. <https://doi.org/10.3114/fuse.2020.05.03>
- Gürkan, H., Yılmaztekin, M., Çakmakçı, S., Hayaloğlu, A., (2018). Volatile compounds and biogenic amines during the ripening of mold-ripened Civil cheese manufactured using three different strains of *Penicillium roqueforti*. *J Food Saf*, 38e12568. <https://doi.org/10.1111/jfs.12568>
- Houbraken, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., (2010). Sex in *Penicillium* series *Roqueforti*. *IMA Fungus*, 1(2): 171-180. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2010.01.02.10>
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G., Coton, E., (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 13(4): 437-456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>
- Kırtıl, H.E. (2018). Küflü peynirlerden izole edilen küflerin moleküler tanımlanması ve karakterizasyonu. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, İstanbul, 131 s.
- Kosalkova, K., Dominguez-Santos, R., Coton, M., Coton, E., Garcia-Estrada, C., Liras, P., Martin, J.F., (2015). A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrins in three different *Penicillium roqueforti* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 7601-7612. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6676-0>
- López-Villavicencio, M., Aguilera, G., Giraud, T., de Vienne, D.M., Lacoste, S., Couloux, A., Dupont, J. (2010). Sex in *Penicillium*: Combined phylogenetic and experimental approaches, *Fungal Genet Biol*, 47(8): 693-706. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.002>
- Martin, J.F. and Coton M., (2017). Blue Cheese: Microbiota and Fungal Metabolites. In: *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, Ed.: Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Penas, E., 1.Baskı, Academic Press.
- Metin, B., (2018). Filamentous Fungi in Cheese Production. In: *Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology*, Ed.: Öztürkoğlu Budak, Ş., Akal, H.C. 1st edition, IGI Global.
- Mioso, R., Toledo Marante, F., Herrera Bravo de Laguna, I., (2015). *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. *J Appl Microbiol*, 118: 781e791. <https://doi.org/10.1111/jam.12706>
- Monnet, C., Landaud, S. Bonnarne, P., Swennen, D. (2014). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol Lett*, 362: 1-9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu025>
- Mycobank, (2020). Taxa descriptions: *Penicillium roqueforti* Thom, <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=15208&Fields=All>, Son Erişim Tarihi: 3.07.2020
- Öztürkoğlu Budak, S., Figge, M.R., Houbraken, J., Vries, R.P. (2016). The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. *Int Dairy J*, 58: 50-53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.09.011>
- Petyaev, I.M., Bashmakov, Y.K., 2012. Could cheese be the missing piece in the French paradox puzzle?. *Med Hypotheses*, 79, 746-749. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.08.018>
- Perrone, G., Susca, A., (2017). *Penicillium* species and their associated mycotoxins. In: *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*. Ed.: Moretti, A. ve Susca, A., Humana Press Springer Protocols, 1st edition, New York.
- Renaud, S., de Lorgeril, M., (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339: 1523-1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-f)

- Ropars, J., Dupont, J., Fontanillas, E., Rodriguez de la Vega, R.C., Malagnac, F., Coton, M., Giraud, T., Lopez-Villavicencio, M., (2012). Sex in cheese: evidence for sexuality in the fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*, 7(11): 7e49665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049665>
- Ropars, J., Lopez-Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., Jany, J.-L., Coton, E., Giraud, T., (2014). Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evol Appl*, 7(4): 433-441. <https://doi.org/10.1111/eva.12140>
- Ropars, J., de la Vega, R.C.R., Lopez-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, E., Dumas, E., Lacoste, S., Debuchy, R., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., (2015). Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Curr Biol*, 25(19): 2562-2569. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.025>
- Ropars, J., De la Vega, R.R., Villavicencio, M.L., Branca, A. (2016a). Diversity and mechanisms of genomic adaptation in *Penicillium*. In: *Aspergillus and Penicillium in the Post-Genomic Era*, Ed.; DeVries, R.G., Andersen, M.R., Caister Academic Press: Lyngby, Denmark, pp. 27–42.
- Ropars, J., Lo, Y.-C., Dumas, E., Snirc, A., Begerow, D., Rollnik, T., Lacoste, S., Dupont, J., Giraud, T., Lopez-Villavicencio, M., (2016b). Fertility depression among cheese-making *Penicillium roqueforti* strains suggests degeneration during domestication. *Evolution*, 70: 2099e2109. <https://doi.org/10.1111/evo.13015>
- Ropars, J., Lopez-Villavicencio, M., Snirc, A., Lacoste, S., Giraud, T., (2017). Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*, 12(3): e0171387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171387>
- Schaack, S., Gilbert, C., Feschotte, C. (2010). Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. *Trends Ecol Evol*, 25(9): 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.06.001>
- Seri, M. (2020). Konya küflü peynirinden izole edilen küflerin moleküler identifikasyonu ve *Penicillium roqueforti* izolatlarının morfolojik karakterizasyonu. İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, İstanbul, 102 s.
- Şengün, I.Y., Yaman, D.B., Gönül, S.A., (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin J.*, 1(3): 291-298. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.x041>
- Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A., (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol*, 78: 343-371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Yalman, M., Tepeli, S.Ö., Demirel Zorba, N.N. (2016). Türkiye’de geleneksel yöntemlerle üretilen peynirlerin küf florası. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4(11): 926-933.